

唐古特大黄乙醇提取物的 HPLC 指纹图谱研究

周剑波^{1,2}, 蒋福全^{1,2}, 文怀秀^{1,2}, 邵 赟¹, 师治贤¹, 陶燕铎^{*1}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘 要:用高效液相色谱法建立唐古特大黄乙醇提取物的指纹图谱分析方法。采用 Phenomenex Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 甲醇 - 0.1% H₃PO₄ 为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为 270 nm, 以大黄酸为参照峰。结果共有 18 个共有峰。此法为有效地控制唐古特大黄乙醇提取物的质量提供了依据。

关键词:唐古特大黄; 提取物; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2006)11-001-05

唐古特大黄 (*Rheum tanguticum Maxim. ex Balf.*) 为蓼科植物, 是大黄药材的主要来源, 其有效成分主要是蒽醌类衍生物如大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素和大黄素甲醚等, 具有泻热通便, 凉血解毒, 逐淤通经等功能^[1], 是中医临床常用中药。有关大黄中蒽醌类衍生物的含量测定方法报道^[2-4]较多, 但以此作为质量控制, 很难全面反映药材或提取物的内在质量。而有关大黄指纹图谱的研究, 文献^[5-10]也曾有报道, 但多限于大黄药材成份的指纹图谱分析。徐雄良等^[11]曾研究了注射用大黄粉针剂的 HPLC 指纹图谱, 关于大黄提取物的 HPLC 指纹图谱还没见报道。建立中药提取物可行的质控方法将更加有助于中药提取物向更广阔的国际市场空间发展。利用色谱指纹图谱可以较为全面地检测其多种成分在药材中分布的全貌, 使药材的内在质量情况可视^[12]。本文通过优选 HPLC 梯度洗脱程序, 建立了大黄乙醇提取物的指纹图谱质量控制技术, 可作为唐古特大黄乙醇提取物及其为主成分制剂的指纹图谱研究基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1100 液相色谱仪 (含在线真空脱气机, 低压四元梯度泵, 手动进样器, 柱温箱, DAD 检测

器), Agilent 化学工作站, 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (国家药典委员会, 版本 2004 A), KQ - 250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声波仪器有限公司), 电子分析天平 (梅特勒公司)。

1.2 试剂

甲醇为色谱纯 (山东禹王化工厂), 水为重蒸水, 其它试剂均为分析纯。大黄酸对照品 (批号: 0757 - 9804)、大黄素对照品 (批号: 110756 - 200110)、大黄酚对照品 (批号: 110796 - 200309)、大黄素甲醚对照品 (批号: 758 - 9301), 以上对照品购自中国药品生物制品检定所。12 批唐古特大黄乙醇提取物由本实验室根据优化工艺制得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: A 相为甲醇, B 相为 0.1% 的 H₃PO₄ 缓冲液, 采用梯度洗脱; 流速: 1.0 mL/min, DAD 检测器, 柱温 30 °。线性梯度洗脱程序见表 1, 运行时间 50 min, 两次进样之间用流动相初始梯度条件平衡 15 min。采用二极管阵列检测器对检测波长进行了考察, 分别记录波长在 230、254、270、280、300 nm 的色谱图。结果在 270 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收, 色谱信息最为丰富, 并且分离度好, 可使主要色谱峰达到基线

* 收稿日期: 2006-02-24; 修订日期: 2006-04-29

基金项目: 中国科学院知识创新工程 (CXY-2002-9) 项目资助

作者简介: 周剑波 (1979 -), 男, 硕士研究生

分离。

表 1 线性梯度洗脱程序
Tab. 1 Gradient elution program

梯度 <i>t</i> /min	流速 /(mL/min)	A/ %		B/ %	
		甲醇	0.1 % H ₃ PO ₄ 缓冲液		
0	1.0	25		75	
20	1.0	65		35	
50	1.0	100		0	

2.2 样品与对照品溶液的制备

2.2.1 提取物的制备 根据文献^[13,14]报道, 经过优化确定提取物的最佳提取工艺为唐古特大黄药材粉碎成粗粉, 加 8 倍量 $V(75\% \text{乙醇}) : V(15\% \text{H}_2\text{SO}_4) = 10 : 1$ 回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 浓缩, 先用乙酸乙酯萃取, 乙酸乙酯层再以 50 g/L NaOH 溶液萃取, 取水层, 加入 HCl 后得沉淀, 干燥成浸膏粉, 得提取物。

2.2.2 样品溶液的制备 准确称取干燥至恒量的提取物粉末 10 mg, 加甲醇超声溶解, 用甲醇定容至 25 mL, 过 0.45 μm 的微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 分别准确称取大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品 5 mg, 加甲醇超声溶解, 用甲醇定容至 25 mL, 制成 0.2 mg/mL 的混合对照品溶液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度 分别准确吸取同一供试品溶液 10 μL , 按上述色谱条件连续进样 5 次, 记录指纹图谱。以大黄酸色谱峰(指纹图谱中为 14 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积稳定, $RSD < 3\%$, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重现性 按样品溶液制备方法处理同一样品 5 份, 各吸取 10 μL , 按上述色谱条件分别测定, 记录指纹图谱。以大黄酸色谱峰(指纹图谱中为 14 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积稳定, $RSD < 3\%$, 表明实验方法的重复性良好。

2.3.3 稳定性 取同一供试品溶液分别在 0、2、4、8、16 h 按上述色谱条件测定, 记录指纹图谱。

以大黄酸色谱峰(指纹图谱中为 14 号峰) 为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各共有峰相对保留时间和相对峰面积稳定, $RSD < 3\%$, 表明样品溶液在 16 h 内稳定。

2.4 唐古特大黄提取物指纹图谱的测定及参数

分别准确吸取对照品溶液及 12 批供试品溶液各 10 μL 按前述色谱条件进样, 记录指纹图谱(见图 1、图 2), 将图谱数据导入指纹图谱相似性评价软件(中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 2004 A 版) 分析, 通过设置参照图谱, 自动匹配(见图 3), 生成对照图(图 2)。确定了 18 个共有峰, 其中 14、

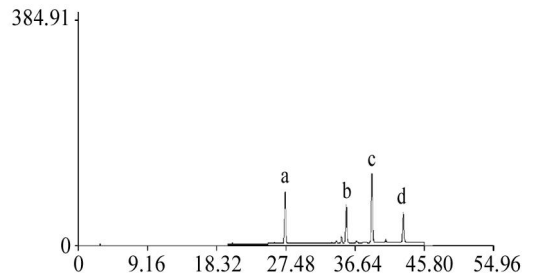


图 1 混合对照品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed reference substances
a - 大黄酸; b - 大黄素; c - 大黄酚; d - 大黄素甲醚

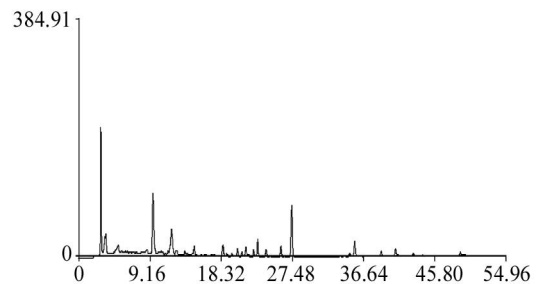


图 2 对照样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a representative sample

15、16、18 号峰分别为大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚, 选取 14 号峰大黄酸为参照峰(标示为 S 峰)。计算各共有峰对保留时间和相对峰面积值(分别见表 2、表 3)。单峰面积与总峰面积的比值大于 10% 的共有峰有 1、4、5、14 号峰, 其相对保留时间分别为 0.104、0.346、0.434、1.000。采用夹角余弦法计算相似度, 进行整体相似度评价, 通过相似度分析发现, 12 批样品的相似度均在 95% 以上(见表 4), 平均为 97.5, 表明样品相似性良好, 可以作为控制唐古特大黄乙醇提取物的质

量依据。

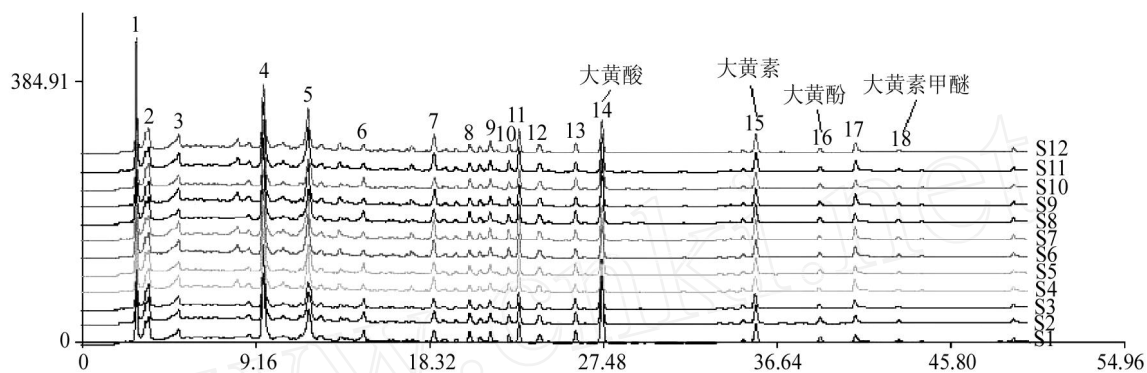


图 3 12 批大黄提取物样品的匹配色谱图

Fig. 3 Matching chromatograms of 12 batches of rhubarb extracts

表 2 12 批大黄提取物指纹图谱共有峰相对保留时间 (t_r /min)

Tab. 2 Relative retention values of characteristic peaks for 12 batches of rhubarb extracts

峰号	批号												平均	RSD/ %
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12		
1	0.103	0.102	0.104	0.105	0.103	0.101	0.104	0.105	0.102	0.104	0.103	0.106	0.104	1.397
2	0.127	0.126	0.125	0.124	0.127	0.124	0.127	0.125	0.126	0.125	0.124	0.125	0.125	0.929
3	0.185	0.183	0.184	0.186	0.185	0.186	0.183	0.184	0.185	0.186	0.184	0.182	0.184	0.711
4	0.348	0.346	0.345	0.347	0.345	0.343	0.345	0.347	0.349	0.346	0.344	0.347	0.346	0.493
5	0.434	0.432	0.435	0.433	0.436	0.431	0.434	0.436	0.432	0.434	0.433	0.435	0.434	0.369
6	0.541	0.543	0.538	0.537	0.539	0.542	0.543	0.540	0.539	0.544	0.542	0.541	0.541	0.403
7	0.678	0.675	0.673	0.676	0.674	0.679	0.677	0.676	0.675	0.674	0.674	0.676	0.676	0.264
8	0.745	0.743	0.747	0.744	0.742	0.746	0.745	0.744	0.743	0.745	0.746	0.747	0.745	0.215
9	0.785	0.783	0.786	0.787	0.782	0.785	0.788	0.786	0.787	0.782	0.784	0.783	0.785	0.260
10	0.821	0.824	0.818	0.817	0.825	0.823	0.822	0.824	0.825	0.820	0.825	0.823	0.822	0.333
11	0.840	0.842	0.837	0.842	0.843	0.841	0.844	0.841	0.843	0.845	0.846	0.844	0.842	0.288
12	0.880	0.877	0.881	0.882	0.878	0.885	0.883	0.878	0.879	0.883	0.881	0.877	0.880	0.296
13	0.949	0.947	0.945	0.953	0.951	0.948	0.953	0.947	0.952	0.946	0.949	0.947	0.949	0.289
14(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
15	1.295	1.292	1.295	1.293	1.296	1.294	1.291	1.297	1.295	1.298	1.292	1.291	1.294	0.179
16	1.420	1.419	1.422	1.421	1.424	1.422	1.417	1.421	1.423	1.418	1.420	1.421	1.421	0.142
17	1.487	1.485	1.490	1.488	1.491	1.486	1.488	1.491	1.485	1.487	1.485	1.486	1.487	0.150
18	1.571	1.574	1.569	1.573	1.568	1.572	1.572	1.568	1.573	1.567	1.572	1.569	1.571	0.149

表 3 12 批大黄提取物指纹图谱共有峰相对峰面积

Tab. 3 Relative peak areas of characteristic peaks for 12 batches of rhubarb extracts

峰号	批号												平均	RSD/ %
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12		
1	1.109	1.100	1.107	1.105	1.107	1.109	1.107	1.108	1.112	1.107	1.109	1.105	1.107	0.265
2	0.331	0.337	0.340	0.334	0.332	0.330	0.328	0.329	0.334	0.338	0.330	0.336	0.333	1.160
3	0.375	0.401	0.380	0.378	0.385	0.373	0.371	0.376	0.381	0.381	0.373	0.379	0.379	2.086
4	1.392	1.403	1.389	1.397	1.421	1.395	1.393	1.398	1.394	1.402	1.395	1.395	1.398	0.593
5	0.910	0.908	0.913	0.912	0.908	0.906	0.901	0.906	0.908	0.911	0.906	0.913	0.909	0.388
6	0.240	0.237	0.243	0.242	0.237	0.237	0.239	0.239	0.237	0.235	0.237	0.242	0.239	1.058
7	0.232	0.239	0.237	0.237	0.240	0.232	0.235	0.236	0.236	0.237	0.231	0.233	0.235	1.221
8	0.158	0.162	0.155	0.161	0.157	0.159	0.154	0.156	0.158	0.157	0.156	0.155	0.157	1.541
9	0.192	0.198	0.198	0.195	0.192	0.189	0.185	0.193	0.197	0.191	0.192	0.194	0.193	1.964
10	0.128	0.130	0.125	0.129	0.127	0.127	0.125	0.126	0.128	0.124	0.128	0.125	0.127	1.459
11	0.297	0.291	0.295	0.293	0.298	0.296	0.293	0.292	0.294	0.291	0.296	0.294	0.294	0.778
12	0.161	0.158	0.163	0.159	0.157	0.159	0.160	0.162	0.161	0.160	0.160	0.163	0.160	1.164
13	0.186	0.187	0.189	0.191	0.185	0.185	0.184	0.187	0.189	0.189	0.185	0.186	0.187	1.151
14(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
15	0.334	0.334	0.333	0.336	0.334	0.333	0.331	0.334	0.334	0.335	0.333	0/330	0.333	0.486
16	0.102	0.102	0.101	0.103	0.104	0.104	0.101	0.102	0.105	0.102	0.104	0/106	0.103	1.549
17	0.135	0.140	0.139	0.142	0.141	0.133	0.136	0.138	0.141	0.142	0.133	0.141	0.138	2.435
18	0.041	0.040	0.040	0.041	0.042	0.040	0.042	0.041	0.040	0.041	0.041	0.040	0.041	1.850

表 4 12 批大黄提取物的相似度

Tab. 4 Similarity analysis results of 12 batches of rhubarb extracts

批号	相似度	批号	相似度
01	0.981	07	0.980
02	0.977	08	0.975
03	0.952	09	0.961
04	0.986	10	0.981
05	0.978	11	0.984
06	0.983	12	0.964

3 讨论

1. 本实验依据国家药典委员会关于《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》,以 HPLC 梯度洗脱法对唐古特大黄的乙醇提取物进行了指纹图谱研究,实验证明,该方法可操作性强、重复性好,可作为唐古特大黄乙醇提取物及其为主要成分制剂的指纹图谱研究基础。

2. 为了找到理想的洗脱条件,我们采用十八

烷基硅烷键合硅胶为固定相的反相柱,分别对甲醇-水、甲醇-0.1% H₃PO₄、乙腈-水和乙腈-0.1% H₃PO₄ 等体系进行了等度和梯度洗脱试验,结果以甲醇-0.1% H₃PO₄ 水体系进行梯度洗脱得到的色谱峰形以及分离度较好;比较了 190~400 nm 波长下的色谱图,结果 270 nm 波长时色谱峰信息较多,分离情况良好;同时考察了不同柱温、不同流速等条件对色谱分离的影响,表明柱温 30℃,流速 1 mL/min 为佳,采用本方法可使主要色谱峰在 50 min 内达到很好的分离,且同时分析了大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 4 个指标成分,这使提取物的指纹图谱分析效率大大提高。

3. 通过本方法分析 12 批唐古特大黄的乙醇提取物,经指纹图谱相似度软件分析,相似度均在 95% 以上。所建立的方法精密度、稳定性和重现性符合指纹图谱研究的技术要求,为唐古特大黄乙醇提取物及其制剂的质量控制提供了科学依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部). 北京: 化学工业出版社, 2000. 18
- [2] 华晓东, 王智华等. 中成药, 2002, 24(5): 340
- [3] 李太平, 王小文等. 中成药, 2003, 25(4): 293
- [4] 曹红, 刘云. 药物分析杂志, 1998, 18(1): 3
- [5] 陈斌, 蔡宝昌等. 中草药, 2003, 34(5): 457
- [6] 朱玲英, 任爱农等. 中成药, 2003, 25(6): 438
- [7] 秦晨, 段玉萍等. 现代仪器, 2000, (3): 8
- [8] 徐雄良, 张志荣, 黄园. 四川大学学报(医学版), 2004, 35(4): 559
- [9] 张立新, 周晓英等. 药品检测, 2001, 10(10): 36
- [10] 刘欣, 胡芳弟等. 分析测试技术与仪器, 2004, 10(3): 140
- [11] 徐雄良, 张志荣, 黄园. 色谱, 2003, 21(6): 596
- [12] 谢培山. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 653
- [13] 裴月湖. 天然药物化学实验, 北京: 人民卫生出版社, 2005: 141
- [14] 郑志华. 广东药学, 2002, 12(3): 58

Study on HPLC fingerprint of alcohol extracts from *Rheum tanguticum*

ZHOU Jianbo^{1,2}, JIANG Fu-quan^{1,2}, WEN Huai-xiu^{1,2}, SHAO Yun¹, SHI Zhi-xian¹ and TAO Yai- duo^{*1}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049), Fenxi Shiyanshi, 2006, 25(11): 1~5

Abstract: Fingerprint chromatograms of alcohol extract from *Rheum tanguticum* by HPLC were established. A Phenomenex Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used, methanol - 0.1% phosphate acid was used as the mobile phase, and gradient elution program was used. UV detection wavelength was 270 nm, and rhein was used as a reference peak. The results indicated that 18 peaks were obtained in fingerprint chromatograms. The method is simple and accurate with a good reproducibility, and it can be used as a quality control method for alcohol extracts from *Rheum tanguticum*.

Key words: *Rheum tanguticum*; Extract; Fingerprint chromatogram; HPLC

全国试剂与应用技术交流会会议通知

(第二轮)

为总结、交流化学试剂(包括小吨位精细化学品)与应用技术、分析测试技术的进展,交流最新成果,搭建产、学、研、销、用平台,促进化学试剂和分析测试技术的发展,中国分析测试协会、全国化学试剂信息站将于2006年11月12~17日在海南省海口市海外酒店召开“全国试剂与应用技术交流会”,具体由《化学试剂》编辑部承办。会议期间除发表论文外,还有科技部条财司领导、中国科学院院士、著名专家、学者的专题报告。

会议时间: 2006年11月13日至17日

报到时间: 2006年11月12日全天

会议地点: 海口市海外酒店

报名方式: 欲参加会议者请填写回执,寄回或传真给全国化学试剂信息站或《化学试剂》编辑部。为了安排食宿方便请务必于9月25日前寄回或传真回执。

联系电话: 010-65283411、65281741; 传真: 65281741 《化学试剂》编辑部

010-68512289 中国分析测试协会 谢小荣

E-mail: webmaster@chinareagent.com.cn

通讯地址: 100010 北京市东城区东四南大街160号《化学试剂》编辑部

中国分析测试协会

全国化学试剂信息站

2006年7月20日