

[药材资源]

不同产地拉萨大黄 HPLC 指纹图谱

徐晨阳^{1,2}, 郭明里^{2#}, 方芳², 李宁^{2*}, 龚云麒^{2*}

(1. 云南中医学院, 云南昆明 650500; 2. 昆药集团股份有限公司, 云南昆明 650100)

摘要: 目的 建立不同产地拉萨大黄 *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao HPLC 指纹图谱。方法 拉萨大黄 75% 甲醇提取物的分析采用 Grace Apollo C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水 (含 0.1% 磷酸), 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 20 °C; 检测波长 319 nm。结果 20 批样品 HPLC 指纹图谱中有 9 个共有峰, 相似度均在 0.90 以上。曲札芪苷、去氧土大黄苷的平均含有量分别为 4.36%、2.68%。结论 该方法稳定可靠, 可用于拉萨大黄药材的质量控制。

关键词: 拉萨大黄; HPLC 指纹图谱; 曲札芪苷; 去氧土大黄苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)02-0358-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.023

HPLC fingerprints of *Rheum lhasaense* from different growing areas

XU Chen-yang^{1,2}, GUO Ming-li^{2#}, FANG Fang², LI Ning^{2*}, GONG Yun-qí^{2*}

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. KPC Pharmaceuticals, Inc, Kunming 650100, China)

ABSTRACT: AIM To establish the HPLC fingerprints of *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao from different growing areas. METHODS The analysis of 75% methanol extract of *R. lhasaense* was developed on a 20 °C thermostatic Grace Apollo C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water (containing 0.1% phosphoric acid) flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 319 nm. RESULTS There were nine common peaks in the fingerprints of twenty batches of samples, with the similarities of more than 0.90. Average content of quzhazhigan and deoxyrhaponticin of twenty batches of samples were 4.36%, 2.68%, respectively. CONCLUSION This stable and reliable method can be used for the quality control of *R. lhasaense*.

KEY WORDS: *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao; HPLC fingerprints; quzhazhigan; deoxyrhaponticin

拉萨大黄为蓼科大黄属植物拉萨大黄 *Rheum lhasaense* A. J. Li et P. K. Hsiao 的干燥根及根茎^[1-3], 生于海拔 3 800~4 600 m 的山坡草地^[3], 产于西藏拉萨、林周、曲松。据《中华藏本草》记载, 其属于亚大黄的一种, 亚大黄(藏语曲匝)

是蓼科大黄属 8 种植物的根及根茎, 具有清腑热、泻疫疠、消肿、愈疮, 治腑热、胆热、瘟病时疫、腹痛、便秘的作用^[4]。研究表明, 拉萨大黄有多种活性成分, 其中所含有的曲札芪苷、虎杖苷、白藜芦醇^[5]等二苯乙烯类化合物表现出突出的药理

收稿日期: 2018-03-22

基金项目: 云南省科技计划项目 (2013BC001)

作者简介: 徐晨阳 (1994—), 男, 硕士生, 研究方向为中药制剂质量与工艺评价。Tel: 15079182378, E-mail: 1219365685@qq.com

#并列第一作者: 郭明里 (1991—), 女, 硕士, 研究方向为药物分析。Tel: 18760726915, E-mail: gml53252811473272@163.com

*通信作者: 李宁 (1982—), 男, 博士, 硕士生导师, 研究方向为天然药物活性成分与质量评价。Tel: (0871) 68319868-2045, E-mail: mailtolining@gmail.com

龚云麒 (1981—), 男, 高级工程师, 研究方向为天然产物化学。Tel: (0871) 68319868-2044, E-mail: gongyun911@163.com

活性。二苯乙烯类化合物具有抗衰老、抗氧化、提高免疫功能、防止动脉硬化、保护肝脏等作用^[6-13]。由于药材受限于产地、栽培方法等因素，其在有效成分含有量、功效、作用上可能存在一定的差异^[14-16]。目前，有关拉萨大黄的含有量测定已有报道^[17-18]，但指纹图谱研究较少，仅凭个别化学成分的含有量难以全面地、客观地评价拉萨大黄的质量，且存在缺乏对共有峰进行定性等问题。本实验建立拉萨大黄的HPLC指纹图谱，同时采用对照品对其共有峰进行归属，用于全面评价拉萨大黄的质量。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪（包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、DAD 检测器）（美国安捷伦公司）；CP225D 分析天平、BD221S 分析天平（德国 Sartorius 公司）；SHB-III 循坏水式多用真空泵（郑州长城科技工贸有限公司）；Milli-Q 超纯水机（德国 Millipore 公司）；5510E-DTH 超声波清洗器（美国必能信公司）。

1.2 试剂与材料 色谱纯乙腈（德国默克股份两合公司）、色谱纯甲醇（德国默克股份两合公司）、磷酸（分析纯）、超纯水。虎杖苷对照品（批号 111575-200502）购自中国食品药品检定研究院，曲札芪苷（批号 20120715）、白藜芦醇（批号 20140920）、去氧土大黄苷（批号 20140623）对照品为昆药集团股份有限公司药物研究院自制。

20 批拉萨大黄药材，详细信息见表 1。所有样品经昆药集团股份有限公司李宁博士鉴定为正品，标本保存于昆药集团股份有限公司药物研究院。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 取样品粉末（过 3 号筛）约 0.1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 75% 甲醇 50 mL，称定质量，超声处理（功率 250 W，频率 35 kHz）30 min，放冷，用 75% 甲醇补足减失质量，摇匀，过滤，取续滤液，即得。

2.2 对照品溶液制备 精密称取曲札芪苷、虎杖苷、白藜芦醇、去氧土大黄苷对照品适量置于棕色量瓶中，用 75% 甲醇溶解并稀释配制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液，即为曲札芪苷、虎杖苷、白藜芦醇、去氧土大黄苷对照品溶液。

2.3 色谱条件 Grace Apollo C₁₈ 柱（250 mm × 4.6 mm, 5 μm）；检测波长 319 nm；柱温 20 ℃；体积流量 1.0 mL/min；流动相乙腈（A）-水（含 0.1% 磷酸，B），梯度洗脱（0~18 min, 15% A；

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

序号	批号	来源	野生/栽培
S1	1#	西藏林周县旁多乡	野生
S2	2#	西藏曲松县城郊	野生
S3	7#	西藏墨竹工卡县尼玛江热乡	野生
S4	10#	西藏曲松县下沙乡	野生
S5	12#	西藏加查县布达拉山	野生
S6	13#	四川松潘县	栽培
S7	20110505	西藏	野生
S8	20110915	西藏	野生
S9	20111123	西藏	野生
S10	20121218	西藏	野生
S11	20131220	西藏	野生
S12	20150107	西藏	野生
S13	—	云南昆明	栽培
S14	—	云南香格里拉	栽培
S15	—	云南丽江	栽培
S16	20160130	西藏	野生
S17	20160825-1	丽江	栽培
S18	20160825-2	丽江	栽培
S19	20160819-1	迪庆	栽培
S20	20160819-2	迪庆	栽培

18~30 min, 20% A；30~45 min, 30% A；45~50 min, 50% A；50~55 min, 30% A；55 min, 15% A）；理论板数按曲札芪苷峰计算应不低于 5 000。

精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，记录 165 min 色谱图，见图 1，主要成分已于 55 min 内全部流出。因此规定分析方法为分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，记录 55 min 色谱图，即得。

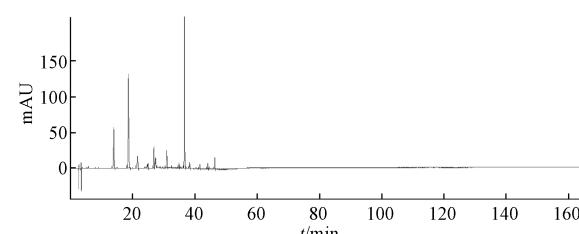


图 1 样品 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of sample

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批号样品（批号 20160130），按“2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下连续进样 6 次，测得各色谱峰相对保留时间 RSD 小于 1% 和相对峰面积 RSD 小于 3%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批号样品（批号 20160130），按“2.1”项下方法平行制备供试品溶液 6 份，在“2.3”项条件下进样，测得各色谱

峰相对保留时间 RSD 小于 1% 和相对峰面积 RSD 小于 3%，表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份批号样品（批号 20160130），按“2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下，于 0、1、2、3、9、22、26、39 h 进样，测得各色谱峰相对保留时间 RSD 小于 1% 和相对峰面积 RSD 小于 3%，表明供试品溶液

在 39 h 内稳定性良好。

2.5 HPLC 指纹图谱建立

2.5.1 HPLC 指纹图谱 取不同批次拉萨大黄药材共 20 批，分别按照已建立的拉萨大黄指纹图谱分析方法进行分析，得到各批药材的 HPLC 指纹图谱，见图 2。

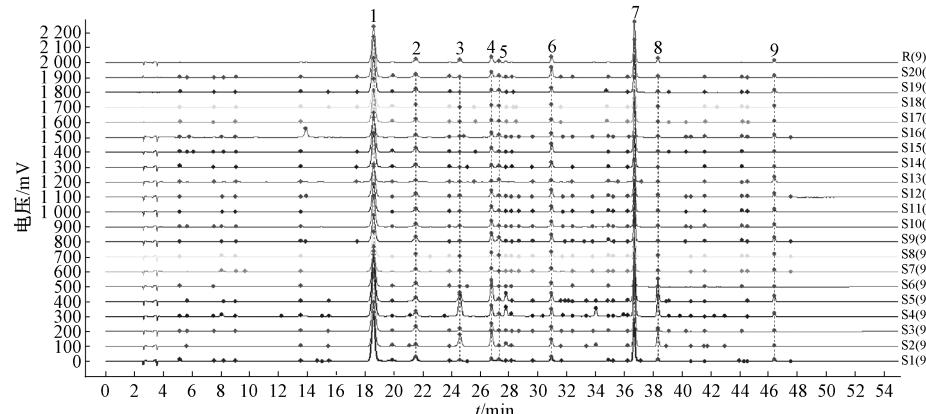


图 2 20 批样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of twenty batches of samples

2.5.2 相似度分析 以 20 批样品的色谱指纹图谱为基础，使用药典会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012.130723 进行数据处理，见图 3，得到共有模式指纹图谱。通过比较 20 批药材的色谱图，确定了 9 个共有峰，见图 4。分别生成 20 批样品的共有模式、野生品的共有模式、栽培品的共有模式。

对 20 批样品 HPLC 指纹图谱进行相似度分析，以 20 批样品的共有模式为参照，得所有批次与共有模式的相似度均在 0.95 以上。野生品平均相似度为 0.983，栽培品平均相似度为 0.988。

以 12 批野生样品的共有模式为参照，分别计算 20 批药材的相似度，得所有批次药材与共有模式的相似度均在 0.95 以上。野生品平均相似度为 0.982，栽培品平均相似度为 0.987。

以 8 批栽培样品的共有模式为参照，分别计算 20 批药材的相似度，得所有批次药材与共有模式的相似度均在 0.90 以上。野生品平均相似度为 0.971，栽培品平均相似度为 0.993。

2.6 相对保留值系统对指纹图谱评价

2.6.1 内参照峰选择 拉萨大黄指纹图谱中的 1 号峰经与对照品对照，确定为曲札芪苷。该色谱峰与相邻的色谱峰分离良好，且为各批拉萨大黄药材中所共有的色谱峰。因此确定其为内参照峰。

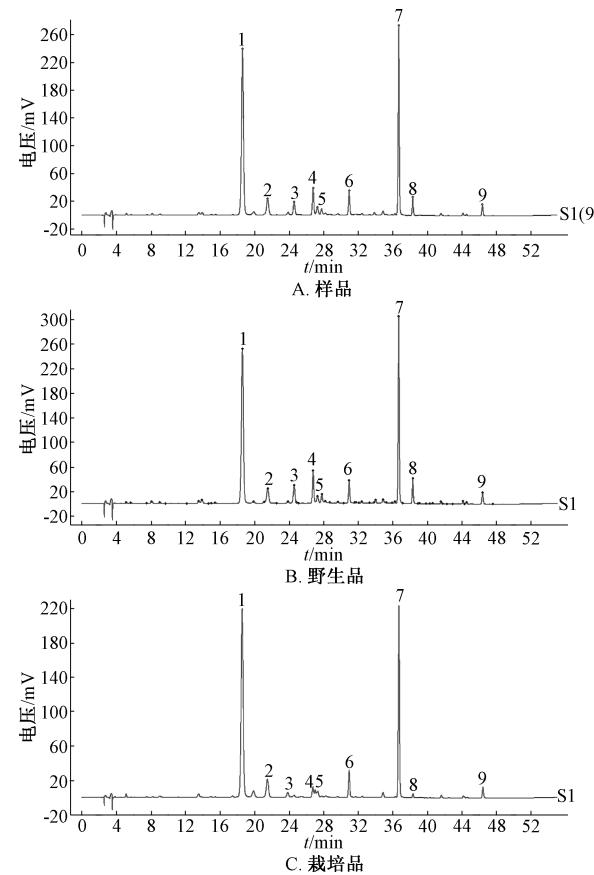


图 3 各样品共有模式图

Fig. 3 Common models of various samples

2.6.2 相对保留时间 相对保留时间是色谱指纹图谱定性的依据,以1号峰的保留时间为标准,其他色谱峰的保留时间与之相比,从而求得各色谱峰的相对保留时间。相对保留时间体系将波动性较大的保留时间转变成稳定性较好的相对保留时间,有助于建立各样品统一的定性依据。在本研究中,各共有峰标识的保留时间和相对保留时间与20批药材共有模式相同。

2.6.3 相对峰面积 相对峰面积是色谱指纹图谱定量的依据。以1号峰的峰面积为标准,其他色谱峰面积与其相比,由此得到一系列的面积比值,这些归一化面积表达了各样品所含成分之间量的关

系,该数据可用于待测样品与标准药材间相似性的量化描述,提高了样品间的可比性和比较结果的可信性。

本研究对拉萨大黄指纹图谱中9个共有峰的保留时间、相对保留时间,各色谱峰相对峰面积比值范围进行了统计计算,见表2。拉萨大黄20批药材共有峰的相对峰面积分布在一个较宽的范围内,最大RSD达到158.84%。其中3号和8号峰变化幅度最大,其次为4号、5号和9号峰,7号峰(除1号曲札芪苷色谱峰以外最大的色谱峰)相对稳定。相对峰面积的变化客观反映了化学成分的批间差异。

表2 16批样品共有峰相对保留时间及相对峰面积

Tab. 2 The relative retention time and relative peak areas of common peaks of sixteen batches of samples

峰号 t_R/min	相对峰面积																				RSD/%	
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	平均	
1	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	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00	
2	1.157	0.111	0.048	0.095	0.092	0.106	0.097	0.113	0.126	0.209	0.118	0.134	0.127	0.129	0.094	0.125	0.137	0.100	0.096	0.117	0.091	0.113
3	1.322	0.026	0.244	0.039	0.322	0.147	0.011	0.035	0.033	0.020	0.027	0.027	0.034	0.009	0.006	0.011	0.033	0.008	0.013	0.010	0.016	0.053
4	1.440	0.035	0.239	0.094	0.126	0.279	0.020	0.109	0.116	0.225	0.140	0.140	0.139	0.042	0.034	0.080	0.158	0.040	0.056	0.051	0.097	0.111
5	1.467	0.033	0.011	0.011	0.039	0.051	0.012	0.038	0.052	0.150	0.030	0.044	0.047	0.131	0.028	0.019	0.104	0.045	0.052	0.073	0.042	0.051
6	1.664	0.058	0.093	0.042	0.088	0.102	0.062	0.094	0.118	0.154	0.113	0.130	0.131	0.055	0.083	0.129	0.118	0.054	0.063	0.077	0.153	0.096
7	1.973	0.472	0.946	0.405	0.682	0.868	0.386	0.643	0.671	0.843	0.586	0.630	0.602	0.776	0.489	0.743	0.833	0.550	0.572	0.582	0.517	0.640
8	2.060	0.023	0.191	0.025	0.180	0.231	0.008	0.040	0.038	0.025	0.025	0.028	0.034	0.019	0.005	0.011	0.039	0.011	0.018	0.012	0.015	0.049
9	2.494	0.030	0.009	0.010	0.036	0.064	0.004	0.054	0.080	0.112	0.047	0.064	0.073	0.209	0.015	0.021	0.079	0.028	0.036	0.047	0.032	0.052
																						88.09

2.7 共有峰指认 取曲札芪苷、虎杖苷、白藜芦醇、去氧土大黄苷对照品溶液,按照拉萨大黄药材指纹图谱分析方法对照品进样分析,通过对照保留时间对拉萨大黄指纹对照图谱中的色谱峰进行指认和标定,鉴定了3个共有峰(曲札芪苷、虎杖苷、去氧土大黄苷),和1个非共有峰(白藜芦醇),见图4。

2.8 含有量测定 在拉萨大黄指纹图谱研究的基础上,以外标一点法对曲札芪苷和去氧土大黄苷进行了含有量测定,见表3。对曲札芪苷,拉萨大黄指纹图谱的分析方法与拉萨大黄质量标准(昆药集团股份有限公司企业内控标准)中曲札芪苷的含有量测定方法完全一致,可视为定量研究。对于去氧土大黄苷,本研究以指纹图谱的结果计算去氧土大黄苷的含有量,没有进行检测限、定量限、加样回收率等方法学考察,因此可视为半定量研究。

20批拉萨大黄药材曲札芪苷的平均含有量为4.36%,其中野生品的平均含有量为4.49%,栽培品的平均含有量为4.15%。20批拉萨大黄药材去

表3 各成分含有量测定结果(%)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (%)

序号	曲札芪苷	去氧土大黄苷
S1	5.71	3.08
S2	5.14	5.62
S3	7.06	3.28
S4	7.29	5.66
S5	6.39	6.36
S6*	4.69	2.07
S7	2.54	1.86
S8	3.19	2.46
S9	3.23	3.15
S10	3.74	2.53
S11	3.34	2.43
S12	3.78	2.63
S13*	1.96	1.74
S14*	4.11	2.32
S15*	4.72	4.09
S16	2.52	2.22
S17*	4.11	2.58
S18*	3.81	2.49
S19*	4.48	2.98
S20*	5.29	3.13

注: *为栽培品

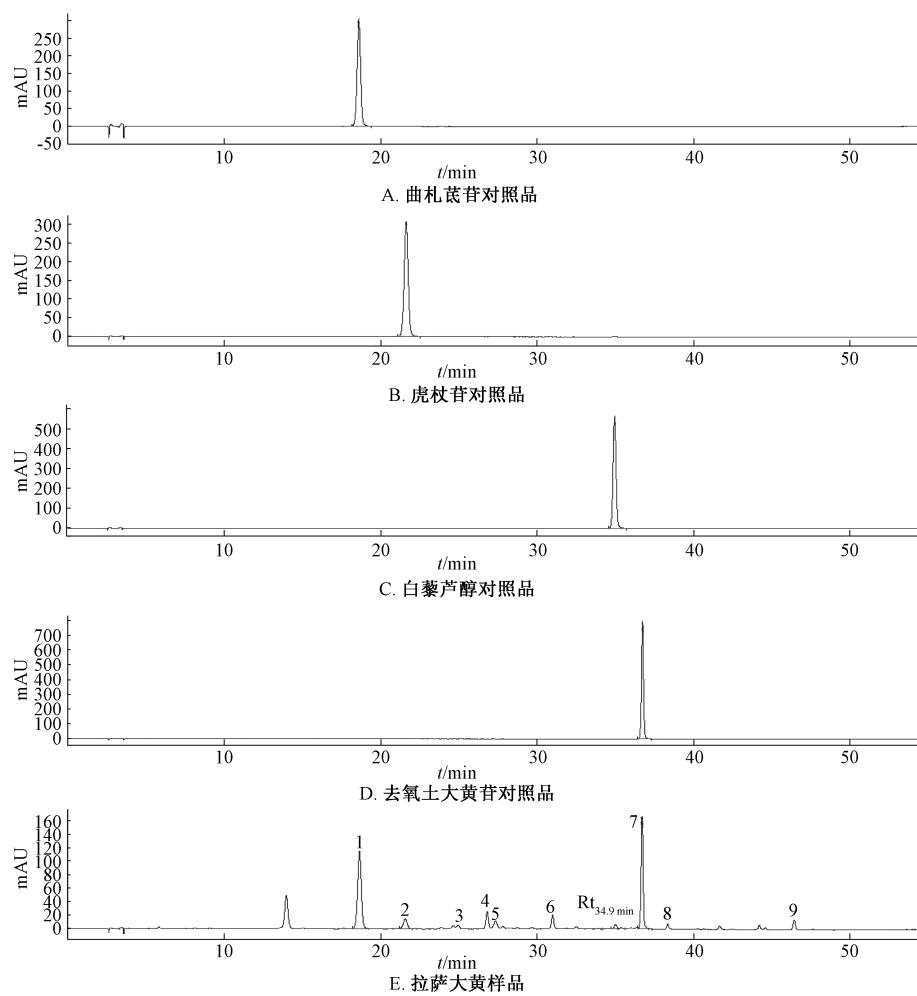


图4 各样品HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various samples

氧土大黄苷的平均含有量为3.13%，其中野生品的平均含有量为3.44%，栽培品的平均含有量为2.68%。

3 小结

本研究建立了拉萨大黄药材的指纹图谱分析方法，对20批拉萨大黄药材进行了测定。用相似度评价软件和相对保留值系统对结果进行了分析评价。并对指纹图谱中的曲札芪苷、虎杖苷、白藜芦醇、去氧土大黄苷4个色谱峰进行了标定。在此基础上，对曲札芪苷和去氧土大黄苷进行定量研究。

结果表明，拉萨大黄栽培品和野生品的化学成分相似，具有较好的化学等同性。各成分的具体变化规律有待更多批次样品数据的积累与比较。本研究建立的分析方法可为拉萨大黄的综合质量评价提供参考。

参考文献：

[1] 肖培根, 陈碧珠, 王立为, 等. 大黄属的植物亲缘关系、化

学成分与疗效间联系性的初步研究 [J]. 药学学报, 1980 (1): 33-39.

[2] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏植物志 (第一卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 598.

[3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 (第二十五卷第一分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 180-181.

[4] 罗达尚. 中华藏本草 [M]. 北京: 民族出版社, 1997: 49-50.

[5] 龚云麒, 陈锦锌, 方芳, 等. 拉萨大黄化学成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 601-602.

[6] 胡琳, 何金星, 胡群, 等. 曲札芪苷在制备防治心脑缺血疾病制剂中的应用及其制备方法: 中国, CN201010116358[P]: 2013-07-03.

[7] 尚建华, 刘一丹, 杨兆祥, 等. 曲札芪苷在制备改善微循环障碍药物中的应用: 中国, CN201210202957[P]: 2016-08-31.

[8] 龚云麒, 刘一丹, 方芳, 等. 曲札芪苷在制备治疗肺损伤或急性呼吸窘迫综合征的药物的用途: 中国, CN201410008296[P]: 2015-07-08.

[9] 陈云建, 杨兆祥, 张建文, 等. 曲札芪苷在制备治疗癌症药物中的应用: 中国, CN201310625163[P]: 2017-06-16.

- [10] 贾玉梅, 王君明, 崔瑛. 基于二苯乙烯类为主要活性成分的虎杖药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 263-269.
- [11] 王君, 方芳. 虎杖苷在心脑血管系统的药理研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18(13): 2105-2107.
- [12] 安梅, 周瑾, 陈晓宇. 白藜芦醇药理学作用的研究进展 [J]. 肿瘤药学, 2014, 4(4): 242-246.
- [13] 马宁, 王建芬, 徐芳, 等. 白藜芦醇衍生物及类似物的药理活性与分析方法研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(2): 120-128.
- [14] 柳莹, 卢敬光, 吴丽, 等. 不同炮制工艺对藏边大黄中藏黄苷A和总蒽醌含量的影响 [J]. 华西药学杂志, 2010, 25(3): 331-333.
- [15] 李芸, 苗小楼, 吴平安, 等. 大黄不同品种不同产地加工品的蒽醌含量比较 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(12): 2257-2261.
- [16] 刘佳, 李莉, 胡会娟, 等. 不同道地产区大黄功效组分含量的差异分析 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(5): 662-669.
- [17] 方芳, 龚云麒, 陈锦锌. 一种测定拉萨大黄成分含量的超高效液相色谱方法: 中国, CN201410008299 [P]: 2015-06-17.
- [18] 安利贞, 陈云建, 方芳, 等. 超高效液相色谱法测定拉萨大黄中三种化学成分的含量 [J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(1): 31-34.

五味子中山葡萄 HPLC 指纹图谱的建立及其伪品鉴别

干建伟^{1,2}, 胡敏², 钱广生^{1*}, 韦婷²

(1. 四川大学华西药学院, 四川成都 610041; 2. 华润三九(雅安)药业有限公司, 四川雅安 625000)

摘要: 目的 建立五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail 中山葡萄 HPLC 指纹图谱及其伪品鉴别。方法 五味子水提物的分析采用 Waters symmetry shield™ RP₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm。结果 10 批样品指纹图谱中有 10 个共有峰, 相似度均大于 0.90。用该液相方法检测山葡萄与五味子, 指纹图谱有显著差异。结论 该方法准确灵敏、重复性好, 能够准确鉴别五味子伪品山葡萄。

关键词: 五味子; 山葡萄; 伪品; HPLC 指纹图谱; 紫外-可见分光光度法

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)02-0363-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.024

Establishment of HPLC fingerprints of *Vitis amurensis* from *Schisandra chinensis* and its counterfeit identification

GAN Jian-wei^{1,2}, HU Min², QIAN Guang-sheng^{1*}, WEI Ting²

(1. West China School of Pharmacy Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. China Resources Sanjiu (Yaan) Pharmaceutical Co. Ltd, Yaan 625000, China)

ABSTRACT: AIM To establish the HPLC fingerprints of *Vitis amurensis* from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Bail and to identify its counterfeit. **METHODS** The analysis of aqueous extract from *S. chinensis* was developed on a 30 °C thermostatic Waters symmetry shield™ RP₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 210 nm. **RESULTS** There were ten common peaks in the fingerprints of ten batches of samples, with the similarities of more than 0.90. There were significant differences in the HPLC fingerprints between *V.*

收稿日期: 2018-05-07

作者简介: 干建伟 (1983—), 男, 工程师, 主要从事中药制药新技术与工艺过程研究。Tel: 18086997715, E-mail: suiyue121@163.com

*通信作者: 钱广生 (1969—), 男, 硕士生导师, 副教授, 从事药品质量控制和仪器分析。Tel: 13540460087, E-mail: qgs@scu.edu.cn