

UPLC 法同时测定大黄中 10 个蒽醌衍生物的含量

谭 鹏^{1,2}, 张海珠³, 张 青⁴, 张定堃⁴, 牛 明², 肖小河², 王伽伯^{2*}

1. 成都市食品药品检验研究院, 四川 成都 610045

2. 解放军第三〇二医院 全军中药研究所, 北京 100039

3. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000

4. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要:目的 建立基于超高效液相色谱(UPLC)法的大黄中 10 个蒽醌衍生物同时定量分析方法。方法 采用 Waters Acquity 超高效液相色谱仪, BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 柱温为 34 ℃; 甲醇和 0.1%磷酸水溶液的混合溶液为流动相, 梯度洗脱; 体积流量为 0.20 mL/min; 进样量为 2.0 μL; 检测波长为 410 nm。通过考察柱温和体积流量对保留时间、分离度、理论塔板数和对称因子 4 个重要的色谱参数的影响, 以此获得 5 个蒽醌糖苷的最佳的色谱分离度和稳健性。结果 优化得到柱温 34 ℃和体积流量 0.20 mL/min 为最佳分离条件, 根据最优参数, 建立一种新的基于 UPLC 的大黄中 10 个蒽醌衍生物同时定量分析方法。20 批次大黄测定结果显示, 2 种不同基原的大黄药材中芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄酸-8-O-β-D-葡萄糖苷的含量差异最大, 分别可超过 60、77 倍, 表明 2 种不同基原的大黄存在较大的质量差异。结论 基于 UPLC 最佳分离参数建立的 10 个蒽醌衍生物同时定量分析方法具有较好的稳健性, 对更加全面地从化学表征的角度评控不同来源的大黄药材的质量具有参考价值。

关键词: 大黄; 蒽醌衍生物; 超高效液相色谱法; 色谱参数优化; 定量分析; 质量评价

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)04-0928-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.028

Simultaneous determination of 10 anthraquinone derivatives in *Rhei Radix et Rhizoma* based on UPLC

TAN Peng^{1,2}, ZHANG Hai-zhu³, ZHANG Qing⁴, ZHANG Ding-kun⁴, NIU Ming², XIAO Xiao-he², WANG Jia-bo²

1. Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China

2. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China

3. Department of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

4. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To establish a simultaneous quantitative analytical method of 10 anthraquinone derivatives in *Rheum officinale* based on ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) for the quality evaluation and control. **Methods** The UPLC method was performed on a BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with a binary gradient mobile phase consisting of a mixture of methanol and 0.1% aqueous phosphoric acid with column temperature at 34 ℃. Using a gradient elution method; The flow rate was set at 0.20 mL/min; The injection volume was set at 2.0 μL; The detection wavelength was set at 410 nm. This study focused on the influence of analytical parameters on the separation efficiency of five anthraquinone glucosides in *R. officinale*. To obtain robust chromatographic resolution of the five anthraquinone glucosides, relatively important chromatographic parameters including the retention time, resolution, theoretical plate number, and symmetry factor were investigated by altering the column temperature and flow rate. **Results** The optimal column temperature was found to be 34 ℃, and the optimal flow rate was 0.20 mL/min. A new UPLC analytical method was developed for simultaneous quantification of 10 anthraquinone derivatives in *R. officinale* based on these optimal parameters. This UPLC-based analytical method was successfully applied to quantitative determination of 10 anthraquinone

收稿日期: 2017-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(81403126); 国家科技基础性工作专项(2015FY111500-080); 成都市科技局项目(2016-HM01-00312-SF); 成都中医药大学重点实验室开放基金(2016302)

作者简介: 谭 鹏 (1987—), 男, 中药学博士, 主要从事中药材质量标准研究。Tel: (010)66933323 E-mail: 2013tanpeng@sina.com

*通信作者 王伽伯, 副研究员, 主要从事中药品质 and 安全性评价研究。Tel: (010)66933323 E-mail: wjb0128@126.com

derivatives in *Rheum tanguticum* and *Rheum palmatum*. The analysis showed that there were significant content differences between aloe-emodin-8-*O*- β -D-glucoside (more than 60-fold) and rhein-8-*O*- β -D-glucoside (more than 77-fold) in the two species of rhubarbs tested. **Conclusion** The UPLC method established for the simultaneous determination of 10 anthraquinone derivatives in *R. officinale* based on the optimal parameters is accurate and sensitive, which will provide a more comprehensive evaluation for the chemical characterization of medicinal materials of *R. officinale* from different sources.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma*; anthraquinone derivatives; ultra-high performance liquid chromatography; chromatographic parameters optimization; quantitative analysis; quality evaluation

大黄 *Rhei Radix et Rhizoma*, 被誉为“药中四维”之一, 在我国具有悠久的入药历史^[1], 数千年的临床实践证明大黄具有较强的泻下通便、活血化瘀和利湿退黄等功效, 临床应用广泛^[2]。在现代医学理论的指导下, 大黄常用于治疗或辅助治疗慢性肾衰竭^[3-4]、急性胰腺炎^[5-6]、黄疸型肝炎^[7-8]等疾病。目前有关大黄的药理作用研究较多^[9-11], 但有关其化学分析的研究较少。蒽醌衍生物是大黄中一类重要的化学成分, 包括芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷等, 具有抗菌^[12-13]、抗炎^[14-15]、抗凝^[16]、抑制癌细胞^[17-18]等药理作用。现代研究表明^[19-20], 大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷等结合型蒽醌糖苷类成分是大黄泻下通便、活血化瘀的主要药理活性成分。同时现有的文献表明大黄产生毒副作用的化学成分主要也是来自于蒽醌衍生物, 例如美国“国家毒理学规划”的研究表明^[21], 长时间小剂量服用大黄素可致肾小管透明小滴生成、膀胱细胞浆改变等毒副作用, 一时引起人们“谈大黄色变”。因此, 准确定量分析不同来源的大黄药材中的蒽醌衍生物对于保障大黄的临床精准用药和规避毒副作用非常重要。由于缺乏良好的分析方法, 目前《中国药典》2015年版是采用间接法来估算总蒽醌衍生物的含量, 并未单独直接测定结合型蒽醌糖苷的含量^[2], 显然并不能全面、直观地反映出不同来源大黄的质量差异性。然而, 由于难以获得良好的色谱分离度, 目前基于常规高效液相色谱法直接定量分析大黄中的结合型蒽醌糖苷比较困难。随着超高效液相色谱仪 (ultra-high performance liquid chromatography, UPLC) 的出现, 因其强大的色谱分离能力、分析时间短和节约流动相等优点, 逐渐受到药学工作者的青睐。

本实验基于 UPLC 法同时定量测定大黄中 10 个具有代表性的蒽醌衍生物, 并通过优化 5 个结合型蒽醌糖苷的色谱分离参数, 以期获得最佳色谱分离度, 最终建立一种简单、快速、准确的定量分析

方法, 为大黄的质量评价与控制提供参考方法。

1 仪器与材料

Acquity 超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司, 配有自动进样器, 光电二极管阵列检测器, Empower 2 色谱工作站; XS-205 电子天平, AL-204 电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; 10~100 μ L 移液枪, 德国 Eppendorf 公司; 超声仪, 40 kHz, 南京新辰生物科技有限公司; Milli-Q 超纯水制备系统, 美国 Millipore 公司。

对照品芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (批号 141225, 质量分数 98.61%)、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (批号 141211, 质量分数 98.35%)、大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (批号 141220, 质量分数 98.42%)、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (批号 141209, 质量分数 98.45%)、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (批号 131012, 质量分数 98.41%)、芦荟大黄素 (批号 13081602, 质量分数 98.30%)、大黄酸 (批号 14082403, 质量分数 99.21%)、大黄素 (批号 150522, 质量分数 98.01%)、大黄酚 (批号 14092204, 质量分数 98.58%)、大黄素甲醚 (批号 140820, 质量分数 99.27%), 由成都普菲德生物科技有限公司提供。色谱级磷酸 (85%)、甲醇、乙腈, 美国 Fisher 公司; 其余试剂为分析纯。

大黄药材采集于四川若尔盖地区和甘肃礼县, 经解放军第三〇二医院全军中药研究所肖小河研究员鉴定编号 Rh01~Rh10 为唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf., 编号 Rh11~Rh20 为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L., 样品保存于解放军第三〇二医院全军中药研究所样品储存室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m), 柱温为 34 $^{\circ}$ C; 柱平衡时间为 5 min; 流动相为甲醇和 0.1%磷酸水溶液的混合溶液, 梯度洗脱程序为 0~5.00 min, 39%~42%甲醇; 5.01~7.00 min, 42%~51%甲醇; 7.01~12.00

min, 51%~56% 甲醇; 12.01~15.00 min, 56%~70% 甲醇; 15.01~17.00 min, 70%~77% 甲醇; 17.01~21.00 min, 77% 甲醇; 21.01~25.00 min, 77%~88% 甲醇; 体积流量为 0.20 mL/min; 进样量为 2.0 μ L; 检测波长为 410 nm; 理论塔板数按大黄素峰计算不低于 7 000。

2.2 对照品溶液的制备

以色谱级甲醇作溶剂, 精密称取芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷等 10 个对照品适量, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 4 mL DMSO 溶解, 再用甲醇定容至刻度, 配制质量浓度为 7.00~60.00 μ g/mL 的对照品溶液, 采用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

准确称取各批次大黄粉末 0.200~0.210 g (过 4 号筛), 置于 50 mL 棕色量瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇, 称定质量, 超声处理 60 min (500 W,

40 kHz), 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足遗失的质量。采用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察^[22-23]

按照《中国药典》2015 年版四部中“药品质量标准分析方法验证指导原则”和“人用药品注册技术规范国际协调会议的指导方针”进行方法学验证考察。

2.4.1 线性关系考察 将上述混合对照品溶液分别稀释为一系列不同质量浓度的混合对照品溶液, 分别进样测定, 每次 2.0 μ L, 记录各待测物质的色谱峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 进样质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 见表 1。结果表明 10 个待测成分在一定进样质量浓度范围内的线性关系良好。用已知质量浓度的对照品溶液不断稀释, 直至得出能被可靠地检测出和定量检测的最低质量浓度, 结果见表 1。

表 1 检测限、定量限和线性关系考察结果

Table 1 UPLC analysis of LOD, limit of quantitation, and linearity

化学成分	t_R /min	线性方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检测限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
芦荟大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	2.76	$Y=12\,315\,X-6\,771$	0.999 1	3.36~56.00	0.50	1.68
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	4.11	$Y=181\,853\,X-1\,355$	0.999 3	4.64~58.00	0.60	2.32
大黄酚-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	10.68	$Y=22\,704\,X-5\,078$	0.999 3	8.00~80.00	1.00	4.00
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	11.29	$Y=8\,028\,X+436$	0.999 4	9.20~46.00	1.10	4.60
大黄素甲醚-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	14.08	$Y=19\,845\,X+7\,531$	0.999 7	2.60~26.00	0.80	2.00
芦荟大黄素	15.03	$Y=21\,091\,549\,X-23\,692$	0.999 5	4.80~80.00	0.80	2.40
大黄酸	17.33	$Y=18\,559\,616\,X-42\,739$	0.999 8	4.80~80.00	0.80	2.40
大黄素	19.84	$Y=14\,658\,429\,X-15\,328$	0.999 7	10.0~100.0	1.50	5.00
大黄酚	20.81	$Y=24\,085\,620\,X-35\,942$	0.999 6	8.00~80.00	1.20	4.00
大黄素甲醚	23.54	$Y=14\,658\,429\,X-15\,328$	0.999 7	6.00~60.00	0.90	3.00

2.4.2 精密度考察 取同一混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 每次 2.0 μ L, 记录各待测成分的色谱峰面积。结果显示芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 10 个待测物质峰面积的 RSD 为 0.88%、1.01%、1.75%、1.68%、1.37%、1.64%、1.71%、1.45%、1.78%、1.09%, 均小于 2.00%, 表明仪器的精密度良好。

2.4.3 稳定性考察 取同一供试品溶液, 分别于制

备后 0、2、4、8、24、48 h 内进样测定, 记录各待测物质的色谱峰面积, 计算芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的色谱峰面积的 RSD。结果显示, 10 个待测物质在 48 h 内色谱峰面积的 RSD 均小于 3.00%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性考察 取同一批次 (Rh04) 的大黄样品粉末 0.200~0.210 g (过 4 号筛), 共 6 份, 精密

称定,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液。准确吸取各供试品溶液各 2.0 μ L 注入 UPLC 进行测定,记录各色谱峰面积,计算各成分质量分数。结果显示 6 份供试溶液中芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的质量分数平均值为 5.86、9.40、7.18、1.68、2.24、1.13、2.18、1.54、1.57、0.80 mg/g,相应的 RSD 值分别为 1.34%、0.77%、1.25%、1.89%、1.16%、2.74%、2.55%、2.14%、2.29%、1.72%。

2.4.5 加样回收率试验 取同一批次已测定的大黄样品(Rh04)粉末约 0.100 g(过 4 号筛),精密称定,置于 50 mL 棕色量瓶中,分别加入相同质量的对照品物质,最后加入甲醇溶液 25 mL,按照“2.3”项方法制备供试品溶液,进样测定各成分的色谱峰面积,计算含量和回收率。结果显示 10 个待测成分的平均回收率在 95.76%~99.84%,RSD 值为 3.85%~4.91%,表明方法的准确性较好。

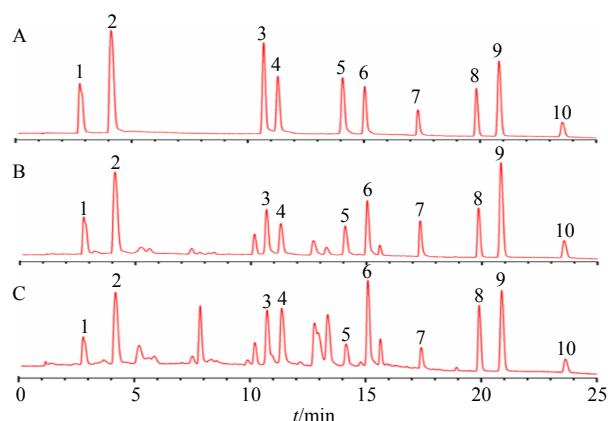
2.5 样品的测定

按照“2.3”项下方法制备 20 批大黄药材供试品溶液,进样分析,每次 2.0 μ L,计算结果。对照品溶液和供试品溶液典型色谱图见图 1,测定结

果见表 2。

2.6 统计分析

根据《中国药典》2015 年版收载的大黄质量分析方法对 20 批次的大黄药材进行了含量测定,结果见图 2。结果显示,不同产地、不同基原的大黄药材经



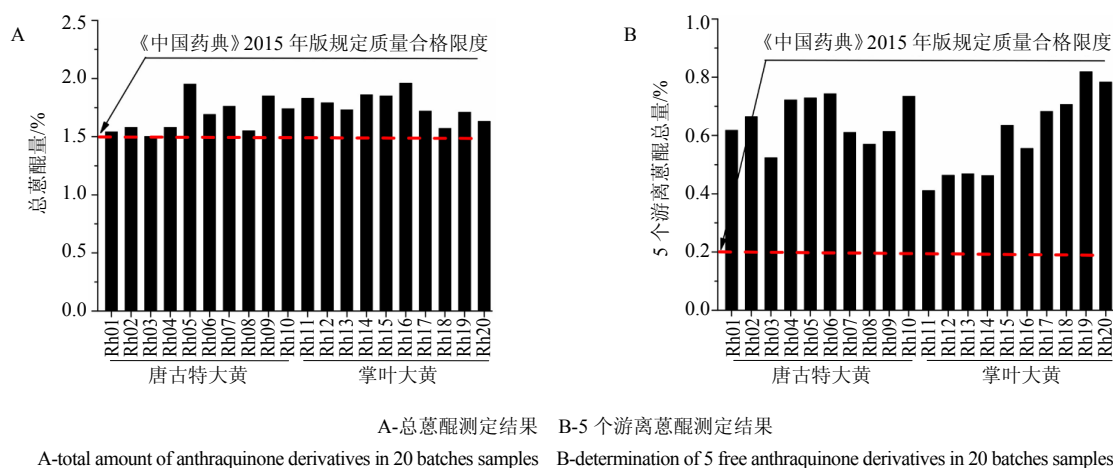
1~10-分别为芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚
1—10-aloe emodin-8-*O*- β -D-glucoside, rhein-8-*O*- β -D-glucoside, chrysophanol-8-*O*- β -D-glucoside, emodin-8-*O*- β -D-glucoside, rheochrysidin-8-*O*- β -D-glucoside, aloe emodin, rhein, emodin, chrysophanol and physcion

图 1 混合对照品 (A)、样品 Rh01 (B)、Rh13 (C) UPLC-UV
Fig. 1 UPLC-UV of mixed standard substances (A), sample Rh01 (B), and Rh13 (C)

表 2 20 批次大黄中 10 个蒽醌衍生物定量测定结果 ($n=3$)

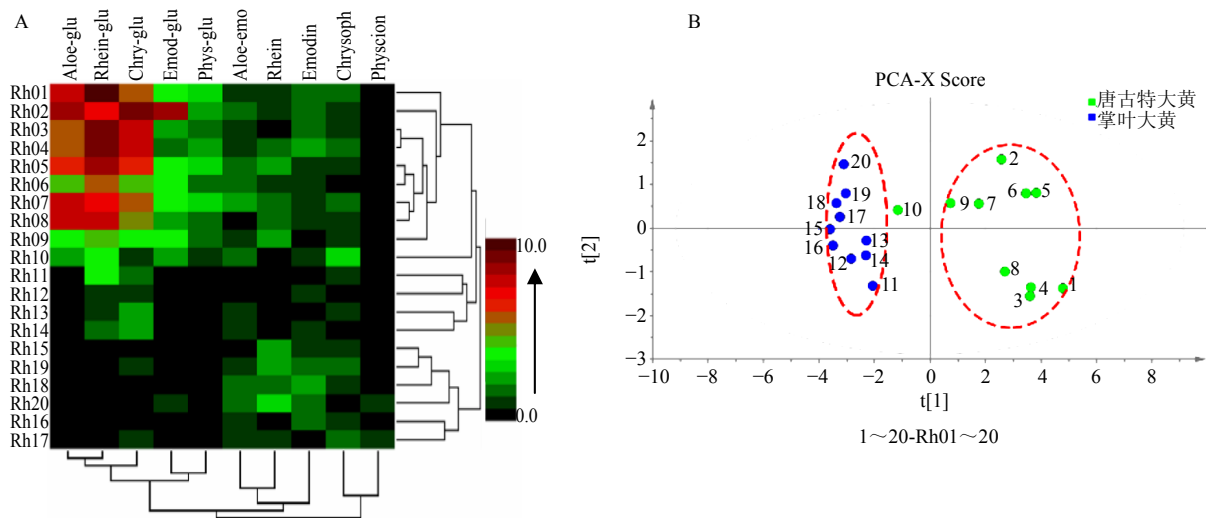
Table 2 Determination results of 10 anthraquinone derivatives in 20 batches of *R. officinale* ($n=3$)

样品	质量分数/%									
	芦荟大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	大黄酸-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	大黄酚-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	大黄素甲醚-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
Rh01	7.17	11.55	5.86	3.50	2.64	1.14	1.69	1.02	1.63	0.69
Rh02	8.42	6.75	9.48	8.11	2.26	1.62	1.86	1.00	1.42	0.74
Rh03	5.77	9.30	7.04	2.31	1.99	1.06	1.73	0.88	1.16	0.40
Rh04	5.86	9.40	7.18	1.68	2.24	1.13	2.18	1.54	1.57	0.80
Rh05	6.33	8.09	6.17	4.33	2.61	1.59	1.47	2.37	1.12	0.73
Rh06	7.17	6.83	5.71	3.42	2.90	2.01	1.19	1.76	1.53	0.94
Rh07	4.74	5.63	4.79	3.14	1.88	1.92	1.07	1.45	0.89	0.77
Rh08	7.03	7.29	5.26	2.11	1.75	0.68	1.33	1.64	1.23	0.81
Rh09	3.19	4.64	4.17	3.22	1.61	1.08	0.94	2.15	1.30	0.66
Rh10	2.24	3.11	1.07	2.15	1.34	1.73	1.12	0.95	2.72	0.82
Rh11	0.89	3.52	1.68	0.77	未检出	0.84	0.71	0.63	1.01	0.91
Rh12	0.90	1.18	1.19	0.74	未检出	0.68	1.33	0.87	0.98	0.77
Rh13	0.81	1.02	2.25	0.93	0.95	1.10	0.91	0.79	1.30	0.58
Rh14	0.93	1.71	2.03	0.74	0.42	1.02	1.20	0.89	0.98	0.53
Rh15	0.44	0.16	0.67	未检出	未检出	0.98	1.37	2.02	1.33	0.64
Rh16	0.18	0.23	0.76	0.13	0.17	1.19	1.54	0.81	1.39	0.62
Rh17	0.27	0.41	1.17	0.40	0.26	1.44	0.97	1.43	1.79	1.19
Rh18	0.14	0.28	0.49	0.72	0.18	1.56	2.13	1.89	1.21	0.27
Rh19	0.56	0.39	1.01	0.84	0.36	1.27	1.88	2.38	1.87	0.78
Rh20	0.33	0.15	0.96	1.35	0.19	1.78	1.60	2.59	0.85	1.01

图 2 20 批次大黄中蒽醌测定结果 ($n = 3$)Fig. 2 Determination results of anthraquinone derivatives in 20 batches samples of *R. officinale* based on data in Chinese pharmacopoeia ($n = 3$)

过盐酸水解后的总蒽醌含量普遍位于 1.50%~1.96%，但是差异性并不明显，见图 2-A；大黄酸等 5 个游离蒽醌总量位于 0.41%~0.81%，同样差异性并不明显，见图 2-B。结果表明，以盐酸水解之后的总蒽醌含量作为大黄质量评价指标，很难有效地区分不同基原、不同产地的大黄药材之间的质量差异。以本实验建立的分析方法测得的 20 批次大黄药材中 10 个蒽醌衍生物的含量作为评价指标，采用 Heml-1.0 软件进行热图和聚类分析，采用统计软件 SIMCA-P 13.0 (Umetrics Corporation) 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)，结果见图 3。聚类分析结果显示 20 批次大

黄药材大致可以得到 2 类，但是区分并不明显，见图 3-A。热图分析结果显示 2 个不同基原的大黄药材质量差异主要体现在结合型蒽醌糖苷的量上，特别是芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷的含量差异。PCA 分析结果显示 Rh01~Rh09 为一类 (Rh10 处于离群)，Rh11~Rh20 为一类，见图 3-B，统计分析结果表明唐古特大黄和掌叶大黄之间存在一定的质量差异，而这种差异主要体现在结合型蒽醌糖苷类的含量差异上面，这也表明了定量测定大黄中的结合型蒽醌糖苷类成分对于评价不同来源的大黄药材质量差异具有重要意义。



A-20 批次大黄中 10 个蒽醌衍生物含量热图和聚类分析结果 B-20 批次大黄中 10 个蒽醌衍生物 PCA 结果

A-Heat-map and hierarchical clustering analysis of content of 10 anthraquinones derivatives in 20 batches samples B-Score plot obtained by principal components analysis of 10 anthraquinones derivatives in 20 batches samples

图 3 统计分析结果 ($n = 3$)Fig. 3 Results of statistical analysis ($n = 3$)

3 讨论

3.1 波长的考察

考虑到大黄药材中结合型蒽醌糖苷与其它极性化合物的色谱分离较为困难,实验过程中比较了乙腈-0.1%磷酸水溶液和甲醇-0.1%磷酸水溶液2种流动相的分离效果,结果显示以甲醇-0.1%磷酸水溶液作为流动相时,基线平稳,色谱分离度较好,故优选甲醇-0.1%磷酸水溶液作为流动相。采用二极管阵列检测器对芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷等10个对照品溶液在200~440 nm进行扫描,得到各个化合物的最大紫外吸收波长。结果显示结合蒽醌苷类化合物在250 nm和410 nm处有较强吸收,而游离蒽醌类化合物在254 nm附近有较强紫外吸收,分别在254 nm和410 nm处进行检测,结果表明在254 nm处得到的色谱图杂质峰较多,对目标峰的干扰严重;而在410 nm处得到的色谱峰杂质峰较少,基线平稳,因此优选410 nm作为检测波长。

3.2 体积流量和柱温的考察

为了得到结合蒽醌苷类化合物稳健的色谱分离(分离度>1.5),实验过程中对流动相的体积流量和柱温进行了系统考察和优化,并利用4个重要的色谱学参数(保留时间、分离度、理论塔板数和对称因子)对5个结合蒽醌苷的优化过程进行评估。根据前期预试验结果,在进行柱温优化过程中,流动相的体积流量为设为0.20 mL/min;在进行流动相流速优化过程中,柱温设为30℃。优化结果表明,要得到大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷二者的满意的色谱分离较为困难:当体积流量超过0.10 mL/min时,分离度和理论塔板数均逐渐下降;综合考虑到仪器系统压力和4个色谱参数,优选体积流量为0.20 mL/min。当柱温从22℃升高到34℃时,大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷的分离度、对称因子、保留时间都有明显改善,当柱温超过34℃时,则有所下降;理论塔板数则是随着柱温的升高逐渐下降。表明这里存在一个色谱分离的最佳临界点,也即在柱温为34℃,体积流量为0.20 mL/min时,大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷等5个结合型蒽醌衍生物能够在系统压力低于82 740 kPa的情况下,达到最佳色谱分离。

利用优化后的色谱参数对供试品溶液进行测定,结果显示在设定的色谱检测条件下,供试品溶

液中的芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和大黄素甲醚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷能和其他化合物达到满意的色谱分离,峰纯度检测显示5个待测成分的色谱峰纯度符合要求,表明分离度到达定量检测的要求,保证了测定结果的准确性。

蒽醌衍生物是大黄药材中一类重要的化学成分,课题组前期研究结果表明^[20],芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷等结合型蒽醌糖苷是大黄发挥活血化瘀功效的重要药效物质。酒大黄的炮制过程中,结合型蒽醌糖苷会逐渐转化成为游离型蒽醌衍生物,因此一个快速、准确的定量分析方法对于酒大黄炮制过程的品质监控具有重要的意义。随着市场上一些含有大黄的排毒养颜、美容减肥、便秘通肠茶/药品的兴起,人们在日常生活中越来越多地接触大黄,如何评价这些含有大黄的制剂的质量差异性,保障不同批次之间的产品质量一致性,一个快速、准确的定量分析方法显得尤为重要。本实验基于UPLC最佳参数,建立了一种简单、快速、准确的10个蒽醌衍生物同时定量分析方法,对更加全面地从化学表征的角度评控不同来源的大黄药材或酒大黄饮片的质量具有参考价值。

参考文献

- [1] Rev G A, Stuart M D. *Chinese Materia Medica* [M]. Shanghai: American Presbyterian Mission Press, 1911.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] Sanada H. Study on the clinical effect of rhubarb on nitrogen-metabolism abnormality due to chronic renal failure and its mechanism [J]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 1996, 38(8): 379-387.
- [4] Zhang Z H, Bai X, Zhao Y Y, et al. An integrated lipidomics and metabolomics reveal nephroprotective effect and biochemical mechanism of *Rheum officinale* in chronic renal failure [J]. *Sci Rep*, 2016, 23(6): 22151.
- [5] Wan B, Fu H Y, Xu F, et al. Efficacy of rhubarb combined with early enteral nutrition for the treatment of severe acute pancreatitis: A randomized controlled trial [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(11): 1375-1384.
- [6] Zhou Y, Wang L, Xiong Y, et al. Add-on effect of crude rhubarb to somatostatin for acute pancreatitis: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 24(194): 495-505.
- [7] 盛颖玥, 邹晓平, 张丽莉, 等. 中药大黄辅助治疗重症急性胰腺炎的系统评价 [J]. 世界华人消化杂志, 2010,

- 18(7): 730-735.
- [8] 谢文瑞, 阳小雅, 陈 垦, 等. 生大黄联合白蛋白治疗重症急性胰腺炎 [J]. 中华全科医学, 2014, 12(2): 174-177.
- [9] 朱 伟, 王学美. 大黄治疗慢性肾功衰竭机制的研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(5): 471-475.
- [10] 闫美娟, 隋 峰, 林 娜. 大黄调节胃肠功能的作用及机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 181-184.
- [11] Zhang C E, Niu M, Xiao X H, *et al.* Untargeted metabolomics reveals dose-response characteristics for effect of rhubarb in a rat model of cholestasis [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 31(7): 85. doi:10.3389/fphar.2016.00085.
- [12] Janeczko M, Maslyk M, Golczyk, *et al.* Emodin, a natural inhibitor of protein kinase CK2, suppresses growth, hyphal development, and biofilm formation of *Candida albicans* [J]. *Yeast*, 2017, 34(6): 253-265.
- [13] Azelmat J, Larente J F, Grenier D. The anthraquinone rhein exhibits synergistic antibacterial activity in association with metronidazole or natural compounds and attenuates virulence gene expression in *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(2): 342-346.
- [14] Han J W, Shim D W, Lee K H, *et al.* Anti-inflammatory effect of emodin via attenuation of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 8102-8109.
- [15] Kim S J, Kim M C, Lee B J, *et al.* Anti-inflammatory activity of chrysophanol through the suppression of NF-kappaB/caspase-1 activation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Molecules*, 2010, 15(9): 6436-6451.
- [16] Seo E J, Ngoc T M, Lee S M, *et al.* Chrysophanol-8-O-glucoside, an anthraquinone derivative in rhubarb, has antiplatelet and anticoagulant activities [J]. *J Pharmacol Sci*, 2012, 118(2): 245-254.
- [17] Ma L S, Yang Y P, Yang H F, *et al.* Emodin suppresses the nasopharyngeal carcinoma cells by targeting the chloride channels [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 615-625.
- [18] Zhang L, He D, Li J Z, *et al.* Emodin targets mitochondrial cyclophilin D to induce apoptosis in HepG2 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 222-228.
- [19] Gdrkdm P V, Vries E D, Karrenbeld A, *et al.* Anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects [J]. *Aliment Pharm Therap*, 1999, 13(4): 443-452.
- [20] 张海珠, 谭 鹏, 肖小河, 等. 基于活血生物效价和化学指纹图谱的大黄品质评价研究 [J]. 药学学报, 2017, 52(3): 436-442.
- [21] Connor S C, Wu W, Sweatman B C. Effects of feeding and body weight loss on the ¹H-NMR-based urine metabolic profiles of male Wistar Han rats: Implications for biomarker discovery [J]. *Biomarkers*, 2004, 9(2): 156-179.