

HPLC法同时测定大黄药材中8个非蒽醌类成分的含量[△]

陆文瑾^{1*}, 窦志华^{2#}, 曹瑞³, 倪丽丽³, 戴莹³(1. 宜兴市第二人民医院药剂科, 江苏宜兴 214221; 2. 南通大学附属南通第三医院药学部, 江苏南通 226006; 3. 南京中医药大学药学院, 南京 210023)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1975-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.21

摘要 目的: 建立同时测定大黄药材中8个非蒽醌类成分含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Symmetry C₁₈, 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 柱温为30 ℃, 检测波长为280 nm, 进样量为30 μL。结果: 没食子酸、儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇4'-O-β-D-(6"-O-没食子酰)-葡萄糖苷、番泻苷A、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2"-O-没食子酰-6"-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷检测进样量的线性范围分别为6.16~2 464 ng($r=0.999\ 9$)、37.4~14 960 ng($r=0.999\ 9$)、7.635~3 054 ng($r=0.999\ 7$)、7.63~3 052 ng($r=0.999\ 9$)、8.32~3 328 ng($r=0.999\ 9$)、11.5~4 600 ng($r=0.999\ 9$)、16.08~6 432 ng($r=0.999\ 9$)、29.3~11 720 ng($r=0.999\ 9$); 定量限分别为3.48、4.30、6.40、4.40、3.39、2.87、8.40、4.95 ng, 检测限分别为2.32、2.58、2.40、2.64、2.26、1.23、4.20、2.97 ng; 精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于5%; 加样回收率分别为94.32%~100.54% (RSD=2.78%, $n=6$)、91.15%~99.36% (RSD=3.72%, $n=6$)、92.16%~98.04% (RSD=2.39%, $n=6$)、93.41%~100.73% (RSD=3.17%, $n=6$)、93.89%~98.40% (RSD=1.99%, $n=6$)、92.61%~101.74% (RSD=3.71%, $n=6$)、92.66%~103.40% (RSD=3.76%, $n=6$)、95.45%~102.70% (RSD=3.06%, $n=6$)。结论: 所建方法简便、准确、专属性强, 可用于同时测定大黄药材中8个非蒽醌类成分的含量。

关键词 大黄; 没食子酸; 儿茶素; 表儿茶素; 白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷; 表儿茶素没食子酸酯; 白藜芦醇4'-O-β-D-(6"-O-没食子酰)-葡萄糖苷; 番泻苷A; 4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2"-O-没食子酰-6"-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷; 高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of 8 Non-anthraquinone Constituents in *Rheum palmatum* by HPLC

LU Wenjin¹, DOU Zhihua², CAO Rui³, NI Lili³, DAI Ying³ (1. Dept. of Pharmacy, Yixing Second People's Hospital, Jiangsu Yixing 214221, China; 2. Dept. of Pharmacy, Nantong Third Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu Nantong 226006, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 8 non-anthraquinone constituents in *Rheum palmatum*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Symmetry C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃ and detection wavelength was 280 nm. Sample size was 30 μL. RESULTS: The linear range of gallic acid, catechin, epicatechin, resveratrol 4'-O-glucopyranoside, epicatechin gallate, resveratrol 4'-O-β-D-(6"-O-galloyl)-glucopyranoside, sennoside A, 4'-hydroxyphenyl-2-butanone-4'-O-β-D-(2"-O-galloyl-6"-O-p-hydroxy cinnamyl)-glucopyranoside were 6.16-2 464 ng ($r=0.999\ 9$), 37.4-14 960 ng ($r=0.999\ 9$), 7.635-3 054 ng ($r=0.999\ 7$), 7.63-3 052 ng ($r=0.999\ 9$), 8.32-3 328 ng ($r=0.999\ 9$), 11.5-4 600 ng ($r=0.999\ 9$), 16.08-6 432 ng ($r=0.999\ 9$), 29.3-11 720 ng ($r=0.999\ 9$), respectively. The limits of quantitation were 3.48, 4.30, 6.40, 4.40, 3.39, 2.87, 8.40 and 4.95 ng, respectively. The limits of detection were 2.32, 2.58, 2.40, 2.64, 2.26, 1.23, 4.20, 2.97 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 5%. Recoveries were 94.32%-100.54% (RSD=2.78%, $n=6$), 91.15%-99.36% (RSD=3.72%, $n=6$), 92.16%-98.04% (RSD=2.39%, $n=6$), 93.41%-100.73% (RSD=3.17%, $n=6$), 93.89%-98.40% (RSD=1.99%, $n=6$), 92.61%-101.74% (RSD=3.71%, $n=6$), 92.66%-103.40% (RSD=3.76%, $n=6$), 95.45%-102.70% (RSD=3.06%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The established method is simple,

[△] 基金项目: 江苏省重点研发计划项目(No.BE2018674); 江苏省中医药局科技项目(No.YB201836); 江苏省药学会夏尔医院药学基金项目(No.S201708); 南通市第五期“226工程”科研项目(No.通委组发[2017]131号); 南通市科技计划(指导性)项目(No.YYZ16025)

* 副主任药师。研究方向: 中药质量评价。电话: 0510-87427211。E-mail: 1053393809@qq.com

通信作者: 主任中药师, 副教授, 博士。研究方向: 中药药效物质基础及质量评价。电话: 0513-85116018。E-mail: zhihuadou@163.com

accurate and specific, and can be used for the simultaneous determination of 8 non-anthraquinone constituents in *R. palmatum*.

KEYWORDS *Rheum palmatum*; Gallic acid; Catechin; Epicatechin; Resveratrol-4'-O-glucopyranoside; Epicatechin gallate; Resveratrol-4'-O-β-D-(6"-O-galloyl)-glucopyranoside; Sennoside A; 4'-hydroxyphenyl-2-butanone-4'-O-β-D-(2"-O-galloyl-6"-O-p-hydroxy cinnamyl)-glucopyranoside; HPLC; Content determination

大黄为蓼科植物掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)或唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. et Balf.)或药用大黄(*Rheum officinale* Bail.)的干燥根和根茎^[1],是世界范围内广泛应用的中草药之一^[2-3]。我国国家药品标准中的800多个中成药处方中均含有大黄,故其质量的优劣可影响用药的有效性和安全性^[4-5]。2015年全国范围内的抽检结果显示,目前市场上流通的大黄药材合格率仅约为80%,其检验项目包括性状、显微鉴别、薄层鉴别、土大黄苷检查、总灰分检查、游离型蒽醌类成分含量测定等^[6]。大黄中含有蒽醌类及蒽酮类、鞣质类、二苯乙烯类、苯丁酮类等非蒽醌类成分^[7],但部分研究仅以大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素和大黄素甲醚等蒽醌类成分作为评价大黄质量的指标,存在一定的局限性^[8],而大黄中含有的非蒽醌类成分也同样具有一定的药理作用^[9]。如蒽酮类成分泻下作用最强^[10],收敛止血作用主要为鞣质类成分^[11],二苯乙烯苷类成分具有抗氧化、抗肿瘤、保肝、调脂、预防并治疗动脉粥样硬化作用^[12],苯丁酮苷类是大黄中具有活性的一类重要化合物^[13]。2015年版《中国药典》(一部)^[1]仅对大黄药材中5个游离型蒽醌类成分的含量作出规定:不得少于0.20%,其酸解后的总蒽醌含量不得少于1.5%;《欧洲药典》(9.0版)^[14]也仅规定了总蒽醌含量不得少于2.2%。鉴于对单一组分的检测尚无法全面评价大黄的质量,因此增加非蒽醌类成分的含量测定对大黄质量标准的完善具有重要意义^[15]。

本课题组前期建立了22批大黄药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并在280 nm波长处得到了41个共有峰,通过外标法测定了5个游离型蒽醌和总蒽醌的含量,通过一测多评法测定了8个结合型蒽醌的含量^[16]。在此基础上,本研究建立了同时测定大黄药材中没食子酸、儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷、番泻苷A、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷等8个非蒽醌类成分含量的HPLC法,旨在为建立更全面的大黄质量评价标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Alliance e2695型HPLC仪,包括e2695型分离单元、2998型二极管阵列检测器、Empower 3色谱工作站(美国Waters公司);SK5200H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);BT 25S型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

没食子酸对照品(批号:150226,纯度:≥98%)、儿茶素对照品(批号:141224,纯度:≥98%)、表儿茶素对照品(批号:140730,纯度:≥98%)、表儿茶素没食子酸酯对照品(批号:140923,纯度:≥98%)、番泻苷A对照

品(批号:CHB170508,纯度:≥98%)均购自成都克洛玛生物科技有限公司;白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷对照品(批号:38963-95-0,纯度:98%)、白藜芦醇4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷对照品(批号:92834097-0,纯度:98%)、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷(批号:950184-00-6,纯度:98%)均购自上海一林生物科技有限公司;甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 药材

22批大黄药材中S2、S18、S22为中国食品药品检定研究院标准药材粉末,S21购自南通三越中药饮片有限公司,其余药材样品均由南通市食品药品监督管理局葛建华主任中药师馈赠。除标准药材外,其余19批均由葛建华主任中药师鉴定为蓼科植物掌叶大黄(*R. palmatum* L.)或唐古特大黄(*R. tanguticum* Maxim. et Balf.)或药用大黄(*R. officinale* Bail.)的干燥根和根茎。除标准药材粉末,其余药材均粉碎成粉末,过四号筛,备用。大黄药材来源见表1。

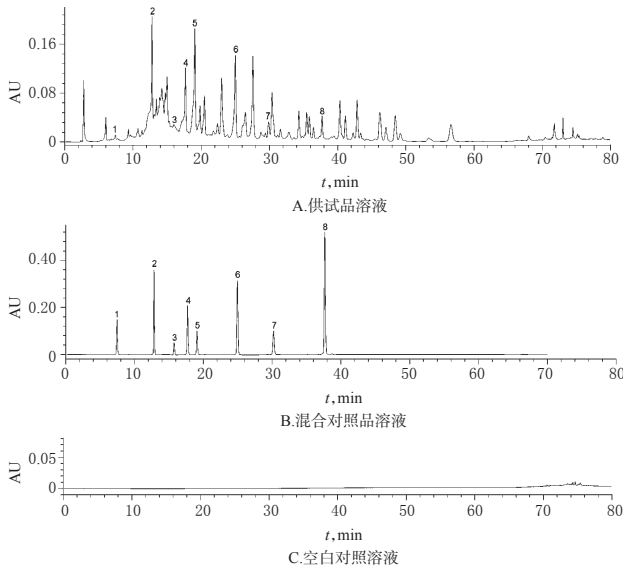
表1 大黄药材来源

编号	基源	产地或来源	采收年份
S1	药用大黄	四川雅安	2014年
S2	药用大黄	中国食品药品检定研究院	年份不详
S3	唐古特大黄	甘肃合作	2015年
S4	唐古特大黄	甘肃合作	2015年
S5	唐古特大黄	甘肃合作	2015年
S6	唐古特大黄	甘肃合作	2015年
S7	唐古特大黄	甘肃合作	2015年
S8	唐古特大黄	青海果洛	2014年
S9	唐古特大黄	青海果洛	2014年
S10	唐古特大黄	青海果洛	2014年
S11	唐古特大黄	青海果洛	2014年
S12	唐古特大黄	青海果洛	2014年
S13	唐古特大黄	青海果洛	2015年
S14	唐古特大黄	青海果洛	2015年
S15	唐古特大黄	青海果洛	2015年
S16	唐古特大黄	四川阿坝	2015年
S17	唐古特大黄	四川成都荷花池市场	年份不详
S18	唐古特大黄	中国食品药品检定研究院	年份不详
S19	掌叶大黄	甘肃礼县	2014年
S20	掌叶大黄	甘肃礼县	2016年
S21	掌叶大黄	甘肃礼县	年份不详
S22	掌叶大黄	中国食品药品检定研究院	年份不详

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 5% A→30% A; 10~40 min, 30% A→60% A; 40~60 min, 60% A; 60~70 min, 60% A→100% A; 70~80 min, 100% A);检测波长:280 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:30 μL。在该色谱条件下,分离度均大于1.5,理论板数以没食子酸计均不低于8 000,空白对照测定无干扰,详见图1。



注: 1. 没食子酸; 2. 儿茶素; 3. 表儿茶素; 4. 白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷; 5. 表儿茶素没食子酸酯; 6. 白藜芦醇 4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷; 7. 番泻苷 A; 8. 4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷

Note: 1. gallic acid; 2. catechin; 3. epicatechin; 4. resveratrol 4'-O-glucopyranoside; 5. epicatechin gallate; 6. resveratrol 4'-O-β-D-(6''-O-galloyl)-glucopyranoside; 7. sennoside A; 8. 4'-hydroxyphenyl-2-butanone-4'-O-β-D-(2''-O-galloyl-6''-O-p-hydroxy cinnamyl)-glucopyranoside

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取样品粉末约 0.15 g, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇 24 mL, 超声 (功率: 200 W, 频率: 53 kHz) 处理 30 min, 冷却后, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 对照品溶液 精密称取儿茶素对照品 9.35 mg、白藜芦醇 4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷对照品 4.6 mg, 分别置于 2 mL 量瓶中; 另取没食子酸对照品 6.16 mg、表儿茶素没食子酸酯对照品 4.16 mg、番泻苷 A 对照品 8.04 mg、白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷对照品 5.45 mg、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷对照品 11.72 mg, 分别置于 5 mL 量瓶中; 另取表儿茶素对照品 5.09 mg, 置于 10 mL 量瓶中; 分别加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 得各单一对照品贮备液。分别精密量取上述没食子酸对照品贮备液、白藜芦醇 4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷对照品贮备液各 0.5 mL, 白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷对照品贮备液 0.7 mL, 儿茶素对照品贮备液 0.8 mL, 表儿茶素没食子酸酯对照品贮备液、番泻苷 A 对照品贮备液各 1.0 mL, 4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷对照品贮备液 1.25 mL, 表儿茶素对照品贮备液 1.5 mL, 置于同一 10 mL 量

瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 制得没食子酸、儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇 4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷、番泻苷 A、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷质量浓度分别为 0.061 6、0.374、0.076 35、0.076 3、0.083 2、0.115、0.160 8、0.293 mg/mL 的混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液 1 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得没食子酸、儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇 4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷、番泻苷 A、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷质量浓度分别为 0.002 464、0.014 96、0.003 054、0.003 052、0.003 328、0.004 6、0.006 432、0.011 72 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 空白对照溶液 以甲醇为空白对照。

2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液 2.5、12.5、25 μL 及混合对照品贮备液 5、10、20、30、40 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分进样量 (x, ng) 为横坐标、峰面积 (y) 为纵坐标进行线性回归, 回归方程与线性范围见表 2。

表 2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, ng
没食子酸	$y=2\ 410\ 982x-36\ 296$	0.999 9	6.16~2 464
儿茶素	$y=732\ 349x-68\ 689$	0.999 9	37.4~14 960
表儿茶素	$y=734\ 494x-4\ 435$	0.999 7	7.635~3 054
白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷	$y=2\ 807\ 391x-50\ 858$	0.999 9	7.63~3 052
表儿茶素没食子酸酯	$y=1\ 596\ 107x-24\ 613$	0.999 9	8.32~3 328
白藜芦醇 4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷	$y=3\ 137\ 732x-85\ 754$	0.999 9	11.5~4 600
番泻苷 A	$y=844\ 769x-3\ 184$	0.999 9	16.08~6 432
4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷	$y=2\ 194\ 907x-179\ 360$	0.999 9	29.3~11 720

2.4 定量限与检测限考察

精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 以信噪比 10:1、3:1 分别计算定量限、检测限。结果, 没食子酸、儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇 4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷、番泻苷 A、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷的定量限分别为 3.48、4.30、6.40、4.40、3.39、2.87、8.40、4.95 ng, 检测限分别为 2.32、2.58、2.40、2.64、2.26、1.23、4.20、2.97 ng。

2.5 精密度的试验

取“2.2.2”项下混合对照品贮备液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 没食子

酸、儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷、番泻苷A、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷峰面积的RSD分别为1.66%、1.72%、2.27%、1.76%、2.29%、1.81%、2.53%、1.96%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.1”项下供试品溶液(编号:S21)适量,分别于室温下放置0、3、6、12、18、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷、番泻苷A、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷峰面积的RSD分别为4.84%、4.20%、4.14%、4.72%、4.16%、4.33%、1.36%、1.96%(n=6),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品粉末(编号:S21),共6份,每份约0.15 g,精密称定,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中8个成分的含量。结果,没食子酸、儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷、番泻苷A、4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷的平均含量分别为0.442、4.580、0.060、0.314、1.280、0.377、3.953、1.000 mg/g, RSD分别为1.53%、3.65%、1.23%、2.21%、2.29%、1.47%、2.59%、2.91%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的样品粉末(编号:S21),共6份,每份约0.075 g,分别加入一定量的各单一对照品贮备液适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

2.9 耐用性试验

取样品粉末(编号:S21)适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件[流动相B不同浓度比例(0.05%磷酸水溶液、0.10%磷酸水溶液、0.15%磷酸水溶液)、不同流速(0.9、1.0、1.1 mL/min)、不同柱温(20、25、30 ℃)]进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品中8个成分的含量,结果见表4。结果表明,该方法能够满足试验要求,耐用性良好。

2.10 样品含量测定

取22批样品粉末适量,按“2.2.1”项下方法制备供试

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	已知样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
没食子酸	0.033 7	0.037 0	0.070 9	100.54	97.16	2.78
	0.033 6	0.037 0	0.068 9	95.41		
	0.033 7	0.037 0	0.069 9	97.84		
	0.033 7	0.037 0	0.070 7	100.00		
	0.033 6	0.037 0	0.068 5	94.32		
	0.033 6	0.037 0	0.068 7	94.86		
儿茶素	0.336 8	0.374 0	0.677 7	91.15	96.23	3.72
	0.336 6	0.374 0	0.682 0	92.35		
	0.337 0	0.374 0	0.700 0	97.06		
	0.337 3	0.374 0	0.707 2	98.90		
	0.336 5	0.374 0	0.708 1	99.36		
	0.336 0	0.374 0	0.704 6	98.56		
表儿茶素	0.004 5	0.005 1	0.009 2	92.16	95.75	2.39
	0.004 5	0.005 1	0.009 3	94.12		
	0.004 5	0.005 1	0.009 4	96.08		
	0.004 5	0.005 1	0.009 5	98.04		
	0.004 5	0.005 1	0.009 5	98.04		
	0.004 5	0.005 1	0.009 4	96.08		
白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷	0.024 3	0.027 3	0.051 4	99.27	97.68	3.17
	0.024 3	0.027 3	0.049 8	93.41		
	0.024 3	0.027 3	0.050 0	94.14		
	0.024 4	0.027 3	0.051 9	100.73		
	0.024 3	0.027 3	0.051 5	99.63		
	0.024 3	0.027 3	0.051 3	98.90		
表儿茶素没食子酸酯	0.093 2	0.099 8	0.190 9	97.90	96.91	1.99
	0.093 2	0.099 8	0.190 8	97.80		
	0.093 3	0.099 8	0.187 0	93.89		
	0.093 4	0.099 8	0.188 3	95.09		
	0.093 1	0.099 8	0.191 3	98.40		
	0.093 0	0.099 8	0.191 2	98.40		
白藜芦醇4'-O-β-D-(6''-O-没食子酰)-葡萄糖苷	0.028 7	0.023 0	0.052 1	101.74	98.05	3.71
	0.028 7	0.023 0	0.052 1	101.74		
	0.028 8	0.023 0	0.051 7	99.57		
	0.028 8	0.023 0	0.050 1	92.61		
	0.028 7	0.023 0	0.051 0	96.96		
	0.028 7	0.023 0	0.050 7	95.65		
番泻苷A	0.294 7	0.241 2	0.536 9	100.41	98.29	3.76
	0.294 5	0.241 2	0.534 5	99.50		
	0.295 0	0.241 2	0.518 5	92.66		
	0.295 2	0.241 2	0.527 5	96.31		
	0.294 5	0.241 2	0.543 9	103.40		
	0.294 0	0.241 2	0.529 1	97.47		
4'-羟基苯基-2-丁酮-4'-O-β-D-(2''-O-没食子酰-6''-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷	0.075 7	0.070 3	0.147 9	102.70	98.48	3.06
	0.075 7	0.070 3	0.143 8	96.87		
	0.075 8	0.070 3	0.147 4	101.85		
	0.075 8	0.070 3	0.142 9	95.45		
	0.075 6	0.070 3	0.144 0	97.30		
	0.075 5	0.070 3	0.143 5	96.73		

品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算各批样品中8个成分的含量,结果见表5。

3 讨论

有研究指出,在280 nm波长处,大黄成分检出最为全面^[17]。鉴于此,本研究在200~800 nm波长范围内对

表4 耐用性试验结果

Tab 4 Results of durability tests

试验条件		没食子酸		儿茶素		表儿茶素		白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷		表儿茶素没食子酸酯		白藜芦醇4'-O-β-D-(6"-O-没食子酰)-葡萄糖苷		番泻苷A		4'-羟基苯基-2-丁酮4'-O-β-D-(2"-O-没食子酰-6"-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷	
		含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %	含量, mg/g	RSD, %
流动相(B)	0.05%磷酸水溶液	0.433	1.48	4.308	3.32	0.058	0.49	0.323	0.87	1.230	2.55	0.374	1.37	3.944	0.72	1.059	1.97
	0.10%磷酸水溶液	0.446		4.372		0.058		0.317		1.193		0.384		3.915		1.083	
	0.15%磷酸水溶液	0.441		4.589		0.058		0.312		1.170		0.378		3.888		1.041	
流速, mL/min	0.9	0.444	0.80	4.737	4.75	0.058	0.50	0.319	0.50	1.234	3.19	0.388	1.80	3.909	0.30	1.100	1.03
	1.0	0.446		4.308		0.058		0.317		1.230		0.374		3.888		1.083	
	1.1	0.439		4.502		0.058		0.321		1.165		0.380		3.890		1.104	
柱温, °C	20	0.429	2.49	4.444	4.74	0.061	2.39	0.325	0.67	1.251	3.96	0.379	3.89	3.804	2.56	1.104	1.00
	25	0.446		4.589		0.058		0.321		1.230		0.374		3.888		1.083	
	30	0.449		4.178		0.059		0.324		1.159		0.402		4.002		1.095	

表5 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 5 Results of content determination of samples(n=3, mg/g)

编号	没食子酸	儿茶素	表儿茶素	白藜芦醇4'-O-葡萄糖苷	表儿茶素没食子酸酯	白藜芦醇4'-O-β-D-(6"-O-没食子酰)-葡萄糖苷	番泻苷A	4'-羟基苯基-2-丁酮4'-O-β-D-(2"-O-没食子酰-6"-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷	合计
S1	1.127	4.660	0.885	0.926	2.042	0.487	5.406	0.717	16.249
S2	0.539	6.555	0.111	0.588	1.796	0.469	5.949	0.905	16.912
S3	1.701	46.427	5.697	6.712	15.995	9.596	11.539	5.711	103.379
S4	0.329	51.946	6.293	8.198	20.551	8.929	11.845	4.383	112.473
S5	0.761	17.744	0.418	6.983	12.307	10.721	5.866	1.891	56.690
S6	0.586	24.674	2.357	6.440	8.625	9.637	12.069	3.270	67.658
S7	0.482	37.843	9.435	2.283	9.674	8.772	0.170	5.254	73.913
S8	0.504	19.702	7.996	2.280	10.163	3.711	7.499	4.762	56.617
S9	0.406	7.465	3.127	2.971	2.876	4.143	5.162	2.708	28.858
S10	0.640	37.527	15.515	4.551	11.316	8.820	8.215	4.531	91.116
S11	1.667	31.029	14.240	5.037	10.234	10.637	4.682	4.427	81.955
S12	0.698	21.340	6.018	2.775	7.264	9.875	0.962	3.878	52.811
S13	0.154	3.145	0.105	0.120	3.465	0.436	9.272	1.390	18.086
S14	1.158	46.864	16.700	1.784	16.511	9.889	9.014	6.762	108.682
S15	0.232	11.580	2.137	2.225	8.280	10.354	11.963	5.059	51.829
S16	11.689	13.098	2.972	1.678	5.236	12.861	4.575	4.156	56.265
S17	0.483	48.435	13.200	6.258	15.173	16.966	7.987	5.814	114.317
S18	0.215	14.058	3.331	1.414	4.099	6.146	6.092	3.178	38.534
S19	2.100	11.953	1.142	0.629	4.853	0.511	4.087	0.741	26.016
S20	0.607	10.839	0.166	0.299	2.384	0.341	3.244	0.565	18.445
S21	0.447	4.477	0.060	0.323	1.239	0.382	3.918	1.006	11.852
S22	0.339	33.377	6.446	4.225	12.927	4.665	10.093	1.618	73.689
平均值	1.221	22.943	5.380	3.123	8.500	6.743	6.800	3.306	58.016
RSD, %	196.12	69.99	99.76	80.52	64.84	71.97	50.80	58.57	58.36

样品进行了全波长扫描。结果发现,8个待测成分在280 nm波长处均有较强吸收,故选择280 nm作为检测波长。同时,笔者又考察了甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液两种流动相体系对待测成分分离情况的影响。结果发现,以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相时的出峰数目较多,且分离度良好,故选择甲醇-0.1%磷酸水溶液作为本研究的流动相。

虽然有研究采用HPLC法同时测定了大黄中2个蒽酮、3个鞣质和4个苯丁酮类成分含量^[18],4个苯丁酮类成分含量^[19],2个蒽酮和2个鞣质类成分含量^[4,20],1个蒽酮和2个鞣质类成分含量^[21]以及2个苯丁酮类和1个二苯乙烯类成分的含量^[22],但均未建立鞣质类成分表儿茶素和二苯乙烯类成分白藜芦醇4'-O-β-D-(6"-O-没食子

酰)-葡萄糖苷含量的测定方法。本研究结果显示,大黄药材样品中这两个成分的含量较高,分别为0.060~16.700、0.341~16.966 mg/g,因此有必要对其进行定量分析。

含量测定结果显示,22批大黄药材中8个成分含量存在较大差异,S1、S2、S21中8个成分的含量相对较低,而S3、S4、S14、S17含量相对较高,其含量差异可能与药材原植物的生长年限有关。本课题组在大黄产区考察发现,药用大黄、掌叶大黄和唐古特大黄的生长年限一般分别为1、3、5年;同一基源、同一产区的成分含量也会存在较大差异,这可能与其生长环境如海拔、经度、纬度、光照、种子遗传等有关^[4,23-24]。

综上所述,本研究所建方法简便、准确、专属性强,

可用于同时测定大黄药材中8个非蒽醌类成分的含量。

参考文献

- [1] 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, 2015:23-24.
- [2] 窦志华, 许波, 蔡向明, 等. 大黄结合型蒽醌含药血清指纹图谱研究[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(17):1453-1456.
- [3] WANG Q, LU ZW, ZHANG L, et al. Applying characteristic fragment filtering for rapid detection and identification of ingredients in rhubarb by HPLC coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(14):2854-2862.
- [4] 商彤, 胡会娟, 孟磊, 等. 遗传和环境对唐古特大黄功效成分含量的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11):2246-2253.
- [5] 龚小红, 赵梦杰, 党琨, 等. 基于主成分分析不同产地大黄13个成分量的比较研究[J]. 中草药, 2017, 48(23):4994-4999.
- [6] 李冬华, 张平, 张明童, 等. 全国大黄药材及其饮片评价性抽检结果分析与一测多评法研究[J]. 中国药事, 2018, 32(6):775-783.
- [7] 张志, 李听弦, 姚楠, 等. 多指标正交试验优化大黄的湿纸煨制工艺[J]. 中国药房, 2018, 29(7):964-967.
- [8] 窦志华, 乔进, 卞理, 等. 指纹图谱与一测多评法相结合的大黄质量控制方法[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(5):442-448.
- [9] CHEN T, YANG X, WANG NN, et al. Separation of six compounds including two n-butyrophenone isomers and two stibene isomers from *Rheum tanguticum* Maxim by recycling high speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography[J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(19):3660-3668.
- [10] 李丽. 大黄炮制前后物质基础变化规律研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2011.
- [11] 刘月红, 黄政海, 董玲, 等. 高效液相色谱法同时测定大黄中14种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23):4514-4519.
- [12] 吴佩根, 程小丽, 刘春生, 等. 不同唐古特大黄变异类型功效组分含量的差异研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(14):2607-2611.
- [13] 余意, 高峰, 李佳兴, 等. UPLC-MS/MS测定何首乌中10个二苯乙烯苷类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23):87-92.
- [14] European Pharmacopoeia Commission. *European Pharmacopoeia* 9.0[S]. Strasbourg: European Drug Quality Administration, 2017:1496-1497.
- [15] SUN JC, WU YT, DONG SJ, et al. Influence of the drying method on the bioactive compounds and pharmacological activities of rhubarb[J]. *J Sci Food Agric*, 2018, 98(9):3551-3562.
- [16] 许波. 大黄质量评价及蒽醌类成分提取纯化工工艺研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2017.
- [17] 赵倩, 陈育鹏, 崔旭盛, 等. 掌叶大黄UPLC多指标成分测定及指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10):1697-1710.
- [18] 刘月红, 黄政海, 董玲, 等. 高效液相色谱法同时测定大黄中14种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23):4514-4519.
- [19] 高晓燕. RP-HPLC测定大黄中4个苯丁酮类化合物[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(17):2594-2596.
- [20] 程小丽, 魏胜利, 刘春生, 等. RP-HPLC-DAD同时测定大黄中9种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18):99-102.
- [21] 颜永刚, 尹立敏, 王红艳, 等. HPLC法同时测定大黄炮制品中10种化学成分的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(27):3839-3842.
- [22] 李丽, 张村, 肖永庆, 等. 大黄药材中苯丁酮及二苯乙烯类成分的含量测定[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(10):670-672, 675.
- [23] 颜永刚, 王红艳, 邓翀, 等. 生长年限、海拔和光照对大黄中8种成分量的影响研究[J]. 中草药, 2017, 48(11):2285-2291.
- [24] 孟磊, 胡会娟, 商彤, 等. 遗传和环境对掌叶大黄功效成分含量的影响研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(12):2495-2502.

(收稿日期:2019-02-01 修回日期:2019-05-14)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅