

## 生大黄与一至九制大黄 HPLC 指纹图谱的对比

张 然 胡昌江\* 李 倩 帅小翠 徐志毅 王智鹏

(成都中医药大学药学院 四川 成都 611137)

**摘要:** 目的 建立生大黄与一至九制大黄的 HPLC 指纹图谱,探讨九蒸九晒对大黄内在成分的影响。方法 用 HPLC 指纹图谱分析了生大黄和一至九制大黄。采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm),以甲醇和 0.1% 磷酸水梯度洗脱,检测波长 254 nm,柱温 35 °C,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。结果 九制大黄与生品比较有 3 个新的色谱峰出现,5 个色谱峰消失,6 个色谱峰变小,5 个指标峰相对含量均发生变化;从一到九制大黄的指纹图谱来看,五制大黄与九制大黄的相似度差异甚微。结论 九制大黄的化学成分既有量的变化,也有质的变化,五制大黄或可取代九制大黄。

**关键词:** 生大黄;九制大黄;五制大黄;高效液相色谱法;指纹图谱;梯度洗脱法

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-0103(2011)04-0372-04

### Comparison of the HPLC fingerprints of the raw and the one to nine-fold processed *Rheum officinale*

ZHANG Ran, HU Chang-jiang\*, LI Qian, SHUAI Xiao-cui, XU Zhi-yi, WANG Zhi-peng

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611137 P. R. China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To study the effect of steamed and shined process for 9 times on the ingredient of *Rheum officinale* Baill. by establishing the HPLC fingerprints illustrative plates of the one to nine-fold processed and raw *Rheum officinale* Baill. **METHODS** HPLC/UV fingerprints of one to nine-fold processed and raw *Rheum officinale* Baill. were analyzed, with using the chromatographic column of Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm 5 μm) and were eluted gradiently with methanol and 0.1% phosphoric acid-water with wavelength, Column temperature, Flow rate of 254 nm, 35 °C and 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, respectively. **RESULTS** Compared with raw *Rheum officinale* Baill., 3 new chromatographic peaks emerged, 5 peaks disappeared, 6 peaks diminished and the content of 5 index peaks in the nine-fold processed one changed. From the fingerprints illustrative plates of one to nine-fold processed *Rheum officinale* Baill., the discrepancy between five-fold and nine-fold processed *Rheum officinale* Baill. was very slight. **CONCLUSION** There are not only quantitative change but also qualitative change in chemical ingredients in the ninefold processed *Rheum officinale* Baill. Additionally the five-fold processed *Rheum officinale* Baill. can take place of the nine-fold processed ones.

**Key words:** Raw *Rheum officinale* Baill.; Nine-fold processed *Rheum officinale* Baill.; Five-fold processed *Rheum officinale* Baill.; HPLC; Fingerprints; Gradient elution

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2011)04-0372-04

九制大黄为蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根及根茎经九蒸九晒后所得<sup>[1]</sup>。历代医药学家认为九制大黄疗效高,不良反应低,倍受推崇和肯定。生大黄性寒、味苦,以泻下攻积、清热泻火、凉血解毒力胜;但临床应用时泻下峻猛,苦寒伤胃而致腹痛;九制大黄其泻下缓和,可消除腹痛之弊,适合于老人、小孩及体质虚弱的患者使用,临床应用效果较好<sup>[2-3]</sup>。但由于九制大黄的工艺繁杂,不适于大生产,且该品种濒临灭绝。为振兴传统的炮制品,拓宽用药范围,采用梯度洗脱法建立了九制大黄的 HPLC 指纹图谱分析法,对生大黄以及一到九制大黄的指纹图谱进行对比研究,可为缩短九制

大黄的生产工艺提供依据。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(日本岛津)。芦荟大黄素(批号:110756-200806,纯度 > 98%)、大黄酸(批号:110757-200206,纯度 > 98%)、大黄素(批号:110756-200110,纯度 > 98%)、大黄酚(批号:110796-200716,纯度 > 98%)、大黄素甲醚(批号:110758-200611,纯度 > 98%)(中国药品生物制品检定所);甲醇为色谱纯;水为纯净水;其余试剂为分析纯;大黄药材购于成都新荷花大黄种植基地,经

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划重大专项(2009BAI84B04)

作者简介:张然,四川成都,正攻读中药炮制专业的硕士学位。Email: omi777@163.com

\* 通信作者( Correspondent author) ,Email: hhccj@ hotmail.com

卢先明教授鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根茎,按传统的九制大黄的方法,制得一制、二制、……、九制大黄<sup>[1]</sup>。

## 1.2 方法与结果

**1.2.1 溶液的制备** 精密称取适量大黄素、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚对照品,加甲醇分别制成含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚各  $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和含  $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  大黄素甲醚的对照品混合溶液。分别精密称取约 0.5 g 生品、一至九制大黄粉末(过 4 号筛),加入 25 mL 甲醇中,称重,浸泡 12 h,超声 30 min,提取液放冷至室温,补足重量,过滤,取续滤液作为供试品溶液<sup>[2]</sup>。

**1.2.2 色谱条件及系统适用性试验** 采用 Kromasil  $\text{C}_{18}$  色谱柱(250 mm × 4.6 mm,  $5 \mu\text{m}$ );流动相 A 为甲醇, B 为 0.1% 磷酸水,梯度洗脱程序为: 0 ~ 5 min, 5% ~ 20% A, 95% ~ 80% B, 5 ~ 15 min, 20% ~ 35% A, 80% ~ 65% B, 15 ~ 23 min, 35% ~ 40% A, 65% ~ 60% B, 23 ~ 28 min, 40% ~ 47% A, 60% ~ 53% B, 28 ~ 43 min, 47% ~ 55% A, 53% ~ 45% B, 43 ~ 63 min, 55% ~ 75% A, 45% ~ 25% B, 63 ~ 78 min, 75% ~ 100% A, 25% ~ 0 B, 78 ~ 85 min, 100% A; 检测波长 254 nm; 记录时间 85 min; 柱温 35 °C; 流速  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**1.2.3 精密度试验** 取同一份供试品溶液,连续进样 5 次,记录色谱图。结果表明:各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的比值无明显变化, RSD 均小于 3%,表明仪器精密度良好。

**1.2.4 稳定性试验** 取同一份供试品溶液,记录 0、3、6、9、12、24 h 时的色谱图。用相似度计算,均大于 0.99。表明样品 24 h 内稳定性良好。

**1.2.5 重复性试验** 取同一生大黄粉末 5 份,精密称定,按“1.2.1”项方法制备供试液,在“1.2.2”项色谱条件下记录色谱图。用相似度计算均大于 0.99,表明重复性良好。

**1.2.6 九制大黄和生大黄指纹图谱的测定** 按“1.2.1”项方法制备生大黄和九制大黄的供试品溶液,按“1.2.2”项色谱条件记录色谱图。对生品和九制的指纹图谱峰进行分析(图 1), 3 个区有明显变化(图 2)。以指标成分大黄酚(图 1 中峰 18)为内参比峰,计算其共有峰的相对峰面积、相对保留时间、相似度(表 1)。通过图 1~2 的直观分析表 1 的数据分析可知:指纹图谱上多了 3 个新峰(图 2 中峰 1、2、3),有 5 个峰消失(图 2 中峰 4、8、11、12、14),有 6 个色谱峰变小(图 2 中峰 5、6、7、9、10、13),5 个指标成分峰含量发生变化(图 1 中峰 15 芦荟大黄素、峰 16 大黄酸、峰 17 大黄素、峰 18 大黄酚、峰 19 大黄素甲

醚) 图 2 中 D 区中的峰基本消失。

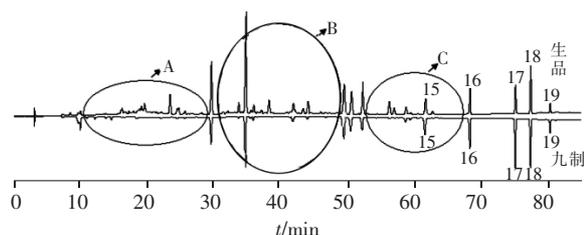


图 1 生大黄和九制大黄的指纹图谱

Fig 1 Fingerprint chromatogram of raw and nine-fold processed *Rheum palmatum* L.

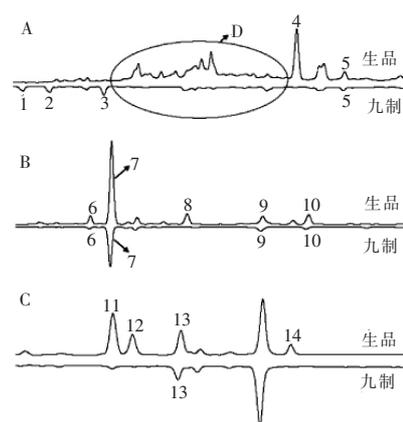


图 2 生大黄和九制大黄的指纹图谱中 A 区(A)、B 区(B)、C 区(C)的变化

Fig 2 The change in part (A), part (B) and part (C) of raw and nine-fold processed *Rheum palmatum*'s fingerprint chromatogram

表 1 生大黄与九制大黄 HPLC 指纹图谱中各峰的相对保留时间与相对峰面积

Table 1 Relative retention time and relative peak area in HPLC fingerprint chromatogram peaks of raw and nine-fold processed *Rheum palmatum* L.

Peaks	$t_R$ / min		Relative peak area	
	raw	nine-fold processed	raw	nine-fold processed
1	-	0.142	-	0.116
2	-	0.157	-	0.105
3	-	0.189	-	0.124
4	0.302	-	0.663	-
5	0.331	0.330	0.226	0.074
6	0.436	0.435	0.359	0.075
7	0.449	0.448	2.746	1.234
8	0.495	-	0.474	-
9	0.541	0.540	0.486	0.208
10	0.570	0.568	0.436	0.094
11	0.726	-	0.454	-
12	0.735	-	0.226	-
13	0.758	0.757	0.248	0.137
14	0.810	-	0.095	-
15	0.797	0.796	0.564	0.571
16	0.882	0.882	0.777	0.887
17	0.970	0.969	0.672	1.135
18	1	1	1	1
19	1.037	1.037	0.198	0.269

**1.2.7 一至九制大黄指纹图谱的对比** 按“1.2.1”项方法制备一至九制大黄供试品溶液,按“1.2.2”项色谱条件记录色谱图,分析对一制到九制的指纹图谱峰(图3)。以指标成分大黄酚(图3中峰14)为内参比峰,计算其共有峰的相对保留时间、相对峰面积、相似度(表2、3)。通过图3的直观分析以及表2、3的数据分析可知:指纹图谱上多了3个新峰(图3中峰1、2、6),有2个峰消失(图3中峰3、10),有5个色谱峰变小(图3中峰4、5、7、8、9)5个指标成分峰含量发生变化(图3中峰11、12、13、14、15)。

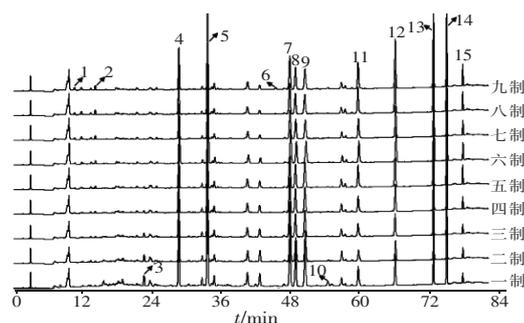


图3 一制到九制大黄的指纹图谱

Fig 3 Fingerprint chromatogram of one to nine - fold processed *Rheum palmatum* L.

表2 一制至九制大黄的HPLC指纹图谱各峰的相对保留时间、相对峰面积及相似度

Table 2 Relative retention time, relative peak area and the similarity in HPLC fingerprint chromatogram peaks of one to nine - fold processed *Rheum palmatum* L.

Items	Peaks	Processed <i>Rheum palmatum</i> L.								
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	9th
$t_R$ /min	1	0.141	0.141	0.141	0.141	0.142	0.142	0.142	0.141	0.142
	2	0.189	0.189	0.189	0.189	0.189	0.190	0.189	0.189	0.189
	3	0.301	0.302	0.301	0.301	0.302	0.303	0.302	0.301	0.302
	4	0.382	0.382	0.382	0.381	0.382	0.383	0.382	0.382	0.382
	5	0.448	0.448	0.448	0.448	0.448	0.449	0.448	0.448	0.448
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.605
	7	0.638	0.639	0.638	0.638	0.638	0.640	0.638	0.638	0.638
	8	0.651	0.652	0.651	0.651	0.651	0.653	0.651	0.651	0.651
	9	0.673	0.674	0.673	0.673	0.673	0.675	0.674	0.673	0.673
	10	0.725	0.726	-	-	-	-	-	-	-
	11	0.796	0.796	0.795	0.796	0.796	0.797	0.796	0.795	0.796
	12	0.881	0.882	0.881	0.881	0.881	0.882	0.882	0.881	0.882
	13	0.969	0.970	0.969	0.970	0.969	0.973	0.970	0.969	0.969
	14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	15	1.037	1.037	1.037	1.037	1.037	1.037	1.037	1.037	1.037
Relative peak area	1	0.003	0.059	0.054	0.067	0.082	0.098	0.126	0.101	0.116
	2	0.085	0.128	0.126	0.088	0.087	0.106	0.147	0.117	0.124
	3	0.398	0.380	0.255	0.059	0.064	0.055	0.048	0.023	0.036
	4	1.218	1.613	1.432	1.233	0.823	0.868	0.898	0.864	0.775
	5	2.445	2.995	2.580	2.215	1.324	1.408	1.442	1.109	1.234
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.052
	7	1.205	1.741	1.454	1.300	0.817	0.893	0.905	0.709	0.763
	8	0.840	1.015	0.935	0.863	0.533	0.575	0.598	0.460	0.483
	9	1.088	1.303	1.126	0.957	0.624	0.600	0.607	0.455	0.493
	10	0.141	0.067	-	-	-	-	-	-	-
	11	0.474	0.472	0.530	0.566	0.471	0.528	0.564	0.528	0.571
	12	0.622	0.667	0.727	0.811	0.644	0.728	0.844	0.864	0.877
	13	0.587	0.827	0.863	1.029	0.826	0.953	1.080	0.963	1.135
	14	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	15	0.147	0.268	0.233	0.262	0.249	0.246	0.259	0.239	0.269
Similarity		0.894	0.892	0.922	0.955	0.982	0.988	0.992	0.998	1.000

## 2 讨论

通过生品与九制大黄的指纹图谱比较,九制大黄指纹图谱上多了3个新色谱峰、5个峰消失、6个峰变小、5个指标成分峰的含量发生了变化。通过标准对照法可以看出:5个指标成分峰中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚从生品到二制变小,三制到九制有变大的趋势;大黄素甲醚从生品到三制变小,四制到九制有变大的趋势。由于5个指标性成

分均为游离蒽醌类,可能与九制后结合蒽醌类减少,游离蒽醌类增多的理论有关,因此,泻下和腹痛作用减弱,通便和清热作用增强,但是否与这些成分的变化有关,有待药效学的进一步验证。通过一制至九制大黄的叠加图以及对其相对保留时间、相对峰面积和相似度的比较,五制大黄与九制大黄的变化甚微,从节省工时考虑认为五制大黄或可取代九制大黄,但需药效学的验证。

A 和总皂甙含量的影响 [J]. 华西药学期刊, 2010, 25(3): 331 - 333.

参考文献:

- [1] 禹玉洪, 胡昌江, 谢秀琼, 等. 九制大黄炮制过程中多糖和鞣质的含量变化研究 [J]. 中成药, 1999, 21(8): 405 - 408.  
[2] 柳莹, 卢敬光, 吴丽, 等. 不同炮制工艺对藏边大黄中藏黄苷

- [3] 杨宏博, 冯平, 李宝才. 大黄抗病毒作用的研究进展 [J]. 华西药学期刊, 2009, 24(4): 428 - 430.

收稿日期: 2010 - 10 - 03

## 黄芪颗粒中黄芪甲苷和总皂苷的测定

王一茜<sup>1</sup>, 曾大富<sup>2</sup>, 祝琳<sup>1</sup>, 晁若冰<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 四川百利药业有限责任公司, 四川 成都 611130)

**摘要:** 目的 测定黄芪颗粒中黄芪甲苷和总皂苷的含量。方法 采用 HPLC 法测定黄芪甲苷的含量, 采用比色法测定总皂苷的含量。结果 黄芪甲苷 0.5 ~ 10  $\mu\text{g}$  与峰面积呈良好的线性关系 ( $r = 0.9997$ ), 平均回收率为 99.1%,  $RSD = 4.1\%$  ( $n = 9$ ); 总皂苷测定以黄芪甲苷为对照, 0.1 ~ 1.0 mg 与吸光度呈良好的线性关系 ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率为 100.4%,  $RSD = 3.1\%$  ( $n = 9$ )。结论 黄芪甲苷和总皂苷的含量测定方法准确、重复性好、结果可靠, 可作为黄芪颗粒的质量控制方法。

**关键词:** 高效液相色谱法; 比色法; 黄芪颗粒; 黄芪甲苷; 总皂苷

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 0103(2011)04 - 0375 - 03

### Determination of astragaloside IV and total saponins in Huangqi granules

WANG Yi-xi<sup>1</sup>, ZENG Da-fu<sup>2</sup>, ZHU Lin<sup>1</sup>, CHAO Ruo-bing<sup>1\*</sup>

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China; 2. Sichuan Baili Pharm Limited Liability Company, Chengdu, Sichuan, 611130 P. R. China)

**Abstract:** **OBJECTIVE** To establish the method for determination of astragaloside IV and total saponins in Astragalus granules. **METHODS** The contents of astragaloside IV were determined by HPLC and contents of total saponins were determined by colorimetry. **RESULTS** The method for determination of astragaloside IV was linear at a range of 0.5 - 10  $\mu\text{g}$  ( $r = 0.9997$ ). The average recovery was 99.1% and  $RSD$  was 4.1% ( $n = 9$ ). The determination of total saponins was performed with astragaloside serving as standard. The method for determination of total saponins was linear at a range of 0.1 - 1.0 mg ( $r = 0.9999$ ). The average recovery was 100.4% and  $RSD$  was 3.1% ( $n = 9$ ). **CONCLUSION** The method for determination of astragaloside IV and total saponins were accurate, reproducible, reliable and can be used as the quality control of Huangqi granule.

**Key words:** HPLC; Colorimetry; Huangqi granule; Astragaloside IV; Total saponins

**CLC number:** R917

**Document code:** A

**Article ID:** 1006 - 0103(2011)04 - 0375 - 03

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。黄芪颗粒是黄芪经加工制成的颗粒剂, 主要用于治疗气短、心悸、虚脱、自汗、体虚、浮肿、慢性肾炎、久泻脱肛、子宫脱垂、痈疽难溃、疮口久不愈合等症<sup>[1]</sup>。黄芪药材主要含皂苷、黄酮、多糖等成分。黄芪颗粒中黄芪甲苷及总皂苷的含量测定方法未见文献报道, 现参考《中国药典》中黄芪的含量测定方法<sup>[2]</sup>, 建立了黄芪颗粒中黄芪甲苷及总皂苷的含量测定方法, 并进行了方法验证。所用方法重复性好、

灵敏度高, 可用于黄芪颗粒的质量控制。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

LC-10AT vp 高效液相色谱仪 (日本岛津); UV-2102C 紫外-可见分光光度计 (上海尤尼柯仪器有限公司)。黄芪甲苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110781 - 200613); 黄芪颗粒、黄芪颗粒阴性样品 (四川百利药业有限责任公司, 产品批号: 070701、070702、070703、070704, 阴性样品批号: K070601); 乙腈为色谱纯; 其余试剂为分析纯。

作者简介: 王一茜, 女, 正攻读药物分析专业的硕士学位。Email: cicywong520@163.com

\* 通信作者 (Correspondent author), Email: caoruobin@scu.edu.cn