

土大黄游离蒽醌类成分 HPLC 指纹图谱

王芳^{1,2}, 王珍珍³, 茅向军², 许乾丽^{2*}, 林瑞超⁴, 戴忠⁴

(1. 遵义医学院, 贵州 遵义 563000; 2. 贵州省食品药品检验所, 贵阳 550004;
3 贵州医科大学, 贵阳 550004; 4. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

[摘要] 目的:建立不同产地土大黄中游离蒽醌类成分 HPLC 指纹图谱的共有模式,评价 31 批不同产地土大黄药材的质量状况。方法:采用高效液相色谱法, Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 以甲醇-0.2% 甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)进行相似度评价, 采用 SPSS 18.0 结合聚类分析(cluster analysis, CA)和主成分分析(principal component analysis, PCA)对 31 批土大黄药材进行质量评价。结果:标定共有指纹峰 6 个, 并指出大黄素(4 号峰), 大黄酚(5 号峰)和大黄素甲醚(6 号峰)3 个成分。土大黄指纹图谱的精密度、稳定性、重复性中 6 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别 < 2.0%, < 5.0%。采用聚类分析法和主成分分析法将土大黄药材分为 2 类, 其中有 27 批药材相似度在 0.8 以上, 进而说明了 31 批土大黄药材之间存在相似性和差异性。结论:指纹图谱结合化学模式识别的构建有利于全面、准确地控制土大黄药材的内在质量。

[关键词] 土大黄; 特征图谱; 聚类分析; 主成分分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0072-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080072

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170214.0841.012.html>

[网络出版时间] 2017-02-14 8:41

HPLC Fingerprint Analysis of Free Anthraquinones in Rumei Radix et Rhizoma

WANG Fang^{1,2}, WANG Zhen-zhen³, MAO Xiang-jun²,

XU Qian-li^{2*}, LIN Rui-chao⁴, DAI Zhong⁴

(1. Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China;

2. Guizhou Provincial of Food and Drug Inspection Institute, Guiyang 550004, China;

3. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

4. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a common pattern of HPLC characteristic fingerprint for anthraquinones in Rumei Radix et Rhizoma from different regions, and evaluate the quality of 31 batches of rhubarb from different regions. **Method:** HPLC was used on diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column, with methanol and 0.2% formic acid solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 254 nm. By using *Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2004 A) was used for similarity evaluation, and SPSS 18.0 combined with cluster analysis (CA) and principal component analysis (PCA) was used to evaluate the quality of rhubarb in 31 batches. **Result:** Six common fingerprint peaks were found, and three components were identified: emodin (4th peak), chrysophanol (5th peak) and physcion (6th peak). For precision,

[收稿日期] 20160709(008)

[基金项目] 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合社字[2009]5003号)

[第一作者] 王芳,在读硕士,从事食品药品质量控制研究, Tel:18300926311, E-mail:360764778@qq.com

[通讯作者] *许乾丽,硕士,主任药师,从事食品药品质量控制研究, Tel:0851-86808967, E-mail:1500368608@qq.com

stability and repeatability of the fingerprint, the average RSD of retention time was less than 2%, and the average RSD of relative peak area was less than 5%. Rumei Radix et Rhizoma was divided into 2 types in CA and PCA methods, and the similarity was above 0.8 in 27 batches, indicating that there were similarity and difference between 31 batches of rhubarb. **Conclusion:** Fingerprint combined with chemical pattern recognition is conducive to a comprehensive and accurate control of the internal quality of Rumei Radix et Rhizoma medicinal materials.

[**Key words**] Rumei Radix et Rhizoma; characteristic fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

贵州土大黄是贵州少数民族用药,来源于蓼科酸模属多种植物。《贵州省中药材、民族药材质量标准》(2003 年版) 记载尼泊尔酸模、齿果酸模和羊蹄的新鲜或干燥根及根茎,作为贵州土大黄的来源^[1-4]。其中 3 种不同的贵州土大黄药材可通过显微特征草酸钙簇晶和淀粉粒来区别^[5]。药理研究表明,土大黄具有杀虫止痒、抗菌抗炎、止血消肿、收敛利胆等功效^[6-8]。其具有显著抗菌活性的主要原因在于富含大黄酚、大黄素和大黄素甲醚等游离蒽醌类成分^[9]。严孝金等^[10],王书莉等^[11]在实验中发现,土大黄与大黄在功效上有一定的相似性,但由于两者间在蒽醌类成分的含量差异,土大黄不能简单替代大黄使用。鉴于酸模属植物为常用的民间用药,以及土大黄良好的药用价值及其质量分析研究的现状,深入研究及其必要^[12]。目前,游离蒽醌类成分的测定方法主要有薄层色谱法^[13]、紫外分光光度法^[14]、毛细管电泳法^[15]、高效液相色谱法^[16]和 LC-MS^[17]。其中,孟军华等^[18]报道有《4 种蓼科植物中大黄素型蒽醌类成分的测定》,原源等^[19]报道有《HPLC 法测定酸模属植物根中蒽醌类成分的含量》,廖银标等^[20]报道有《不同产地羊蹄药材 HPLC 指纹图谱研究》。鉴于中药指纹图谱在一定程度上可以较全面的评价药材质量,本研究依据贵州土大黄 3 个种(齿果、尼泊尔、羊蹄)的化学活性部位,建立了贵州土大黄游离蒽醌类成分 HPLC 指纹图谱,选择大黄素、大黄酚和大黄素甲醚等 3 种在酸模属植物中分布最为广泛的蒽醌类成分进行特征指认。通过相似度评价,结合聚类分析和主成分分析,为土大黄的质量评价提供了新的参考依据。

1 材料

DK-98-11A 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司),XS205 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),KQ-300 DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司),DTF-200 型手提式高速万能粉碎机(浙江温岭市林大机

械有限公司)。LC-20AD 型高效液相色谱仪(SPD-M20A 二极管阵列检测器,CBM-20 A 系统控制器,CTO-20 AC 柱温箱,LC-20 AT 泵,SIL-20 A 自动进样器,LC 2000 色谱数据工作站,日本岛津公司)。谱峰差异性和整体相似性评价运用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版)。

对照品大黄素(批号 110756-200110),大黄酚(批号 110796-200615),大黄素甲醚(批号 110758-200611)均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

对贵州省范围内的土大黄药材进行收集,由贵阳中医学院陈德媛研究员鉴定,部分品种未能鉴定。具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 用 Diamasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2% 甲酸水(B)溶液,梯度洗脱(0 ~ 15 min, 70% ~ 77% A; 15 ~ 20 min, 77% ~ 81% A; 20 ~ 42 min, 81% A; 42 ~ 45 min, 81% ~ 100% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称定大黄素对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 0.241 7 g·L⁻¹的大黄素对照品溶液;精密称定大黄酚对照品适量,加三氯甲烷-甲醇(1:4)制成含 0.180 6 g·L⁻¹的大黄酚对照品溶液;精密称定大黄素甲醚对照品适量,加三氯甲烷-甲醇(2:3),制成含 0.184 7 g·L⁻¹的大黄素甲醚对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取同一批药材粉末(过四号筛)约 1 g,精密称定,置索氏提取器中,加三氯甲烷 100 mL,加热回流提取至提取液无色(约 4 h),提取液蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份土大黄样品,按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,每次

表 1 土大黄样品信息表

Table 1 Rumei Radix et Rhizoma sample information

No.	产地	采集日期	品种	拉丁名
S1	贵阳小关阳光奶牛场	2009-12	羊蹄	<i>Rumex crispus</i>
S2	贵大小关校区旁边	2009-12	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S3	贵阳小关牡羊村	2009-12	齿果	<i>R. dentatus</i>
S4	贵阳小关水库路边	2009-12	尼泊尔	<i>R. nepalensis</i>
S5	贵州罗甸	2010-01	-	-
S6	贵州罗甸	2010-01	-	-
S7	贵阳乌当三江农场泡塘桥	2010-03	齿果	<i>R. dentatus</i>
S8	贵州凯里	2010-04	-	-
S9	水城大丫口	2010-04	尼泊尔	<i>R. nepalensis</i>
S10	水城长坎	2010-04	齿果	<i>R. dentatus</i>
S11	水城长坎	2010-04	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S12	德祥药业提供	-	齿果	<i>R. dentatus</i>
S13	贵州丹寨	2010-06	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S14	水城勺米乡坡脚村	2010-06	-	-
S15	惠水县摆榜乡阜康堂药业公司基地	2010-08	-	-
S16	贞丰县农场镇王里岗	2010-10	-	-
S17	安顺市贵州储备局内	2010-10	-	-
S18	安龙县新桥镇十二分村	2010-10	-	-
S19	贵大小关校区旁边	2010-10	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S20	花溪平桥地边	2011-03	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S21	花溪平桥石缝中	2011-03	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S22	花溪平桥松土中	2011-03	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S23	花溪平桥树下 1	2011-03	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S24	花溪平桥树下 2	2011-03	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S25	花溪平桥湿地	2011-03	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S26	清镇池塘边 1	2011-07	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S27	清镇池塘边 2	2011-07	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S28	清镇路边	2011-07	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S29	清镇大路边 1	2011-07	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S30	清镇树下	2011-07	羊蹄	<i>R. crispus</i>
S31	清镇大路边 2	2011-07	-	-

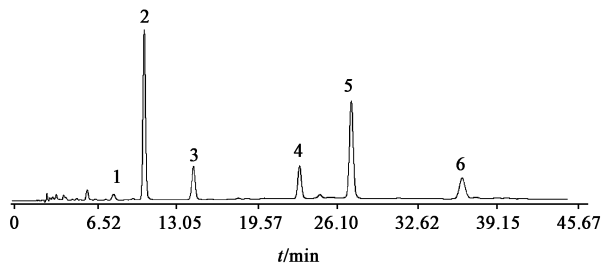
10 μL。以 5 号峰作为参照峰 S,6 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别 < 2.0% 和 < 5.0%。说明该仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一份土大黄样品,按 2.3 项下的方法制备供试品溶液,按 2.1 项下的色谱条件分别在 0,2,4,8,12,24 h 测定,每次 10 μL,以 5 号峰作为参照峰 S,相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别 < 2.0% 和 < 5.0%。说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批土大黄药材粉末 6 份,分别制备供试品溶液。以 5 号峰为参照峰 S,6 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 分别 < 2.0% 和 < 5.0%,说明该方法重复性良好。

2.5 参照色谱峰的选择与峰的指认 经色谱峰的光谱分析以及与对照品相对保留时间的比较,5 号峰的峰面积较大,分离较好,出峰时间适中且稳定,故选择 5 号色谱峰作为参照峰。其中有 6 个峰为 31 批土大黄药材的共有峰,并指认了其中 3 个共有峰,分别为大黄素(4 号峰),大黄酚(5 号峰)和大黄素甲醚(6 号峰),见图 1。

2.6 样品测定 运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 A 版,采用中位数法进行相似度分析。以余弦夹角、相关系数为测度,分别计算 31 批样品的相似度。S1 ~ S31 号土大黄药材相似度评价结果分别为 0.993, 0.943, 0.976, 0.762, 0.988, 0.968, 0.931, 0.931, 0.922, 0.944, 0.975, 0.992,



4. 大黄素;5. 大黄酚;6. 大黄素甲醚

图 1 土大黄药材指纹谱共有模式(R)

Fig.1 Common model of chromatographic fingerprints of Rumei Radix et Rhizoma

0.977, 0.981, 0.992, 0.926, 0.963, 0.940, 0.943, 0.789, 0.716, 0.913, 0.853, 0.860, 0.758, 0.934, 0.971, 0.911, 0.930, 0.972, 0.895。可以看出 31 批土大黄药材中有 27 批指纹图谱与对照图谱比较, 相似度 > 0.8, 有 4 批相似度较低。表明该药材可能与产地、采集日期、品种和存储条件有关, 其内在质量存在一定的差异性, 需进行化学图谱模式的识别和分类的分析, 见图 2。

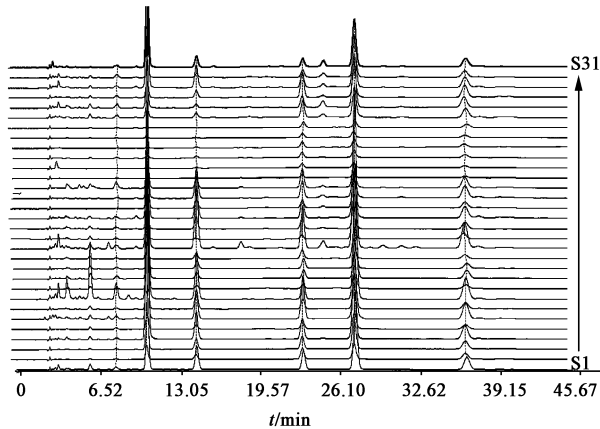


图 2 31 批土大黄样品指纹谱

Fig. 2 31 batches of Rumei Radix et Rhizoma chloroform section fingerprint

2.7 化学模式识别

2.7.1 系统聚类分析 将 31 批土大黄药材作为研究对象, 获得 6 个共有峰, 将 5 号峰设为参照峰, 得到 31 × 6 阶原始数据矩阵, 以相对峰面积为变量, 运用 SPSS 18.0 软件对其进行系统聚类分析, 聚类分析结果见图 3。31 批药材基本可分为二大类, 其中 S2, S20, S21, S22, S23, S24, S25, S26, S28 号为第一大类, 其余的药材为第二大类。

2.7.2 主成分分析 采用 SPSS 18.0 统计分析软件, 选择 6 个共有峰的相对峰面积作为评价指标, 对土大黄药材的相对峰面积进行标准化处理及主成分分析, 得到各主成分的特征值及贡献率, 结果见

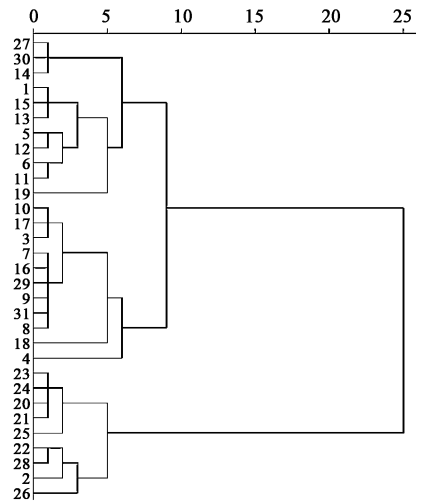


图 3 土大黄样品聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of Rumei Radix et Rhizoma

表 2。由结果可知, 该 2 个主成分的特征值均 > 1, 累计贡献率为 96.222%, 是影响土大黄小极性成分质量控制的主因子, 基本能反映土大黄小极性成分的质量评价指标, 与聚类分析的结果一致。S4, S20, S21, S25 号样品分布在两端, 与相似度分析的结果 (S4, S20, S21, S25 号样品相似度低) 一致, 结果见图 4。

表 2 主成分的特征值及贡献率

Table 2 Characteristic value and contribution rate of principal component %

成分	特征值	方差贡献	累计方差贡献
1	22.75	73.386	73.386
2	7.079	22.836	96.222

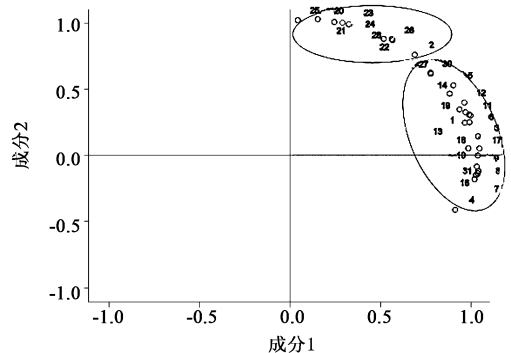


图 4 主成分分析平面投影

Fig.4 Principal component analysis plan

3 讨论

中药指纹图谱能尽可能全面地反映样品所含化学成分群的特征信息, 进而对样品进行质量评价和质量控制。通过相似度分析和 SPSS 18.0 分析, 还能显著地体现差异性成分的信息^[21]。首先通过聚

类分析,将31批土大黄药材分为2类,可以得出土大黄药材的质量与品种、产地、采收期等因素密切相关。其次通过主成分分析结合聚类分析找出其中相似性成分和差异性的成分。其中,第一主成分的方差贡献率最大,为73.386%。它所含的化学成分信息可基本涵盖贵州土大黄药材化学成分信息之间的相似性。贵州土大黄药材不同种之间各成分的含量有差别,同一个种(羊蹄)之间各成分的含量也有差别;不同产地、不同采收期对药材各成分的含量也有影响。采用相似度软件和SPSS 18.0软件对其结果的表达方式及其具体数值可能会有所不同,但其结论均趋于一致,这说明几种指纹图谱相似度评价标准方法之间有较好的一致性。综合运用聚类分析和主成分分析,可互相验证、补充各自不足,更加客观、快速验证、评价土大黄药材的内在质量。

[参考文献]

[1] 贵州省卫生厅. 贵州省中药材民族药材标准[M]. 贵阳:贵州科技出版社,1994:14.
[2] 魏白琪. 酸模属中草药的调查鉴定与成分分析[J]. 药学报,1981,16(4):289-293.
[3] 贵州省中药材. 民族药材质量标准[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:24.
[4] 刘景,夏忠庭,周桂荣,等. 巴天酸模根化学成分研究[J]. 中药材,2011,34(6):893-895.
[5] 王世清,万明香. 贵州土大黄的品种鉴定研究[J]. 中国药业,2005,14(1):33-34.
[6] 王桂荣. 大黄、山大黄、土大黄的基源、成分、药理与临床应用概述[J]. 邯郸医学高等专科学校学报,2003,16(1):89-91.
[7] ZHANG H, GUO Z, WU N, et al. Two novel naphthalene glucosides and an anthraquinone isolated from *Rumex dentatus* and their antiproliferation activities in four cell lines [J]. *Molecules*, 2012, 17(1):843-850.
[8] 孙丽霞,任金荣,单保恩,等. 大黄制剂对小鼠的急性毒性和自然免疫调节作用[J]. 癌变·畸变·突变,2006,18(1):35-37.

[9] 王雷,张名利,姜云飞,等. 中药羊蹄化学成分及其生物活性研究[J]. 世界最新医学信息文摘,2015,15(12):70-71.
[10] 严孝金,冯天师,王玉刚,等. 从化学、药效和毒性角度比较认识正品大黄与土大黄[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3876-3880.
[11] 王书莉,薛淑娟,陈随清,等. 河南产大黄类药材质量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(3):24-27.
[12] 朱晶晶,王峥涛,张朝凤,等. 酸模属植物中化学成分及其药理活性研究进展[J]. 中草药,2008,39(3):450-454.
[13] 王亚芳,周艳飞,李应超,等. 4种羊蹄药材的薄层鉴别及质量评价研究[J]. 黑龙江畜牧兽医:科技版,2015(5):163-164.
[14] 郭澄,张纯,邵元福. 大黄蒽醌类成分含量测定方法的探讨[J]. 时珍国药研究,1998,9(3):223-224.
[15] 罗益远,刘娟秀,刘训红,等. 胶束电动毛细管电泳同时测定何首乌中7种指标成分含量的研究[J]. 中国药理学杂志,2015,50(9):802-807.
[16] 张琳,张宝琦,王志轩,等. HPLC法同时测定大鼠体内5种大黄蒽醌类化合物[J]. 中成药,2016,38(3):594-599.
[17] 周芙琼,夏崇才,朱维娜,等. UPLC-MS/MS法同时测定止痒乳膏中10个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2016,36(7):1207-1213.
[18] 孟军华,金泽祥,赵汉琪,等. 4种蓼科植物中大黄素型蒽醌类成分的测定[J]. 医药导报,2013,32(8):1080-1082.
[19] 原源,陈万生,张汉明,等. HPLC法测定酸模属植物根中蒽醌类成分的含量[J]. 第二军医大学学报,2000,21(10):952-954.
[20] 廖银标,孙毅东,吕玉玲. 不同产地羊蹄药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材,2011,34(6):868-871.
[21] 包永睿,王帅,唐爽,等. 基于指纹图谱结合多元统计分析的天麻总苷差异指标的研究[J]. 中药材,2016,39(5):1082-1085.

[责任编辑 顾雪竹]