

大黄及其醇提液 HPLC 特征图谱相关性研究

张子龙¹, 魏刚¹, 刘东辉¹, 黄月纯^{2*}, 杨丽娥¹, 段园园²

(1. 广州中医药大学, 广州 5104051; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] 目的: 建立大黄 HPLC 特征图谱分析方法, 研究大黄与其醇提液 HPLC 特征图谱的相关性, 评价大黄醇提工艺。方法: 采用 Zorbax SB-Aq C₁₈ 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1% 的磷酸溶液 (梯度洗脱); 检测波长 430, 280 nm, 柱温为 40 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 大黄及其醇提液在 430 nm 波长条件下均标示出 14 个蒽醌类共有峰, 其中鉴别了 5 个游离蒽醌类成分, 10 批大黄及其醇提液中有 8 批样品相似度分别 >0.96 及 0.95, 2 批样品差异较大, 相似度 <0.90; 在 280 nm 波长条件下标示出 10 个共有峰, 其中鉴别了 2 个特征成分, 10 批大黄及其醇提液中有 8 批样品相似度 >0.94 及 0.92, 2 批相似度低于 0.90。同批次大黄及其醇提液在 430, 280 nm 波长处的相似度分别为 0.992~0.999, 0.987~0.999, 表明大黄的常规醇提工艺能保留大黄饮片的主要特征成分。结论: 方法准确可靠, 重复性好, 为大黄饮片及其醇提液的质量控制提供方法依据, 并为大黄复方制剂的工艺与质量控制提供了参考。

[关键词] 大黄; 醇提液; 特征图谱; 相关性; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0069-05

Analysis on Correlation of HPLC Specific Chromatogram of Rhei Radix Et Rhizoma and its Ethanol Extract

ZHANG Zi-long¹, WEI Gang¹, LIU Dong-hui¹, HUANG Yue-chun^{2*}, YANG Li-e¹, DUAN Yuan-yuan¹

(1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the method of specific chromatogram analysis of Rhei Radix Et Rhizoma by HPLC, and to study the correlation between Rhei Radix Et Rhizoma and its ethanol extract and to estimate the alcohol extracting technology. **Method:** HPLC was used with the Zorbax SB-Aq C₁₈ column, the acetonitrile-phosphoric acid solution ($\varphi = 0.1\%$) (gradient elution) was employed as a mobile phase, detection wavelength was at 430 nm and 280 nm, column temperature was set at 40 °C, and flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Fourteen common peaks were separated in the decoction pieces and its ethanol extract of Rhei Radix Et Rhizoma and 5 peaks were identified in 430 nm, the similarities of 8 batches of the decoction pieces and ethanol extract were over 0.96 and 0.95, the similarities of the other 2 batches were below 0.90. 10 common peaks were separated in the decoction pieces and its ethanol extract and 2 peaks were identified in 280 nm, the similarities of 8 batches of the decoction pieces and ethanol extract were over 0.94 and 0.92, the similarities of the other 2 batches were below 0.90. The similarities between the decoction pieces and its ethanol extract were 0.992-0.999 in 430 nm and 0.987-0.999 in 280 nm, which respectively indicates that the traditional alcohol extracting technology of Rhei Radix Et Rhizoma can reserve the main characteristic component. **Conclusion:** The method is reliable, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of the decoction pieces and ethanol extract of

[收稿日期] 2012111015(007)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B074); 广东高校科技成果转化重大项目(cgzhd1009); 广东省产学研结合项目(2011B090400319)

[第一作者] 张子龙, 硕士, 在读研究生, Tel: 020-36591724, E-mail: zzl1986long@163.com

[通讯作者] * 黄月纯, 硕士生导师, 主任中药师, 从事中药新药研究与指纹图谱分析工作, Tel: 020-36591724, E-mail: huangyuechun@163.com

Rhei Radix Et Rhizoma as well as for compound preparation containing Rhei Radix Et Rhizoma.

[Key words] Rhei Radix Et Rhizoma; ethanol extract; specific chromatogram; correlation; HPLC

大黄为蓼科多年生草本植物掌叶大黄、唐古特大黄或药用大黄的干燥根及根茎。本品味苦、性寒,具有攻积滞、导湿热、泻火、凉血、祛瘀、解毒等功效^[1]。大黄主要含有蒽醌类及其衍生物、双蒽酮及其苷类、没食子酸酯、色原酮及其苷类、鞣质类、苯基丁酮类等^[2]。蒽醌类以两种形式存在,大部分与葡萄糖结合成蒽苷,少部分游离形式的苷元如大黄酸(rhein)、大黄酚(chrysophanol)、大黄素(emodin)、芦荟大黄素(aloe-emodin)和大黄素甲醚(physcione)。大黄的泻下成分主要是结合型的蒽醌苷和二蒽酮苷,以二蒽酮苷中的番泻苷 A, B, C, D, E, F (sennoside A, B, C, D, E, F) 泻下作用最强^[1]。游离蒽醌是抗菌消炎的主要有效成分,鞣质(没食子酸)多与收敛、止血作用有关^[3]。文献报道^[4],对大黄系统化学成分研究和对生、熟大黄饮片中 16 种化学成分进行含量测定分析,除苯丁酮及其苷类成分无明显变化外,其余成分的变化均较显著;与生大黄相比,熟大黄中蒽醌苷元类成分含量增加了约 1 倍,而其苷类成分的含量则降低了约 1 倍,其中大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷已完全消失;生大黄中儿茶素的含量较高,但炮制为熟片后该成分完全破坏,而没食子酸的含量则增加了 2.4 倍。生大黄泻下成分蒽醌苷类在高温短时(8 min)即可达到较高的溶出,但高温提取超过 10 min 其蒽醌苷类成分的含量会显著降低,从而影响其泻下作用;而 60 °C 温浸服用时,温浸时间以 50 min 最佳^[5]。因此,临床上生大黄入煎剂后下或温水冲泡服用。

大黄提取工艺研究已有较多文献报道,多以蒽醌类成分含量为指标进行研究,研究表明不同体积分数的乙醇溶液提取效果基本优于水提效果,因此,制剂生产中大黄多采用醇提工艺^[6-9]。醇提采用的溶媒有 70% 乙醇^[6]、75% 乙醇^[7]、80% 乙醇^[8]、95% 乙醇^[9]等。从节约提取溶剂、提高中药饮片的利用率等考虑,选择 75% 乙醇溶液作为大黄的提取溶媒较优^[7]。目前,对于大黄药材特征图谱研究已有文献报道^[10-13],但未见采用特征图谱评价大黄醇提工艺的文献报道。因此,本文根据大黄所含成分类型的差异,优化大黄 HPLC 特征图谱分析方法,采用 430, 280 nm 两种检测波长分别对大黄蒽醌类与其他类成分进行特征图谱分析,并分析大黄饮片及其醇提液特征图谱的相关性,评价醇提工艺,为大黄饮

片的质量评价及含大黄复方制剂的工艺、质量研究提供一定的参考依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(美国 Agilent, HP-1200), 光二极管阵列检测器(美国 Agilent); 大黄饮片分别购自广州致信中药饮片有限公司等几家药材公司, 经广州中医药大学第一附属医院黄月纯主任中药师鉴定系大黄系蓼科多年生草本植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎; 芦荟大黄素(批号 110795-200806)、大黄酸(批号 110757-200206)、大黄素(批号 0756-9908)、大黄酚(批号 110796-200716)、大黄素甲醚(批号 110758-200610)、没食子酸(批号 110831-200302)、儿茶素(批号 110877-200001)等对照品, 均购自中国药品生物制品检定所; 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Zorbax SB-Aq C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 的磷酸溶液, 梯度洗脱(0 ~ 5 min, 2% 乙腈; 5 ~ 10 min, 2% ~ 10% 乙腈; 10 ~ 30 min, 10% ~ 20% 乙腈; 30 ~ 40 min, 20% ~ 30% 乙腈; 40 ~ 55 min, 30% ~ 40% 乙腈; 55 ~ 60 min, 40% ~ 50% 乙腈; 60 ~ 70 min, 50% ~ 60% 乙腈; 60 ~ 70 min, 50% ~ 60% 乙腈; 70 ~ 75 min, 60% ~ 70% 乙腈; 75 ~ 80 min, 70% ~ 2% 乙腈, 检测波长为 430, 280 nm, 柱温为 40 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液①的制备 精密称取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量, 加甲醇溶解配制成每 1 mL 含芦荟大黄素 14.4 μg、大黄酸 16.7 μg、大黄素 16.0 μg、大黄酚 15.0 μg、大黄素甲醚 16.3 μg 的混合对照品溶液①。

2.2.2 混合对照品溶液②的制备 精密称取没食子酸、儿茶素适量, 加甲醇溶解配制成每 1 mL 含没食子酸 0.154 8 mg、儿茶素 0.205 0 mg 的混合对照品溶液②。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 大黄供试品溶液的制备 称取大黄饮片粉末(过四号筛)0.4 g, 精密称定, 精密加入甲醇 50 mL, 浸泡 15 min, 超声处理 40 min, 滤过, 残渣再加体积分数

为 70% 的甲醇溶液 50 mL 超声处理 40 min, 滤过, 合并 2 次滤液, 蒸干, 残渣加体积分数为 80% 的甲醇溶液溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 即得。

2.3.2 大黄醇提液供试品溶液的制备^[7] 称取大黄饮片 50 g, 加入体积分数为 75% 的乙醇溶液 400 mL, 回流提取 3 次, 每次 1 h, 滤过, 合并 3 次滤液, 加体积分数为 75% 的乙醇溶液调整至 1 000 mL, 精密吸取醇提液 8 mL, 蒸干, 残渣加体积分数为 80% 的甲醇溶液溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密密度试验 取大黄供试品溶液 5 μ L, 连续进样 6 次。结果在 430, 280 nm 检测波长下, 24 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明供试品溶液精密密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取大黄供试品溶液 5 μ L, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样 6 次。结果在 430, 280 nm 检测波长下, 24 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批大黄样品 6 份, 分别制备供试品溶液, 取大黄各供试品溶液 5 μ L 进样。

结果在 430, 280 nm 检测波长下, 24 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明供试品溶液重复性良好。

2.5 样品检测 精密吸取混合对照品溶液①10 μ L、混合对照品溶液②5 μ L、大黄及其醇提液供试品溶液各 5 μ L, 按 2.1 项的色谱条件进样分析。

2.6 特征图谱的建立与分析

2.6.1 共有峰的确定与成分鉴定 根据以上样品的分析结果, 大黄在 430 nm 波长下标示出 14 个蒽醌类共有峰, 280 nm 波长下标示出 10 个共有峰, 不同批次间相同检测波长下共有峰的紫外光谱一致, 因此, 选择这些特征峰作为特征图谱共有峰。经对照品对照, 430 nm 检测波长下, 峰 10 为芦荟大黄素, 峰 11 为大黄酸, 峰 12 为大黄素, 峰 13 为大黄酚, 峰 14 为大黄素甲醚; 280 nm 检测波长下, 峰 1 为没食子酸, 峰 2 为儿茶素。430 nm 波长下, 以峰 11 (大黄酸) 为参照峰, 分别计算大黄及其醇提液各共有峰的相对保留时间 (R_{TR}) 与相对峰面积 (R_A), 结果见表 1。280 nm 波长下, 以峰 6 为参照峰, 分别计算大黄及其醇提液各共有峰的相对保留时间 (R_{TR}) 与相对峰面积 (R_A), 结果见表 2。

表 1 大黄及其提取液 HPLC 特征图谱分析 (430 nm) ($\bar{x} \pm s$)

峰号	饮片 R_{TR}	饮片 R_A	提取液 R_{TR}	提取液 R_A
1	0.544 7 \pm 0.000 7	0.098 \pm 0.046	0.544 4 \pm 0.000 6	0.101 \pm 0.048
2	0.594 4 \pm 0.000 6	0.124 \pm 0.053	0.594 1 \pm 0.000 6	0.132 \pm 0.053
3	0.748 8 \pm 0.000 2	0.480 \pm 0.169	0.748 8 \pm 0.000 4	0.493 \pm 0.170
4	0.758 5 \pm 0.000 2	0.243 \pm 0.119	0.758 5 \pm 0.000 4	0.252 \pm 0.125
5	0.819 5 \pm 0.000 2	0.070 \pm 0.027	0.819 3 \pm 0.000 3	0.058 \pm 0.022
6	0.830 3 \pm 0.000 3	0.154 \pm 0.063	0.830 2 \pm 0.000 6	0.158 \pm 0.063
7	0.838 0 \pm 0.000 1	0.042 \pm 0.023	0.837 7 \pm 0.000 3	0.031 \pm 0.018
8	0.846 2 \pm 0.000 5	0.078 \pm 0.046	0.846 0 \pm 0.000 3	0.060 \pm 0.037
9	0.922 1 \pm 0.000 2	0.096 \pm 0.014	0.922 2 \pm 0.000 3	0.100 \pm 0.017
10	0.946 6 \pm 0.000 1	0.421 \pm 0.047	0.946 7 \pm 0.000 3	0.438 \pm 0.058
11 (s)	1.000 0	1.000	1.000 0	1.000
12	1.132 8 \pm 0.000 2	0.609 \pm 0.100	1.132 9 \pm 0.000 3	0.641 \pm 0.099
13	1.202 8 \pm 0.000 2	0.632 \pm 0.115	1.203 0 \pm 0.000 5	0.690 \pm 0.169
14	1.271 8 \pm 0.000 3	0.176 \pm 0.037	1.271 8 \pm 0.000 4	0.147 \pm 0.036

表 2 大黄及其提取液 HPLC 特征图谱分析 (280 nm) ($\bar{x} \pm s$)

峰号	饮片 R_{TR}	饮片 R_A	提取液 R_{TR}	提取液 R_A
1	0.237 3 \pm 0.004 1	3.770 \pm 1.793	0.238 0 \pm 0.001 6	3.726 \pm 1.618
2	0.588 3 \pm 0.001 2	0.868 \pm 0.207	0.589 9 \pm 0.000 9	0.898 \pm 0.201
3	0.767 0 \pm 0.005 2	1.498 \pm 0.610	0.766 8 \pm 0.000 7	1.384 \pm 0.520

续表 2

峰号	饮片 R_{TR}	饮片 R_A	提取液 R_{TR}	提取液 R_A
4	0.778 4 ± 0.001 4	2.334 ± 0.968	0.779 7 ± 0.000 7	2.170 ± 0.833
5	0.866 8 ± 0.001 0	0.547 ± 0.115	0.868 5 ± 0.000 7	0.508 ± 0.098
6(s)	1.000 0	1.000	1.000 0	1.000
7	1.093 9 ± 0.000 7	0.384 ± 0.077	1.094 1 ± 0.000 9	0.414 ± 0.062
8	1.169 0 ± 0.001 3	1.613 ± 0.992	1.170 3 ± 0.001 0	1.525 ± 0.927
9	1.266 2 ± 0.002 0	0.938 ± 0.377	1.268 6 ± 0.001 0	0.901 ± 0.316
10	1.266 2 ± 0.002 0	1.052 ± 0.567	1.268 6 ± 0.001 0	1.025 ± 0.555

2.6.2 相似度分析 采用国家药典委员会中药色谱特征图谱相似度评价系统软件(2004A 版),中位数法计算样品相似度。分别以 10 批大黄及其醇提液特征图谱生成的共有模式为对照,计算大黄及其醇提液各自检测波长下的相似度,结果见表 3,4。在 430 nm 检测波长下,混合对照品①、10 批大黄及其醇提液生成的特征图谱共有模式见图 1~3,在 280 nm 检测波长下,混合对照品②、10 批大黄及其醇提液生成的特征图谱共有模式见图 4~6。

表 3 大黄及其提取液特征图谱的相似度(430 nm)

No.	饮片相似度	醇提液相似度	饮片-醇提液相似度
S1	0.996	0.994	0.998
S2	0.992	0.992	0.999
S3	0.963	0.954	0.999
S4	0.996	0.997	0.999
S5	0.962	0.971	0.997
S6	0.990	0.990	0.998
S7	0.993	0.983	0.995
S8	0.985	0.991	0.992
S9	0.761	0.757	0.999
S10	0.843	0.846	0.999

表 4 大黄及其提取液特征图谱的相似度(280 nm)

No.	饮片相似度	醇提液相似度	饮片-醇提液相似度
S1	0.982	0.977	0.999
S2	0.963	0.970	0.997
S3	0.961	0.967	0.999
S4	0.987	0.987	0.998
S5	0.948	0.959	0.999
S6	0.988	0.986	0.998
S7	0.945	0.966	0.987
S8	0.963	0.927	0.987
S9	0.814	0.852	0.996
S10	0.864	0.885	0.999

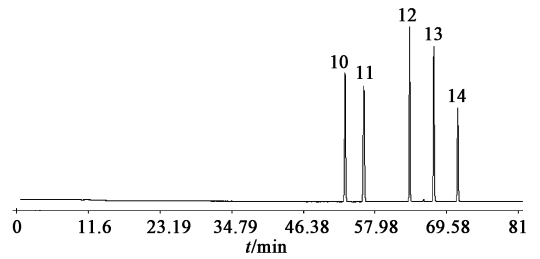


图 1 混合对照品①HPLC 特征图谱(430 nm)

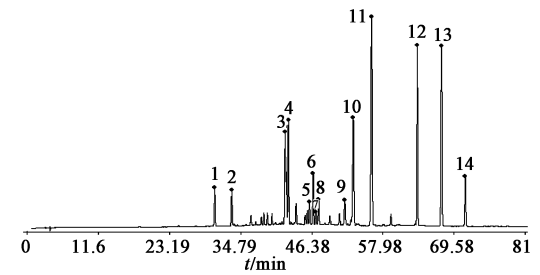


图 2 大黄 HPLC 特征图谱共有模式(430 nm)

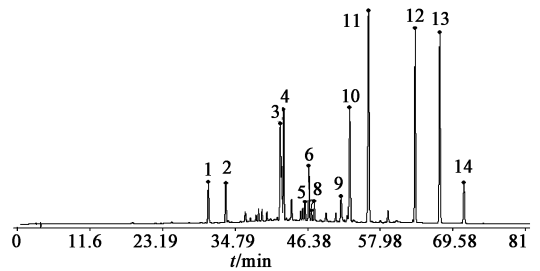


图 3 大黄醇提液 HPLC 特征图谱共有模式(430 nm)

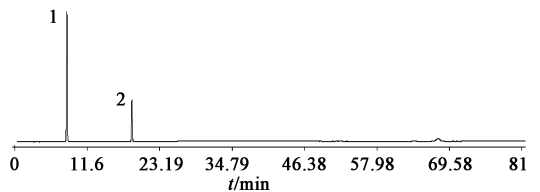


图 4 混合对照品②HPLC 特征图谱(280 nm)

3 讨论

大黄提取工艺研究多以蒽醌类成分含量为指标,制剂生产中大黄多采用不同浓度的乙醇回流提取^[6-9],从提取溶剂节约及利用率提高考虑,以 75%

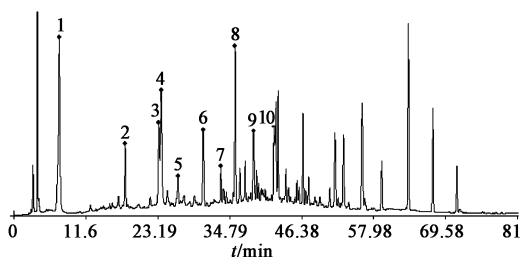


图5 大黄 HPLC 特征图谱共有模式(280 nm)

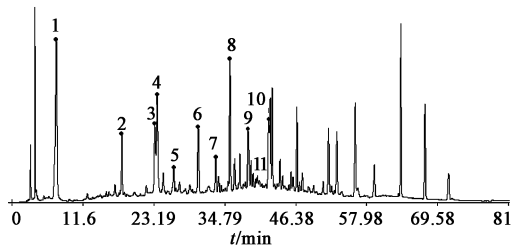


图6 大黄醇提液 HPLC 特征图谱共有模式(280 nm)

乙醇溶液作为大黄的提取溶媒较优^[7]。因此,本研究选择75%乙醇溶液作为大黄的提取溶媒,研究大黄饮片及其醇提液 HPLC 特征图谱的相关性,评价大黄醇提工艺。

根据大黄所含成分类型的差异,优选了430,280 nm 两种检测波长分别对大黄蒽醌类与其他类成分进行特征图谱分析,既能在430 nm 检测波长条件下特征性地检出大黄蒽醌类成分,排除一些峰的干扰,又能在280 nm 检测波长条件下对一些吸收较小的特征成分(如儿茶素)较好地检出。本研究鉴别了7个特征成分,其他成分鉴定有待于进一步研究。在430 nm 波长条件下10批大黄及其醇提液中有8批样品相似度分别<0.96,0.95,2批样品差异较大,相似度<0.90;在280 nm 波长条件,10批大黄及其醇提液中有8批样品相似度>0.94,0.92,2批相似度低于0.90。同批次大黄及其醇提液在430,280 nm 波长处的相似度分别为0.992~0.999,0.987~0.999,表明大黄的常规醇提工艺能保留

大黄的主要特征成分。本研究为大黄饮片及其醇提液的质量控制提供一定的方法依据,并为大黄复方制剂的工艺与质量控制提供了参考。

[参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第2卷[M]. 上海:上海科技出版社,1999:1357.
- [2] 阴健,郭力弓. 中药现代研究与临床应用(I)[M]. 北京:学苑出版社,1993:66,77.
- [3] 金汝城,谢伟雪,逢艳. 大孔吸附树脂对大黄总蒽醌类物质的吸附纯化[J]. 兰州大学学报(医学版),2008,34(1):47.
- [4] 田国芳,李丽,张村,等. 大黄生、熟饮片质量评价方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):48.
- [5] 陈东东,李丽,张村,等. 提取温度和时间对大黄片主要蒽醌苷类成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(10):50.
- [6] 蒋孟良,郭建生,杨平华. 提取方法对大黄中蒽醌含量的影响[J]. 现代应用药学,1993,10(1):33.
- [7] 何坦. 基于双柏散的中药喷膜剂工艺路线、包装与成膜材料的筛选[D]. 广州:广州中医药大学,2011.
- [8] 黄园,徐雄良,张志荣,等. 正交试验法研究水提与醇提对大黄蒽醌提取率的影响[J]. 中成药,2003,25(4):273.
- [9] 马桔云,赵晶岩,战丹. 大黄醇回流提取工艺的研究[J]. 黑龙江医药,2001,14(1):8.
- [10] 李磊,刘瑞,袁波,等. 大黄 HPLC 特征图谱分析[J]. 中国药学杂志,2005,40(17):1302.
- [11] 刘欣,胡芳弟,封士兰,等. 大黄药材特征图谱研究[J]. 分析测试技术与仪器,2004,10(3):140.
- [12] 陈斌,蔡宝昌,潘扬,等. 不同产地掌叶大黄 HPLC 特征图谱的比较[J]. 中草药,2003,34(5):457.
- [13] 皮凤娟,贺福元,罗杰英,等. 运用 HPLC 指纹图谱确定大黄控制中进样量的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(8):1.

[责任编辑 顾雪竹]