

大黄种子蒽醌含量的测定

刘何春^{1,2,3}, 徐文华^{1,2}, 臧黎黎⁴, 周国英^{1,2*}

¹中国科学院西北高原生物研究所; ²中国科学院藏药研究重点实验室, 西宁 810008;

³中国科学院大学, 北京 100049; ⁴电子科技大学, 成都 610041

摘要: 采用 HPLC-DAD 法探究唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄种子中蒽醌的含量, 测定大黄种子中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚的含量, 色谱柱为 Agilent Eclipse plus C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm); 流动相 A 相为甲醇, B 相为 0.1% 冰乙酸溶液; 柱温 25 °C; 检测波长 254 nm。结果发现大黄种子中含有大黄素、大黄素甲醚和大黄酚, 且含量丰富, 但未检测出芦荟大黄素和大黄酸。总蒽醌的含量顺序为掌叶大黄种子 > 唐古特大黄种子 > 药用大黄种子。测定方法精密度、准确度、稳定性均符合生物样品测定要求, 可用于大黄种子蒽醌含量的测定。

关键词: 大黄种子; HPLC-DAD; 蒽醌

中图分类号: Q517

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.020

Determination of Anthraquinone Derivatives in Rhubarb Seeds

LIU He-chun^{1,2,3}, XU Wen-hua^{1,2}, ZANG Li-li⁴, ZHOU Guo-ying^{1,2*}

¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences; ²Key Laboratory of Tibetan Medicine Research,

Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; ³University of Chinese Academy of

Sciences, Beijing 100049, China; ⁴University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, China

Abstract: The aim of this study was to explore the concentrations of anthraquinone derivatives detected in *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. seeds, *R. palmatum* Linn. seeds and *R. officinale* Baill. seeds. The contents of aloe-emodin, rhein, emodin, emodin, chrysophanol in rhubarb seeds were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Agilent Eclipse plus C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm) column was used for chromatographic separation with the mobile phase consisting of methanol (A) and 0.1% acetic acid (B) in a gradient elution mode. Column temperature was 25 °C; Detection wavelength was 254 nm. The results showed that the order of content of concentrations of anthraquinone derivatives was *Rh. palmatum* Linn. seeds > *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. seeds > *Rh. officinale* Baill. seeds. Rhubarb seeds contain abundant emodin, emodin and chrysophanol, excluding aloe-emodin and rhein. The developed method was proved to be accurate, precise, stable and suitable for the determination of anthraquinone derivatives in Rhubarb seeds.

Key words: Rhubarb seeds; HPLC-DAD; anthraquinone derivatives

中药大黄为蓼科 (Polygonaceae) 大黄属 (*Rheum* Linn.) 植物唐古特大黄 (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.)、掌叶大黄 (*R. palmatum* Linn.) 或药用大黄 (*R. officinale* Baill.) 的干燥根及根茎^[1]。唐古特大黄又名鸡爪大黄、君木扎 (藏名), 在青海主要生长于 2300 ~ 4200 m 的林缘、林下、沟谷灌丛及草地, 其他主要分布于甘肃南部、西藏东北部、四川西北部

等^[2], 栽培或野生。掌叶大黄主产于甘肃、青海、西藏、四川等地, 主要为栽培, 产量最大。药用大黄主产于四川、贵州、云南、湖北、陕西等地, 栽培或野生。据《青海植物志》记载, 大黄属植物果实形态为瘦果卵形或椭圆形至近圆形, 具三棱, 沿棱生翅^[2]。唐古特大黄瘦果椭圆状三棱形, 长 8 ~ 10 毫米, 宽 6 ~ 8 毫米, 顶端微凹, 基部浅心形, 暗褐色, 翅无皱缩; 掌叶大黄瘦果长方状椭圆形, 长 10 ~ 11 毫米, 宽 8 ~ 9 毫米, 两端凹陷, 翅呈皱缩状; 药用大黄瘦果长圆状椭圆形, 长 8 ~ 10 毫米, 宽 7 ~ 9 毫米, 顶端圆, 中央微下凹, 基部浅心形, 翅成皱缩状^[2,3]。

收稿日期: 2014-09-29 接受日期: 2014-11-19

基金项目: 青海省重大科技攻关项目 (2014-NS-115); 国家科技支撑计划 (2011BA105B03)

* 通讯作者 Tel: 86-971-6159630; E-mail: zhouguy@nwipb.cas.cn

大黄发挥其药用价值的成分主要是蒽醌类衍生物,包括芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚及其苷类,具有较强的泻下、镇痛抗炎、抗氧化抑酶、抗病源微生物、抗衰老、调节免疫、保肝、利胆、降血脂的作用^[4]。目前,对于大黄种子的研究多集中在发芽率、千粒重、净度、含水量等质量检验指标上^[5],周浓等^[6]曾对栽培掌叶大黄不同部位蒽醌衍生物的含量进行分析,不同部位包括根茎、叶、花序和种子,种子中检测到了蒽醌的存在。野生大黄资源日益减少,大黄种子资源丰富,其中唐古特大黄和药用大黄是否含有蒽醌类衍生物、以及含量多少未见报道,鉴于此,本实验采用 HPLC-DAD 法测定唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄种子中蒽醌含量,以期对加大大黄种子的开发利用、缓解野生大黄资源匮乏的现状提供一定科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

唐古特大黄种子和药用大黄种子于 2012 年采自青海省湟中县拦隆口镇药材种植基地,掌叶大黄种子于 2006 年采自甘肃省岷县。经中国科学院西北高原生物研究所周国英研究员鉴定为唐古特大黄种子、掌叶大黄种子和药用大黄种子。种子按照以下三种方式处理:一是不作处理,即完整的大黄种子;二是将种翅去除,即剩余的大黄种子部分;三是第二种处理下得到的种翅。

1.2 实验仪器

Agilent(安捷伦)1200 型高效液相色谱仪,包括 G1322A 脱气装置、G1311A 四元泵、G1329A 标准型自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315D 二极管数组检测器。N-1001D-WD 旋转蒸发器。

1.3 实验试剂

有机溶剂包括分析级甲醇、冰乙酸、盐酸、三氯甲烷(天津百世化工有限公司);色谱纯甲醇(山东禹王实业有限公司化工分公司);HPLC 级超纯水由实验室自制;对照品芦荟大黄素(批号:110795-201007)、大黄酸(批号:110757-200206)、大黄素(批号:110756-200110)、大黄素甲醚(批号:110758-201013)和大黄酚(批号:110796-201118)购自中国食品药品检定研究院,各标品纯度均在 98% 以上。

1.4 色谱分析方法

1.4.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Eclipse plus C₁₈ (4.6 × 250

mm, 5 μm)。体积流量 1.0 mL/min。流动相 A 相为纯甲醇, B 相为 0.1% 冰乙酸水溶液, 梯度洗脱程序为: 0 ~ 20 min, 60% ~ 80% A; 20 ~ 40 min, 80% ~ 95% A; 40 ~ 45 min, 95% A。柱温 25 °C, 检测波长 254 nm。混合对照品色谱图见图 1。

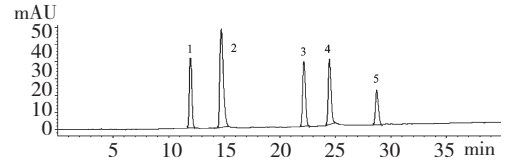


图 1 混合对照品色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of mixed standard

1. 芦荟大黄素; 2. 大黄酸; 3. 大黄素; 4. 大黄素甲醚; 5. 大黄酚

1. Aloe-emodin; 2. Rhubarb acid; 3. Emodin; 4. Physcion; 5. Chrysophanol

1.4.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚各适量;以甲醇溶解,摇匀并定容,制成含芦荟大黄素(33.33 μg/mL)、大黄酸(66.67 μg/mL)、大黄素(16.67 μg/mL)、大黄素甲醚(50 μg/mL)、大黄酚(33.33 μg/mL)的混合对照品溶液。

1.4.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过四号筛)约 0.150 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定重量,加热回流 1 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足损失的重量,摇匀,滤过。精密量取续滤液 5 mL,置烧瓶中,挥去溶剂,加 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,置分液漏斗中,分取三氯甲烷层,酸液再用三氯甲烷提取三次,每次 10 mL,合并三氯甲烷液,减压回收溶液至干,残渣加甲醇使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

1.4.4 线性关系考察

吸取 1.4.2 项下的混合对照品 2、4、6、8、10、12 μL,注入高效液相色谱仪,按照 1.4.1 项下的色谱条件进行检测,拟合峰面积(Y)和进样量(X, μg)作回归曲线,得回归方程:芦荟大黄素($Y = 2058.7X + 0.0867, R^2 = 0.9999$, 在 0.067 ~ 0.400 μg 范围内呈良好线性关系);大黄酸($Y = 1927.4X - 11.987, R^2 = 0.9999$, 在 0.133 ~ 0.800 μg 范围内呈良好线性关系);大黄素($Y = 4007.1X + 0.42, R^2 = 0.9999$, 在 0.033 ~ 0.200 μg 范围内呈良好线性关系);大黄素

甲醚($Y = 1345.1X + 10.82, R^2 = 0.9998$, 在 $0.100 \sim 0.600 \mu\text{g}$ 范围内呈良好线性关系); 大黄酚($Y = 1212.3X - 12.773, R^2 = 0.9999$, 在 $0.067 \sim 0.400 \mu\text{g}$ 范围内呈良好线性关系)。

1.4.5 精密度试验

分别在 1 d 内和连续 5 d 精密吸取同一混合对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 在 1.4.1 项下的色谱条件下重复进样 5 次测定。记录各成分色谱峰面积, 计算各对照品的浓度。结果表明, 混合对照品溶液中, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚浓度的日内 RSD 分别为 0.26%、0.51%、0.50%、0.39%、0.31%, 日间 RSD 分别为 0.44%、3.37%、3.16%、0.32%、2.19%。表明仪器及进样精密度良好。

1.4.6 稳定性试验

精密吸取上述混合对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 分别在 0、2、4、6、8、16、24 h 进样分析, 根据峰面积计算混合对照品溶液中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚的浓度, RSD 分别为 0.53%、1.68%、0.66%、2.02%、0.45%。表明 24 h 内 5 个对照品稳定性良好。

1.4.7 重复性试验

取同一样品, 称取 6 份, 各约 0.150 g , 精密称定, 分别制备供试品溶液, 并进行测定结果表明, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚 6 次测定的 RSD 分别为 2.06%、1.30%、0.56%、2.19%、0.37%。表明方法重复性较好。

1.4.8 加样回收率实验

采用加样回收法, 精密称取已知含量的大黄根粉末 0.150 g , 分别精密加入相当于样品中五种蒽醌含量的 80%、100%、120% 的对照品溶液进行测定。精密吸取 $10 \mu\text{L}$, 计算回收率。结果表明, 芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄酚的回收率分别为 97.73%、99.21%、102.40%、101.55%、96.66%, RSD 分别为 1.55%、3.01%、1.22%、0.86%、2.53%。

1.4.9 样品测定

精密称取各大黄种子粉末约 0.150 g , 按照 1.4.3 项下的方法制备供试液, 按照 1.4.1 项下的色谱条件注入液相色谱仪, 每批平行测定 3 次, 记录色谱峰面积, 用标准曲线计算含量。样品色谱图见图 2。

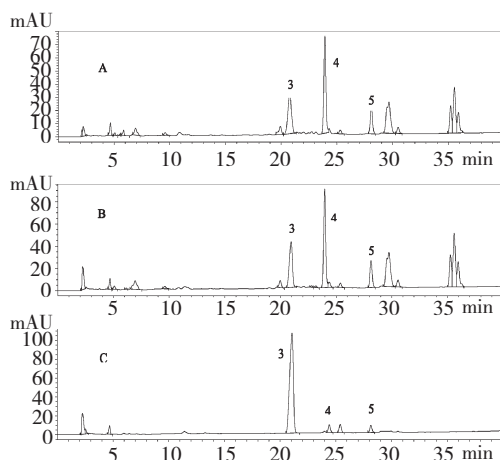


图 2 唐古特大黄种子(A)、掌叶大黄种子(B)及药用大黄种子(C)样品的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. seeds (A), *Rh palmatum* Linn. seeds (B) and *Rh. officinale* Baill. seeds (C)

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

2 结果与分析

2.1 大黄种子蒽醌含量的测定

大黄种子的蒽醌含量测定结果见表 1。由表 1 可知, 三种大黄种子总蒽醌的含量百分比为: 掌叶大黄种子(3.529%) > 唐古特大黄种子(2.922%) > 药用大黄种子(2.116%)。大黄素含量为: 药用大黄种子(16.750 mg/g) > 掌叶大黄种子(4.625 mg/g) > 唐古特大黄种子(3.781 mg/g)。大黄素甲醚含量为: 掌叶大黄种子(21.937 mg/g) > 唐古特大黄种子(18.305 mg/g) > 药用大黄种子(1.737 mg/g)。大黄酚含量为: 掌叶大黄种子(8.839 mg/g) > 唐古特大黄种子(7.123 mg/g) > 药用大黄种子(2.677 mg/g)。

唐古特大黄种子和掌叶大黄种子中, 大黄素甲醚含量 > 大黄酚 > 大黄素。药用大黄种子中大黄素含量较高, 是掌叶大黄种子的 4 倍, 唐古特大黄种子的 6 倍左右, 但只有大黄素一种含量较高, 大黄素甲醚和大黄酚的含量远低于其他两种大黄种子。芦荟大黄素和大黄酸在三种大黄种子中未检测到。虽然三种大黄种子的总蒽醌含量都未达到药典规定的根和根茎的 1.5% 的含量, 但都超过了 1%, 表明大黄种子除了育种的作用外, 还蕴藏有药用价值。

表1 大黄种子中蒽醌含量的测定结果

Table 1 Concentrations of anthraquinone derivatives detected in Rhubarb Seeds with wing

	含量 ^a Concentration (mg/g)					
	芦荟大黄素 Aloe emodin	大黄酸 Rhein	大黄素 Emodin	大黄素甲醚 Physcion	大黄酚 Chrysophanol	总蒽醌 Total (%)
唐古特大黄种子 <i>Rheum tanguticum</i> Maxim. ex Balf. seeds	-	-	3.781	18.305	7.123	2.922
掌叶大黄种子 <i>Rh. palmatum</i> Linn. seeds	-	-	4.625	21.937	8.839	3.529
药用大黄种子 <i>Rh. officinale</i> Baill. seeds	-	-	16.750	1.737	2.677	2.116

2.2 去除种翅后的大黄种子蒽醌含量的测定

去除种翅后的大黄种子的蒽醌含量测定结果见表2。由表2可知,三种大黄种子总蒽醌的含量百分比为:唐古特大黄种子(1.849%)>掌叶大黄种子(1.695%)>药用大黄种子(1.377%)。大黄素含量为:药用大黄种子(9.791 mg/g)>唐古特大黄种子(2.509 mg/g)>掌叶大黄种子(2.090 mg/g)。大黄素甲醚含量为:唐古特大黄种子(11.094 mg/g)>掌叶大黄种子(11.035 mg/g)>药用大黄种子(1.965 mg/g)。大黄酚含量为:唐古特大黄种子

(1.849 mg/g)>掌叶大黄种子(1.695 mg/g)>药用大黄种子(1.377 mg/g)。

去除种翅后的唐古特大黄种子和掌叶大黄种子中,大黄素甲醚含量>大黄酚>大黄素。药用大黄种子中大黄素含量较高,是掌叶大黄种子唐古特大黄种子和的4倍,但只有大黄素一种含量较高,大黄素甲醚和大黄酚的含量远低于其他两种大黄种子。芦荟大黄素和大黄酸在去翅的大黄种子中未检测到。

表2 去除种翅大黄种子中蒽醌含量的测定结果

Table 2 Concentrations of anthraquinone derivatives detected in Rhubarb Seeds that removed wing

	含量 ^a Concentration (mg/g)					
	芦荟大黄素 Aloe emodin	大黄酸 Rhein	大黄素 Emodin	大黄素甲醚 Physcion	大黄酚 Chrysophanol	总蒽醌 Total (%)
唐古特大黄种子(去翅) <i>Rheum tanguticum</i> Maxim. ex Balf. seeds	-	-	2.509	11.094	4.885	1.849
掌叶大黄种子(去翅) <i>Rh. palmatum</i> Linn. seeds	-	-	2.090	11.035	3.824	1.695
药用大黄种子(去翅) <i>Rh. officinale</i> Baill. seeds	-	-	9.791	1.965	2.677	1.377

2.3 大黄种子种翅的蒽醌含量的测定

大黄种子的种翅蒽醌含量测定结果见表3。由表3可知,三种大黄种子总蒽醌的含量百分比为:药用大黄种子(1.111%)>掌叶大黄种子(0.618%)>唐古特大黄种子(0.562%)。大黄素含量为:药用大黄种子(8.975 mg/g)>唐古特大黄种子(0.971 mg/g)>掌叶大黄种子(0.855 mg/g)。大黄素甲醚含量为:掌叶大黄种子(4.368 mg/g)>唐古特大黄种子(2.867 mg/g)>药用大黄种子(0.322 mg/g)。大黄酚含量为:药用大黄种子(2.020 mg/g)>唐古特大黄种子(1.786 mg/g)>

掌叶大黄种子(0.953 mg/g)。

唐古特大黄种翅和掌叶大黄种翅中,大黄素甲醚含量>大黄酚>大黄素。药用大黄种子中大黄素含量较高,高达唐古特和掌叶大黄种翅的9倍,但大黄素甲醚含量远低于其他两种大黄种翅,大黄酚含量还较高。芦荟大黄素和大黄酸在三种大黄种翅中未检测到。

结果显示,无论大黄酸、大黄素甲醚、大黄酚还是总蒽醌,都是未去翅种子>去翅种子>种翅,而且去翅种子和种翅含量的加和与完整种子的含量接近。

表3 大黄种子种翅中蒽醌含量的测定结果

Table 3 Concentrations of anthraquinone derivatives detected in Rhubarb Seeds wing

	含量 ^a Concentration (mg/g)					
	芦荟大黄素 Aloe emodin	大黄酸 Rhein	大黄素 Emodin	大黄素甲醚 Physcion	大黄酚 Chrysophanol	总蒽醌 Total (%)
唐古特大黄种子 <i>Rheum tanguticum</i> Maxim. ex Balf. seeds	-	-	0.971	2.867	1.786	0.562
掌叶大黄种子 <i>Rh. palmatum</i> Linn. seeds	-	-	0.855	4.368	0.953	0.618
药用大黄种子 <i>Rh. officinale</i> Baill. seeds	-	-	8.975	0.322	2.020	1.111

3 讨论与结论

3.1 大黄种子蒽醌在实践领域中的应用前景

蒽醌是大黄药材发挥其泻下、抗病源微生物、镇痛抗炎、抗氧抑酶、保肝、利胆、降血脂、抗衰老、调节免疫作用的主要成分^[2-4],在大黄的根茎部含量丰富,但是,由表1可知,三种大黄的种子中也含有大黄素、大黄素甲醚和大黄酚,而且药用大黄种子中大黄素含量较高,唐古特大黄和掌叶大黄种子中大黄素甲醚含量丰富。药典2010年版一部中要求大黄根和根茎的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚总量不得低于1.5%才能入药,部分大黄种子蒽醌含量已经达到了根和根茎的入药要求,但是参照其他研究,发现种子蒽醌的应用前景还是相当广泛。周浓等^[6]曾对栽培掌叶大黄不同部位蒽醌衍生物的含量进行分析,不同部位包括根茎、叶、花序和种子,种子中五种蒽醌都检测到了,但是本实验只检测到三种(大黄素、大黄素甲醚和大黄酚),原因有待于进一步研究。其总蒽醌含量为8.026 mg/g左右,是本实验测得的掌叶大黄种子未去翅时的总蒽醌(35.401 mg/g)的1/3左右。熊辉岩等^[7]曾对唐古特大黄、波叶大黄、穗序大黄的根(及根茎)、叶片、叶柄、主茎四部分的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚4种游离和结合蒽醌的含量进行了测定和比较,并未包括种子蒽醌。李磊等^[8]在对不同产地野生和栽培掌叶大黄蒽醌类含量的比较时发现,甘肃不同产地的栽培掌叶大黄总蒽醌含量在0.17%~0.65%之间波动,四川不同产地的野生掌叶大黄总蒽醌含量在1.78%~3.87%之间波动,本实验得到的结果(0.562%~3.529%)是种子蒽醌含量介于栽培和野生大黄根茎蒽醌含量之间。

大黄素有抗菌、止咳、抗肿瘤、解痉、降压、利尿

的功效^[9],药用大黄种子大黄素含量丰富,以其为主要成分入药的话,可以考虑利用掌叶大黄种子;大黄素甲醚体外抗菌作用显著^[10],唐古特大黄和掌叶大黄种子大黄素甲醚含量丰富,若取其为主要成分入药的话,可以考虑利用唐古特和掌叶大黄种子。

唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄种子的蒽醌总含量高,使该类植物种子具有一定的药用价值。除少量种子被采摘用作育种外,大量的大黄种子资源均未被充分开发利用,造成了极大的资源浪费。上述实验结果表明,大黄种子具有极好的开发利用前景,为进一步研究开发利用大黄种子资源提供了线索和依据。

3.2 结论

本实验结果证明,唐古特大黄种子、掌叶大黄种子 and 药用大黄种子中含有大黄素、大黄素甲醚和大黄酚,且含量丰富。测定方法 HPLC 法稳定、操作简便、成本低,本实验也证明了该方法灵敏、准确,有良好的重复性和稳定性,均符合生物样品测定要求,可用于大黄种子蒽醌含量的测定。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 22.
- 2 Liu SW (刘尚武). Flora Qinghaica. (青海植物志). Xining: Qinghai People's Publishing House, 1997.
- 3 Xiao SP (肖苏萍), Chen M (陈敏), Huang LQ (黄璐琦), et al. Primary study on shapes of fruits and germination characters of seeds of Radix et Rhizoma Rhei. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2007, 32: 195-198.

(下转第69页)