

HPLC 同时测定不同生长年限和不同采收期网果酸模中 6 个成分含量

郭昌洪², 许京¹, 王瑞海¹, 苗青¹, 严光俊², 杨诗龙², 刘丽梅^{1*}

1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700

2. 湖北省荆州市中医医院, 湖北 荆州 434000

摘要:目的 建立网果酸模 *Rumex chalepensis* 中 6 个成分的含量测定方法。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱 Agilent Extend-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 254 nm 波长处二极管阵列检测器检测, 流动相为甲醇-0.1%甲酸, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 ℃, 进样量 5 μL。结果 对照品大黄酚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚分别在 208~3120、22.40~336.35、178.9~2908.8、16.7~250.8、104.4~1566.0、45.2~677.7 ng, 线性关系良好, 平均回收率 ($n=6$) 分别为 97.66%、97.10%、98.78%、97.38%、102.48%和 95.51%。16 批网果酸模中大黄酚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的质量分数分别为 0.6~7.1、0~2.7、1.0~6.5、0.1~0.6、0.7~4.3、0.1~0.4 mg/g; 对比分析不同生长年限、不同采收期、不同地块样品含量, 2 年生网果酸模初春或夏末初秋采集, 6 个成分含量总和较高, 为 12.2 mg/g。结论 所建立的方法可用于同时测定网果酸模中 6 个成分含量, 确定了网果酸模的采收年限和季节, 为网果酸模药材质量评价标准的制定提供了科学依据。

关键词: 网果酸模; 大黄酚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷; 大黄素-8-β-*D*-吡喃葡萄糖苷; 酸模素; 大黄素; 大黄酚; 大黄素甲醚; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)21-5342-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.030

Simultaneous determination of six components from *Rumex chalepensis* with different growth years and harvesting periods by HPLC

GUO Chang-hong², XU Jing¹, WANG Rui-hai¹, MIAO qing¹, YAN Guang-jun², YANG Shi-long², LIU Li-mei¹

1. Institute of Basic Theory Research of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Hubei Jingzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jingzhou 434000, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of six components from *Rumex chalepensis* Mill.. **Methods** The contents of chrysophanol-8-*O*-β-*D*-glucoside, emodin-8-β-*D*-glucoside, nepodin, emodin, chrysophanol, and physcion were simultaneously determined by HPLC. The mobile phase was methanol-0.1% formic acid, gradient elution, flow rate of 1 mL/min, column temperature of 25 ℃, injection volume of 5 μL, detected by Agilent Extend-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and diode array detector at 254 nm wavelength. **Results** The content of chrysophanol-8-*O*-β-*D*-glucoside, emodin-8-β-*D*-glucoside, nepodin, emodin, chrysophanol, and physcion had good linear relationship in the ranges of 208—3120, 22.40—336.35, 178.9—2908.8, 16.7—250.8, 104.4—1566.0, 45.2—677.7 ng, respectively. The average recovery rates were 97.66%, 97.10%, 98.78%, 97.38%, 102.48%, and 95.51% ($n=6$). The contents of chrysophanol-8-*O*-β-*D*-glucoside, emodin-8-β-*D*-glucoside, nepodin, emodin, chrysophanol, and physcion in 16 batches of *R. chalepensis* were determined in the range of 0.6—7.1, 0—2.7, 1.0—6.5, 0.1—0.6, 0.7—4.3, and 0.1—0.4 mg/g, respectively. Sample contents of different growing years, harvesting dates, and plots were compared and analyzed. Two-year-old *R. chalepensis* was collected in early spring or late summer and early autumn. The total content of six components was 12.2 mg/g, which was relatively high. **Conclusion** The established method can be used for simultaneous determination of six components from *R. chalepensis*, and determine the harvesting time and season of *R. chalepensis*, which provides a scientific basis for the formulation of quality evaluation criteria of *R. chalepensis*.

Key words: *Rumex chalepensis* Mill.; chrysophanol-8-*O*-β-*D*-glucoside; emodin-8-β-*D*-glucoside; nepodin; emodin; chrysophanol; physcion; high performance liquid chromatography

收稿日期: 2019-05-06

基金项目: 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目 (YZ-1721); 湖北省卫生健康委员会 2018—2019 年度中医药科研立项项目 (鄂卫通[2019]13 号-ZY2019F015); 荆州市 2018 年度科技发展计划项目 (荆科技发[2018]37 号-2018091)

作者简介: 郭昌洪 (1974—), 副主任药师, 从事药物基础研究与临床应用管理。E-mail: 519859768@qq.com

*通信作者 刘丽梅 (1965—), 研究员, 从事中药药效物质基础研究。Tel: (010)64089006 E-mail: liulimeih@sinasina.com

蓼科酸模属植物网果酸模 *Rumex chalepensis* Mill. 的干燥根及根茎在湖北省荆州市中医医院已有 30 多年的药用历史, 属于地方草药, 当地称之为金不换, 其始载于《中药志》, 又名红丝酸模, 主要分布在湖北、江西、河南、浙江及安徽等地^[1-4], 其具有清热解毒、通便、杀虫之功效, 民间用于止血和治疗痢疾^[5]。网果酸模主要含有酸模素及蒽醌类成分, 酸模素具有很强的抗真菌(白色念珠菌、红色发癣菌)活性^[6-7], 蒽醌类化合物广泛存在于蓼科植物中, 蒽醌苷为泻下主要药效成分之一, 游离蒽醌具有抗菌、消炎、抗肿瘤等作用^[7-8]。目前对于蒽醌苷类成分鲜有以 HPLC 法测定, 常采用分光光度法测定, 但此法干扰因素多, 实验结果误差大^[9]。尚未发现网果酸模中酸模素、游离蒽醌、结合蒽醌含量同时测定的报道, 本研究采用 HPLC 同时测定不同生长年限和不同采收期网果酸模中大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、黄素-8- β -D-吡喃葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 6 个成分含量, 该方法色谱峰分离度较好, 为其制定科学、可控的质量评价标准提供了科学依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100 系列, 包括 G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315B DAD 检测器, HP 化学工作站; Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m, 美国安捷伦公司); SB-5200DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); CP2202S 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 对照品大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号 PS010712)、酸模素(批号 PS170608-03)、大黄素批号 PS000259)、大黄酚(批号 PS010475)、大黄素甲醚(批号 PS000263)均购自成都普思科技股份有限公司, 对照品大黄素-8- β -D-吡喃葡萄糖苷(批号 AF8032001)购自成都埃法生物科技有限公司, 所有对照品质量分数均大于 98%。

药材采自湖北省荆州市公安县章庄铺镇, 由黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为网果酸模 *Rumex chalepensis* Mill., 去掉根茎残基, 根及根茎洗净, 切片, 阴干, 得其饮片, 具体信息见表 1。乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯(Fisher 公司), 其他试剂均为分析纯, 水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	栽种时间	生长周期/月	采集时间	生长年限/年	采收季节	地块
1	2015-09	24	2017-09-24	2	秋	1 号
2	2015-09	25	2017-10-11	2~3	秋	1 号
3	2015-09	30	2018-02-28	2~3	春	1 号
4	2015-09	36	2018-09-17	3	秋	1 号
5	2018-08	6	2019-02-15	0~1	春	1 号
6	2017-03	6	2017-09-24	0~1	秋	2 号
7	2017-02	12	2018-02-28	1	春	2 号
8	2017-03	18	2018-09-17	1~2	秋	2 号
9	2014-02	30	2016-08-23	2~3	秋	2 号
10	2017-02	24	2019-02-15	2	春	2 号
11	2017-12	3	2018-02-28	0~1	春	3 号
12	2017-12	9	2018-09-17	0~1	秋	3 号
13	2015-03	31	2017-07-18	2~3	夏	3 号
14	2014-12	33	2017-09-24	2~3	秋	3 号
15	2014-12	34	2017-10-11	2~3	秋	3 号
16	2017-12	15	2019-02-15	1~2	春	3 号

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄素-8- β -D-吡喃葡萄糖苷对照品适量, 少许二氯甲烷溶解, 加甲醇分别制成含大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄素-8- β -D-吡喃葡萄糖苷分别为 482.4、99.6、116.8、302.8、99.2、148.2 μ g/mL 的溶液; 分别精密量取上述对照品溶液 90、1 000、320、40、200、180 μ L 于 2 mL 量瓶中, 混匀, 甲醇定容, 即得含大黄酚-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄素-8- β -D-吡喃葡萄糖苷各 21.7、49.8、18.7、6.1、9.9、13.3 μ g/mL 混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取网果酸模饮片末 1.0 g(过 50 目筛), 精密称定, 置于具塞三角瓶中, 加甲醇 40 mL, 称定质量, 超声提取 1 h, 放置至室温, 甲醇补足减失质量, 摇匀, 静置, 取上清液, 过 0.45 μ m 滤膜, 即得^[10]。

2.3 色谱条件

色谱柱 Agilent Extend-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 254 nm 波长处二极管阵列检测器检测, 流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱, 0~14 min, 45%~60% A; 14~25 min, 60%~86% A; 25~30 min, 86%~100% A; 30~35 min, 100% A。体积流量 1 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 5 μ L, 在此条件下, 网果酸模中 6 个成分与其他组分均能达到基线分离(图 1)。

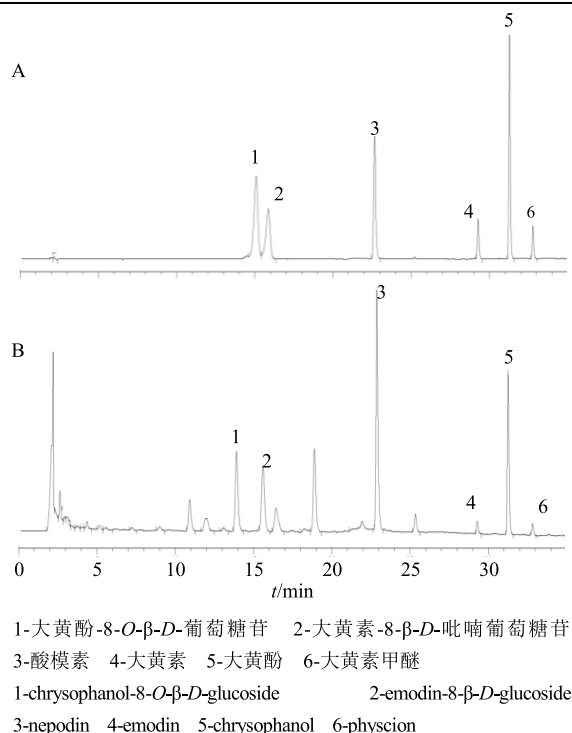


图 1 对照品 (A) 及样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of substances (A) and samples (B)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取“2.1”项下混合对照品溶液,按“2.3”项下色谱条件方法,进样量分别为 1、3、6、9、12、15 μL ,测定峰面积。以进样质量为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y) 制标准曲线,并计算大黄酚-8- O - β - D -葡萄糖苷、大黄素-8- β - D -吡喃葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚回归方程分别为 $Y=5.139 X-15.221$, $r^2=1.000 0$; $Y=4.266 2 X-1.363 1$, $r^2=0.999 9$; $Y=4.156 4 X+16.215$, $r^2=1.000 0$; $Y=6.224 X-2.799$, $r^2=0.999 8$; $Y=9.674 1 X-12.221$, $r^2=1.000 0$; $Y=2.530 9 X-2.667 3$, $r^2=0.999 9$ 。结果表明 6 个成分分别在 208.0~3120.0、22.40~336.35、178.9~2908.8、16.7~250.8、104.4~1566.0、45.2~677.7 ng 线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 5 μL ,连续进样 6 次,大黄酚-8- O - β - D -葡萄糖苷、大黄素-8- β - D -吡喃葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 0.38%、0.52%、0.19%、1.72%、0.48%、0.51%。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 5 μL ,分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 依法测定,由峰面积值统计结果可见供试品溶液在 12 h 保持稳定, RSD 分别为 2.93%、2.98%、1.32%、0.74%、0.72%、1.27%。

2.4.4 重复性试验 取网果酸模药材粉末 (批号 20171011) 6 份,各约 1.0 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备成供试品溶液,分别测定并计算大黄酚-8- O - β - D -葡萄糖苷、大黄素-8- β - D -吡喃葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚质量分数平均值分别为 0.23%、0.05%、0.38%、0.01%、0.12%、0.02%, RSD 分别为 2.49%、2.73%、1.88%、1.40%、0.48%、0.31%。

2.4.5 加样回收率试验 取网果酸模药材粉末约 0.5 g 共 6 份,精密称定,分别精密加入“2.1”项下对照品溶液 2.50、2.80、16.00、0.6、6.00、0.70 mL,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样测定,计算回收率,结果大黄酚-8- O - β - D -葡萄糖苷、大黄素-8- β - D -吡喃葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 6 个成分的平均回收率分别为 97.66%、97.10%、98.78%、97.38%、102.48%、95.51%, RSD 分别为 0.90%、2.85%、1.34%、2.92%、1.04%、2.69%。

2.4.6 定量限 将各对照品溶液用甲醇溶液稀释至一定浓度,进样测定各化合物的定量限^[11]。大黄酚-8- O - β - D -葡萄糖苷、大黄素-8- β - D -吡喃葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚定量限分别为 0.59、1.74、1.08、0.59、0.29、1.37 ng。

2.5 网果酸模不同年限、不同采收期样品含量测定

精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 5 μL ,注入液相色谱仪分析测定 16 批不同生长年限、采收季节网果酸模中 6 个成分含量测定结果见表 2;不同地块采集样品 6 个成分含量与其生长时间的关系见图 2。

网果酸模分为春季播种和秋季播种,多在夏末秋初采集。当春天播种在第 2 年夏末秋初采集,生长年限 2 年,实际生长周期为 1.5 年;当秋天播种在第 3 年夏末秋初采集,生长年限 3 年,实际生长周期为 2 年;当春天播种在第 3 年夏末秋初采集,生长年限 3 年,实际生长周期为 2.5 年。

1 号地较高质量分数为 9.5~9.9 mg/g,平均质量分数为 8.0 mg/g,样品的生长时间为 2~2.5 年;2 号地较高质量分数为 10.1~12.2 mg/g,平均质量分数为 9.1 mg/g,样品的生长时间为 1.5~2.5 年;3 号地较高质量分数范围为 1.23~1.35 mg/g,平均质量分数为 9.8 mg/g,样品的生长时间为 0.75~1.5 年。综合 3 个地块 16 个样品 6 种成分高含量范围对应的生长时间,频次较高的 1.5~2.5 年,由此可以确定网果酸模在 1.5~2.5 年间采收比适宜,平均生长年限为 2 年。

表 2 网果酸模各批次 6 个成分含量测定结果

Table 2 Determination results of six components in each batch of *R. chalepensis*

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						总量/ (mg·g ⁻¹)
	大黄酚-8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	大黄素-8-β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	酸模素	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚	
1	3.2	0.9	3.5	0.2	1.4	0.3	9.5
2	3.4	0.8	2.9	0.2	1.1	0.3	8.7
3	3.2	1.0	3.6	0.2	1.6	0.3	9.9
4	0.9	0	1.0	0.2	1.0	0.2	3.3
5	4.8	1.9	1.2	0.1	0.6	0.1	8.7
6	2.3	0.6	2.1	0.2	1.3	0.3	6.8
7	0.8	0.2	4.5	0.3	1.7	0.3	7.8
8	1.3	2.0	6.5	0.3	1.8	0.3	12.2
9	0.7	0.2	3.6	0.6	4.3	0.7	10.1
10	4.2	1.6	1.6	0.1	0.9	0.2	8.6
11	0.6	0.1	1.4	0.2	0.9	0.2	3.4
12	2.4	2.4	6.2	0.3	1.9	0.3	13.5
13	3.4	1.1	3.4	0.3	1.6	0.4	10.2
14	3.2	0.9	3.2	0.3	1.7	0.4	9.7
15	3.2	1.0	3.6	0.2	1.6	0.3	9.9
16	7.1	2.7	1.5	0.1	0.7	0.2	12.3
平均值	2.8	1.1	3.1	0.2	1.5	0.3	9.0

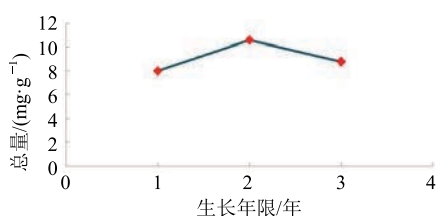


图 2 不同生长年限网果酸模 6 个成分总含量

Fig. 2 Column chart of total content of six components in *R. chalepensis* with different growing years

根据不同地块采集样品酸模素及蒽醌类成分含量对应的采收季节发现,网果酸模采收季节为初春(1、2月)或夏末秋初(8、9月),酸模素及蒽醌类成分含量之和最高。

综上所述,上述 6 个成分可作为网果酸模含量控制指标。网果酸模最佳采收年限为 2 年,采收时间为初春和夏末秋初适宜。

3 讨论

本实验选取网果酸模中固有的并具有明确化学结构和生物活性的大黄酚-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、酸模素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 6 个成分为网果酸模的质量标志物^[6-8, 12]。通过筛选提取方法、提取溶剂、提取溶剂体积和提取时间最终确定供试品溶液的制备方法。在进行稳定性考察时,连续测定网果酸模 24 h 内 6 个成分的峰面积,考察各成分的稳定性,发现酸模素的峰面积随时间延长逐渐降低,在 0~12 h 内满足稳定性考察要求,因此,本实

验限定在 12 h 检测样品含量。本研究共测定 16 批网果酸模中酸模素及蒽醌类成分含量,其平均质量分数为 0.90%,为其制定科学、可控的质量评价标准提供了科学依据。

参考文献

- [1] 中国医学科学院药物研究所等. 中药志 (第 1 册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979.
- [2] 李建秀, 周凤琴, 张照荣. 山东药用植物志 [M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2013.
- [3] 冉先德. 中华药海 (第 1 册) [M]. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 1993.
- [4] 邱颂平. 大黄的药学与临床研究 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [5] 南京中医药大学编著. 中药大辞典 (上册) [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2014.
- [6] 邓玉环. 土大黄基源鉴定及质量标准研究 [D]. 太原: 山西省中医药研究院, 2016.
- [7] 蔡少青, 秦路平. 生药学 [M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [8] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 227-234.
- [9] 张 村, 李 丽, 肖永庆, 等. HPLC 法同时测定大黄不同来源药材中 2 个蒽醌苷类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1): 53-55.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [11] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [12] 张铁军, 白 钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学报, 2019, 54(2): 187-196.