

基于 UPLC-PDA 指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价大黄质量

严 辉¹, 谢舒平¹, 濮宗进¹, 陈嘉倩¹, 周桂生¹, 郭 盛¹, 赵 明¹, 魏 牧², 王元龙², 段金廛^{1*}

1. 南京中医药大学江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/国家中医药管理局中药资源循环利用重点研究室/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023
2. 甘南百草生物科技发展有限公司, 甘肃 合作 747000

摘要: 目的 采用超高效液相色谱-光电二极管阵列检测器 (UPLC-PDA) 建立大黄药材指纹图谱及同时测定大黄中 9 个成分含量的分析方法, 并对 17 批不同产地、不同基原、不同生长年限的大黄进行质量分析和评价。方法 采用 ThermoSynchronis C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱。指纹图谱数据导入 SIMCA-P 14.1 软件进行聚类分析和主成分分析, 同时基于 UPLC-PDA 法对番泻苷 B、大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素共 9 个成分进行定量分析。结果 17 批大黄药材指纹图谱共寻找共有峰 20 个, 经对照品指认 9 个峰。聚类分析与主成分分析显示, 唐古特大黄、掌叶大黄能够显著区分, 唐古特大黄与药用大黄相似, 聚为一类; 4 年与 5 年的唐古特大黄不能区分、1 年与 2 年的掌叶大黄不能区分。指标性成分含量测定结果显示, 唐古特大黄高于其他 2 种大黄, 4 年的唐古特大黄质量优于 5 年的, 2 年的掌叶大黄质量优于 1 年的。结论 采用 UPLC-PDA 技术, 建立的大黄药材指纹图谱结合多成分含量测定的方法能够快速、科学、准确地区分不同基原的大黄, 并对不同年限大黄质量进行初步评价, 为大黄药材基原区分及质量评价提供依据。

关键词: 大黄; 指纹图谱; 番泻苷 B; 大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷; 番泻苷 A; 大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷; 大黄素; 大黄酸; 大黄酚; 大黄素甲醚; 芦荟大黄素; 主成分分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)18-4755-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.18.020

Quality evaluation of rhubarb based on UPLC-PDA fingerprint and multi-component content determination by chemical pattern recognition

YAN Hui¹, XIE Shu-ping¹, PU Zong-jin¹, CHEN Jia-qian¹, ZHOU Gui-sheng¹, GUO Sheng¹, ZHAO Ming¹, WEI Mu², WANG Yuan-long², DUAN Jin-ao¹

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization / Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization, State Administration of Traditional Chinese Medicine / National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing 210023, China
2. GannanBaicao Biotechnology Development Co., Ltd., Hezuo, 747000, China

Abstract: Objective A method was established to obtain fingerprint and determination of nine components in rhubarb based on ultra-performance liquid chromatography photodiode array detection (UPLC-PDA), and 17 batches of rhubarb from different regions, different varieties and different growth years were analyzed. **Methods** A ThermoSynchronis C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used with a gradient of acetonitrile (A)-0.1% formic acid (B) as a mobile phase. Fingerprint data was imported into SIMCA-P 14.1 software for cluster analysis and principal component analysis. At the same time, a total of nine components including sennoside B, rhein-8-*O*-β-*D*-glucoside, sennoside A, emodin-8-*O*-β-*D*-glucoside, aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion were

收稿日期: 2020-03-06

基金项目: 2017 年江苏大学生创新创业训练计划项目; 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (CARS-21); 江苏省高校中药学优势学科 II 期建设项目 (2014-ysxk); 名贵中药资源可持续利用能力建设项目 (2060302-1702-15)

作者简介: 严 辉 (1980—), 男, 江苏扬中人, 博士, 副教授, 主要从事中药资源学研究。Tel: (025)85811132 E-mail: glory-yan@163.com

*通信作者: 段金廛 (1956—), 男, 教授, 博士生导师, 中国自然资源学会中药及天然药物资源研究专业委员会主任委员, 中国中药协会中药资源循环利用专业委员会主任委员, 主要从事中药资源化学与资源循环利用研究。Tel: (025)85811291 E-mail: dja@njucm.edu.cn

quantitatively analyzed. **Results** 20 common peaks were found in the fingerprints of 17 batches of rhubarb, and 9 peaks were identified by standard compounds. Cluster analysis and principal component analysis showed that *Rheum tanguticum* was similar to *Rheum officinale* and could be distinguished with *Rheum palmatum* well. Four years and five years of *R. tanguticum* could not be distinguished, one year and two years of *R. palmatum* could not be distinguished neither. The determination of the indicator components showed that *R. tanguticum* was higher than the other two kinds of rhubarb; Four years of *R. tanguticum* was better than five years, and two years of *R. palmatum* was better than one year. **Conclusion** This method established rhubarb fingerprint combined with multi-component determination based on UPLC-PDA technology could quickly, scientifically and accurately distinguish rhubarb of different origins. The preliminary evaluation of the rhubarb in different years and a basis for distinguishing the source of rhubarb was also provided.

Key words: rhubarb; fingerprint; sennoside B; rhein-8-*O*- β -D-glucoside; sennoside A; emodin-8-*O*- β -D-glucoside; aloe-emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion; principal component analysis

大黄属 *Rheum* L. 植物系蓼科 (Polygonaceae) 多年生宿根草本植物, 大黄的药用历史悠久, 传统中医理论认为大黄性苦寒, 具有攻积导滞、泄火解毒、行瘀通经功能。现代研究表明蒽醌衍生物是大黄药材中一类重要的化学成分, 也是其发挥药效的主要成分, 具有泻下、保肝、利胆、调血脂、抗肿瘤、抗病毒^[1]、抗炎等药理作用^[2-5]。大黄的药用历史悠久, 同时因为其用途广泛, 药效特异, 许多同属植物也被作为替代药材使用^[6], 除根及根茎为传统药用部位外, 叶片、叶柄等非药用部位也有入药习惯^[7-9], 而《中国药典》2015 年版^[10]中收载的正品大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎。大黄是一种多功效、多基原、多道地产区中药材, 项目组在产地调研中发现, 大黄对生长环境的要求较为严苛, 对生长地区的海拔、温度、湿度、光照、土壤状态都有较高的要求, 目前大黄药材主要来源于人工栽培, 其中药用大黄其适宜生长的海拔高度在 1 500~2 000 m; 掌叶大黄分布更为广泛, 栽培区域多位于 2 000~3 000 m 的高原山区^[11]; 与前两者相比^[12], 唐古特大黄更耐寒凉气候, 多分布于甘南、青海、川西北等青藏高原地区, 目前在甘肃省甘南地区合作市、卓尼县、临潭县等地人工栽培面积已接近达上千公顷, 该地区海拔在 2 500~3 500 m, 气候高寒阴湿, 紫外线强烈, 年日照在 2 300~4 200 h, 年均气温 2 ℃, 年均降水量 550 mm, 甘南地区唐古特大黄一般生长年限长达 4~5 年^[13], 在栽培过程中几乎不使用农药, 深受国内外市场推崇。由于大黄药材的基原、生长区域、生长年限等因素不同, 导致不同大黄药材的次生代谢产物的积累量不同和质量差异^[14-15]。前期研究发现^[16], 对于不同产区大黄药材的品质评价体系和方法仍不统一, 目前尚未建立快速、准确、实用的

分析方法用于区分不同来源大黄药材的品质^[17-18]。

指纹图谱分析是实现鉴别中药真实性、评价质量一致性和产品稳定性的可行模式, 指纹图谱结合对多种特征性成分的定量分析^[18], 能够科学、全面地反映药材的内在质量。对大黄中游离型蒽醌和结合型蒽醌进行同时测定, 能够揭示不同基原、不同规格等级的大黄药材内在成分的含量差异^[19]。目前已有研究利用指纹图谱结合含量测定的方法发现大黄药材与饮片之间存在差异, 并进一步基于液质联用指认相关特征峰^[20]。本研究采用超高效液相色谱-光电二极管阵列检测器 (UPLC-PDA) 技术, 建立指纹图谱结合含量测定的分析方法, 并对不同产地、不同基原、不同生长年限的大黄进行质量分析和品质评价^[21-22]。希望为大黄药材的质量评价提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acquity 超高效液相色谱仪, 配有四元泵、柱温箱、自动进样器、PDA 检测器和 Empower 工作站 (美国 Waters 公司); Sartorius BT125D 电子分析天平 (德国塞利多斯公司); EPED 超纯水系统 (南京易普达易科技发展有限公司); KQ-250E 型超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); AnkeGL-16GII 型离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试药

番泻苷 B (批号 lw18061205)、番泻苷 A (批号 lw18060803)、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 (批号 P20A9F59346)、大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷 (批号 lw190309)、芦荟大黄素 (批号 lw18052206)、大黄酸 (批号 lw18031506)、大黄素 (批号 lw16071004)、大黄酚 (批号 lw19012503)、大黄

素甲醚（批号 1w18041603）购自南京良纬生物科技有限公司，甲醇、乙腈、甲酸（色谱纯）购自美国默克公司，甲醇（分析纯，批号 20190116）购自国药集团化学试剂有限公司，2015、2016 年唐古特大黄药材共 3 批，采挖后经晒干，保存于甘肃省合作市的甘南百草生物科技有限公司药材

阴凉库，其余 14 批大黄样品均于 2017 年采挖后，统一由甘南百草生物科技有限公司晒干，17 批样品含水率 10%~15%，经南京中医药大学严辉副教授鉴定均唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim.ex Balf.、掌叶大黄 *R. palmatum* L.、药用大黄 *R. officinale* Baill.，样品信息见表 1。

表 1 17 批不同来源大黄药材信息表

Table 1 17 batches of *RHEI Radix et Rhizoma* from different regions

序号	基原	产地	采收时间	生长年限/年	规格
S1	唐古特大黄	甘肃合作	2017-10	4	丁（直径<0.5 cm）
S2	唐古特大黄	甘肃合作	2017-10	4	丁（直径<0.5 cm）
S3	唐古特大黄	甘肃合作	2017-10	4	片（直径<2.5 cm）
S4	唐古特大黄	甘肃合作	2017-10	4	片（直径<2.5 cm）
S5	唐古特大黄	甘肃合作	2017-10	4	头片
S6	唐古特大黄	甘肃合作	2015-10	4	头黄
S7	唐古特大黄	甘肃合作	2016-10	4	片（直径<2.5 cm）
S8	唐古特大黄	甘肃合作	2015-10	4	剥皮统片
S9	唐古特大黄	青海贵德	2017-10	5	统片
S10	唐古特大黄	青海互助	2017-10	5	片（直径<2.5 cm）
S11	唐古特大黄	青海互助	2017-10	5	片（直径<2.5 cm）
S12	掌叶大黄	甘肃礼县	2017-10	2	个子
S13	掌叶大黄	甘肃礼县	2017-10	2	水根
S14	掌叶大黄	甘肃会宁	2017-10	1	个子
S15	掌叶大黄	甘肃庄浪	2017-10	2	个子
S16	掌叶大黄	甘肃庄浪	2017-10	1	水根
S17	药用大黄	湖北利川	2017-11	1	个子

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

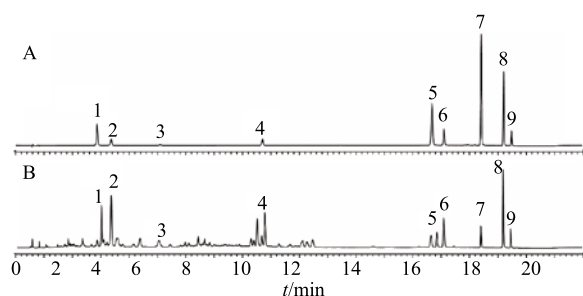
精密称定大黄药材粉末 0.5 g（4 号筛），置 50 mL 具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定质量；超声提取 30 min 后，放冷，称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀。13 000 r/min 离心 10 min，取上清液，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取番泻苷 A、B，大黄酸-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、大黄素-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，加 70% 甲醇溶解，配成质量浓度分别为 349.654、233.333、355.556、186.244、122.222、133.321、120.000、118.889、88.444 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱：ThermoSynchronis C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相为乙腈（A）-0.1% 甲酸水（B），体积流量 0.4 mL/min；检测波长 254 nm（测定大黄素、大黄酸、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄素-8-*O*-*D*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*-*D*-葡萄糖苷）和 320 nm（测定番泻苷 A、B）；柱温 30 ℃，进样量 2 μL。梯度洗脱程序：0~1 min，10%~20% A；1~4.5 min，20%~20% A；4.5~5 min，20%~23% A；5~8.5 min，23%~33% A；8.5~13 min，33%~33% A；13~15 min，33%~60% A；15~17 min，60%~100% A；17~18 min，100% A；18~20 min，100%~10% A。对照品及样品色谱图见图 1。



1-番泻苷 B 2-大黄酸-8- β -D-葡萄糖苷 3-番泻苷 A 4-大黄素-8- β -D-葡萄糖苷 5-芦荟大黄素 6-大黄酸 7-大黄素 8-大黄酚 9-大黄素甲醚
1-sennoside B 2-rhein-8- β -D-glucoside 3-sennoside A 4-emodin-8- β -D-glucoside 5-aloe-emodin 6-rhein 7-emodin 8-chrysophanol 9-phycion

图 1 对照品 (A) 及大黄样品 (B) 溶液 UPLC 色谱图
Fig. 1 UPLC of reference substance (A) and *Rhei Radix et Rhizoma* (B)

2.4 大黄药材 UPLC 指纹图谱

2.4.1 大黄药材 UPLC 指纹图谱的建立 取 17 批大黄药材, 照“2.1”项方法制备供试品溶液, 照“2.3”项下色谱条件进行测定, 得 17 批大黄药材 UPLC 色谱图。数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版), 进行色谱峰匹配, 设置样品 S1 作为参照图谱, 中位数法生成对照图谱, 采用多点校正法建立大黄指纹图谱。选择大黄中的主要成分且分离较好的色谱峰作为共有峰, 共标定了 20 个共有峰。经对照品指认, 鉴定出 9 个成分, 峰 2 为番泻苷 B, 峰 4 为大黄酸 8- β -D-葡萄糖苷, 峰 7 为番泻苷 A, 峰 10 为大黄素 8- β -D-葡萄糖苷, 峰 15 为芦荟大黄素, 峰 17 为大黄酸, 峰 18 为大黄素, 峰 19 为大黄酚, 峰 20 为大黄素甲醚。将 17 批大黄药材指纹图谱与对照指纹图谱匹配, 计算相似度, 相似度结果见表 2, 色谱图见图 2、3。

表 2 17 批大黄药材相似度评价结果

Table 2 Similarity evaluation of 17 batches of *Rhei Radix et Rhizoma*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.937	S10	0.966
S2	0.972	S11	0.944
S3	0.965	S12	0.822
S4	0.972	S13	0.769
S5	0.856	S14	0.779
S6	0.947	S15	0.900
S7	0.951	S16	0.881
S8	0.981	S17	0.877
S9	0.928		

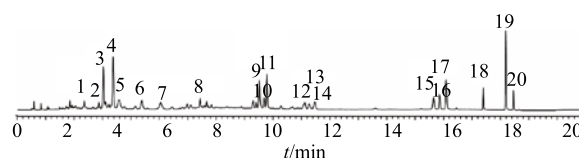


图 2 大黄 UPLC 对照指纹图谱
Fig. 2 UPLC fingerprint of *Rhei Radix et Rhizoma*

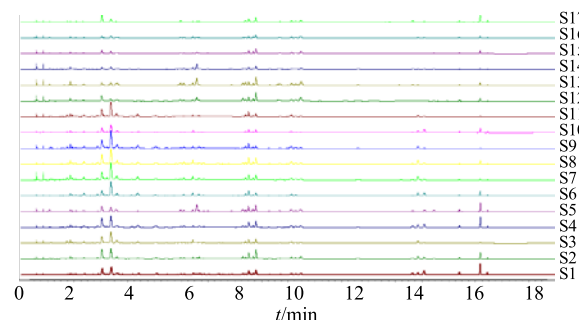


图 3 17 批大黄药材 UPLC 指纹图谱
Fig. 3 UPLC fingerprints of 17 batches of *Rhei Radix et Rhizoma*

2.4.2 聚类分析 (Cluster analysis, CA) 将 17 批大黄样品的峰面积数据导入 SIMCA-P 14.1 软件, 以 20 个共有色谱峰峰面变量进行 CA。CA 结果显示, 大黄药材能够区分为 2 类, 其中一类是掌叶大黄, 另一类为唐古特大黄与药用大黄, 掌叶大黄与唐古特大黄的成分组成差异大于药用大黄与唐古特大黄。分析结果显示药用大黄与唐古特大黄十分接近, 聚类图见图 4。

2.4.3 主成分分析 (principal components analysis, PCA) 将 17 批大黄样品的峰面积数据导入 SIMCA-P 14.1 软件, 以 19 个共有色谱峰峰面变量, 进行 PCA 分析, PCA 结果显示, 3 种大黄能够较好地地区分开, 表明唐古特大黄、掌叶大黄、药用大黄的化学成分组成存在差异, 4 年与 5 年的唐古特大黄无法显著区分, 1 年与 2 年的掌叶大黄也无明显差异。药用大黄和唐古特大黄不能明显区分 (图 5-A), 与聚类分析结果一致,

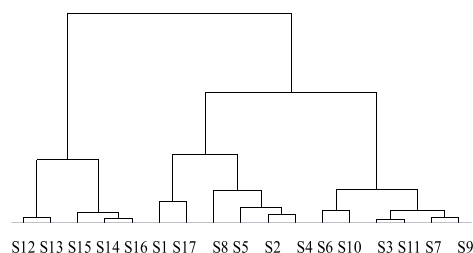


图 4 17 批大黄药材聚类分析
Fig. 4 CA of 17 batches of *Rhei Radix et Rhizoma*

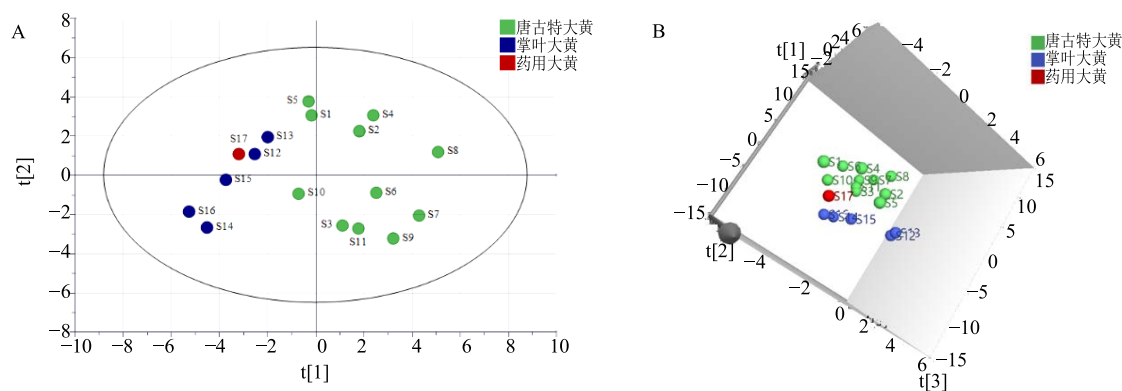


图 5 17 批大黄 PCA (A) 和 PCA 3D (B) 得分图

Fig. 5 PCA (A) and PCA 3D (B) of 17 batches of *Rhei Radix et Rhizoma*

因此不同基原的差异可能是大黄内在化学成分含量差异的主要原因。

2.4.4 唐古特大黄与掌叶大黄的比较 唐古特大黄与掌叶大黄的 PCA 分析发现, 2 种大黄能够显著分布在两侧, 说明 2 种大黄间的差异显著, OPLS-DA 分析也能较好地地区分 2 种大黄, 进一步筛选出 VIP

值大于 1 的成分, 分别是峰 7、2、3、4、16、1、6、9、5、8、12, 表明唐古特大黄与掌叶大黄之间番泻苷 A、番泻苷 B、大黄酸 8-O- β -D-葡萄糖苷、峰 3、16、1、6、9、5、8、12 存在差异, 其中番泻苷 A、B 的影响最大, 进一步推测番泻苷 A、B 的含量能够区分唐古特大黄与掌叶大黄。

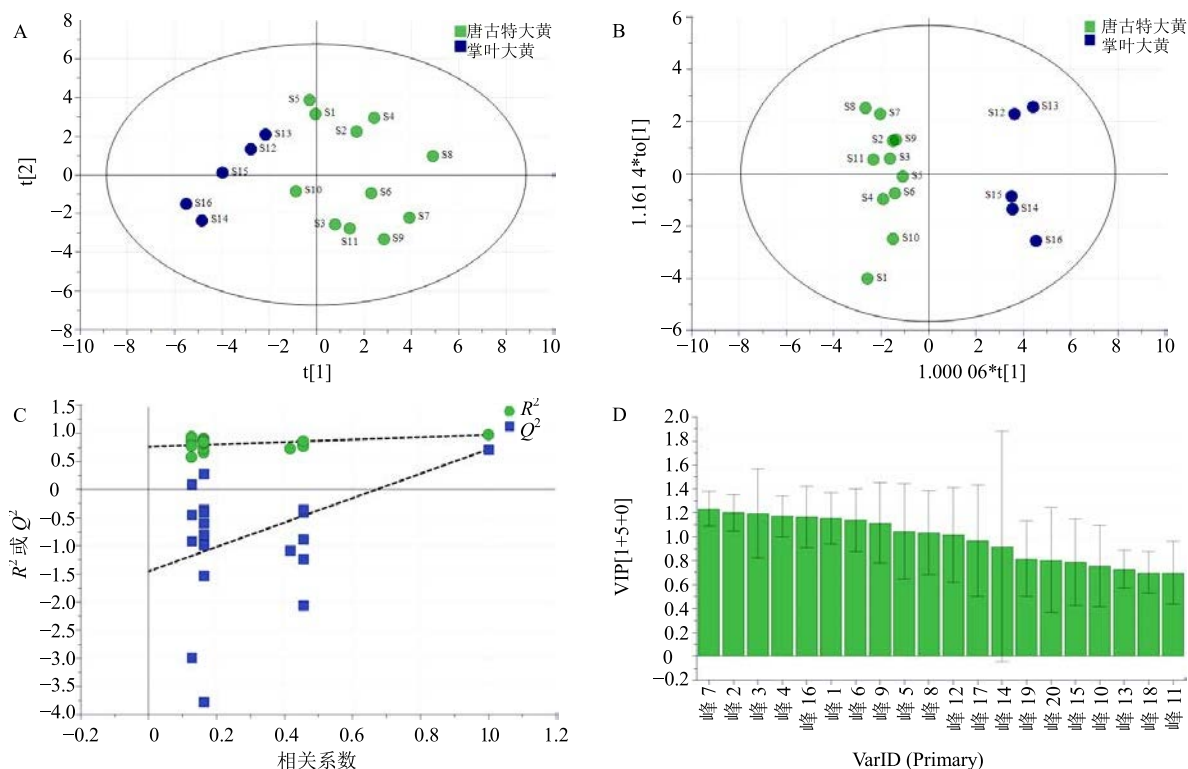


图 6 唐古特大黄与掌叶大黄的 PCA (A)、PCA 3D (B)、C-OPLS-DA (C)、VIP (D) 值图

Fig. 6 PCA (A), PCA 3D (B), C-OPLS-DA (C), VIP (D) of *R. palmatum* L. and *R. tanguticum* Maxim. ex Balf.

2.5 多指标成分含量测定

2.5.1 标准曲线的建立 分别精密吸取“2.2”项下制备的对照品溶液 2 μ L, 注入液相色谱仪中, 以对

照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积的积分值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 计算标准曲线回归方程 (表 3)。

表 3 标准曲线回归方程及线性范围
Table 3 Calibration curves of nine constituents

对照品	回归方程	r^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
番泻苷 B	$Y=4\,707.8 X+850.47$	0.999 9	7.291~233.333
大黄酸-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	$Y=15\,778 X-74\,997$	0.999 6	11.111~355.556
番泻苷 A	$Y=1\,547.3 X+9\,084.2$	0.997 2	13.333~349.654
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	$Y=6\,658.7 X+867.55$	0.999 0	1.472~94.222
芦荟大黄素	$Y=21\,899 X+2\,235$	0.999 5	0.954~61.111
大黄酸	$Y=16\,035 X+7\,819.3$	0.999 9	1.402~89.778
大黄素	$Y=15\,840 X+12\,065$	0.999 7	3.750~120.000
大黄酚	$Y=19\,561 X-4\,514.4$	0.999 8	0.928~59.444
大黄素甲醚	$Y=1\,547.3 X+9\,084.2$	0.999 3	1.733~14.351

2.5.2 精密度试验 分别精密吸取混合对照品溶液,按上述色谱条件重复进样 6 次,计算番泻苷 B、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积 RSD 均小于 3%,表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性试验 精密称取样品(S9)6份,按照上述方法制备供试品溶液,计算番泻苷 B、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄素-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 RSD 均小于 5%,表明该方法重复性良好

2.5.4 稳定性试验 精密称取样品(S9)6份,按照上述方法制备供试品溶液,0、2、4、8、12、18 h 进样,计算番泻苷 B、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积 RSD 均小于 4%,结果证明供试品溶液在 18 h 之内稳定。

2.5.5 加样回收率试验 选取已测定样品(S9)约 0.5 g,分别加入与样品中各成分量 80%、100%、120%的对照品,按照上述方法制备供试品溶液,计算回收率。结果番泻苷 B、大黄酸-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、番泻苷 A、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的平均回收率分别为 100.21%、100.18%、100.40%、99.52%、101.39%、101.43%、100.60%、100.50%、101.89%,RSD 为 1.88%、1.60%、0.78%、0.83%、3.26%、1.42%、0.90%、2.11%、1.59%。

2.5.6 大黄中指标成分含量比较 唐古特大黄中蒽醌类化合物(结合型蒽醌和游离型蒽醌)含量高于其他基原大黄(图 7 和表 4),质量分数在 10.644~18.119 mg/g,游离型蒽醌与结合型蒽醌的总含量均

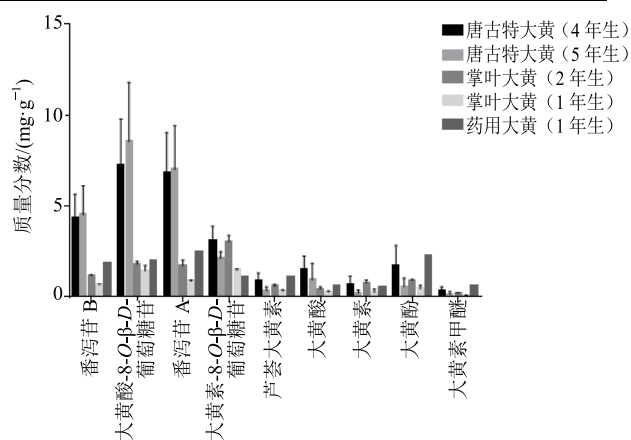


图 7 不同规格等级大黄成分含量比较

Fig. 7 Comparison of contents in different specifications of *Rhei radix et Rhizoma*

高于其他品种大黄,分别为 0.878~8.942 mg/g、6.664~13.750 mg/g。掌叶大黄中游离型蒽醌 0.945~3.195 mg/g,结合型蒽醌 2.730~5.165 mg/g。药用大黄游离型蒽醌 5.038 mg/g,结合型蒽醌 3.071 mg/g。唐古特大黄中番泻苷 A、B 的含量显著高于掌叶大黄和药用大黄。不同年限的唐古特大黄的比较中发现,4 年与 5 年的唐古特大黄指标性成分含量差异不明显,5 种游离型蒽醌的含量五年生的大黄低于 4 年生的大黄,而 5 年生大黄的番泻苷 B 与大黄酸 8-*O*- β -D-葡萄糖苷的含量更高。

3 讨论

本实验考察了水、50%甲醇、甲醇、乙醇、50%乙醇共 5 种不同的提取溶剂,根据色谱峰峰度以及峰面积的对比,并结合文献报道,优选出甲醇作为最佳提取溶剂。对比超声 10、30、50 min 3 种不同提取时间,优化出提取时间为 30 min。提取溶剂的体积考察了 25、50、75 mL,选择 25 mL 作为提取溶剂的体积时,色谱峰数目较多,且信号响应

表 4 大黄中 9 种成分含量 ($n=3$)

Table 4 Determination results of 17 batches of *Rhei radix et Rhizoma* ($n=3$)

编号	质量分数/(mg g ⁻¹)											
	番泻苷 B	大黄酸-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	番泻苷 A	大黄素-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	游离型蒽醌	结合型蒽醌	蒽醌总量
S1	3.161	4.760	5.651	2.436	1.270	2.730	1.322	2.910	0.710	8.942	12.847	21.789
S2	4.240	6.555	8.322	3.935	0.781	1.201	0.641	1.863	0.353	4.839	18.812	23.651
S3	3.882	6.991	5.824	2.020	0.280	0.544	0.299	0.480	0.030	1.633	14.835	16.468
S4	4.885	7.344	8.567	3.376	1.400	1.967	0.778	2.884	0.370	7.399	19.287	26.686
S5	2.024	2.882	2.728	4.091	1.333	1.633	1.355	2.972	0.488	7.781	9.701	17.482
S6	4.733	8.992	5.829	2.099	0.565	1.878	0.270	1.110	0.320	4.143	16.920	21.063
S7	5.853	10.599	8.520	2.840	0.302	0.572	0.121	0.393	0.080	1.468	21.959	23.427
S8	5.863	9.597	9.221	3.666	0.858	1.450	0.522	1.201	0.240	4.271	22.484	26.755
S9	6.244	11.276	9.472	2.474	0.170	0.321	0.143	0.223	0.021	0.878	23.222	24.100
S10	3.064	4.940	4.661	1.724	0.578	1.980	0.385	1.090	0.290	4.323	11.325	15.648
S11	4.210	9.421	6.863	2.155	0.203	0.433	0.064	0.339	0.066	1.105	18.439	19.544
S12	1.128	1.742	1.611	3.423	0.594	0.311	0.580	0.871	0.187	2.543	6.776	9.319
S13	1.229	1.957	1.462	2.890	0.661	0.556	0.911	0.872	0.195	3.195	6.309	9.504
S15	1.118	1.655	2.040	2.741	0.423	0.383	0.752	0.964	0.212	2.734	6.436	9.170
S14	0.696	1.622	2.044	1.422	0.248	0.237	0.104	0.292	0.064	0.945	5.088	6.033
S16	0.674	1.190	0.890	1.540	0.357	0.295	0.361	0.566	0.072	1.651	3.620	5.271
S17	1.832	1.960	2.499	1.111	1.050	0.627	0.490	2.280	0.591	5.038	5.570	10.608

较强。游离蒽醌在 254 nm 有较强的紫外吸收,且在 254 nm 下色谱峰较多,基线较为平稳,因此选择 254 nm 作为指纹图谱与含量测定的检测波长。

CA 分析与 PCA 分析结果显示药用大黄与唐古特大黄十分接近,而已有文献报道唐古特大黄与药用大黄的亲缘关系较近^[11],这可能是 2 种大黄化学成分组成上的相似的原因之一。唐古特大黄中番泻苷 A、B 的含量显著高于掌叶大黄和药用大黄,而番泻苷类成分是大黄泻下作用的主要药效成分^[23],同时,药理实验表明唐古特大黄的泻下作用强于其他 2 种大黄,番泻苷类成分的含量高低与大黄药材质量息息相关^[24]。较高含量的药效成分,使得唐古特大黄成为公认的优质大黄药材来源。不同年限的唐古特大黄的比较中发现,4 年与 5 年的唐古特大黄指标性成分含量差异不明显,5 种游离型蒽醌的含量 5 年生的大黄低于 4 年生的大黄,而 5 年生大黄的番泻苷 B 与大黄酸 8-*O*- β -D-葡萄糖苷的含量更高。根据相关文献报道^[25],随着生长时间的延长,唐古特大黄中有效成分的积累逐渐增加,9~10 月的 4 年生唐古特大黄有效成分含量最高,而到 5 年生大黄 10 月份开始采收时,其成分含量呈现下降趋势。5 年生的唐古特大黄采收时间为 10 月

份,这可能是有些成分含量降低的原因之一。唐古特大黄适宜在秋末茎叶枯萎或次春发芽前采挖,10 月份的大黄质量优于 5、7 月份的大黄,因此大黄在生产上应以采收 4 年生唐古特大黄为主。采收期定为 10 月中旬前较为合理^[26]。掌叶大黄 2 年生的样品 8 个指标性成分含量均高于 1 年生样品,表明 2 年生掌叶大黄质量优于 1 年生的大黄,已有研究证明^[27],3 年生掌叶大黄质量优于 2 年生的,为保证药材质量,因此建议将掌叶大黄的生长年限延长到 3 年。

大黄是典型的多基原、多产地的中药材,其生长过程中影响因素较多,比如气温、降水、紫外线、土壤、遗传、采收时间等,均会影响大黄药材的质量,因此市场上的大黄药材质量参差不齐。建立的基于 UPLC 结合指纹图谱与多成分含量测定的方法,既能采用化学计量学方法区分不同基原的大黄药材,又能对大黄中主要的药理活性成分进行准确定量,进一步对大黄药材的质量进行评价。这为科学、准确、可靠地评价大黄药材质量提供研究基础。实验结果表明 4 年与 5 年的唐古特大黄不能明显区分,但 4 年的唐古特大黄中所含有效成分的含量较高,5 年的唐古特大黄中有效成分含量已经开始下

降,因此建议在唐古特大黄生长到 4 年的 10 月份进行采收,保证唐古特大黄的质量。而掌叶大黄的有效成分随着时间的增加逐渐积累,建议将掌叶大黄的采收期延后,以提高市场中掌叶大黄药材的质量。大黄药材成分复杂,且来源复杂,需要摆脱单一或几个成分控制药材质量的模式,将指纹图谱的整体评价方法与多成分含量结合,能够为大黄药材质量评价体系的升级提供研究基础。

参考文献

- [1] Zhang C, Li L, Xiao Y, *et al.* Two new anthraquinone glycosides from the roots of *Rheum palmatum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(12): 1026-1032.
- [2] Janeczko M, Maslyk M, Kubinski K, *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.
- [3] Kim S, Kim M, Lee B, *et al.* Anti-Inflammatory activity of chrysophanol through the suppression of NF-kappa B/Caspase-1 activation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Molecules*, 2010, 15(9): 6436-6451.
- [4] Seo E J, Tran M N, Lee S, *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.
- [5] Zhang L, He D, Li K, *et al.* Emodin targets mitochondrial cyclophilin D to induce apoptosis in HepG2 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 222-228.
- [6] 高亮亮. 唐古特大黄、药用大黄和掌叶大黄的化学成分和生物活性研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.
- [7] 南海江, 许旭东, 陈士林, 等. 大黄属植物研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(4): 690-701.
- [8] 毛春芳, 施 忠, 罗 琳, 等. HPLC 法同时测定大黄中芦荟大黄素等 11 种成分的量 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2400-2403.
- [9] Zheng Q, Wu H, Guo J, *et al.* Review of rhubarbs: chemistry and pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(1): 9-32.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [11] 李 桢. 不同品种大黄生物活性物质分析及其亲缘关系鉴定 [D]. 成都: 西华大学, 2016.
- [12] 侯小琪. 掌叶大黄不同居群主要药用成分的变异及其与生长环境的相关性分析 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2012.
- [13] 安桃芳, 马 秀. 唐古特大黄的人工栽培技术 [J]. 中国农业信息, 2016(15): 151.
- [14] 陈艳琰, 唐于平, 陈嘉倩, 等. 大黄资源化学研究进展与利用策略 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 5170-5178.
- [15] 孟 磊, 胡会娟, 商 彤, 等. 遗传和环境对掌叶大黄功效成分含量的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(12): 2495-2502.
- [16] 张天铜. 掌叶大黄规范化栽培关键技术研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [17] 余一鸣, 胡永慧, 韩立云, 等. 中药质量控制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.
- [18] 李 强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- [19] 曹 瑞, 窦志华, 倪丽丽, 等. 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 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1100-1110.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 钟胜佳, 钟盛浩. 指纹图谱联合一测多评法在大黄质量控制中的应用效果 [J]. 临床合理用药杂志, 2019, 12(3): 147-148.
- [23] Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. Production of monoclonal antibody against a major purgative component, sennoside A, its characterization and ELISA [J]. *Analyst*, 2000, 125(6): 1109-1113.
- [24] 王家葵, 李 傲, 王 慧, 等. 正品大黄不同品种间泻下效价强度比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1987-1991.
- [25] 齐 浩. 唐古特大黄规范化栽培关键技术研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
- [26] 沈 娜, 崔玉磊, 徐文华, 等. 种植密度和采收期对唐古特大黄生长发育和产量的影响 [J]. 中药材, 2017, 40(6): 1253-1257.
- [27] 陆国弟, 李成义, 王惠珍, 等. 基于多指标分析甘肃产掌叶大黄质量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(10): 57-63.