

DOI:CNKI:11-3495/R.20110301.1641.002

· 化学与分析 ·

## 大黄生、熟饮片质量评价方法研究

田国芳<sup>1</sup>, 李丽<sup>2</sup>, 张村<sup>2</sup>, 肖永庆<sup>1,2\*</sup>, 王云<sup>2</sup>, 黄文倩<sup>1</sup>

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:探讨建立具有生、熟大黄饮片专属性的质量评价方法。方法:以 TLC 及 HPLC 对生、熟大黄饮片进行定性、定量比较分析。结果:石油醚-乙酸乙酯-甲酸(15:5:1)和氯仿-甲醇-甲酸(6:1:0.2) 2 个展开系统的 TLC 鉴别和 HPLC 指纹图谱比较,均可以清晰地反映出 2 种饮片化学成分组成和含量上的变化。主要化学成分的含量测定显示,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。结论:可将蒽醌苷及其苷元、二苯乙烯苷及鞣质单体的含量作为大黄生、熟饮片定量分析的指标,其中大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷和儿茶素可作为生大黄饮片的特征指标成分。

**[关键词]** 生大黄;熟大黄;质量评价

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0048-04

## Quality Evaluation of Raw Rhubarb and Stewed Rhubarb

TIAN Guo-fang<sup>1</sup>, LI Li<sup>2</sup>, ZHANG Cun<sup>2</sup>, XIAO Yong-qing<sup>1,2\*</sup>, WANG Yun<sup>2</sup>, HUANG Wen-qian<sup>1</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Science, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the individual quality evaluation standard of raw rhubarb and stewed Rhubarb. **Method:** Qualitative and quantitative identification of two pieces from rhubarb were performed by using the thin-layer chromatography, HPLC fingerprint chromatogram. **Result:** The change of quantity and content in pieces could be reflected directly and clearly in HPLC fingerprint chromatogram and the TLC in which two kinds of mobile phase were used. There were notable differences in the content of 5 kinds of free anthraquinone, anthraquinone glycoside, stilbene glycoside, catechin and gallic acid in stewed Rhubarb and raw rhubarb. **Conclusion:** Suggestion on quality standard of raw rhubarb and stewed Rhubarb should be taken differently by the indicator including the content of free anthraquinone, anthraquinone glycoside, catechin, gallic acid and stilbene glycoside. The emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside and the catechin are the characteristics index of raw rhubarb.

**[Key words]** raw rhubarb; stewed rhubarb; quality evaluation

大黄为临床常用中药,是典型的生熟异治中药。

中医传统理论认为,生大黄气味重浊沉降,直达下焦,攻积导滞,凉血解毒,作用峻烈,易伤脾胃,多用于大便秘结等。熟大黄泻下作用缓和,活血化瘀作用增强,多用于年老体虚、儿童患者<sup>[1]</sup>。大黄生、熟饮片在中医临床上的用途是不同的,因此对于大黄生、熟饮片的质量评价标准也必须有其专属性。目前,《中国药典》尚未制定大黄饮片的质量评价标准,即使是大黄药材的质量标准研究,文献多采用水

**[收稿日期]** 2011-01-07

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(30730111)

**[通讯作者]** \*肖永庆,首席研究员,博士生导师,研究方向:中药化学,中药炮制, Tel:010-84040221, E-mail: x.heqi@163.com

**[网络出版时间]** 2011-03-01 16:41

解后进行大黄中蒽醌苷元含量测定<sup>[2-4]</sup>,而对原生态蒽醌苷元及苷类成分含量研究很少。本课题以掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 为研究对象,在系统化学成分研究的基础上,以 TLC, HPLC 对主要成分进行了比较研究,同时对大黄生、熟饮片的主要成分的含量进行了比较分析,建立了具有生、熟大黄饮片专属性的质量评价方法。

## 1 仪器与试药

Waters 高效液相色谱仪(2695 pump, 2996 检测器, Empower 2 数据处理软件); KQ-100DE 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 甲醇、乙腈、四氢呋喃为色谱纯, 水为纯净水, 使用前均经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过; 其他试剂均为分析纯。

对照品由本研究室分离、纯化, 经 HPLC 面积归一化法测定, 含量均达到 98% 以上。

大黄药材采自青海玉树, 经中国中医科学院中药研究所胡世林研究员鉴定为掌叶大黄 *R. palmatum* 的根及根茎; 生、熟大黄饮片以掌叶大黄为原料药材, 按照《中国药典》<sup>[5]</sup> 相关项下的炮制方法, 由北京人卫饮片厂分别制备成 10 批大黄生片和 10 批大黄熟片。

## 2 方法与结果

### 2.1 大黄生、熟饮片的定性比较

**2.1.1 TLC 鉴别** 取生、熟大黄饮片粉末(过 40 目筛)各 0.5 g, 加甲醇 25 mL, 超声提取 20 min, 滤过, 制备成供试品溶液。再取芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品各 0.5 mg, 以 10 mL 甲醇溶解, 作为对照品溶液。吸取上述供试品溶液各 3  $\mu\text{L}$ , 对照品溶液各 5  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一 MERCK GF<sub>254</sub> 板上, 以石油醚(60~90  $^{\circ}\text{C}$ )-乙酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(365 nm)下检视。生、熟大黄供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显示 5 个相同的橙黄色荧光斑点, 但熟大黄中各斑点荧光明显强于生大黄。结果见图 1。

另取上述供试品溶液各 3  $\mu\text{L}$ , 分别点于同一 MERCK GF<sub>254</sub> 板上, 以氯仿-甲醇-甲酸(6:1:0.2)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(365 nm)下检视。熟大黄与生大黄相比, 薄层图谱中减少了一个蓝色荧光斑点(Rf 0.25)。结果见图 2。

### 2.2 指纹图谱鉴别<sup>[6-7]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm  $\times$  250

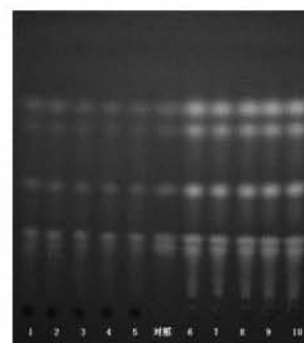


图 1 生、熟大黄饮片 TLC 图谱  
1~5. 生大黄饮片; 6~10. 熟大黄饮片;  
对照品: 自上而下为大黄酚, 大黄素甲醚,  
大黄素, 大黄酸, 芦荟大黄素

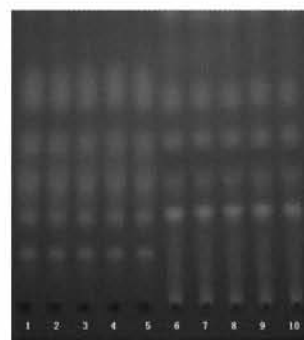


图 2 生、熟大黄饮片 TLC 图谱  
1~5. 生大黄饮片; 6~10. 熟大黄饮片

表 1 流动相梯度

$t$ /min	流速 /mL·min <sup>-1</sup>	MeOH /%	1.0% HAc /%
0	1	5	95
10	1	30	70
40	1	60	40
60	1	60	40
70	1	100	0
75	1	100	0

mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相甲醇-1.0% 冰醋酸梯度洗脱(表 1), 检测波长 280 nm, 430 nm, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。在此条件下不同大黄饮片分别能检出 38, 18 个峰, 分离较佳。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取大黄生片粉末(过 40 目筛)0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 10min 后, 放冷, 密塞, 再称定质量, 以甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 以微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ )滤过, 即

表 2 大黄中主要成分含量测定方法学参数

种类	成分	生大黄	熟大黄	色谱条件
蒽醌 苷元类 成分 [8]	芦荟大黄素	0.055 9	0.093 9	Agilent TC-C <sub>18</sub> (2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); phenomenex 保护柱(3 mm × 4 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1% 磷酸(85:15); 检测波长 254 nm; 流速 1.0 mL·min <sup>-1</sup> ; 柱温 35 °C
	大黄酸	0.226 9	0.343 1	
	大黄素	0.052 9	0.121 4	
	大黄酚	0.078 0	0.145 7	
	大黄素甲醚	0.024 1	0.059 9	
	蒽醌苷元总量	0.437 8	0.764	
蒽醌 苷类 成分 [9-10]	芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷	0.193 6	0.083 9	Agilent TC-C <sub>18</sub> (2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); phenomenex 保护柱(3 mm × 4 mm, 5 μm); 流动相乙腈-1% 冰醋酸溶液(20:80); 检测波长 410 nm; 流速 1.0 mL·min <sup>-1</sup> ; 柱温 35 °C
	大黄酸-8-O-β-D-葡萄糖苷	1.138 5	0.591 1	
	大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷	0.182 5	-	Agilent TC-C <sub>18</sub> (2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); phenomenex 保护柱(3 mm × 4 mm, 5 μm); 流动相四氢呋喃-1% 冰醋酸溶液(25:75); 检测波长 280 nm; 流速 1.0 mL·min <sup>-1</sup> ; 柱温 35 °C
	芦荟大黄素-3-CH <sub>2</sub> -O-β-D-葡萄糖苷	0.055 5	0.031 4	
	蒽醌苷类总量	1.570 1	0.706 4	
二苯 乙烯 苷类 [11]	反-3,5,4'-三羟基乙炔基-4'-O-β-D-葡萄糖苷	0.620 7	0.119 7	Agilent XDB C <sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); Agilent 保护柱(3 mm × 4 mm, 5 μm); 流动相甲醇-1% 冰醋酸溶液(20:80); 检测波长 280 nm; 流速 1.0 mL·min <sup>-1</sup> ; 柱温 35 °C
	反-3,5,4'-三羟基二苯乙炔基-4'-O-β-D-(6"-O-没食子酰基)-葡萄糖苷	1.301 1	0.233 4	Agilent Eclipse XDB-C <sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); Agilent 保护柱(4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm); 流动相甲醇-1% 冰醋酸(32:68); 检测波长 300 nm; 流速 1.0 mL·min <sup>-1</sup> ; 柱温 35 °C
苯丁 酮类 成分 [12]	4'-羟基苯基-2-丁酮	0.172 9	0.151 6	Agilent Eclipse XDB-C <sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); Agilent 保护柱(4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm); 流动相甲醇-1% 冰醋酸(20:80); 检测波长 280 nm; 流速 1.0 mL·min <sup>-1</sup> ; 柱温 35 °C
	4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(6"-没食子酰基)-葡萄糖苷	0.395 0	0.386 1	
	4-(4-羟基苯基)-2-丁酮-4'-O-β-D-(6"-O-肉桂酰基)-葡萄糖苷	0.056 4	0.041 4	
鞣质 成分 [13]	没食子酸	0.176 8	0.423 1	Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), phenomenex 保护柱(3 mm × 4 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.01% 磷酸溶液梯度洗脱; 检测波长 277 nm; 流速 0.9 mL·min <sup>-1</sup> ; 柱温 30 °C
	儿茶素	1.357 3	-	Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), phenomenex 保护柱(3 mm × 4 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.01% 磷酸溶液梯度洗脱; 检测波长 277 nm; 流速 0.9 mL·min <sup>-1</sup> ; 柱温 30 °C

得。分别精密吸取上述样品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪进行测定。结果显示, 生、熟大黄饮片指纹图谱共有峰数量及各峰的相对比例均有明显的差异。见图 3。

**2.3 主要成分的含量比较研究** 课题组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(色谱条件及测定结果见表 2)<sup>[8-13]</sup>, 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。二苯乙烯苷类成分的变化更为显

著, 熟片中该类成分的总量仅为生片的 18%。鞣质单体成分的变化也具有显著的鉴别意义, 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。因此, 可将蒽醌苷及其苷元、二苯乙烯苷及鞣质单体的含量作为大黄生、熟饮片定量分析的指标, 其中大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷和儿茶素的含量可作为生大黄饮片的特征指标成分。

### 3 讨论

本文通过 TLC, HPLC 指纹图谱定性鉴别及主要化学成分定量分析, 探讨了大黄生、熟饮片质量标准的评价内容。与生大黄片相比, 熟片化学成分变化

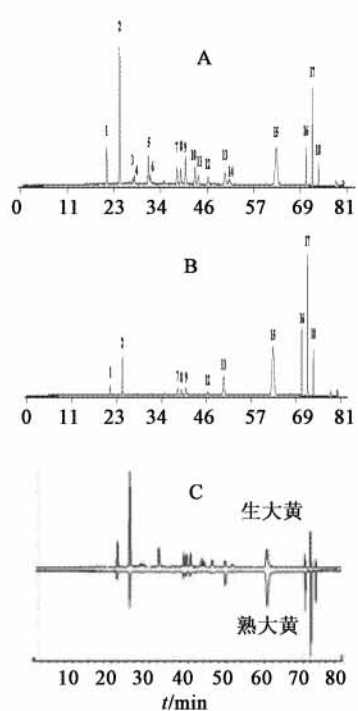


图3 生、熟大黄指纹图谱(430 nm)

A. 生大黄;B. 熟大黄;C. 生、熟大黄镜像比较

显著,利用石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯-甲酸(15:5:1)和氯仿-甲醇-甲酸(6:1:0.2)2个展开系统进行鉴别,可以清晰地反映出2种饮片化学成分组成和含量上的变化,因此建议以上述2种展开系统作为大黄生、熟饮片的定性鉴别方法。此外,HPLC指纹图谱比较也进一步证实了TLC鉴别的结果,炮制为熟片后,苷类成分峰面积显著降低,而其相应的苷元成分峰面积显著增加,2种饮片的HPLC指纹图谱差异显著,可以作为生、熟饮片的鉴别方法。

通过定量比较分析,建议将蒽醌苷及其苷元、二苯乙烯苷及鞣质单体的含量作为大黄生、熟饮片的限量指标,其中大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷和儿茶素的含量可作为生大黄饮片的特征指标成分。

#### [参考文献]

[1] 黄兆胜. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:137.

- [2] 李先端,黄璐琦. 炮制对中药大黄5种蒽醌成分含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 904.
- [3] 李玉林,车国冬,索有瑞,等. 青海栽培和野生唐古特大黄蒽醌类成分的HPLC对比分析[J]. 天然产物研究与开发, 2008(20): 469.
- [4] Katsuko KAMATSU, Yorinobu NAGAYAMA. Development of a high performance liquid chromatographic method for systematic quantitative analysis of chemical constituents in rhubarb[J]. Chem. Pharm. Bull. 2006, 54(7): 941.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2010:22.
- [6] 李丽,张村,肖永庆,等. 大黄5种饮片化学成分的变化规律[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(12): 839.
- [7] 李丽,张村,肖永庆,等. 大黄5种饮片指纹图谱色谱峰的归属与比较[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(13): 1668.
- [8] 张村,李丽,肖永庆,等. 大黄5种饮片中游离蒽醌类成分比较研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(15): 1914.
- [9] 张村,李丽,肖永庆,等. 大黄不同饮片中2个蒽醌苷类成分的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2872.
- [10] 田国芳,张村,李丽,肖永庆,等. 大黄5种炮制品中芦荟大黄素-3-CH<sub>2</sub>-O-β-D-葡萄糖苷和大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷变化规律[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2437.
- [11] 李丽,张村,肖永庆,等. 大黄5种饮片中2个二苯乙烯苷类成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1415.
- [12] 李丽,张村,肖永庆,等. 大黄5种饮片中2个苯丁酮成分含量比较研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 17(8): 559.
- [13] 王云,李丽,张村,等. 大黄5种饮片中没食子酸和儿茶素的含量比较研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2267.

[责任编辑 蔡仲德]