

青海地区唐古特大黄药材 HPLC 指纹图谱研究

李锦萍^{1,2,3}, 陈桂琛^{1*}, 纪兰菊¹, 保 怡¹, 李玉林¹, 周国英¹

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 青海师范大学, 青海 西宁 810008;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:目的 建立了青海地区唐古特大黄药材的 HPLC 指纹图谱。方法 采用反相高效液相色谱法, 乙腈-水 (0.04% 的磷酸) 为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 40 。结果 精密度、重现性、稳定性试验中共有峰面积和保留时间的 RSD 均小于 5%。青海不同采集地唐古特大黄的平均相似度为 0.925。结论 该方法简便、实用、可靠, 可用于以青海果洛地区为主产地不同海拔唐古特大黄药材质量标准的分析检测, 也为栽培大黄代替野生大黄提供理论基础。

关键词: 青海; 唐古特大黄; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)05-0762-04

Fingerprints of *Rheum tanguticum* from Qinghai Region by HPLC

LI J in-ping^{1,2,3}, CHEN Gui-chen¹, JI Lan-ju¹, BAO Yi¹, LI Yu-lin¹, ZHOU Guo-ying¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Qinghai Normal University, Xining 810008, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To establish the HPLC fingerprints of *Rheum tanguticum* from Qinghai Region. **Methods** By RP-HPLC, acetonitrile and water including 0.04% H₃PO₄ as mobile phase, gradient elution, flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 280 nm, and the temperature was 40 . **Results** The RSD of peak areas and retention time of common peak in the test of precision, repeatability, and stability has not reached 5%, respectively. A verage similarity was 0.925 in *R. tanguticum* collected from different habitats. **Conclusion** All above results show that this method is simple, practicable, and reliable. It can be used as a standard analysis method in the quality control of *R. tanguticum* from Guoluo Region in Qinghai Province. It also provides a theory foundation on which the species cultivated could replace the wild ones.

Key words: Qinghai; *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.; HPLC; fingerprints

大黄为蓼科大黄属植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* Linn.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Regel 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎。具有泻火解毒、攻积化瘀、导泻、利胆、保肝、降血脂、止血、抗肿瘤、调节免疫等多重作用^[1]。唐古特大黄在青海主要生长于海拔 2 300~4 200 m 的林缘、林下、沟谷灌丛及草地, 四川西北部和甘肃南部也有分布^[2]。

大黄的指纹图谱已有文献报道^[3-5], 但未见不同海拔唐古特大黄及对种植与野生唐古特大黄对比的研究。按照国家药典委员会关于“中药注射剂指纹图谱试验研究的技术要求(暂行)的通知(2000)”要求, 并参考相关文献报道^[6], 对种植与野生唐古特大

黄进行了指纹图谱研究。应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)(国家药典委员会), 对其所有峰和共有峰相似度进行评价和标准指纹图谱的模拟比较。试验证明, 该方法简便、准确、重现性好, 结合药材中共有峰和所有峰的相似度, 可以评价其药材质量、判断其基源。

1 药材、仪器与试剂

1.1 青海地区唐古特大黄野生样品采集: 2004年10月中旬采集于青海果洛州班玛和达日两县; 栽培样品取自湟中县群加乡、湟源县大黑沟种植基地; 部分材料购自当地药材市场, 总计12批。所有采集和种植材料均为果后期唐古特大黄根部, 采集样品均由中国科学院西北高原生物研究所卢学峰博士鉴

* 收稿日期: 2005-09-12

基金项目: 国家科技攻关计划中西部专项资助(2001BA901A47); 青海省重大科技攻关招标项目(2001-N-107-02)

作者简介: 李锦萍(1974—), 女, 青海西宁人, 讲师, 现在中国科学院西北高原生物研究所攻读硕士学位, 主要从事中藏药种植及化学分析研究。

* 通讯作者 陈桂琛 Tel: (0971) 6143900 E-mail: gcchen@nwipb.ac.cn

定, 样品来源及编号见表1。

1.2 试剂与仪器: LC—10A T_{VP} 二元泵 (日本岛津); Rheodyne 7725 进样器 (美国); SPD—M 10A V P 二极管阵列检测器 (日本岛津); Class—V P 液相色谱工作站 (日本岛津); Milli—Q 超纯水

装置; A T—132 柱温箱 (Auto-Science 公司); 梯度滞后时间为 0.25 min; 水为重蒸水并经 0.45 μm 滤膜滤过; 乙腈 (美国 Tedia 公司, 色谱纯); 甲醇 (上海化学试剂有限公司, 分析纯); 磷酸 (上海化学试剂有限公司, 分析纯)。

表1 唐古特大黄样品来源

Table 1 Origins of *R. tanguticum*

| 样品号 | 产地 | 采集时间或来源 | 样品号 | 产地 | 采集时间或来源 |
|-------|-------------------|---------------------|-------|-----------------------|---------------------|
| T- 01 | 班玛则达 (海拔 3 810 m) | 2004- 10- 16 | T- 07 | 甘德上贡麻 (4 050 m) | 2004- 10- 17 |
| T- 02 | 达日满掌 (4 360 m) | 2004- 10- 15 | T- 08 | 甘德上贡麻 (4 030 m) | 2004- 10- 17 |
| T- 03 | 班玛知钦 (3 810 m) | 2004- 10- 16 | T- 09 | 达日建设 (3 980 m) | 2004- 10- 18 |
| T- 04 | 甘德上贡麻 (4 056 m) | 2004- 10 采挖 | T- 10 | 湟中群加 (栽培 4 年 2 900 m) | 2004- 09- 30 |
| T- 05 | 班玛 | 班玛药材市场购买 (2004- 09) | T- 11 | 湟源大黑沟 (栽培 3 年 2900 m) | 2004- 09- 27 |
| T- 06 | 班玛 | 班玛药材市场购买 (2003- 09) | T- 12 | 玉树 | 玉树药材市场购买 (2003- 09) |

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (254 mm × 4.6 mm, 5 μm); 乙腈-0.04% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱: 0~ 50 min 乙腈体积分数由 10% 增至 35%; 50~ 70 min 由 35% 增至 100%; 70~ 80 min 为 100%; 检测波长 280 nm; 柱温 40 °C; 体积流量 1.0 mL/min, 进样体积 20 μL。

2.2 供试品的制备: 经过提取溶剂对比实验, 甲醇提取法显示色谱分析峰数目较多, 为 23 个共有峰, 且操作简单。取大黄样品各 1.0 kg 粉碎, 过 20 目筛, 混合均匀后精密称取 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 25 mL, 回流提取 2 h, 放冷至室温, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 取上清液, 过 0.45 μm 滤膜, 备用。样品应在避光、低温、密闭容器条件下保存。

2.3 精密度试验: 取同一批号的供试品溶液 (T- 01), 连续进样 5 次, 测得各共有峰面积和保留时间的 RSD 分别为 1.26% ~ 4.92% 和 0.047% ~ 1.490%, 表明精密度良好。

2.4 稳定性试验: 取同一批号的供试品溶液 (T- 03), 分别在 0.2、4、6、8、10 h 进样, 测得各共有峰面积和保留时间的 RSD 分别为 1.10% ~ 4.85% 和 0.032% ~ 0.959%, 表明样品在 10 h 内稳定。

2.5 重现性试验: 取同一批号样品 5 份 (T- 07), 精密称量, 按相同方法制备供试品溶液, 分别进样, 测得各共有峰面积和保留时间的 RSD 分别为 1.00% ~ 4.53% 和 0.012% ~ 0.386%, 表明重现性良好。

2.6 指纹图谱分析、数据处理及相似度: 用 2.1 的色谱条件测定了 12 批采集样品指纹图谱。根据指纹图谱相似度计算要求, 以 T- 01 (班玛则达) 样

品色谱峰作为标准指纹图谱, 其中 25.6 min 左右出现的峰为主要峰, 选择此峰为参照峰 (k)。按照“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A)”进行对照指纹图谱的模拟, 标准指纹图谱的生成原理为中位矢量法, 标准指纹图谱如图 1 所示, 对各个峰紫外光谱图进行对比分析, 确定 23 个共有峰。并且提供了 12 批青海唐古特大黄样品的叠加图 (图 2)。采用夹角余弦法对各个样品相对峰面积、相对保留时间及相似度进行计算。以所有峰的峰面积计算相似度, 平均相似度为 0.925; 以共有峰的相对峰面积计算相似度, 12 个样品的相似度为 0.923~ 0.994, 平均相似度为 0.971; 以共有峰的相对保留时间计算 12 个样品的相似度为 0.999~ 1.000, 平均值为 1.000, 结果见表 2~ 4。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择、色谱条件的选择及优化以及检测波长的选择按参考文献方法^[7,8], 样品处理过程中发现粉碎后回流提取被检测物质的提取率比其他方法, 如超微粉碎、超声提取高, 文献报道大黄提取以丙酮-水为溶媒提取效果好^[9], 试验中甲醇提取物出现的峰最多, 故选择甲醇为提取溶剂。色谱条件选择优化过程中分别考察了 0.01%、0.02%、0.03% 和 0.04% 的磷酸溶液, 1% 冰醋酸

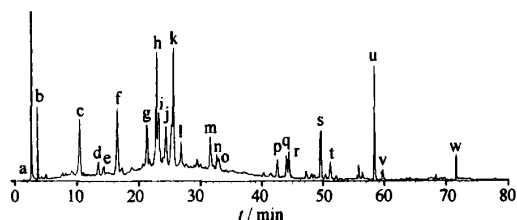


图1 唐古特大黄的指纹图谱

Fig 1 Fingerprint of *R. tanguticum*

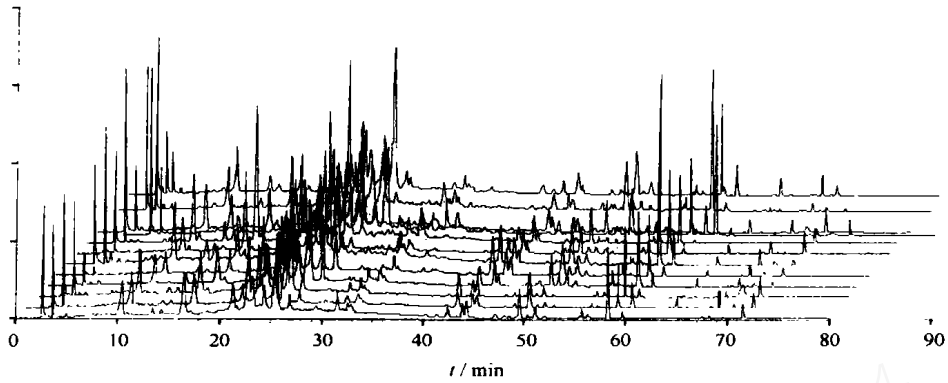


图2 12批药材色谱分离叠加图(色谱分离图从下到上依次为样品1~12)

Fig 2 Overlap chromatogram of separated 12 batches of herbs (From below to top: chromatogram of samples 1—12)

表2 唐古特大黄样品所有峰的相似度

| 样品编号 | 相似度 | 样品编号 | 相似度 |
|------|-------|------|-------|
| 1 | 1.000 | 7 | 0.941 |
| 2 | 0.950 | 8 | 0.903 |
| 3 | 0.952 | 9 | 0.916 |
| 4 | 0.932 | 10 | 0.899 |
| 5 | 0.909 | 11 | 0.898 |
| 6 | 0.930 | 12 | 0.871 |

溶液与甲醇、乙腈所组成的流动相,其结果显示乙腈-0.04%磷酸水溶液系统得到的色谱图最佳。出峰时间通过160 min的观察发现80 min后无色谱峰。

对190~370 nm扫描的各波长下的色谱图进行比较分析,结果280 nm各峰分离良好,峰数目较多。因此,选择280 nm作为检测波长。同时按照试行的要求考察了其他波长下的色谱图,其结果

表3 唐古特大黄样品共有峰相对峰面积及相似度

Table 3 Relative peak area and similarity of common peak from *R. tanguticum*

| 样品编号 | 共有峰 | | | | | | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | k | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j | l |
| 1 | 1.000 | 0.391 | 0.118 | 0.386 | 0.107 | 0.093 | 0.451 | 0.371 | 0.743 | 0.458 | 0.396 | 0.248 |
| 2 | 1.000 | 0.198 | 0.076 | 0.324 | 0.085 | 0.086 | 0.325 | 0.250 | 0.528 | 0.328 | 0.504 | 0.201 |
| 3 | 1.000 | 0.236 | 0.087 | 0.376 | 0.084 | 0.076 | 0.330 | 0.268 | 0.569 | 0.386 | 0.403 | 0.177 |
| 4 | 1.000 | 0.238 | 0.093 | 0.304 | 0.142 | 0.095 | 0.388 | 0.384 | 0.666 | 0.596 | 0.462 | 0.251 |
| 5 | 1.000 | 0.101 | 0.030 | 0.367 | 0.157 | 0.122 | 0.403 | 0.554 | 0.993 | 0.590 | 0.591 | 0.580 |
| 6 | 1.000 | 0.164 | 0.065 | 0.339 | 0.160 | 0.117 | 0.262 | 0.317 | 0.657 | 0.418 | 0.523 | 0.188 |
| 7 | 1.000 | 0.283 | 0.112 | 0.315 | 0.117 | 0.081 | 0.634 | 0.347 | 0.349 | 0.419 | 0.345 | 0.195 |
| 8 | 1.000 | 0.133 | 0.165 | 0.259 | 0.099 | 0.059 | 0.479 | 0.349 | 0.213 | 0.455 | 0.328 | 0.134 |
| 9 | 1.000 | 0.339 | 0.133 | 0.388 | 0.144 | 0.119 | 0.396 | 0.402 | 0.657 | 0.519 | 0.475 | 0.225 |
| 10 | 1.000 | 0.396 | 0.149 | 0.369 | 0.118 | 0.115 | 0.493 | 0.372 | 0.557 | 0.642 | 0.397 | 0.178 |
| 11 | 1.000 | 0.403 | 0.158 | 0.454 | 0.172 | 0.114 | 0.588 | 0.425 | 0.519 | 0.688 | 0.552 | 0.219 |
| 12 | 1.000 | 0.269 | 0.116 | 0.339 | 0.145 | 0.097 | 0.248 | 0.279 | 0.477 | 0.370 | 0.334 | 0.197 |

| 样品编号 | 共有峰 | | | | | | | | | | | 相似度 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | m | n | o | p | q | r | s | t | u | v | w | |
| 1 | 0.260 | 0.112 | 0.116 | 0.088 | 0.096 | 0.124 | 0.228 | 0.133 | 0.253 | 0.029 | 0.096 | 0.988 |
| 2 | 0.132 | 0.140 | 0.083 | 0.128 | 0.092 | 0.089 | 0.134 | 0.048 | 0.149 | 0.087 | 0.078 | 0.981 |
| 3 | 0.084 | 0.113 | 0.053 | 0.117 | 0.091 | 0.101 | 0.140 | 0.056 | 0.195 | 0.032 | 0.109 | 0.989 |
| 4 | 0.207 | 0.174 | 0.099 | 0.169 | 0.185 | 0.087 | 0.223 | 0.096 | 0.262 | 0.056 | 0.041 | 0.994 |
| 5 | 0.158 | 0.264 | 0.193 | 0.425 | 0.261 | 0.202 | 0.342 | 0.187 | 0.317 | 0.067 | 0.064 | 0.951 |
| 6 | 0.115 | 0.182 | 0.180 | 0.184 | 0.116 | 0.068 | 0.166 | 0.049 | 0.354 | 0.073 | 0.018 | 0.975 |
| 7 | 0.172 | 0.112 | 0.154 | 0.121 | 0.150 | 0.088 | 0.169 | 0.049 | 0.262 | 0.043 | 0.099 | 0.945 |
| 8 | 0.173 | 0.099 | 0.178 | 0.089 | 0.078 | 0.046 | 0.139 | 0.032 | 0.121 | 0.008 | 0.045 | 0.923 |
| 9 | 0.186 | 0.168 | 0.128 | 0.126 | 0.148 | 0.099 | 0.184 | 0.043 | 0.193 | 0.091 | 0.113 | 0.990 |
| 10 | 0.331 | 0.211 | 0.092 | 0.127 | 0.132 | 0.125 | 0.315 | 0.095 | 0.372 | 0.026 | 0.060 | 0.970 |
| 11 | 0.336 | 0.221 | 0.138 | 0.173 | 0.128 | 0.105 | 0.377 | 0.096 | 0.526 | 0.036 | 0.011 | 0.961 |
| 12 | 0.124 | 0.135 | 0.074 | 0.094 | 0.115 | 0.056 | 0.204 | 0.084 | 0.187 | 0.088 | 0.006 | 0.979 |

表4 唐古特大黄样品共有峰相对保留时间及相似度

Table 4 Relative retention time and similarity of common peak from *R. tanguticum*

| 样品 编号 | 共有峰 | | | | | | | | | | | 相似度 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | k | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j | |
| 1 | 1.000 | 0.106 | 0.146 | 0.409 | 0.528 | 0.562 | 0.647 | 0.833 | 0.892 | 0.907 | 0.955 | 1.049 |
| 2 | 1.000 | 0.106 | 0.145 | 0.408 | 0.527 | 0.560 | 0.646 | 0.832 | 0.892 | 0.906 | 0.955 | 1.050 |
| 3 | 1.000 | 0.106 | 0.145 | 0.399 | 0.522 | 0.556 | 0.643 | 0.831 | 0.889 | 0.904 | 0.956 | 1.049 |
| 4 | 1.000 | 0.106 | 0.145 | 0.414 | 0.532 | 0.565 | 0.650 | 0.835 | 0.891 | 0.908 | 0.957 | 1.046 |
| 5 | 1.000 | 0.105 | 0.144 | 0.411 | 0.533 | 0.566 | 0.650 | 0.834 | 0.889 | 0.907 | 0.955 | 1.047 |
| 6 | 1.000 | 0.106 | 0.146 | 0.410 | 0.532 | 0.564 | 0.650 | 0.833 | 0.890 | 0.907 | 0.957 | 1.048 |
| 7 | 1.000 | 0.106 | 0.146 | 0.407 | 0.527 | 0.560 | 0.645 | 0.832 | 0.892 | 0.905 | 0.955 | 1.051 |
| 8 | 1.000 | 0.107 | 0.143 | 0.405 | 0.526 | 0.559 | 0.646 | 0.832 | 0.893 | 0.906 | 0.955 | 1.051 |
| 9 | 1.000 | 0.105 | 0.145 | 0.411 | 0.531 | 0.564 | 0.650 | 0.834 | 0.891 | 0.905 | 0.957 | 1.049 |
| 10 | 1.000 | 0.105 | 0.144 | 0.409 | 0.533 | 0.567 | 0.652 | 0.835 | 0.890 | 0.908 | 0.956 | 1.047 |
| 11 | 1.000 | 0.105 | 0.144 | 0.412 | 0.535 | 0.568 | 0.652 | 0.835 | 0.890 | 0.908 | 0.955 | 1.046 |
| 12 | 1.000 | 0.105 | 0.143 | 0.406 | 0.530 | 0.564 | 0.648 | 0.834 | 0.891 | 0.909 | 0.954 | 1.046 |

| 样品 编号 | 共有峰 | | | | | | | | | | | 相似度 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | m | n | o | p | q | r | s | t | u | v | w | |
| 1 | 1.232 | 1.275 | 1.286 | 1.660 | 1.717 | 1.733 | 1.938 | 1.998 | 2.276 | 2.333 | 2.794 | 1.000 |
| 2 | 1.233 | 1.275 | 1.286 | 1.661 | 1.719 | 1.734 | 1.939 | 2.000 | 2.279 | 2.335 | 2.797 | 1.000 |
| 3 | 1.227 | 1.273 | 1.284 | 1.659 | 1.715 | 1.732 | 1.935 | 1.994 | 2.264 | 2.319 | 2.775 | 1.000 |
| 4 | 1.202 | 1.270 | 1.282 | 1.650 | 1.706 | 1.722 | 1.925 | 1.983 | 2.255 | 2.310 | 2.764 | 1.000 |
| 5 | 1.225 | 1.270 | 1.283 | 1.641 | 1.695 | 1.711 | 1.908 | 1.966 | 2.233 | 2.288 | 2.737 | 1.000 |
| 6 | 1.228 | 1.273 | 1.287 | 1.658 | 1.714 | 1.729 | 1.933 | 1.991 | 2.267 | 2.322 | 2.779 | 0.999 |
| 7 | 1.234 | 1.276 | 1.286 | 1.663 | 1.720 | 1.736 | 1.941 | 2.002 | 2.282 | 2.338 | 2.801 | 1.000 |
| 8 | 1.234 | 1.275 | 1.286 | 1.662 | 1.719 | 1.735 | 1.940 | 2.001 | 2.279 | 2.336 | 2.798 | 1.000 |
| 9 | 1.228 | 1.274 | 1.286 | 1.659 | 1.715 | 1.731 | 1.935 | 1.993 | 2.255 | 2.310 | 2.763 | 1.000 |
| 10 | 1.227 | 1.232 | 1.286 | 1.657 | 1.713 | 1.728 | 1.933 | 1.990 | 2.251 | 2.307 | 2.758 | 1.000 |
| 11 | 1.226 | 1.267 | 1.282 | 1.645 | 1.702 | 1.716 | 1.918 | 1.974 | 2.238 | 2.294 | 2.741 | 1.000 |
| 12 | 1.226 | 1.267 | 1.283 | 1.642 | 1.700 | 1.714 | 1.917 | 1.973 | 2.238 | 2.294 | 2.741 | 1.000 |

显示 12 批在不同波长下的色谱指纹图谱具有很好的相似度。

3.2 实验结果表明,唐古特大黄药材指纹图谱具有较好的稳定性和重现性,12 批唐古特大黄药材样品指纹图谱的特征性和专属性很强,共有峰稳定性很好,符合国家药典委员会颁发的“中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南”的要求。较全面地反映唐古特大黄的化学信息,可作为唐古特大黄药材的专属性指纹图谱,为青海地区以果洛为主产地的不同海拔唐古特大黄药材品质提供有效、稳定的质量控制方法。对海拔约 2 900m 的湟源大黑沟、湟中群加栽培 3、4 年的唐古特大黄与野生唐古特大黄的指纹图谱特征比较,证明其化学成分信息符合野生唐古特大黄药材的指纹特征,为栽培大黄替代野生大黄提供理论基础。

References

[1] Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. *Tibetan Medicine Glossary* (藏药志) [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991.
 [2] Liu SW. *Flora Qinghaiica* (青海植物志) [M]. (Vol 1) Xining: Qinghai People's Publishing House, 1997.

[3] Chen B, Cai B C, Pan Y, et al. Comparison of HPLC fingerprint chromatography of *Rheum palmatum* of different producing areas [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 34(5): 457-460.
 [4] Wang R, Zhang Q, Jia Z P, et al. Application of chromatograph-digitized fingerprint spectrum in identification of indigenous medicinal materials *Radix et Rhizoma Rhei* from Gansu Province [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2003, 26(7): 484-486.
 [5] Xu X L, Zhang Z R. Optimization of the separation conditions of fingerprint for *Rhubarb* by high performance liquid chromatography [J]. *J Sichuan Univ* (四川大学学报), 2004, 35(4): 559-562.
 [6] Zhou Y X. *Research Technology of Fingerprint in Chinese Materia Medica* (中药指纹图谱研究技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
 [7] Zhu L Y, Ren A N, Ge J, et al. Study on HPLC fingerprint of anthraquinones compounds in *Radix et Rhizoma Rhei* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2003, 25(6): 438-440.
 [8] Ji L J, Liao Z X, Sun H F. Determination of chemical compounds of four rhubarbs [J]. *Acta Biol Plate Sin* (高原生物学集刊), 1999, 14: 237-243.
 [9] Liu X, Hu F D, Feng S L, et al. Study of chromatography fingerprint (CEP) of Dahuang [J]. *Anal Test Technol Instrum* (分析测试技术与仪器), 2004, 10(3): 140-144.