

# 大黄药材指纹图谱研究

刘欣<sup>1</sup>, 胡芳弟<sup>1</sup>, 封士兰<sup>1</sup>, 赵健雄<sup>1</sup>, 李应东<sup>2</sup>, 徐静汶<sup>1</sup>, 宋平顺<sup>3</sup>

(1. 兰州医学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000;

3. 甘肃省药品检验所, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 采用高效液相色谱法, Hypersil ODS 柱, 甲醇-1.0%冰醋酸为梯度流动相, 研究了大黄的指纹图谱, 其中大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素作为参照物, 并对它们进行了含量测定. 检测波长: 430 nm. 共找出了 23 个共有峰, 其中的 5 个峰是参照物, 12 个样品之间的相似度在 90% 以上. 样品处理方法简单, 研究所得的大黄指纹图谱稳定性、重复性好, 可作为大黄药材的特征指纹图谱.

**关键词:** 大黄; 指纹图谱; 高效液相

中图分类号: O657.72

文献标识码: A

文章编号: 1006-3757(2004)03-0140-05

大黄性寒, 味苦. 能泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经. 用于实热便秘、积滞腹痛、湿热黄疸、瘀血经闭、急性阑尾炎、痈肿疔疮、烫伤等<sup>[1]</sup>. 北京医科大学药学院的范国强等研究了中国大黄属掌叶组大黄主要化学成分的高效液相色谱法指纹图谱, 用甲醇-水-甲酸作为梯度流动相, 研究了药用大黄、掌叶大黄、唐古特大黄、六盘山鸡爪大黄、秦岭大黄、裂叶大黄、绿花唐古特大黄等, 从中找出了 7 个共有峰. 该方法没有对大黄中的主要指标成分进行定位; 所使用的流动相中含有强酸性的甲酸, 对色谱柱的寿命影响比较大. 张立新等<sup>[2]</sup>研究了肾康注射液中大黄药材指纹图谱, 他们用水解法处理大黄药材样品, 从中找出了 7 个共有峰, 其中 5 个是大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素. 该方法先用甲醇提取样品, 再酸水解氯仿萃取法处理样品, 方法繁杂, 花费时间长. 朱玲英等<sup>[3]</sup>研究了大黄药材蒽醌苷元类成分的 HPLC 指纹图谱, 虽然采用了大黄酸作为参照物进行了指标成分峰的定位, 但并未测定其含量. 我们采用高效液相色谱法研究了甘肃、四川等不同产地 12 个大黄样品的指纹图谱, 用甲醇-水-冰醋酸作为梯度流动相, 分析了 23 个共有峰, 平均相似度为 98.59%. 用主要指标成分大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素等进行了定位,

并测定了它们的含量. 研究结果表明 10 个大黄样品指纹图谱的特征性及专属性强, 为全面评价大黄药材的质量提供了技术支持.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

美国 Waters2695 高效液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器, 甲醇为色谱纯 (山东禹王)、冰醋酸为分析纯 (北京化工厂)、超纯水 (兰州医学院第一附属医院药剂科), 大黄采自甘肃、四川、西藏. 由甘肃中医学院李成义教授鉴定为掌叶大黄 (*Rheum palmatum* L.). 大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素、掌叶大黄对照药材、唐古特大黄对照药材购自中国药品生物制品鉴定所.

### 1.2 色谱条件

Hypersil ODS 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 大连依利特公司生产, Kromasil ODS 保护柱 (4.6 mm × 10 mm, 5 μm). 甲醇-1.0%冰醋酸梯度流动相见表 1. 温度 25 °C. 色谱峰光谱采集范围: 220 ~ 500 nm; 以大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素为参照物检测波长 430 nm.

### 1.3 对照品溶液的制备

分别精密称取大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素

收稿日期: 2004-04-09; 修订日期: 2004-05-20.

基金项目: 甘肃省 2002 年省长基金项目 GSO24-A43-018.

作者简介: 刘欣 (1977 - ), 男, 分析化学专业硕士研究生.

甲醚、芦荟大黄素对照品 3.710、1.840、3.630、4.175、2.060 mg,用甲醇溶解定容至 5.0 mL。制成浓度分别为 0.742、0.368、0.726、0.835、0.412 mg/ml 的对照品贮备溶液。分别取大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素贮备溶液 0.1 mL,大黄素甲醚 0.05 mL 混合,用甲醇定容于 2 mL,制成对照品溶液。

表1 测定大黄指纹图谱的流动相

时间 / min	流速 / (mL/min)	醋酸水溶液 / %	甲醇 / %
0	1.0	95	5
10	1.0	70	30
40	1.0	40	60
60	1.0	40	60
70	1.0	0	100

## 1.4 供试品溶液的制备

### 1.4.1 丙酮水提取法

称取大黄药材粗粉 0.5 g,用 50% 丙酮水溶液超声提取 2 次 (30 min, 30 mL),过滤,滤液蒸干溶剂,残渣用 50% 甲醇水溶液溶解定容至 10 mL,0.45 μm 膜过滤。进样量 10 μL。波长扫描范围 220 ~ 500 nm。

### 1.4.2 甲醇提取法

称取大黄药材粗粉 0.5 g,用甲醇超声提取 3 次 (30 min, 30 mL),过滤,滤液蒸干溶剂,残渣用甲醇定容至 10 mL,0.45 μm 膜过滤。进样量 10 μL。波长扫描范围 220 ~ 500 nm。

### 1.4.3 氯仿提取法

称取大黄药材粗粉 0.1 g,用氯仿超声提取 3 次 (20 min, 30 mL),过滤,滤液蒸干溶剂,残渣用氯仿定容至 5 mL,0.45 μm 膜过滤。进样量 10 μL。波长扫描范围 220 ~ 500 nm。

### 1.4.4 酸水解-氯仿提取法

称取大黄药材粗粉 0.5 g,加 20% 硫酸 0.1 mL,水解 2 hr,再用氯仿超声提取 3 次 (30 min, 30 mL),过滤,滤液蒸干溶剂,残渣用氯仿定容至 10 mL,0.45 μm 膜过滤。进样量 10 μL。波长扫描范围 220 ~ 500 nm。

## 2 结果和讨论

### 2.1 检测波长的选择

对 220 ~ 500 nm 扫描的各波长下的色谱图进

行分析比较,结果在 430 nm 波长下各峰分离良好,而且大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素都有最大吸收,以它们作为大黄指纹图谱的参照峰。其它波长下虽然峰数比较多,但是分离不好。

### 2.2 供试品溶液制备方法的选择

用 4 种方法制备的供试品溶液,按色谱条件测定大黄的指纹图谱,结果用甲醇作为提取溶剂,得到的指纹图谱中检测不到对照品;氯仿作为溶剂处理样品,样品进到色谱柱,用流动相冲洗时容易产生沉淀,堵塞色谱柱;用酸水解法处理样品,所得到的指纹图谱的峰数目少,用丙酮-水作为提取溶剂得到的峰数多,各峰分离良好,而且对照品能全部检测到,因此选择丙酮-水法处理样品。

### 2.3 流动相的选择

先用最常用的甲醇和水作为流动相检测,不论如何调整比例,都得不到比较好的色谱图。于是将水换为醋酸溶液,分别试用了 0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 的醋酸溶液,结果 1.0% 的醋酸溶液和甲醇一起组成梯度流动相分离效果比较好,峰数也比较多。对照品大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素的保留时间分别为 56.481、70.318、72.152、73.997、47.350 min。

### 2.4 主要色谱峰的鉴定

样品指纹图谱中的 18、20、21、22、23 号峰的保留时间及紫外光谱图与大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素对照品色谱峰一致,故大黄样品指纹图谱中 18、20、21、22、23 号特征峰分别鉴定为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 (图 1,图 2)。

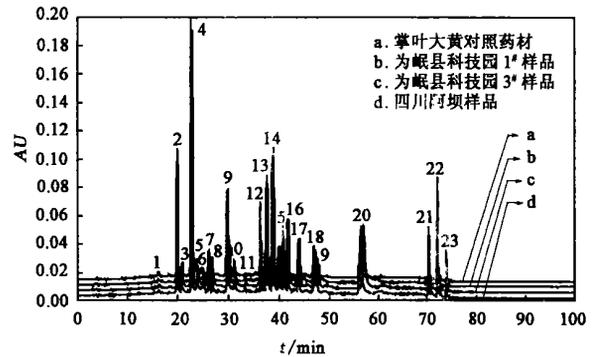


图1 大黄药材特征指纹图谱

Fig.1 Typical chromatogram of determined fingerprint of Dahuang

### 2.5 指纹图谱分析、数据处理及相似度

用 1.2 色谱条件测定了 12 批大黄药材样品指纹图谱。将各样品的各个峰紫外光图谱与大黄对照

药材各个峰紫外光图谱进行对比分析,找到 23 个共有峰.对各个样品的相似度进行了计算.数据处理用 Waters Pater Mach 相似度软件计算,采用的原理是夹角余弦法.以共有峰的峰面积计算相似度,其中 12 个样品的相似度为 95.72%~99.99%;平均相似度为 99.21%.可作为大黄药材的具有专属性的指纹图谱.结果见表 2.

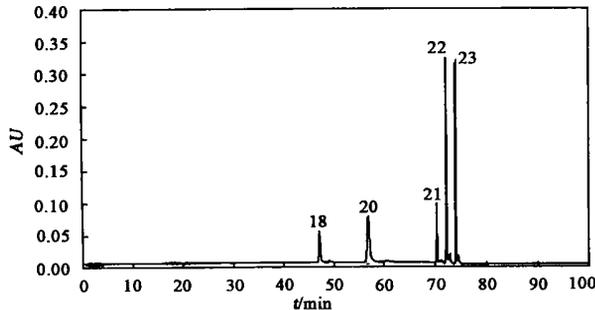


图 2 5 种对照品的 HPLC 图

Fig. 2 Chromatogram of five standards

## 2.6 相似度的精密度与重复性

分别取大黄对照药材样品溶液,连续进样 3 次,测定指纹图谱相似度的日内精密度,各共有峰的峰面积与对照品相比相似度(%)分别为 98.56、98.76、99.23,  $RSD$  为 0.346%;连续 3 d 进样,测定指纹图谱相似度的日间精密度,共有峰的峰面积与对照品相比相似度分别为 99.99%、98.56%、99.23%,  $RSD$  为 0.725%;分别取大黄对照药材 3 份,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,测定指纹图谱相似度的重复性,3 份对照药材共有峰的峰面积与对照品相比相似度分别为 99.99%、98.21%、99.59%,  $RSD$  为 0.932%.

## 3 大黄中指标成分含量测定

色谱条件 Hypersil ODS 柱 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) 大连依利特公司生产, Kromasil ODS 保护柱 (4.6 mm  $\times$  10 mm, 5  $\mu$ m). 甲醇-1%冰醋酸梯度流动相见表 3. 温度 25  $^{\circ}$ C. 检测波长 430 nm. 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的回

表 2 12 个大黄样品共有峰的保留时间(min)及与大黄对照药材之间的相似度

Table 2 Retention time of common peaks and similarity of 12 Dahuang samples

峰 编号	掌叶大黄 对照药材	唐古特大黄 对照药材	云南	岷县科 技园 1 <sup>#</sup>	岷县科 技园 2 <sup>#</sup>	岷县科 技园 3 <sup>#</sup>	岷县科 技园 4 <sup>#</sup>	西藏昌 都基达	礼县 1 <sup>#</sup>	礼县 2 <sup>#</sup>	礼县 3 <sup>#</sup>	四川阿坝 (野生)
1	16.236	16.076	16.378	16.378	16.378	16.378	16.170	16.553	16.329	16.329	16.211	16.329
2	19.930	19.930	19.984	20.147	20.055	20.047	19.852	20.337	20.074	20.073	19.898	20.728
3	22.804	22.823	22.866	22.900	22.925	22.240	22.693	22.543	22.291	22.299	22.749	22.693
4	23.820	23.794	23.421	23.089	23.655	22.942	23.687	23.364	23.008	23.003	23.765	23.677
5	25.219	25.212	25.139	25.340	25.248	25.403	25.120	25.783	25.184	25.239	25.182	25.061
6	26.187	26.188	26.281	26.543	26.381	26.347	26.082	26.757	26.434	26.427	26.147	26.116
7	26.969	27.017	27.205	27.412	27.655	27.293	27.076	27.531	27.345	27.339	27.123	26.892
8	30.052	30.057	29.908	29.948	29.948	29.943	29.938	30.022	30.049	30.060	29.996	29.937
9	30.554	30.570	30.270	30.190	30.270	30.209	30.734	30.685	30.454	30.270	30.769	30.460
10	30.854	31.239	31.333	31.556	31.475	31.372	31.078	31.792	31.114	31.564	31.421	31.134
11	35.602	35.671	35.806	35.702	35.822	35.721	35.501	35.656	35.967	35.953	35.577	35.747
12	36.411	36.435	36.527	36.750	36.619	36.570	36.335	36.577	36.649	36.640	36.396	36.341
13	37.529	37.553	37.624	37.842	37.728	37.181	37.436	36.978	37.262	37.269	37.509	37.439
14	38.777	38.811	38.919	39.176	39.322	38.953	38.666	39.449	39.076	39.059	38.753	39.686
15	39.985	40.010	40.180	40.434	40.243	40.122	39.879	40.243	40.315	40.300	39.969	39.901
16	41.758	41.787	41.920	41.310	41.995	40.185	40.784	41.524	41.179	41.157	40.872	41.683
17	43.039	42.984	42.650	42.922	42.575	43.213	43.761	42.413	42.048	42.037	43.851	43.788
18	47.528	47.587	47.151	47.451	47.175	47.170	47.404	47.826	47.284	47.281	47.499	47.436
19	48.813	48.874	47.813	47.787	47.820	47.835	48.020	48.004	47.980	47.984	47.989	47.936
20	56.362	56.543	57.002	57.669	56.881	57.009	56.173	58.349	57.256	57.188	56.302	56.235
21	70.150	70.201	70.307	70.865	70.231	70.318	70.131	70.176	70.351	70.322	70.135	70.137
22	71.980	72.009	72.083	72.195	72.018	72.096	72.599	72.261	72.115	72.090	72.603	72.606
23	73.795	73.823	73.906	73.997	73.819	73.907	73.789	74.047	73.928	73.903	73.797	73.797
相似度	99.99	95.67	99.99	99.99	97.17	95.72	99.99	99.99	99.99	99.99	99.99	93.12

归方程分别为:  $A = 4.31 \times 10^4 C - 2.22 \times 10^4$ ,  $r = 0.9995$ ;  $A = 8.13 \times 10^4 C - 5.68 \times 10^4$ ,  $r = 0.9975$ ;  $A = 4.38 \times 10^4 C - 3.50 \times 10^4$ ,  $r = 0.9931$ ;  $A = 6.62 \times 10^4 C - 4.10 \times 10^4$ ,  $r = 0.9993$ ;  $A = 5.07 \times 10^4 C - 3.61 \times 10^4$ ,  $r = 0.9978$ . 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的线性范围分别为 10.25

~ 206.00 ng、19.55 ~ 391.00 ng、9.20 ~ 184.00 ng、18.15 ~ 363.00 ng、10.44 ~ 208.80 ng. 样品处理方法同 1.4.1, 结果见表 4, 色谱图见图 3.

### 4 大黄中指标成分加样回收率试验

取 1.3 项下这 5 个标准品溶液定量加入已测定

表 3 测定大黄中五种蒽醌类化合物含量的流动相

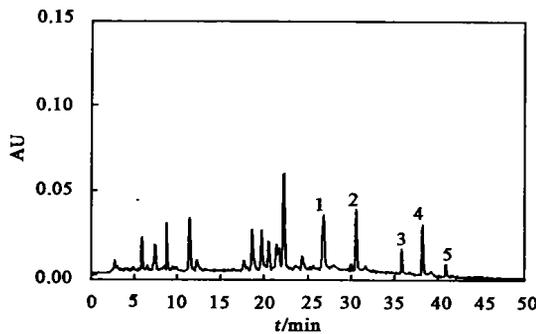
Table 3 Mobile phase for determination the five anthraquinones compounds

时间/min	流速/(mL/min)	醋酸水溶液/%	甲醇/%
0	1.0	60	40
20	1.0	40	60
40	1.0	0	100
50	1.0	0	100

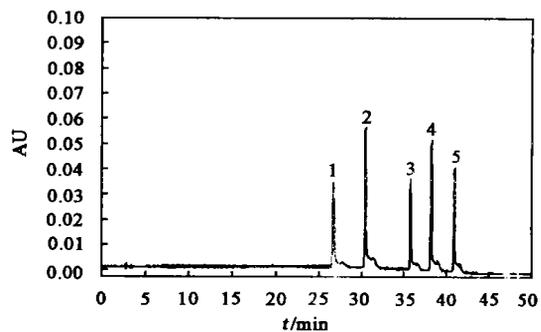
表 4 大黄样品中大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚的含量

Table 4 Contents of emodin, rhein, physcion, aloe-emodin and chrysophanol in Dahuang samples (mg/g)

样品	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
掌叶大黄	0.857	1.670	0.321	0.579	0.134
唐古特大黄	1.130	2.209	0.640	0.529	0.134
云南	0.526	0.888	0.297	0.321	0.092
宕昌	0.328	0.453	0.169	0.338	0.083
西藏昌都基达	1.099	2.260	0.624	0.581	0.119
礼县下坪 1	0.236	0.645	0.113	0.168	0.049
礼县下坪 2	0.488	0.749	0.138	0.281	0.067
岷县科技园	0.596	0.489	0.163	0.628	0.087
四川阿坝	0.443	0.599	0.189	0.547	0.114



(a) 大黄样品色谱图



(b) 对照品色谱图

图 3 大黄样品色谱图(a)和对照品色谱图(b)

Fig. 3 Chromatogram of Dahuang sample(a) and standard(b)

含量的大黄对照药材中, 依表 3 条件重复测定 5 次, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均回收率分别为 99.99%、101.56%、104.23%、98.56%、98.76%, RSD 分别为 2.21%、3.65%、

1.24%、1.52%、2.59%.

### 5 讨论

(1) 通过测定, 我们将大黄的指纹图谱评价标

准定为有 23 个特征峰,其中 18、20、21、22、23 号峰分别为芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚。

(2) 从大黄 10 个样品的高效液相色谱指纹图谱中可以看到,不同产地、不同采集时间的样品的指纹图谱的相似度都在 90% 以上,这说明大黄指纹图谱具有比较好的稳定性和重复性,可作为大黄药材的具有专属性的指纹图谱,从而为大黄药材质量控

制提供参考。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 徐国钧. 生药学[M]. 北京:人民卫生出版社,1996.
- [ 2 ] 张立新,周晓英,张良,等. 肾康注射液中大黄药材指纹图谱研究[J]. 药品检测,2001,10(10):36-37.
- [ 3 ] 朱玲英,任爱农,葛进,等. 大黄药材蒽醌苷元类成分的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2003,25(6):438-440.

## Study of Chromatography Fingerprint(CFP) of Dahuang

LIU Xin<sup>1</sup>, HU Fang-di<sup>1</sup>, FENG Shi-lan<sup>1</sup>,  
ZHAO Jiar-xiong<sup>1</sup>, LI Ying-dong<sup>2</sup>, XU Jing-wen<sup>1</sup>, SONG Ping-shun<sup>3</sup>

- (1. Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China;
- 2. Lanzhou Traditional Chinese Medical college, Lanzhou 730000, China;
- 3. Gansu Prorincial Institute for Drug Control, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** Subject and method: study of Chromatography Fingerprint (CFP) of Dahuang. High - performance liquid chromatography (HPLC) on a Hypersil ODS column with Methanol - 1.0% HAC gradient elution. CFP was referenced to emodin, rhein, physcion, aloë-emodin and chrysophanol, then contents of those were determined, determination wavelength 430nm. Result: 23 common peaks were pointed out and five peaks of those peaks were referenced, their similarity of 12 samples were more than 90%. Conclusion: The handling of samples were simple, the method on chromatography Fingerprint of Dahuang were reliable, good repetition and their similarity accorded with demand on "the technology guide to experiment studies on chromatography Fingerprint of injection of traditional Chinese medicine (TCM)", issued by the nation pharmacopoeial commission.

**Key words:** Dahuang; chromatography fingerprint (CFP); HPLC

**Classifying number:** O657.72