

青海栽培和野生唐古特大黄蒽醌类成分的 HPLC对比分析

李玉林^{1,2}, 车国冬^{1,2}, 索有瑞¹, 周国英^{1,2}, 胡凤祖¹, 陈桂琛^{1*}

¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; ²中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要:采用 HPLC法测定青海栽培唐古特大黄中的 5种蒽醌含量,并和野生唐古特大黄药材进行了比较。结果表明,二、三、四年龄栽培唐古特大黄中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 5种蒽醌总量分别为 1.21%, 2.01%, 1.62%, 其中三、四年龄栽培唐古特大黄已达到《药典》规定的药用标准;野生大黄的总蒽醌含量远高于栽培大黄为 3.64%。

关键词:栽培唐古特大黄;蒽醌;芦荟大黄素;大黄酸;大黄素;大黄酚;大黄素甲醚

中图分类号: Q946.8; R284.1

文献标识码: A

Comparative Analysis of Anthraquinones Content Between Cultivated and Wild *Rheum tanguticum*

LI Yu-lin^{1,2}, CHE Guo-dong^{1,2}, SUO You-ru¹, ZHOU Guo-ying^{1,2}, HU Feng-zu¹, CHEN Gui-chen^{1*}

¹Northwest Institute of Plateau Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: The total contents of five anthraquinones including aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, and physcion in cultivated and wild *Rheum tanguticum* from Qinghai Province were analyzed by HPLC. The results showed that the total contents of five anthraquinones in cultivated *Rheum tanguticum* growing two, three and four years were 1.21%, 2.01% and 1.62%, respectively, and the total contents of five anthraquinones in three and four years cultivated *Rheum tanguticum* were all achieved officinal standard. The total contents of five anthraquinones in wild *Rheum* were 3.64% and higher than that in cultivated *Rheum*.

Key words: cultivated *Rheum tanguticum*; anthraquinones; aloe-emodin; rhein; emodin; chrysophanol; physcion

唐古特大黄 (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf) 为蓼科 (Polygonaceae) 大黄属 (*Rheum* Linn.) 多年生草本植物, 是药典中大黄药材的主要来源, 是青海省的道地药材之一。其有效成分主要是大黄素、大黄酚、大黄酸、芦荟大黄素和大黄素甲醚等蒽醌类衍生物, 具有泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经等功能。由于需求量很大, 野生资源日渐枯竭, 现已有多处人工栽培。由于蒽醌类化合物为大黄的主要活性部分, 因此定期采集栽培大黄样品, 对不同生长年限栽培大黄根部样品进行活性成分跟踪分析, 并和野生大黄药材进行比较, 对于人工栽培大黄质量控制具有重要意义^[1]。测定大黄中蒽醌含量的主要方法有高效液相色谱法、薄层扫描法、比色法等^[2-4]。

本实验采用《中华人民共和国药典》(2005年第一部)^[5]所载 HPLC法测定和比较了二、三和四年龄唐古特大黄和野生唐古特大黄药材中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 5种蒽醌的含量。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器与试剂

Waters 515 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Mettler Toledo AG135 万分之一电子天平。芦荟大黄素 (批号 110795-200504)、大黄酸 (批号 0757-200206)、大黄素 (批号 1107565-200110)、大黄酚 (批号 110796-200309)、大黄素甲醚 (批号 0758-200206) 对照品由中国药品生物制品检定所提供。甲醇为色谱醇, 水为蒸馏水, 其它试剂均为分析纯。

1.2 材料

实验用唐古特大黄 (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf) 样品采自青海省湟源县大黑沟乡大黄种植

收稿日期: 2006-07-05 接受日期: 2006-09-30

基金项目: 国家中西部专项 (2001BA901A47); 青海省重大科技项目 (2001-N-107-02)

*通讯作者 86-971-6143523; E-mail: gcchen@nwipb.ac.cn

基地(表 1)。野生大黄药材购自青海省果洛藏族自治州。取采集的大黄样品根部,洗净,自然干燥,粉碎,过 60 目筛,备用。

表 1 栽培唐古特大黄和野生唐古特大黄药材样品概况

Table 1 The samples of cultivated and wild *Rheum tanguticum*

样品编号 Na	采样时间 Collecting time	生长期 Grown age	地点 Region	海拔(m) Altitude
DHG030927B	2003. 09. 27	二年	湟源	2900
DHG040927C	2004. 09. 27	三年	湟源	2900
DHG040927D	2004. 09. 27	四年	湟源	2900
DHYC	(野生药材)	不详	果洛	3600 ~ 3900

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Kromasac C₁₈柱;流动相: 甲醇-0.1%磷酸(85:15);检测波长: 254 nm;流速: 1.0 mL/min;柱温: 室温。在此条件下各组分得到良好分离, HPLC液相色谱图见图 1。

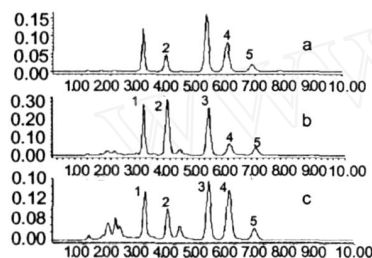


图 1 对照品、栽培大黄及野生大黄的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Samples

1. 芦荟大黄素 Alo-emodin; 2. 大黄酸 Rhein; 3. 大黄素 Emodin; 4. 大黄酚 Chrysophanol; 5. 大黄素甲醚 Physcion

a 对照品 Reference substances; b 栽培大黄 Cultivated *Rheum*; c 野生大黄 Wild *Rheum*

2.2 对照品溶液制备

精密称取芦荟大黄素对照品、大黄酸对照品、大黄素对照品、大黄酚对照品、大黄素甲醚对照品适量,用甲醇溶解分别制成每 1 mL 含芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚各 80 mg,大黄素甲醚 40 mg 的溶液;分别精密量取上述对照品溶液 2 mL,混匀,即得。

2.3 线性关系考察

精密量取大黄素、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素对照品溶液适量混合,加甲醇制成标准系列进样测定。以色谱峰面积 A 对进样量 C (mg) 进行线性回归,结果表明:各组分在各自进样量范围内线性关系

良好,线性范围、回归方程、回归系数见表 2。

表 2 5 种蒽醌衍生物对照品标准曲线

Table 2 Calibration curve of 5 anthraquinone derivatives

对照品 Control	回归方程 Regressive equation	相关系数 <i>r</i>	线性范围 Linear range (mg)
芦荟大黄素 Alo-emodin	$y = 49654500x + 12970$	0.9996	0.005 ~ 0.16
大黄酸 Rhein	$y = 41723300x + 173577$	0.9996	0.005 ~ 0.16
大黄素 Emodin	$y = 49327800x + 266023$	0.9992	0.005 ~ 0.16
大黄酚 Chrysophanol	$y = 34584600x + 136418$	0.9990	0.005 ~ 0.16
大黄素甲醚 Physcion	$y = 24179800x + 45923$	0.9986	0.0025 ~ 0.08

2.4 供试样品的制备

取本品粉末约 0.30 g,精密称取,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定重量,加热回流 1 h,放冷再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,精密量取滤液 5 mL,置烧瓶中,挥去甲醇,加入 8% 盐酸溶液 10 mL,超声处理 2 min,再加三氯甲烷 10 mL,加热回流 1 h,放冷,移至分液漏斗中,用少量三氯甲烷洗涤容器,并入分液漏斗中,分取三氯甲烷层,酸液用三氯甲烷提取三次,每次约 10 mL,合并三氯甲烷萃取液,减压回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇到刻度,摇匀即得。

2.5 样品测定

分别精密吸取对照品混合溶液和供试品溶液各 10 mL,按上述色谱条件进行测定,以外标法计算样品中大黄素、大黄酸、大黄酚、芦荟大黄素的含量,结果见表 3。

2.6 精密度试验

在上述色谱条件下,对同一对照品溶液重复进样 5 次,测得峰面积的 RSD 为芦荟大黄素 1.38%,大黄酸 1.22%,大黄酚 1.42%,大黄素 1.65%,大黄素甲醚 1.88% ($n=5$)。

2.7 重现性试验

在上述色谱条件下,对同一批样品按样品溶液的制备方法平行制备 5 份,分别进样 10 μ L,同时取混合对照品溶液进样 10 mL 进行 HPLC 分析,按外标法测定含量并计算 RSD,芦荟大黄素 2.46%,大黄酸 2.24%,大黄酚 2.65%,大黄素 3.09%,大黄素甲醚 3.45%。

表 3 样品含量测定结果

Table 3 The analytical results of samples

样品编号 Na	称样量 Quality	含量 Content (%)					总量 Total
		芦荟大黄素 Abe-emodin	大黄酸 Rhein	大黄素 Emodin	大黄酚 Chrysophanol	大黄素甲醚 Physcion	
DHG030927B	0.300	0.24	0.47	0.36	0.09	0.05	1.21
DHG040927C	0.301	0.38	0.70	0.65	0.16	0.12	2.01
DHG040927D	0.304	0.33	0.56	0.49	0.13	0.11	1.62
DHYC	0.300	0.60	0.39	0.83	1.40	0.42	3.64

2.8 回收率试验

取已知含量的大黄样品 5 份,精密称定,分别精密加入一定量对照品溶液,按照样品溶液制备方法制备并测定,计算平均回收率。结果芦荟大黄素的平均回收率 98.2% (RSD = 2.58%, $n = 5$);大黄酸的回收率 99.0% (RSD = 2.46%, $n = 5$);大黄素的平均回收率 98.6% (RSD = 2.72%, $n = 5$);大黄酚的平均回收率 97.5% (RSD = 3.08%, $n = 5$);大黄素甲醚的平均回收率 96.5% (RSD = 3.37%, $n = 5$)。

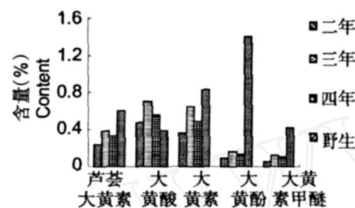


图 2 栽培和野生大黄中 5 种蒽醌成分的对比分析

Fig. 2 Comparative analysis of five anthraquinone constituents between cultivated and wild *Rheum*

3 讨论

3.1 俞森等^[6]报道栽培掌叶大黄生长时间越久,其成分含量越高,三年龄大黄质量可以达到药典要求。《中华人民共和国药典》规定:药用大黄中 5 种蒽醌的总量不得少于 1.5%^[5]。HPLC 分析表明,栽培唐古特大黄中 5 种蒽醌总量二、三、四年龄的分别为 1.21%、2.01%、1.62%,蒽醌活性成分积累基本呈上升趋势。但四年的较三年的蒽醌总量则有所下降,三、四年龄的栽培唐古特大黄均达到《药典》规定的药用标准。

3.2 二至四年龄栽培大黄中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的积累基本呈增加趋势,但四年的较三年的则均略有下降。和野生大黄药材比较,二至四年龄栽培大黄中,芦荟大黄素和大黄素的积累程度已达到野生大黄的 40%~80%;大黄酸的含量则比野生大黄要高;而大黄酚和大黄素甲醚的积累远远不足,只有野生大黄的五分之一至十分之一。大黄素和大黄素甲醚是大黄中的主要有

效单体,大黄素能抑菌、抗炎、保护肝肾、抑制血小板凝聚、改善微循环及抗癌等活性^[7];大黄素甲醚则通过血脑屏障,具有抗菌活性^[8]。虽然三、四年龄栽培大黄总蒽醌含量即可达到《药典》规定的标准,但和野生大黄药材相比,大黄酚和大黄素甲醚的含量则明显较低,这是否影响到栽培大黄药材的药效作用,有待进一步做药理学方面的研究。

参考文献

- Li YL (李玉林), Suo YR (索有瑞), Wang HL (王洪伦). Analysis of total anthraquinones content in cultivated *Rheum tanguticum*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, 18: 1020-1022.
- Cao WG (曹纬国), Liu ZQ (刘志勤), Shao Y (邵赞), et al. Determination of four anthraquinone derivatives in true balm *Rheum tanguticum* of Qinghai Province. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), 2004, 24: 2140-2142.
- He LY (何丽一), Luo SR (罗淑荣). Study on the analysis of anthraquinone derivatives of Chinese medicinal herbs. *Acta Phama Sin* (药理学学报) 1980, 15: 555-562.
- Zhu Y (朱晔), Lin ZQ (林竹青). The study on assay anthraquinone content of *Rhdix et Rihizon a Rhei Heilongjiang Med J* (黑龙江医药), 2003, 16: 171-172.
- China Pharmacopoeia Committee (中华人民共和国药典委员会). Chinese Pharmacopoeia, 1st Volume (中国药典, 第一部). Beijing: Chemical Industry Press, 2005. 17-18.
- Yu S (俞森), Zhang H (张浩), Liu XF (刘显福), et al. Comparison of contents of emodin and chrysophanol in *Rheum palmatum* L. in diferent growing periods and by distinctive cultivated method. *West China J Pham Sci* (华西药科学杂志), 2005, 20: 221-223.
- Zhang XP (张喜平), Li ZF (李宗芳). General situation in pharmacological studies on emodin. *Chin Pham Bull* (中国药理学通报), 2003, 19: 851-854.
- Zhang P (张平), Su LK (苏立凯), Li HM (李会敏), et al. Protective effects of physicon against cerebral injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Chin J Pathophysiology* (中国病理生理杂志), 2005, 21: 1829-1833.