

HPLC法同时测定大黄-黄连药材中5种蒽醌类成分的含量及最优配伍研究

王有森*,王智亮(潍坊市人民医院药剂科,山东潍坊 261599)

中图分类号 R943.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4818-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.17

摘要 目的:建立同时测定大黄-黄连药材中5种蒽醌类成分含量的方法,并优选大黄-黄连药材质量比。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾(48:52, V/V, 每100 mL中加十二烷基硫酸钠0.4 g,磷酸调节pH至4.0),流速为1 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μL。考察大黄-黄连药材质量比为1:1、1:2、2:1、2:3、3:2时配伍药材中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量。结果:芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样量分别在0.652~3.081、0.704~3.422、1.280~6.197、0.633~0.324、1.326~5.954 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系($r \geq 0.9997$),精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0% ($n=6$),平均加样回收率为98.92%~100.37% ($RSD \leq 2.26\%$, $n=6$)。大黄-黄连药材质量比为2:1时,5种蒽醌类成分总量最高。结论:本方法精密度、稳定性、重复性良好,可用于不同配伍比大黄-黄连药材的质量检定;大黄-黄连药材的最佳质量比为2:1。

关键词 大黄;黄连;配伍;蒽醌类成分;高效液相色谱法

Simultaneous Content Determination of 5 Anthraquinones of Rhei Radix-coptidis Rhizoma by HPLC and Study on the Optimal Compatibility

WANG Yousen, WANG Zhiliang (Dept. of Pharmacy, Weifang People's Hospital, Shandong Weifang 261599, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous content determination 5 anthraquinones of rhei radix-coptidis rhizoma, and optimize its best mass ratio. METHODS: HPLC was performed on the column of Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile-0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate (48:52, V/V, adding sodium dodecyl sulfate 0.4 g per 100 mL, pH value was adjusted to 4.0); detection wavelength was 254 nm; flow rate was 1 mL/min; column temperature was 25 ℃; and injection volume was 10 μL. When mass ratio of rhei radix-coptidis rhizoma was 1:1, 1:2, 2:1, 2:3, 3:2, the contents of aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and emodin ether were investigated. RESULTS: The aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and emodin ether showed good linear relationship with peak area in the range of 0.652-3.081, 0.704-3.422, 1.280-6.197, 0.633-0.324, 1.326-5.954 μg ($r \geq 0.9997$); RSDs of precision, stability, reproducibility tests were lower than 2.0% ($n=6$); and average recovery was 98.92%-100.37% ($RSD \leq 2.26\%$, $n=6$). When mass ratio was 2:1, the total contents of 5 ingredients were the highest. CONCLUSIONS: The method has good precision, stability, reproducibility, and can be used for the quality verification of rhei radix-coptidis rhizoma under different compatibilities. The best mass ratio of rhei radix-coptidis rhizoma is 2:1.

KEYWORDS Rhei radix; Coptidis rhizoma; Compatibility; Anthraquinones; HPLC

大黄黄连泻心汤源自张仲景的《伤寒杂病论》,注有“心下痞,按之濡,其脉关上浮者,大黄黄连泻心汤主之”^[1]。现代药理研究表明,大黄黄连泻心汤具有调血脂、抗菌、增强机体免疫功能、抗消化性溃疡等作用^[2-4]。该方由大黄2两、黄连1两合煎而成,即大黄-黄连药材的质量比为2:1,但这是否是其有效成分的最佳比例尚不得而知。因此,笔者以高效液相色谱(HPLC)法测定大黄-黄连药材不同配伍下蒽醌类成分(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚)的含量^[5-7],以多种成

分指标综合评价大黄黄连泻心汤加减方,为其质量标准的控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括二极管阵列检测器(美国Agilent公司);KQ-500GVDV型超声清洗仪(昆山超声仪器有限公司);BS224S型分析天平(德国Satorius公司);MF10型粉碎机(德国IKA公司)。

1.2 药材与试剂

大黄、黄连药材购自安徽亳州,经潍坊市人民医院药剂科王智亮主管药师鉴定,均符合2015年《中国药典》

*主任药师。研究方向:医院药学。电话:0536-8234981。E-mail:wfwys666@163.com

(一部)相关规定。芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110795-201305、110757-201302、110756-201210、110796-201101、110758-201206,纯度:>98%);甲醇为色谱纯,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

色谱柱:Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾(48:52, V/V, 每100 mL 中加十二烷基硫酸钠0.4 g,磷酸调节pH至4.0);流速:1 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:25 ℃;进样量:10 μL^[8-10]。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 按“2.9”项下质量比称取大黄-黄连药材共约0.2 g,精密称定,加入甲醇20 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz,下同)40 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得供试品溶液。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 取减压干燥至恒质量的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量,以甲醇溶解,超声20 min,制得芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量浓度分别为0.124 8、0.135 2、0.250 7、0.126 7、0.264 5 mg/mL的混合对照品溶液。

2.3 专属性试验

取供试品溶液、混合对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚出峰处未见其他干扰峰;芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分离度大于2,且以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰理论板数计大于4 000。色谱图见图1。

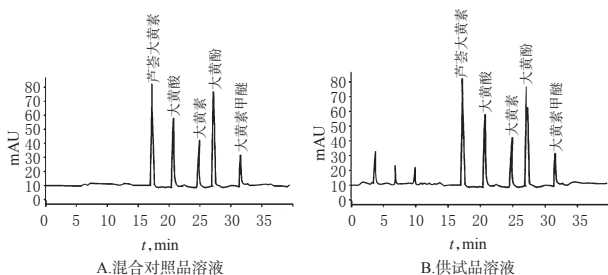


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

取混合对照品溶液5、10、15、20、25 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚进样量为横坐标($x, \mu\text{g}$)、峰面积积分为纵坐标(y)进行线性回归分析,得回归方程、线性范围见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range

成分	回归方程	r	线性范围, μg
芦荟大黄素	$y=1\ 535.46x-694.05$	0.999 9	0.652~3.081
大黄酸	$y=2\ 763.09x-582.37$	0.999 8	0.704~3.422
大黄素	$y=1\ 340.25x-726.41$	0.999 9	1.280~6.197
大黄酚	$y=2\ 041.37x-875.15$	0.999 7	0.633~0.324
大黄素甲醚	$y=1\ 864.14x-647.38$	0.999 9	1.326~5.954

由表1可知,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚在各自进样量范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

量取混合对照品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定6次。结果,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为1.24%、0.86%、0.73%、1.09%、0.86%($n=6$),表明本试验精密度良好。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液,于室温下放置0、2、4、6、8、10 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定6次。结果,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积的RSD分别为0.98%、0.85%、1.32%、1.16%、0.92%($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置10 h内稳定。

2.7 重复性试验

取大黄、黄连适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定6次。结果,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量的RSD分别为1.48%、1.86%、1.25%、1.19%、1.07%($n=6$),表明本试验重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的大黄-黄连样品(质量比为2:1),共6份,加入芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品溶液(0.124 8、0.135 2、0.250 7、0.126 7、0.264 5 mg/mL)适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表2。

2.9 样品中蒽醌类成分的含量测定

制备大黄-黄连药材质量比分别为1:1、1:2、2:1、2:3、3:2的样品,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定蒽醌类成分的含量,结果见表3。

3 讨论

大黄、黄连二药,味苦性寒、直折火势,是治疗各种火证的主药。黄连解毒汤、大黄汤、栀子金花汤、三补丸、大金花丸、清心丸、既济解毒汤、人中黄丸、当归龙荟丸等泻火之剂,其实都是在“大黄黄连泻心汤”基础上,据证加减而成。《金匱要略》中提到“大黄泻心汤”可“急泻三阳实火”,大黄中蒽醌类成分的作用就是泄下^[1],黄连

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery test(n=6)

成分	称样量, g	样品量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
芦荟大黄素	0.251 3	0.319 2	0.312 0	0.627 1	98.7	99.63	1.82
	0.252 0	0.320 1	0.312 0	0.630 8	99.6		
	0.251 1	0.318 9	0.312 0	0.638 0	102.3		
	0.251 4	0.319 3	0.312 0	0.623 1	97.4		
	0.251 7	0.319 7	0.312 0	0.633 2	100.5		
	0.251 5	0.319 7	0.312 0	0.629 5	99.3		
大黄酸	0.255 4	0.296 3	0.317 4	0.612 7	99.7	100.37	2.26
	0.255 2	0.297 2	0.317 4	0.609 5	98.4		
	0.256 1	0.301 5	0.317 4	0.630 3	103.6		
	0.255 7	0.298 0	0.317 4	0.623 3	102.5		
	0.256 4	0.297 4	0.317 4	0.620 1	101.7		
	0.255 9	0.296 2	0.317 4	0.601 8	96.3		
大黄素	0.255 0	0.396 5	0.338 0	0.736 5	100.6	98.92	1.89
	0.255 7	0.397 2	0.338 0	0.742 9	102.3		
	0.255 3	0.396 8	0.338 0	0.730 4	98.7		
	0.256 1	0.397 6	0.338 0	0.733 5	99.4		
	0.255 9	0.397 4	0.338 0	0.724 5	96.8		
	0.256 3	0.397 9	0.338 0	0.721 3	95.7		
大黄酚	0.125 0	0.586 3	0.527 1	1.114 9	100.3	99.47	1.75
	0.125 7	0.586 9	0.527 1	1.106 6	98.6		
	0.125 5	0.586 7	0.527 1	1.110 6	99.4		
	0.126 1	0.587 4	0.527 1	1.111 8	99.5		
	0.124 0	0.585 4	0.527 1	1.120 9	101.6		
	0.125 3	0.586 6	0.527 1	1.099 9	97.4		
大黄素甲醚	0.250 8	0.381 5	0.328 4	0.698 4	96.5	99.68	2.13
	0.251 0	0.381 7	0.328 4	0.706 1	98.8		
	0.250 5	0.380 9	0.328 4	0.708 3	99.7		
	0.252 4	0.382 6	0.328 4	0.719 5	102.6		
	0.251 6	0.382 1	0.328 4	0.699 6	96.7		
	0.252 2	0.382 3	0.328 4	0.723 1	103.8		

表3 含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 3 Result of content determination(n=3, mg/g)

大黄-黄连(m/m)	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
1:1	1.004	1.045	1.407	3.962	1.654
1:2	1.104	1.127	1.582	4.763	1.785
2:1	1.186	1.135	1.601	4.852	1.826
2:3	1.105	1.129	1.585	4.759	1.778
3:2	1.158	1.128	1.590	4.802	1.796

中生物碱作用为抑菌^[12-13],因此本文考察重点为蒽醌类成分。

供试品溶液的制备中比较了超声和回流提取法,结果超声提取效果明显且操作简单、方便,用时较短,故采用超声提取法。超声提取法是采用超声波辅助溶剂进行提取,通过破坏植物药材的细胞,使溶剂渗透到药材细胞中,可缩短提取时间、提高提取率,多用于小型生产或实验。超声提取与药材实际运用中的煎煮提取都是属于物理提取,但超声提取较煎煮提取药材有效成分含量多,由于各指标成分在超声或煎煮中提取条件一致,因此各成分含量比例一致^[14-16]。笔者为了让各药对中各指标成分在短时间内含量结果差异更明显,因此采用超声提取法,这也是试验中采取的通用方法。笔者在预试

验中考察了不同超声时间下,不同百分比甲醇、乙醇的超声效果,结果表明各指标成分在甲醇中超声 40 min 提取率较高。

2015年版《中国药典》(一部)中大黄和三黄片等含大黄的制剂中蒽醌类成分含量测定检测波长均为 254 nm^[17],实验对 5 种成分进行 200~400 nm 全波长扫描,测得最大吸收峰均为(250±5) nm,因此选择检测波长为 254 nm。

由含量测定结果可知,当大黄-黄连药材质量比为 1:1 时,蒽醌类成分含量最低;随着黄连的比例降低,蒽醌类成分逐渐增加。这可能是由于大黄-黄连配伍时,黄连主要成分生物碱与酸性的蒽醌类发生沉淀作用,使得大黄蒽醌类成分减少。由于该方中大黄和黄连均为主要组成,因此不宜过多减少黄连比例,故本试验未考察大黄-黄连质量比超过 3:1 的配比^[18-20]。

综上所述,本方法操作简便,可用于大黄-黄连不同配伍下蒽醌类成分的含量测定。在一定范围内,适当增加大黄配比,可增加蒽醌类成分含量。

参考文献

- [1] 张薛光.谈谈对《金匱要略》泻心汤出处、方名的理解[J]. 中医文献杂志,2007(3):9-11.
- [2] 王丽娟.具有调节血脂作用的药物组合物及其制备方法: 中国,CN101288726[P]. 2008-10-22.
- [3] 张洋.大黄黄连泻心汤、理中丸(汤)抗醋酸涂沫型胃溃疡药效学及作用机理的研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2009.
- [4] 胡芳,周娟娟,施嫣嫣,等.泻心汤体外抗菌作用拆方研究[J].现代中药研究与实践,2015(6):364-366.
- [5] 李玉恒,张振秋,赖静怡,等. HPLC 波长切换技术同时测定黄连片中 7 种成分含量[J].药物分析杂志,2011,31(2):371-374.
- [6] 李鑫健,方翠芬,祝明. HPLC 法同时测定利胆排石片中大黄素、大黄酚及大黄素甲醚[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):82-84.
- [7] 曹丽娟,苗静,刘洁秀,等.基于主成分分析的决明子中蒽醌类成分含量研究[J].中国中药杂志,2015,40(13):2589-2593.
- [8] 李树翠,冯俭,张秋燕,等.采用“一测多评”法测定大黄及其制剂中大黄蒽醌类成分的含量[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):66-71.
- [9] 裴贵珍,郭鑫,张雪峰,等. HPLC 法同时测定六味能消胶囊中木香炔内酯、去氢木香炔内酯、大黄素、大黄酚的含量[J].药物分析杂志,2015,35(2):241-245.
- [10] 杜星,李昭,郭东艳,等.大黄生品及不同炭品中总蒽醌及游离蒽醌的含量测定[J].现代中西医结合杂志,2013,22(27):3059-3060.
- [11] 苏彬,李晓波.配伍甘草对大黄泻下作用影响的研究进展

8个省14个产地的木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯含量比较与相关性分析

丁瑜潇*, 吕伟旗, 沈宏伟*(丽水市人民医院药剂科, 浙江 丽水 323000)

中图分类号 R914.1;R931.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4821-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.18

摘要 目的:为木鳖子良种选育与高产优质栽培提供参考。方法:在2015年版《中国药典》(一部)等文献基础上,优化测定木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯含量的高效液相色谱(HPLC)法;比较8个省14个产地的木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯含量并进行聚类分析;采用SPSS 17.0软件分析海拔、经纬度与木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯含量间的相关性。结果:木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯质量浓度在0.05~0.5 mg/mL范围内与峰面积呈良好线性关系,回归方程为 $Y=4\ 361.95X+67.380\ 8$ ($R^2=0.999\ 7$);定量限为15.62 ng,检测限为4.67 ng;平均回收率为99.76%(RSD=1.36%, $n=9$)。8个省14个产地的木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯含量存在极显著差异($P<0.01$)。根据聚类分析结果,将8个省14个产地的木鳖子划分为I、II、III、IV 4个类群,III与IV类群木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯含量较高,包括广西壮族自治区平南县、贵州省江口县、贵州省德江县、福建省建阳区与湖南省会同县5个产地,其中广西壮族自治区平南县、贵州省江口县、贵州省德江县、湖南省会同县属于高海拔、低经纬度地区,福建省建阳区属于高海拔地区。木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯含量与海拔呈正相关,与经度、纬度呈负相关。结论:测定木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯含量的HPLC法简便、准确、重复性好,所测8个省14个产地的木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯含量均达到2015年版《中国药典》(一部)标准,广西壮族自治区平南县、贵州省江口县、贵州省德江县、湖南省会同县等低经纬度、高海拔地区栽培有利于积累木鳖子中丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯成分。

关键词 木鳖子;丝石竹皂苷元3-O-β-D-葡糖醛酸甲酯;产地;相关性

Content Comparison and Correlation Analysis of Gypsogenin 3-O-β-D-glucuronic Acid Methyl Ester in *Momordica cochinchinensis* from 14 Production Places of 8 Provinces

DING Yuxiao, LYU Weiqi, SHEN Hongwei (Dept. of Pharmacy, Lishui People's Hospital, Zhejiang Lishui 323000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for variety breeding, high yield and high quality cultivation of *Momordica cochinchinensis*. METHODS: Based on *Chinese Pharmacopoeia* (2015 edition, Vol I), HPLC for determining the content of gypsogenin 3-O-β-D-glucuronic acid methyl ester in *M. cochinchinensis* was optimized, the contents of gypsogenin 3-O-β-D-glucuronic acid methyl ester in *M. cochinchinensis* from 14 production places of 8 provinces were compared, and cluster analysis was conducted.

- [J].中国中药杂志,2015,40(4):577-581.
- [12] 张晶晶,谈恒山.黄连素的临床应用研究进展[J].药学与临床研究,2015,23(3):287-290.
- [13] 杨宏博,苏敏,刘慧浪,等.基于生物热力学的黄连不同提取部分抑菌活性分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(16):51-56.
- [14] 罗璇捷,杨宜婷,黄寿根,等.超声提取法与索氏提取法提取陈皮黄酮类有效成分的分析比较[J].中药材,2016,39(2):371-374.
- [15] 张学良,樊钰库,王霞英,等.超声提取法测定槐花中总黄酮含量[J].中国医院用药评价与分析,2012,12(9):816-817.
- [16] 唐小清,高苏亚,范涛.中药姜黄中姜黄素的超声提取法条件的选择[J].广州化工,2013,41(17):101-102,105.
- [17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:354.
- [18] 黄萍,高静雯,邹佳丽,等.大黄黄连泻心汤不同配伍下黄芩苷和汉黄芩苷在大鼠体内的药动学比较研究[J].世界科学技术(中医药现代化),2012,14(2):1445-1450.
- [19] 庞婷,谢臻,陈勇,等.大黄配伍药对的泻火作用变化及其共性关系研究[J].广西中医药,2016,39(4):67-70.
- [20] 谢臻,周媛,陈勇,等.配伍药物与pH值环境对大黄蒽醌类成分溶出变化的影响规律[J].中草药,2013,44(24):3476-3481.

* 药师。研究方向:中药材质量分析与检测。电话:0578-2292513。E-mail:cathy9393@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:中药成分分析。电话:0578-2292718。E-mail:lstracy1027@163.com

(收稿日期:2017-08-22 修回日期:2017-10-07)
(编辑:刘明伟)