

HPLC 指纹图谱、Q-TOF/MS 定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究

曹 瑞¹, 窦志华^{2*}, 倪丽丽^{1*}, 周云中³, 罗 琳⁴, 戴 莹¹, 陶金华⁴

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学南通中西医结合临床医学院, 江苏 南通 226006

3. 精华制药集团股份有限公司, 江苏 南通 226005

4. 南通大学, 江苏 南通 226019

摘 要: **目的** 建立更全面的大黄饮片质量评价方法。**方法** HPLC 法建立 35 批大黄饮片指纹图谱, 并生成对照指纹图谱, 标定共有峰, 并进行相似度评价; Q-TOF/MS 对共有峰进行鉴定, 对通过对照品比对确认的 13 个蒽醌类成分进行定量测定。**结果** 大黄饮片指纹图谱标定共有峰 45 个, 包括蒽醌类成分 17 个 (其中芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷 8 个结合型蒽醌及芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 5 个游离型蒽醌通过对照品比对确认)、蒽酮类成分 2 个 (番泻苷 B 和番泻苷 A, 均通过对照品比对确认)、鞣质类成分 17 个 (其中没食子酸、儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯通过对照品比对确认)、二苯乙烯类成分 2 个 [白藜芦醇 4'-*O*-葡萄糖苷和白藜芦醇 4'-*O*-β-*D*-(6"-*O*-没食子酰)-葡萄糖苷, 均通过对照品比对确认]、苯丁酮类成分 4 个 [其中 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)-葡萄糖苷通过对照品比对确认]、色原酮类成分 2 个、萘类成分 1 个; 35 批大黄饮片中 13 个蒽醌类成分含量测定结果差异较大。**结论** 建立的方法可用于大黄饮片质量评价。

关键词: 大黄饮片; 高效液相色谱法; 四级杆飞行时间串联质谱; 蒽醌; 多成分定量; 质量评价

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)05-1100-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.012

Quality evaluation of rhubarb pieces by HPLC fingerprint, Q-TOF/MS qualitative and multi-component quantitative analysis

CAO Rui¹, DOU Zhi-hua², NI Li-li¹, ZHOU Yun-zhong³, LUO Lin⁴, DAI Ying¹, TAO Jin-hua⁴

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Nantong Clinical Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nantong 226006, China

3. Jinghua Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nantong 226005, China

4. Nantong University, Nantong 226019, China

Abstract: **Objective** To establish a more comprehensive quality evaluation method for rhubarb pieces. **Methods** Fingerprints of 35 batches of rhubarb pieces were determined by HPLC, the control fingerprint was established, the common peaks were calibrated and the similarity was evaluated. Components of common peaks were identified by Q-TOF/MS and the content of 13 anthraquinones confirmed by reference substance was determined. **Results** There were 45 common peaks in the fingerprint of rhubarb pieces, including 17 anthraquinones (among them, eight bound anthraquinones of aloe-emodin-8-*O*-glucoside, rhein-8-*O*-glucoside, emodin-

收稿日期: 2018-12-19

基金项目: 江苏省重点研发计划 (社会发展) 项目 (BE2018674); 江苏省中医药科技计划项目 (YB201836); 江苏省药学会夏尔临床药理学基金科研项目 (S201708); 南通市“226 工程”科研资助计划项目 (201714); 南通市科技计划项目 (YYZ16025)

作者简介: 曹 瑞, 在读硕士, 主要从事中药药效物质及质量评价研究。Tel: 17766096300 E-mail: 1334951821@qq.com

***通信作者** 窦志华, 博士, 主任中药师, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中药药效物质及质量评价研究。

Tel: (0513)85116018 E-mail: zhihuadou@163.com

倪丽丽, 女, 在读硕士, 主要从事中药检验与质量分析研究。Tel: 18796181975 E-mail: 1321718162@qq.com

1-*O*-glucoside, chrysophanol-1-*O*-glucoside, chrysophanol-8-*O*-glucoside, aloe-emodin-3-hydroxymethyl-*O*-glucoside, emodin-8-*O*-glucoside, physcion-8-*O*-glucoside and five free anthraquinones of aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion were confirmed by reference substance), two anthrones (sennoside B and sennoside A, confirmed by reference substances), 17 tannins (among them, gallic acid, catechin, epigallocatechin gallate, epicatechin and epicatechin gallate were confirmed by reference substance), two stilbenes [resveratrol 4'-*O*-glucoside and resveratrol 4'-*O*- β -D-(6''-*O*-galloyl)-glucoside, confirmed by reference substances], four butyropheneone [among them, 4-(4'-hydroxyphenyl)-2-butanone 4'-*O*- β -D-(2''-*O*-galloyl-6''-*O*-*p*-hydroxy-cinnamyl) glucoside, confirmed by reference substances], two chromones and one naphthalenes. The content of 13 anthraquinones in 35 batches of rhubarb pieces was quite different. **Conclusion** The established method can be used to evaluate the quality of rhubarb pieces.

Key words: rhubarb pieces; high performance liquid chromatography (HPLC); quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (Q-TOF/MS); anthraquinones; multi-constituent quantitative analysis; quality evaluation

大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、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，是中国四大传统中药之一^[1]，其质量优劣关系到临床用药的有效性和安全性^[2]，但市场上流通的大黄质量参差不齐，一项全国评价性抽检检测结果表明，市场上大黄饮片合格率仅为 88% 左右^[3]，且质量评价方法存在一定局限性^[4]，所以研究切实可行的大黄饮片质量评价方法具有重要意义。

指纹图谱是国际公认的整体评价中药质量的方法^[5-9]，但指纹图谱各共有峰代表什么、含量多少，难以说清^[10]。高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法 (HPLC-Q-TOF/MS) 为目前快速分离、鉴定中药成分的主要方法^[11]，可用于指纹图谱共有峰成分鉴定。在指纹图谱基础上进行多成分定量分析可弥补其定性分析模糊性的不足^[12]。大黄指纹图谱研究始于 20 世纪 90 年代初^[13]，2006 年左右液质联用技术开始应用于大黄成分鉴定^[14-22]，早在 20 世纪 80 年代末就开始了大黄多成分定量研究，我国和日本学者分别陆续建立了 HPLC 同时测定大黄中 34、32、28 个成分含量的方法^[23-25]，但以上研究方法没有结合开展。最近虽见有建立掌叶大黄指纹图谱采用 Q-TOF/MS 进行成分鉴定的文献报道，但仅对其中的 5 个成分进行了含量测定^[26]。

大黄所含的活性成分主要为蒽醌类、蒽酮类、鞣质类、二苯乙烯类、苯丁酮类等^[27]。本课题组前期建立了大黄指纹图谱，标定共有峰 35 个，并分别建立了一测多评同时测定 2 个鞣质类成分、1 个结合型蒽醌和 5 个游离型蒽醌共计 8 个成分及外标法测定 2 个鞣质类成分、4 个结合型蒽醌和 5 个游离型蒽醌共计 11 个成分含量的方法^[10,12]，但未采用液质联用技术对共有峰进行鉴定。本实验以 35 批大黄饮片为对象，建立了指纹图谱，标定共有峰 45 个，

采用 Q-TOF/MS 技术对 45 个共有峰进行了成分鉴定，并对通过对照品比对确认的 8 个结合型蒽醌及 5 个游离型蒽醌进行了含量测定比较，以期建立更全面的大黄饮片质量评价方法。

1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱系统，包括 e2695 分离单元、2998 二极管阵列检测器和 Empower 色谱工作站，美国 Waters 公司；HPLC-DAD-Q-TOF/MS 系统，包括岛津 Shimadzu Prominence UFLC 型液相色谱仪，配有 LC-20AD XR 泵、SIL-20AC XR 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱、SPD-M20A 二极管阵列检测器，日本岛津公司；AB SCIEX Triple TOF 4600 质谱仪，配有电喷雾离子源、Q-TOF/MS 检测器，美国 AB SCIEX 公司；SK5200H 超声波清洗器，上海科导超声仪器有限公司；Sartorius BT 25S 型电子天平，德国赛多利斯公司。

对照品芦荟大黄素 (批号 110795-201710，质量分数 98.3%)、大黄酸 (批号 110757-201607，质量分数 99.3%)、大黄素 (批号 110751-201512，质量分数 98.7%)、大黄酚 (批号 110796-201621，质量分数 99.2%)、大黄素甲醚 (批号 110758-201616，质量分数 99.0%) 购自中国食品药品检定研究院；对照品芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 (批号 141225，HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷 (批号 150122，HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷 (批号 141211，HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷 (批号 150325，HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷 (批号 150114，HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷 (批号 141212，HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 (批号 141209，HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷 (批号 150120，HPLC 测定质量分

数 $\geq 98\%$)、番泻苷 A (批号 CHB170508, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、番泻苷 B (批号 CHB170509, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、没食子酸 (批号 150226, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、儿茶素 (批号 141224, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、表没食子儿茶素没食子酸酯 (批号 140727, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、表儿茶素 (批号 140730, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$)、表儿茶素没食子酸酯 (批号 140923, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$) 购自成都克洛玛生物科技有限公司; 对照品白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷 (CAS NO38963-95-0, 质量分数 98%)、白藜芦醇 4'-O- β -D-(6"-O-没食子酰)-葡萄糖苷 (CAS NO928340-97-0, 质量分数 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 (CAS NO950184-00-6, 质量分数 98%), 购自上海一林生物科技有限公司; 甲醇, 色谱纯, 美国 TEDIA 公司; 娃哈哈饮用纯净水, 杭州娃哈哈集团有限公司。

3 批 (S1、S23、S34) 大黄饮片购自国内中药饮片公司, 32 批 (S2~S22、S24~S33、S35) 大黄饮片购自国内地市级以上中医院; S31、S33、S35 为熟大黄, 其余为生大黄; S10~S17、S24~S35 为小包装, 其余均为普通包装。所有饮片实验前均粉碎成粉末, 过四号筛。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立及共有峰鉴定

2.1.1 色谱条件 Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~30%甲醇; 10~40 min, 30%~60%甲醇; 40~60 min, 60%甲醇; 60~70 min, 60%~100%甲醇; 70~80 min, 100%甲醇; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 280 nm。

2.1.2 质谱条件 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液, 梯度条件同“2.1.1”项。DuoSpray 离子源, ESI 电离方式, 负离子模式检测。离子源温度 600 $^{\circ}$ C, 离子源喷射电压-4 500 V, 雾化气 (Gas 1) 60 psi (1 psi=6.895 kPa), 加热气 (Gas 2) 60 psi, 气帘气 (CUR) 35 psi。定性分析采用 TOFMS-IDA-10MS/MS 信息采集方式获取质谱信息, 其参数设置如下: 一级质谱解簇电压 (DP) 为-80 V, 碰撞能量 (CE) 为-10 eV, TOF-MS 累计时间为 250 ms, 母离子扫描范围为 m/z 115~1 500; 二级质谱子离子质谱扫

描范围为 m/z 50~1 500, CE 为-35 eV, 碰撞能量扩展 (CES) 为 15 eV。

2.1.3 混合对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 配成没食子酸、儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素、表儿茶素没食子酸酯、白藜芦醇 4'-O-葡萄糖苷、白藜芦醇 4'-O- β -D-(6"-O-没食子酰)葡萄糖苷、番泻苷 B、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、芦荟大黄素-8-O-葡萄糖苷、大黄酸-8-O-葡萄糖苷、大黄素-1-O-葡萄糖苷、大黄酚-1-O-葡萄糖苷、大黄酚-8-O-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-羟甲基-O-葡萄糖苷、大黄素-8-O-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷、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 11.6、8.6、10.9、11.3、9.5、8.8、4.1、18.8、17.6、7.7、12.6、5.925、1.005、2.985、3.15、11.085、7.68、1.635、0.93、1.8、0.727 5、1.74、1.89 μ g/mL 的混合对照品溶液, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 供试品溶液的制备 取大黄饮片粉末约 0.15 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇 24 mL 左右, 超声 30 min, 冷却后加甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.5 精密度试验 精密吸取 S1 供试品溶液 30 μ L 连续进样 6 次, 记录各共有峰保留时间及峰面积, 以 33 号峰 (大黄酚-1-O-葡萄糖苷) 为参照峰, 计算其他共有峰与参照峰的相对保留时间 (t_R) 和峰面积比值 (PAR) 的 RSD, 结果 t_R 的 RSD $\leq 0.60\%$, PAR 的 RSD $\leq 2.92\%$, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取 S1 供试品溶液 30 μ L, 分别于制备后的 0、3、6、12、18、24 h 进样测定, 同“2.1.5”项下方法分析, 结果 t_R 的 RSD $\leq 1.10\%$, PAR 的 RSD $\leq 2.96\%$, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 称取 6 份 S1 粉末, 每份约 0.15 g, 精密称定, 分别按“2.1.4”项下方法制备成 6 个供试品溶液, 各精密吸取 30 μ L 进样测定, 同“2.1.5”项下方法分析, 结果 t_R 的 RSD $\leq 1.14\%$, PAR 的 RSD $\leq 2.98\%$, 表明样品处理方法的重复性较好。

2.1.8 对照指纹图谱的建立 分别精密吸取 S1~S35 供试品溶液 30 μ L 注入 Waters Alliance 高效液相色谱系统测定, 将 35 批样品的指纹图谱以 AIA 格式依次导入国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2012 版)》, 以 S1 指

纹图谱作为参照谱,使用中位数进行自动匹配,加以多点校正,生成了对照指纹图谱,标定共有峰 45 个。见图 1。

2.1.9 指纹图谱的相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)》对 35 批样品(S1~S35)指纹图谱与对照指纹图谱进行相似度评价,结果分别为 0.963、0.921、0.642、0.962、0.976、0.950、0.939、0.814、0.889、0.456、0.940、0.970、0.920、0.954、0.918、0.801、0.913、0.967、0.956、0.968、0.960、0.965、0.956、0.836、0.965、0.943、0.942、0.958、0.936、0.947、0.776、0.886、0.662、0.853、0.732。结果显示, S3、S10 相似度最低,其次是 S31、S33 和 S35,相似度高于 0.80 且低于 0.85 的有 S8、S16 和 S24,其余样品相似度

均高于 0.85。

2.1.10 共有峰的鉴定 分别精密吸取 S1 供试品溶液、混合对照品溶液各 20 μ L,注入 HPLC-DAD-Q-TOF/MS 系统测定,提取总离子流图(图 2),根据准分子离子 $[M-H]^-$ 和/或加合离子 $[M+Cl]^-$ 信息判断并得到的一级质谱精确相对分子质量,并根据产生的二级质谱碎片离子信息,通过与对照品或文献数据比对,并在线检索中医药百科全书数据库(<http://www.ehbio.com/ETCM/>),对 45 个共有峰进行成分鉴定,结果见表 1。大黄饮片指纹图谱 45 个共有峰包括蒽醌类成分 17 个(其中芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡

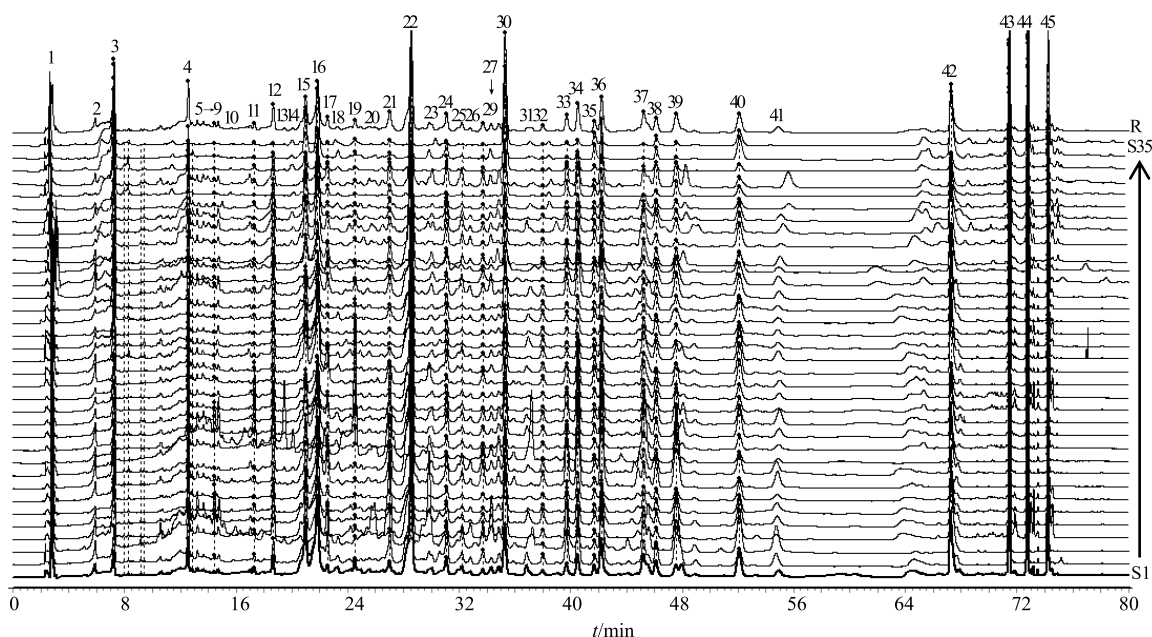


图 1 大黄饮片样品 HPLC 指纹图谱 (S1~S35) 及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint of rhubarb pieces (S1—S35) and reference fingerprint (R)

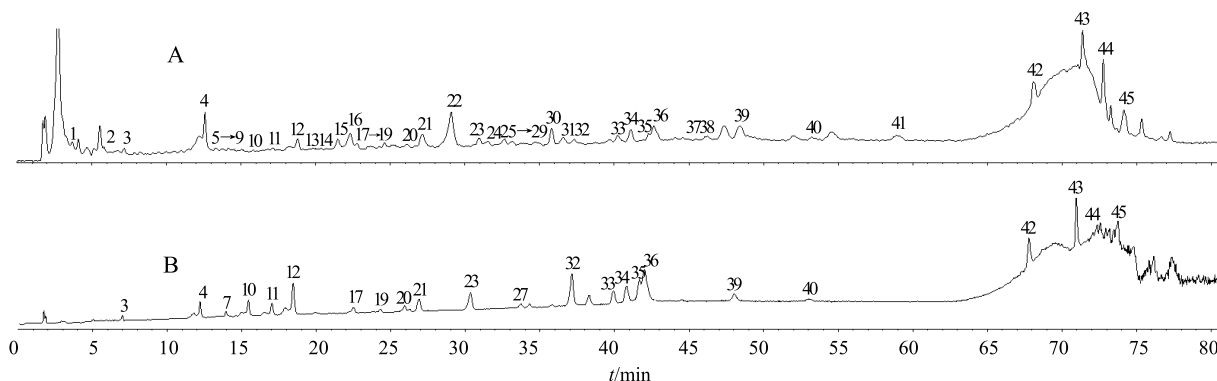


图 2 大黄饮片样品 (A) 及混合对照品 (B) 总离子流图 (负离子模式)

Fig. 2 TIC of rhubarb pieces (A) and mixed reference (B) (negative ion mode)

表 1 大黄饮片指纹图谱共有峰 Q-TOF/MS 鉴定结果

Table 1 Identification of common peaks in rhubarb pieces fingerprint by Q-TOF/MS

峰号	<i>t_R</i> /min	分子式	[M-H] ⁻			[M+Cl] ⁻			化合物名称	化合物类型	参考文献
			理论值	实际值	误差/ (×10 ⁻⁶)	理论值	实际值	误差/ (×10 ⁻⁶)			
1	3.072	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.067 1	331.067 7	1.9	367.043 7	367.043 5	-0.7	没食子酸-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷 ^b	鞣质类	23-24
2	5.822	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.067 1	331.068 2	3.4	367.043 7	367.043 9	0.4	没食子酸-4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷 ^b	鞣质类	23-24
3	7.187	C ₇ H ₆ O ₅	169.014 2	169.015 7	8.6	204.990 9	204.991 4	2.3	没食子酸 ^a	鞣质类	
4	12.592	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.071 8	289.072 4	2.2	325.048 4	325.048 7	0.8	儿茶素 ^a	鞣质类	
5	13.333	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.146 1	729.147 3	1.6	765.122 8	765.124 0	1.6	原花青素 B-1-3- <i>O</i> -没食子酸酯 ^b	鞣质类	24
6	13.706	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.146 1	729.147 4	1.8	765.122 8	765.123 4	0.8	原花青素 B-2-3'- <i>O</i> -没食子酸酯 ^b	鞣质类	24
7	14.138	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁				493.054 3	493.055 8	3.0	表没食子儿茶素没食子酸酯 ^a	鞣质类	
8	14.524	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.135 2	577.136 4	2.2	613.111 8	613.113 4	2.6	原花青素 B1 ^b	鞣质类	24
9	14.799	C ₄₄ H ₃₄ O ₂₀				917.133 7	917.133 7	0.0	原花青素 B-2-3,3'-二- <i>O</i> -没食子酸酯 ^b	鞣质类	24-25
10	15.824	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.071 8	289.071 8	0.1	325.048 4	325.048 6	0.5	表儿茶素 ^a	鞣质类	
11	17.191	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.124 2	389.123 6	-1.5	425.100 9	425.100 8	-0.2	白藜芦醇 4'- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^a	二苯乙烯类	
12	18.801	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	441.082 7	441.083 4	1.5	477.059 4	477.060 3	1.9	表儿茶素没食子酸酯 ^a	鞣质类	
13	19.686	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	477.140 2	477.141 2	2.0	513.116 9	513.117 5	1.1	异莲花掌苷 ^b	苯丁酮类	24-25,29
14	20.260	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	477.140 2	477.140 5	0.6	513.116 9	513.118 0	2.1	莲花掌苷 ^b	苯丁酮类	23-24,29
15	21.499	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	309.098 0	309.098 3	1.0	345.074 7	345.075 3	1.9	2- <i>O</i> -桂皮酰-β- <i>D</i> -葡萄糖苷 ^b	鞣质类	24
16	22.308	C ₁₂ H ₁₀ O ₅	233.045 5	233.046 1	2.4				2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色原酮	色原酮类	18
17	22.674	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.098 9	1.2	467.075 0	467.076 0	2.0	芦荟大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^a	蒽醌类	
18	23.751	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	309.098 0	309.093 3	4.3				1- <i>O</i> -桂皮酰-β- <i>D</i> -葡萄糖苷	鞣质类	28
19	24.564	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₂	541.135 2	541.136 8	3.0	577.111 8	577.114 3	4.3	白藜芦醇 4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6"- <i>O</i> -没食子酰)-葡萄糖苷 ^a	二苯乙烯类	
20	26.568	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	861.188 4	861.189 7	1.5	897.165 0	897.168 6	4.0	番泻苷 B ^a	蒽醌类	
21	27.146	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.077 6	445.078 2	1.3	481.054 3	481.055 2	1.8	大黄酸-8- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^a	蒽醌类	
22	29.070	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.108 9	461.109 9	2.1	497.085 6	497.086 3	1.4	1- <i>O</i> -没食子酰-2- <i>O</i> -肉桂酰-β- <i>D</i> -葡萄糖苷 ^b	鞣质类	23-25
23	30.522	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	861.188 4	861.188 7	0.4	897.165 0	897.166 5	1.6	番泻苷 A ^a	蒽醌类	
24	31.547	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₅	613.119 9	613.121 2	2.1	649.096 6	649.097 3	1.1	1,6-二- <i>O</i> -没食子酰-2- <i>O</i> -肉桂酰-β- <i>D</i> -葡萄糖苷 ^b	鞣质类	24-25
25	32.646	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.108 9	461.109 7	1.7	497.085 6	497.085 7	0.2	1- <i>O</i> -没食子酰-6- <i>O</i> -肉桂酰-β- <i>D</i> -葡萄糖苷 ^b	鞣质类	24
26	33.098	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₂	487.088 2	487.089 8	3.3				大黄酸-1- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -乙酰)-β- <i>D</i> -葡萄糖苷	蒽醌类	16,26
27	34.000	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.098 9	1.2				大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^a	蒽醌类	
28	34.713	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₅	613.119 9	613.122 0	3.4	649.096 6	649.098 7	3.3	1,2-二- <i>O</i> -没食子酰-6- <i>O</i> -肉桂酰-β- <i>D</i> -葡萄糖苷 ^b	鞣质类	24-25
29	34.974	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	233.081 9	233.082 6	2.9				2-(2'-羟丙基)-5-甲基-7-羟基色原酮	色原酮类	18
30	35.810	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₂	487.088 2	487.089 2	2.1				大黄酸-8- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -乙酰)-β- <i>D</i> -葡萄糖苷	蒽醌类	16,26
31	36.574	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	407.134 8	407.135 5	1.8	443.111 4	443.111 4	-0.1	6-甲氧基酸模素-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷 ^b	萜类	24
32	37.428	C ₃₂ H ₃₂ O ₁₃	623.177 0	623.178 1	1.7	659.153 7	659.154 3	0.9	4'-羟基苯基-2-丁酮-4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(2"- <i>O</i> -没食子酰-6"- <i>O</i> -对羟基桂皮酰)-葡萄糖苷 ^a	苯丁酮类	
33	40.252	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.103 5	415.103 9	1.1	451.080 1	451.080 4	0.6	大黄酚-1- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^a	蒽醌类	
34	41.111	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	415.103 5	415.103 8	0.8	451.080 1	451.080 6	1.0	大黄酚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^a	蒽醌类	
35	42.308	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.098 8	1.0	467.075 0	467.075 7	1.4	芦荟大黄素-3-羟甲基- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^a	蒽醌类	
36	42.659	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.098 4	431.099 3	2.2				大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^a	蒽醌类	
37	46.159	C ₃₂ H ₃₂ O ₁₂	607.182 1	607.184 4	3.8	643.158 8	643.160 8	3.1	4-(4'-羟基苯基)-2-丁酮-4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(2"- <i>O</i> -没食子酰-基-6"- <i>O</i> -桂皮酰基)-葡萄糖苷 ^b	苯丁酮类	24

续表 1

峰号	<i>t_R</i> /min	分子式	[M-H] ⁻			[M+Cl] ⁻			化合物名称	化合物 参考	
			理论值	实际值	误差/ (×10 ⁻⁶)	理论值	实际值	误差/ (×10 ⁻⁶)		类型	文献
38	47.394	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₂	501.103 9	501.104 7	1.7	537.080 5	537.081 2	1.3	大黄酚-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6'- <i>O</i> -丙二酰)-葡萄糖苷/大黄酚-1- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6'- <i>O</i> -丙二酰)-葡萄糖苷	蒽醌类	30
39	48.430	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.114 0	445.114 8	1.8	481.090 7	481.091 7	2.1	大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷 ^a	蒽醌类	
40	53.225	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 5	269.045 8	0.9	305.022 2	305.022 2	-0.1	芦荟大黄素 ^a	蒽醌类	
41	59.034	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.041 2	285.040 5	2.6				ω-羟基大黄素 (6-羟基芦荟大黄素) ^b	蒽醌类	14,23
42	68.093	C ₁₅ H ₈ O ₆	283.024 8	283.025 8	3.5				大黄酸 ^a	蒽醌类	
43	71.381	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 5	269.046 8	4.7				大黄素 ^a	蒽醌类	
44	72.726	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253.050 6	253.051 3	2.6				大黄酚 ^a	蒽醌类	
45	74.140	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.061 2	283.061 8	2.1				大黄素甲醚 ^a	蒽醌类	

a-本实验通过对照品比对确认; b-文献通过对照品比对确认

a-This experiment was confirmed by comparison of reference materials; b-Literature was confirmed by comparison of reference materials

葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷 8 个结合型蒽醌及芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 5 个游离型蒽醌通过对照品比对确认, ω-羟基大黄素文献中采用对照品比对确认), 蒽醌类成分 2 个(番泻苷 B 和番泻苷 A 均通过对照品比对确认), 鞣质类成分 17 个(其中没食子酸、儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯、表儿茶素和表儿茶素没食子酸酯通过对照品比对确认, 另有 11 个文献中采用对照品比对确认), 二苯乙烯类成分 2 个[白藜芦醇 4'-*O*-葡萄糖苷和白藜芦醇 4'-*O*-β-*D*-(6"-*O*-没食子酰)-葡萄糖苷, 均通过对照品比对确认], 苯丁酮类成分 4 个[其中 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)-葡萄糖苷通过对照品比对确认, 其余 3 个文献中均采用对照品比对确认], 色原酮类成分 2 个, 萘类成分 1 个(文献中采用对照品比对确认)。

另外 6 个成分本实验及相关文献报道均未通过对照品比对确认, 其结构系根据产生的二级质谱碎片离子与文献记载进行比对推导。16 号峰在一级图谱中给出 *m/z* 233.045 5, 为准分子离子峰 [M-H]⁻; 在二级质谱中, [M-H]⁻ 发生裂解丢失 1 分子 CO₂, 产生 *m/z* 189.054 7 的碎片离子, [M-H-CO₂]⁻ 随后依次丢失 CO 和 CH₃, 产生 *m/z* 161.060 1 和 146.036 0 的碎片离子, 与文献记载的 2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色原酮质谱数据一致^[18]。18 号峰在一级图谱中给出 *m/z* 309.099 3, 为准分子离子峰 [M-H]⁻; 在二级质谱中, [M-H]⁻ 发生裂解丢失葡萄糖 (C₆H₁₀O₅), 产生 *m/z* 147.039 9 的碎片离子, [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻ 随后丢失 1 分子 CO₂, 产生 *m/z*

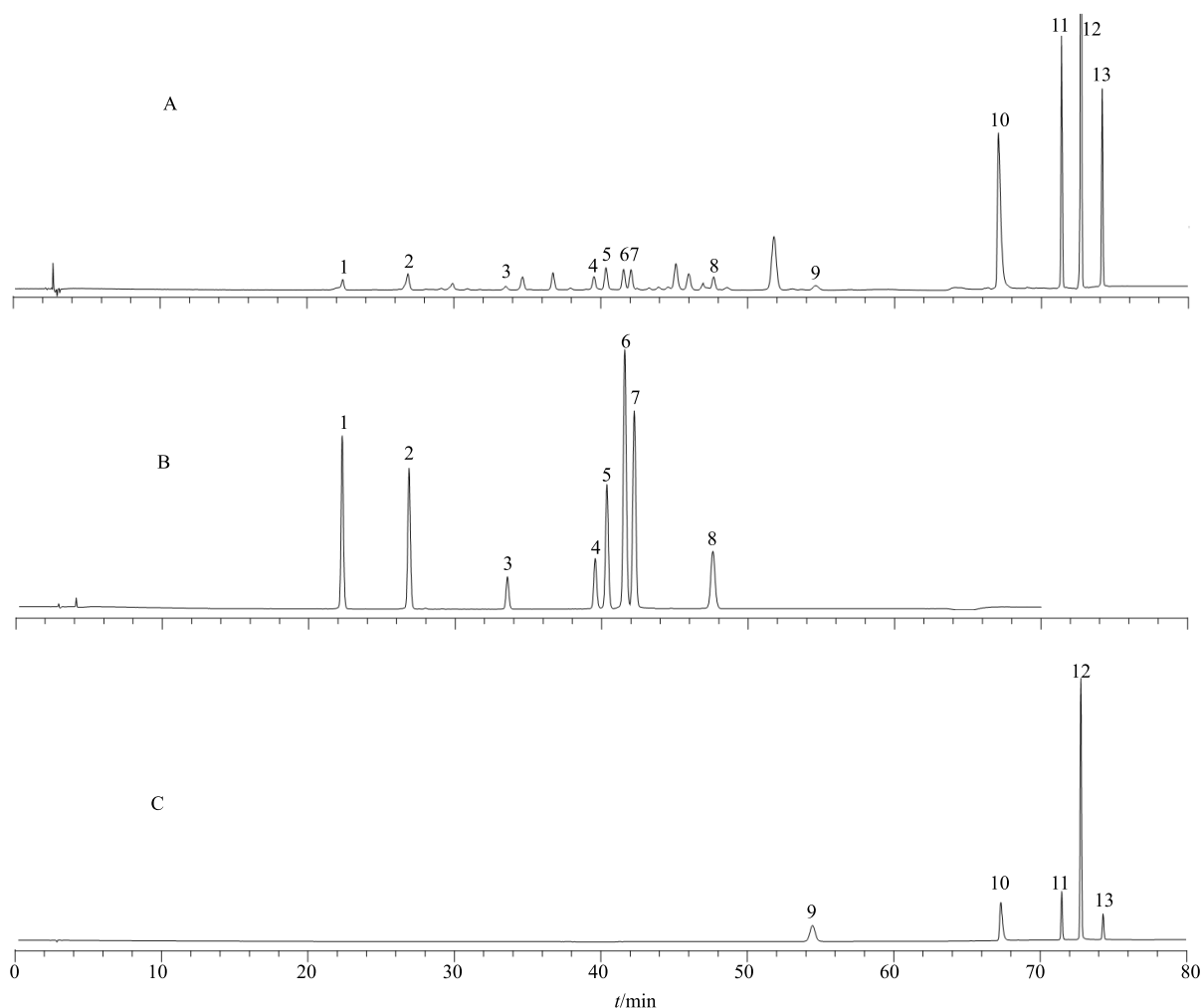
103.055 7 的碎片离子, 二级质谱中同时出现 *m/z* 161.061 6 的碎片离子, 为 [M-H]⁻ 发生裂解丢失桂皮酸 (C₉H₈O₂), 与文献记载的 1-*O*-桂皮酰-β-*D*-葡萄糖苷质谱数据一致^[28], 中医药百科全书数据库也有大黄中存在该成分的记载。26 号峰和 30 号峰在一级图谱中均给出 *m/z* 487.089 2, 为准分子离子峰 [M-H]⁻; 在二级质谱中, 26 号峰 [M-H]⁻ 发生裂解丢失葡萄糖, 产生 *m/z* 325.033 9 的碎片离子, [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻ 随后丢失乙酰基 (C₂H₂O), 产生 *m/z* 283.024 9 的碎片离子, [M-H-C₆H₁₀O₅-C₂H₂O]⁻ 随后依次丢失 CO₂ 和 CO, 产生 *m/z* 239.033 4 和 211.040 5 的碎片离子, 30 号峰出现 *m/z* 283.024 8、239.034 0 和 211.039 1 的碎片离子, 与 26 号峰裂解行为一致, 以上质谱数据分别与文献记载的大黄酸-1-*O*-(6'-*O*-乙酰)-β-*D*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-(6'-*O*-乙酰)-β-*D*-葡萄糖苷一致^[16,20-22,26]。29 号峰在一级图谱中给出 *m/z* 233.082 6, 为准分子离子峰 [M-H]⁻; 在二级质谱中, [M-H]⁻ 发生裂解丢失 CH₃CHO, 产生 *m/z* 189.055 8 的碎片离子, 与文献记载的 2-(2'-羟基丙基)-5-甲基-7-羟基色原酮质谱数据一致^[18]。38 号峰在一级图谱中给出 *m/z* 501.104 7 和 537.080 5, 分别为准分子离子峰 [M-H]⁻ 和加合离子峰 [M+Cl]⁻; 在二级质谱中, [M-H]⁻ 发生裂解丢失丙二酰基葡萄糖 (C₉H₁₂O₈), 产生 *m/z* 253.051 4 的碎片离子, [M-H-C₉H₁₂O₈]⁻ 随后依次丢失 CO, 分别产生 *m/z* 225.055 3 和 197.071 6 的碎片离子, 根据文献报道^[30]该成分为大黄酚-8-*O*-β-*D*-(6'-*O*-丙二酰)-葡萄糖苷或大黄酚-1-*O*-β-*D*-(6'-*O*-丙二酰)-葡萄糖苷。

2.2 13 个蒽醌类成分含量测定

2.2.1 色谱条件 检测波长 430 nm, 其他同“2.1.1”项。该条件下的样品和混合对照品色谱图见图 3。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 5.64 mg、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷 9.64 mg、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷 4.04 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷 10.3 mg、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷 8.88 mg、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷 7.24 mg、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 10.24 mg、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷 4.28 mg, 分别置 20 mL 量瓶中, 分别加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 配成 8 个结合型蒽醌对照品储备液; 分别精密吸取大黄素-1-*O*-

葡萄糖苷储备液 0.75 mL, 大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷储备液 1.2 mL, 芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷和大黄素-8-*O*-葡萄糖苷储备液各 2.5 mL, 大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷储备液 3.5 mL, 芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷储备液 5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 配成 8 个结合型蒽醌混合对照品溶液 A; 精密吸取 8 个结合型蒽醌混合对照品溶液 A 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇至刻度, 摇匀, 配成 8 个结合型蒽醌混合对照品溶液 B。精密称取大黄酸 6.88 mg、大黄素甲醚 8.36 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 芦荟大黄素 3.32 mg、大黄素 4.64 mg、大



1-芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 2-大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷 3-大黄素-1-*O*-葡萄糖苷 4-大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷 5-大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷 6-芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷 7-大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 8-大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷 9-芦荟大黄素 10-大黄酸 11-大黄素 12-大黄酚 13-大黄素甲醚
1-aloe-emodin-8-*O*-glucoside 2-rhein-8-*O*-glucoside 3-emodin-1-*O*-glucopyranoside 4-chrysophanol-1-*O*-glucoside 5-chrysophanol-8-*O*-glucoside 6-aloe emodin-3-CH₂-*O*-glucoside 7-emodin-8-*O*-glucoside 8-phycion-8-*O*-glucoside 9-aloe-emodin 10-rhein 11-emodin 12-chrysophanol 13-phycion

图 3 大黄饮片样品 (A)、8 个结合型蒽醌混合对照品 (B) 及 5 个游离型蒽醌混合对照品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC chromatograms of rhubarb pieces (A), mixed reference substances of eight bound anthraquinones (B) and mixed reference substances of five free anthraquinones (C)

黄酚 10.4 mg, 分别置 20 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配成 5 个游离型蒽醌对照品储备液; 分别精密吸取大黄酸、大黄素、大黄素甲醚储备液各 1.0 mL, 芦荟大黄素、大黄酚储备液各 2.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配成 5 个游离型蒽醌混合对照品溶液 A; 精密吸取 5 个游离型蒽醌混合对照品溶液 A 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 配成 5 个游离型蒽醌混合对照品溶液 B。

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取 8 个结合型蒽醌混合对照品溶液及 5 个游离型蒽醌混合对照品溶液 B 2.5、12.5、25 μ L, 8 个结合型蒽醌混合对照品溶液及 5 个游离型蒽醌混合对照品溶液 A 5、10、20、30、40 μ L, 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 测定峰面积值, 以峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行回归处理, 得 13 个蒽醌类成分的回归方程及线性范围, 见表 2。

2.2.4 精密度试验 分别精密吸取 8 个结合型蒽醌

表 2 13 个蒽醌类成分回归方程及线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges of 13 anthraquinones

对照品	回归方程	r	线性范围/ng
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=911\ 758\ X-13\ 065$	0.999 9	5.64~2 256.00
大黄酸-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=568\ 371\ X-7\ 907$	0.999 9	9.64~3 856.00
大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=919\ 883\ X-3\ 446$	0.999 9	1.212~484.8
大黄酚-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=741\ 460\ X-4\ 958$	0.999 9	2.472~988.8
大黄酚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=1\ 034\ 202\ X-10\ 473$	0.999 9	4.44~1 776.00
芦荟大黄素 3-羟甲基- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=1\ 025\ 361\ X-12\ 886$	0.999 9	7.24~2 896.00
大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=886\ 957\ X-6\ 353$	0.999 9	5.12~2 048.00
大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=1\ 007\ 383\ X-9\ 027$	0.999 9	2.996~1 198.4
芦荟大黄素	$Y=1\ 853\ 225\ X-6\ 542$	0.999 9	3.32~1 328.00
大黄酸	$Y=1\ 020\ 896\ X-7\ 277$	0.999 9	6.88~2 752.00
大黄素	$Y=1\ 898\ 738\ X-8\ 077$	0.999 9	2.32~928.00
大黄酚	$Y=2\ 368\ 966\ X-41\ 000$	0.999 9	10.40~4 160.00
大黄素甲醚	$Y=371\ 648\ X-7\ 544$	0.999 9	8.36~3 344.00

混合对照品溶液 A 和 5 个游离型蒽醌混合对照品溶液 A 各 10 μ L, 连续 6 次进样测定, 记录芦荟大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-羟甲基-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的峰面积积分值, 计算 RSD, 结果见表 3, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 提取“2.1.6”项下测定的 430 nm 下的色谱图, 记录以上 13 个成分的峰面积积分值, 计算 RSD, 结果见表 3, 表明该供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 提取“2.1.7”项下测定的 430 nm 下的色谱图, 记录以上 13 个成分的峰面积积分值, 代入回归方程计算 6 次测定的各成分的平均含量及其 RSD, 结果见表 3, 表明样品处理方法的重

复性较好。

2.2.7 回收率试验 精密称定 S1 粉末 6 份, 每份约 0.075 g, 分别精密加入一定体积的 13 个蒽醌类对照品储备液适量, 加甲醇至 24 mL 左右, 按“2.1.4”项下方法制成供试品溶液, 分别精密吸取 30 μ L 进样测定并计算以上 13 个成分的加样回收率及其 RSD, 结果见表 3。

2.2.8 样品测定及结果计算 提取“2.1.8”项下测定的 S1~S35 的 430 nm 色谱图, 记录 13 个蒽醌类成分峰面积, 代入回归方程计算样品中各成分的含量。结果见表 4。

3 讨论

本课题组前期研究发现大黄结合型蒽醌难溶于甲醇, 与大部分文献记载不符^[31], 故 8 个大黄结合型蒽醌混合对照品溶液制备采用 70%甲醇溶解。

大黄中的蒽醌分游离型和结合型 2 种, 以往的研究多集中于游离型蒽醌^[32], 但游离型蒽醌和结合

表 3 含量测定精密性、稳定性、重复性、回收率试验结果

Table 3 Results of precision, stability, reproducibility and recovery test for content determination

成分	精密性试验	稳定性试验	重复性试验		回收率试验	
	RSD/%	RSD/%	质量分数/(mg·g ⁻¹)	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
芦荟大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.51	3.24	0.754	4.63	96.84	1.60
大黄酸-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.40	1.67	1.715	2.04	100.92	1.57
大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.24	4.50	0.197	2.46	95.11	2.19
大黄酚-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.54	3.90	0.870	3.54	98.73	1.21
大黄酚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.50	3.22	1.115	2.15	96.85	1.85
芦荟大黄素 3-羟甲基- <i>O</i> -葡萄糖苷	3.06	3.12	1.027	2.09	96.15	3.70
大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.51	1.85	1.181	1.47	96.91	3.44
大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	2.46	0.83	1.029	2.50	98.18	2.83
芦荟大黄素	1.39	2.67	2.102	2.43	98.03	2.86
大黄酸	1.62	2.45	8.046	2.72	99.84	4.70
大黄素	1.23	2.18	2.572	1.54	98.04	3.40
大黄酚	3.39	2.02	6.784	1.23	96.97	2.68
大黄素甲醚	0.80	1.73	9.896	1.33	96.56	1.73

表 4 大黄饮片中 13 个蒽醌类成分含量测定结果

Table 4 Results of determination of 13 anthraquinones in rhubarb pieces

样品 编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)												
	芦荟大黄素- 8- <i>O</i> -葡萄糖苷	大黄酸-8- <i>O</i> - 葡萄糖苷	大黄素-1- <i>O</i> - 葡萄糖苷	大黄酚-1- <i>O</i> - 葡萄糖苷	大黄酚-8- <i>O</i> - 葡萄糖苷	芦荟大黄素-3-羟 甲基- <i>O</i> -葡萄糖苷	大黄素-8- <i>O</i> - 葡萄糖苷	大黄素甲醚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	芦荟 大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素 甲醚
S1	0.726	1.692	0.195	0.848	1.083	1.011	1.197	1.016	2.161	8.361	2.618	6.900	9.999
S2	2.231	3.594	0.556	2.282	3.031	0.938	2.984	2.256	1.401	5.146	2.026	4.278	7.652
S3	2.950	12.662	0.923	5.019	0.971	0.835	3.014	2.931	3.639	13.362	2.856	4.528	8.691
S4	0.352	0.801	0.124	0.489	0.576	0.874	0.691	0.775	1.761	7.484	3.364	7.354	9.139
S5	0.217	1.788	0.355	1.475	1.858	1.353	1.537	1.131	2.269	8.274	3.780	7.720	12.925
S6	0.406	0.782	0.149	0.525	0.843	0.809	0.943	0.970	1.511	6.505	3.451	6.888	11.294
S7	0.923	0.471	0.196	0.850	1.390	0.840	0.440	0.496	1.631	4.126	2.686	8.041	12.037
S8	2.776	4.488	0.893	3.788	4.251	0.591	3.361	2.764	0.748	1.901	1.049	2.434	4.720
S9	2.467	7.081	0.879	3.595	5.389	1.453	5.065	3.270	1.582	7.079	3.210	6.390	8.075
S10	1.896	11.946	0.535	2.244	1.092	0.583	1.146	0.543	0.872	7.443	0.781	1.800	1.963
S11	0.638	0.778	0.167	0.466	0.784	0.735	0.610	0.306	1.184	3.005	1.711	5.396	7.915
S12	0.841	2.007	0.345	0.995	1.085	1.069	1.508	0.797	2.366	8.912	3.424	6.665	10.483
S13	1.913	3.920	0.530	2.560	3.516	1.167	2.806	1.617	1.520	5.338	1.934	5.016	7.416
S14	0.461	0.745	0.116	0.465	0.771	0.648	0.415	0.267	1.144	3.741	1.593	5.499	6.335
S15	0.441	0.762	0.149	0.641	1.101	0.840	0.523	0.371	1.253	3.747	1.934	6.164	8.219
S16	2.684	1.976	0.468	1.527	2.174	1.281	1.059	0.959	2.250	2.421	1.223	5.439	9.150
S17	0.596	0.717	0.160	0.568	0.853	1.566	0.597	0.328	2.608	7.198	4.315	9.582	15.138
S18	0.640	0.934	0.212	0.622	1.081	1.345	1.299	0.594	2.514	9.670	5.014	9.332	15.902
S19	0.269	0.267	0.078	0.261	0.678	0.859	0.354	0.460	1.721	7.093	3.143	6.674	11.747
S20	0.421	0.579	0.112	0.415	0.721	0.415	0.551	0.635	0.963	3.116	1.544	4.565	4.960
S21	0.537	1.564	0.214	0.674	0.576	1.185	0.885	0.405	2.081	11.541	3.451	6.137	10.682

续表 4

样品 编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)												
	芦荟大黄素- 8-O-葡萄糖苷	大黄酸-8-O- 葡萄糖苷	大黄素-1-O- 葡萄糖苷	大黄酚-1-O- 葡萄糖苷	大黄酚-8-O- 葡萄糖苷	芦荟大黄素-3-羟 甲基-O-葡萄糖苷	大黄素-8-O- 葡萄糖苷	大黄素甲醚-8- O-葡萄糖苷	芦荟 大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素 甲醚
S22	0.329	0.402	0.142	0.364	0.664	0.724	0.684	0.757	1.070	4.855	2.257	5.096	6.903
S23	1.814	2.304	0.506	1.863	2.446	1.419	1.891	1.278	2.087	5.487	3.106	7.749	12.391
S24	2.869	1.032	0.504	2.359	4.151	1.471	0.883	1.412	2.210	1.166	1.099	8.038	12.037
S25	0.510	0.786	0.149	0.580	0.959	0.944	0.931	0.780	2.027	7.533	3.529	7.580	11.170
S26	1.386	2.819	0.316	1.471	1.165	0.696	1.561	0.708	1.237	5.045	1.580	3.158	4.272
S27	0.308	0.491	0.097	0.369	0.734	1.565	0.272	0.213	2.173	7.665	2.969	10.952	11.259
S28	1.062	1.447	0.293	1.203	1.456	1.149	0.981	0.588	1.899	7.103	2.628	6.840	9.530
S29	0.447	1.029	0.131	0.734	1.317	1.103	0.691	0.458	1.546	6.028	2.373	8.286	8.711
S30	0.362	0.997	0.146	0.383	0.673	0.636	0.545	0.395	0.930	6.331	1.807	3.711	6.563
S31	0.614	1.023	0.142	1.009	1.715	1.055	0.961	0.691	0.900	2.968	1.736	3.799	5.608
S32	1.539	3.104	0.466	1.643	1.724	0.535	2.357	1.153	0.958	3.721	1.560	2.861	5.150
S33	0.437	0.849	0.096	0.620	0.866	0.592	0.441	0.361	0.666	1.899	1.085	2.293	3.797
S34	0.122	0.273	0.021	0.091	0.156	1.627	0.057	0.091	2.235	8.371	3.003	7.586	10.897
S35	0.200	0.407	0.021	0.219	0.339	1.409	0.119	0.122	1.449	6.222	2.851	5.393	9.978

型蒽醌药理作用并不一样^[1]，近年来结合型蒽醌的活性备受国内外学者关注^[32]，《中国药典》2015 年版仅测定了游离型蒽醌和总蒽醌，本研究建立的同时测定 8 个结合型蒽醌和 5 个游离型蒽醌的方法可以为更全面评价大黄质量提供借鉴。

文献报道多以 280 nm 和 430 nm 作为大黄指纹图谱的检测波长，以 280 nm 下出峰最为全面^[33]，故本研究以 280 nm 作为指纹图谱的检测波长，本课题组前期研究发现，430 nm 波长下检出的均为蒽醌类成分^[34]，为避免其他成分对蒽醌类成分检测的干扰，本研究以 430 nm 作为该类成分的含量测定波长。

蒽醌类成分是大黄的主要活性成分^[1]，但研究发现该类成分也具有一定毒性，表现为一定剂量范围内发挥肝肾保护作用，超过一定剂量则产生毒性反应^[35]，由表 3 含量测定结果可知，不同来源大黄饮片中蒽醌类成分含量差异较大，可能存在因含量过高引发毒性的用药安全性和因含量不足而导致疗效不明显的疗效不稳定问题，应引起临床的高度重视。

参考文献

- [1] 谭 鹏, 张海珠, 张 青, 等. UPLC 法同时测定大黄中 10 个蒽醌衍生物的含量 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 928-934.
- [2] 龚小红, 赵梦杰, 党 珏, 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.

- [3] 李冬华, 张 平, 张明童, 等. 全国大黄药材及其饮片评价性抽验结果分析与一测多评法研究 [J]. 中国药事, 2018, 32(6): 775-783.
- [4] 任伟光, 王 琦, 黄林芳, 等. 大黄类药材的质量评价进展 [J]. 中南药学, 2014, 12(4): 354-359.
- [5] 陈林伟, 秦昆明, 徐雪松, 等. 中药指纹图谱数据库的研究现状及展望 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3041-3047.
- [6] Chen F F, Qi H Y, Shi Y P. Fingerprint analysis of *Codonopsis Radix* by HPLC coupled with chemometrics analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 307-312.
- [7] 秦建平, 吴建雄, 郎 悦, 等. 痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(4): 427-430.
- [8] 李 莉, 李德坤, 鞠爱春. 注射用五味子提取物指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(3): 475-480.
- [9] 王月红, 游飞祥, 王 磊, 等. 六经头痛片 HPLC 指纹图谱建立及多指标成分定量测定研究 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4167-4173.
- [10] 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.
- [11] 游飞祥, 袁雪海, 许 浚, 等. 基于 HPLC-Q-TOF/MS 的六经头痛片化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4157-4166.
- [12] 窦志华, 卞 理, 许 波, 等. 指纹图谱、多成分定量与模式识别相结合的大黄质量评价 [J]. 中华中医药学

- 刊, 2017, 35(11): 2903-2907.
- [13] 洪筱坤, 王智华, 李 旭, 等. 19 个大黄样品 HPLC 指纹图谱的比较分析 [J]. 上海中医药杂志, 1993, 27(8): 32-34.
- [14] Lin C C, Wu C I, Lin T C, *et al.* Determination of 19 rhubarb constituents by high performance liquid chromatography-ultraviolet-mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2006, 29(17): 2584-2593.
- [15] Jin W, Wang Y F, Ge R L, *et al.* Simultaneous analysis of multiple bioactive constituents in *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(14): 2351-2360.
- [16] Ye M, Han J, Chen H B, *et al.* Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, 18(1): 82-91.
- [17] Zhu T T, Liu X, Wang X L, *et al.* Profiling and analysis of multiple compounds in rhubarb decoction after processing by wine steaming using UHPLCQ-TOF-MS coupled with multiple statistical strategies [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(15): 3081-3090.
- [18] Yan Y, Zhang Q, Feng F. HPLC-TOF-MS and HPLC-MS/MS combined with multivariate analysis for the characterization and discrimination of phenolic profiles in nonfumigated and sulfur-fumigated rhubarb [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(14): 2667-2677.
- [19] 王 晴, 卢志威, 刘月红, 等. UPLC-Q-TOF/MS^E 结合诊断离子过滤方法快速分析大黄中酚类成分 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1922-1931.
- [20] Zhang L, Liu H, Qin L, *et al.* Global chemical profiling based quality evaluation approach of rhubarb using ultra performance liquid chromatography with tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(3): 511-522.
- [21] Liu Y, Li L, Xiao Y Q, *et al.* Global metabolite profiling and diagnostic ion filtering strategy by LC-QTOF MS for rapid identification of raw and processed pieces of *Rheum palmatum* L. [J]. *Food Chem*, 2016, 192: 531-540.
- [22] Wang M, Fu J F, Guo H M, *et al.* Discrimination of crude and processed rhubarb products using a chemometric approach based on ultra fast liquid chromatography with ion trap/time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(3): 395-401.
- [23] 郑俊华, 西泽信, 山岸乔, 等. 正品大黄中 34 种化学成分的高效液相色谱法定量分析 [J]. 北京医科大学学报, 1989, 21(1): 54-56.
- [24] Kashiwada Y, Nonaka G I, Nishioka I. Studies on rhubarb (*Rhei Rhizoma*). XV¹⁾. Simultaneous determination of phenolic constituents by high-performance liquid chromatography [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(4): 999-1004.
- [25] Komatsu K, Nagayama Y, Tanaka K, *et al.* Comparative study of chemical constituents of rhubarb from different origins [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(11): 1491-1499.
- [26] 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.
- [27] 梁淋渊, 甘麦邻, 罗 燕. 大黄化学成分与药理活性研究进展 [J]. 中兽医医药杂志, 2017, 36(1): 80-83.
- [28] Michodjehoun-Mestres L, Amraoui W, Brillouet J M. Isolation, characterization, and determination of 1-*O*-*trans*-cinnamoyl- β -D-glucopyranose in the epidermis and flesh of developing cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) and four of its genotypes [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(4): 1377-1382.
- [29] 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.
- [30] Wang Z W, Wang J S, Luo J, *et al.* Three new phenolic glucosides from the roots of *Rheum palmatum* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2012, 60(2): 241-245.
- [31] 竇志华, 曹 瑞, 卞 理, 等. 正交试验法优选大黄中蒽醌类成分提取工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3279-3286.
- [32] Chen A Z, Sun L, Yuan H, *et al.* Simultaneous qualitative and quantitative analysis of 11 active compounds in rhubarb using two reference substances by UHPLC [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(19): 3686-3696.
- [33] 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.
- [34] 刘翠玲, 刘东辉, 黄月纯, 等. 大黄饮片 HPLC 指纹图谱的方法学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5): 442-445.
- [35] 陶明宝, 张 乐, 刘 飞, 等. 含蒽醌类成分中药的安全性研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 238-243.