

HPLC 法分析不同年限及不同部位掌叶大黄 9 种成分的积累特征

李欢¹, 黑小斌¹, 李依民^{1*}, 刘志军², 张海英³, 高静¹, 颜永刚¹, 张岗^{1*}

¹陕西中医药大学药学院 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, 西安 712046;

²陇县大兴中药材种植专业合作社; ³陇县市场监管局, 陇县 721200

摘要:为研究不同年限及部位掌叶大黄 9 种成分含量及其变化特征。利用 HPLC 法进行分析, 色谱柱为武本 C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), 流动相为甲醇-磷酸水 (0.2%), 检测波长 260 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。线性范围良好 ($R^2 > 0.995$), 精密度、稳定性、重复性 RSD 均小于 2%, 加样回收率 97.30% ~ 108.20%。含量分析表明: 同一部位, 随着年限增加, 除根中没食子酸、根茎中大黄素、叶片中大黄酚的含量无变化外, 其他 8 成分的含量均随年限增加而增加或者第 4 年增加、第 5 年无显著变化。同一年限, 大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量次序为根 > 根茎 > 叶片; 3 年生芦荟大黄素, 4 年生没食子酸、番泻苷 B 叶片中含量与根中大致相等且高于根茎; 5 年生大黄素-8-*O*-葡萄糖苷的含量次序为叶片 > 根茎 > 根, 根与根茎中没食子酸、大黄酚的含量相当且高于叶片。本实验成功建立简便快捷、重现性好的 HPLC 分析方法, 明确了不同年限及部位掌叶大黄 9 种成分积累特征, 为大黄质量评价和药材高效生产提供理论依据。

关键词:掌叶大黄; 含量测定; 积累特征; 高效液相色谱法; 蒽醌

中图分类号: R932; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)6-0923-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.6.001

Accumulation profile of nine constituents in different years old stage and parts of *Rheum palmatum* L. by HPLC analysis

LI Huan¹, HEI Xiao-bin¹, LI Yi-min^{1*}, LIU Zhi-jun², ZHANG Hai-ying³,
GAO Jing¹, YAN Yong-gang¹, ZHANG Gang^{1*}

¹College of Pharmacy and Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China;

²Daxing Traditional Chinese Medicine Planting Professional Cooperative in Longxian County;

³Market Supervision Bureau of Longxian County, Longxian, 721200, China

Abstract: To analyze the contents and variation rules of 9 components in different years old stage and parts of *Rheum palmatum* L. The HPLC analysis was performed on Woburn C₁₈ chromatographic column (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), the detection wavelength was set at 260 nm, the column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL/min, with the injection volume of 10 μL. The linear range was good ($R^2 > 0.995$), RSDs of precision, stability, and repeatability tests were all low than 2%, and the average recoveries were 97.30% - 108.20%. The contents analysis showed that, in the same part, except for the relative stability of gallic acid in the root, emodin in the rhizome, and chrysophanol in the leaf, the contents of the other components increased year by year or at the 4th year, and showed no significant change at the 5th year. During the same year, the contents of chrysophanol-8-*O*-glucoside, emodin, chrysophanol, physcion ether was in the order of root > rhizome > leaf. Contents of aloe emodin at the 3rd year, gallic acid, and sennoside B at the 4th year in leaves were as much as those in roots. The contents of emodin-8-*O*-glucoside at the 5th year was in the order of leaf > rhizome > root. The contents of gallic acid

收稿日期: 2019-01-09 接受日期: 2019-04-25

基金项目: 2018 年中医药公共卫生服务补助资金第四次全国中药资源普查项目 (财社 [2018] 43 号); 陕西中医药大学新进博士科研启动经费 (104080001); 陕西省高校青年杰出人才支持计划; 咸阳市中青年科技领军人才项目

* 通信作者 Tel: 86-29-38185165; E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com, 2051058@sntcm.edu.cn

and chrysophanol in root and rhizome were the merely equal, however, higher than those in leaves, at the 5 th year. The HPLC analysis method with simple, rapid, and good reproducibility was successfully established, clarifying the different accumulation characteristics of 9 components in different ages and parts of *R. palmatum* L., providing a theoretical basis for its quality evaluation and efficient medicine production.

Key words: *Rheum palmatum* L.; contents determination; accumulation profile; HPLC; anthraquinone

中药大黄为蓼科多年生高大草本植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L., 唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎, 别名将军、黄良等, 性寒、味苦, 泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经^[1], 临床应用广泛。大黄含有蒽醌类、酚类、鞣质、萜苷类及有机酸等成分^[2], 蒽醌类为其主要活性成分, 有抗炎、保肝、调节胃肠道及抗肿瘤等药理作用^[3-5]。《中国药典》(2015年版)规定大黄含量检测指标为芦荟大黄素、大黄素、大黄酸、大黄酚和大黄素甲醚^[1]。

大黄喜冷凉气候, 耐寒, 忌高温, 生于海拔 1 200 ~ 4 000 米山沟或林下, 野生资源有限, 现多栽培于甘肃、青海、四川和陕西等省区。掌叶大黄栽培面积最广, 市场需求量最大, 已在分析方法、成分含量、分子鉴定及资源利用等方面开展一定研究。如通过超声辅助双水相提取佐以高效液相色谱法以及结合响应面优化, 为大黄蒽醌类成分提供了高效、快速、低成本的分方法^[6]。HPLC 分析野生掌叶大黄有效成分含量明显高于栽培品, 光照、湿度为影响含量的主要环境因子^[7]。不同年限大黄含量测定结果表明, 大黄宜选用三年以上生药作为大黄药材来源^[8]。叶绿体 matK 可用于大黄正品与伪品的分子鉴定^[9]。另有研究发现掌叶大黄分根和须根中蒽醌类含量明显高于其他部分^[10,11]。掌叶大黄叶片生药学及相关含量测定研究为叶片资源有效利用奠定基础^[12,13]。但是与掌叶大黄年限以及部位相关的研究仍然较少, 因此, 对不同年限及部位栽培掌叶大黄成分差异积累及药材质量形成规律的探索成为急需解决的科学问题。本实验将 3、4、5 年生掌叶大黄分别分为根、根茎、叶片 3 个部位, 进行 9 种成分的 HPLC 含量检测, 以期对掌叶大黄的品质及资源有效利用提供理论基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪, 包括四元超高压溶剂系统、自动进样恒温样品管理器, Waters 2998 PAD 检测器, Empower 3 色谱工作站 (Waters, USA);

GB204 型电子分析天平 (北京赛多利斯); KQ-200KED 超声波清洗机 (江苏昆山); CZX-9140MBE 电热鼓风干燥箱 (上海博迅)。

1.2 试剂

对照品没食子酸 (批号 122811)、番泻苷 B (11z15) 购自天津西玛科技有限公司; 大黄素 (110795-200505)、大黄酸 (0757-200206)、大黄素甲醚 (110758-200610)、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷 (110796-200615)、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷 (10756-200110) 购自中国食品药品检定研究院。大黄酚 (B2038) 和芦荟大黄素 (B20772) 购自上海源叶生物科技有限公司。色谱甲醇购自上海泰坦科技有限公司。娃哈哈纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 材料

新鲜掌叶大黄全株于 2018 年 11 月采自陇县大兴中药材种植专业合作社大黄种植基地, 北纬 34° 37'27"、东经 106°48'35", 海拔 1 524.3 米; 经陕西中医药大学张岗教授鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.。3 年生 (批号 ZY1501-ZY1509)、4 年生 (ZY1401-ZY1409)、5 年生 (ZY1301-ZY1309) 植株各 9 批, 每批次分别处理为根、根茎、叶片 3 部分, 根和根茎切成薄片, 45 °C 恒温干燥, 备用。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱为武本 C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) 色谱柱; 流动相由甲醇 (A) 和 0.2% 磷酸水 (B) 组成, 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 5% ~ 15% A; 5 ~ 15 min, 15% ~ 30% A; 15 ~ 25 min, 30% ~ 35% A; 25 ~ 31 min, 35% ~ 42% A; 31 ~ 46 min, 42% ~ 53% A; 46 ~ 66 min, 53% ~ 68% A; 66 ~ 75 min, 68% ~ 100% A; 75 ~ 85 min, 100% A), 检测波长 260 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min。进样量为 10 μL。在上述色谱条件下分析, 理论板数按各个成分计算均不低于 5 000, 与相邻组分峰的分度均大于 1.5, 色谱峰对称因子均在 0.95 ~ 1.05。典型样品色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液制备

精密称取没食子酸、番泻苷 B、大黄酚-8-*O*-葡萄

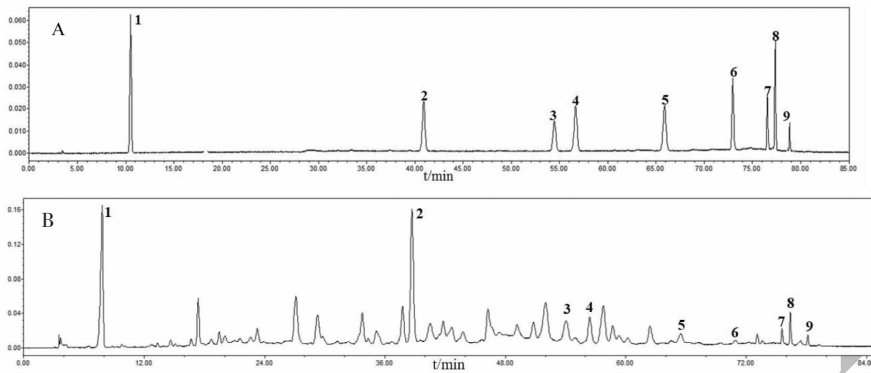


图 1 掌叶大黄中 9 个化学成分标准品 (A) 及样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC profiles of mixed reference substances of nine components (A) and *R. palmatum* L. sample (B)

注:1. 没食子酸;2. 番泻苷 B;3. 大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷;4. 大黄素-8-*O*-葡萄糖苷;
5. 芦荟大黄素;6. 大黄酸;7. 大黄素;8. 大黄酚;9. 大黄素甲醚。

Note:1. gallic acid;2. senna glycoside B;3. chrysophanol-8-*O*-glucoside;4. emodin-8-*O*-glucoside;
5. aloe-emodin;6. rhein;7. emodin;8. chrysophanol;9. physcion.

糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚等对照品适量,分别置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到质量浓度分别为 0.224、0.656、0.172、0.234、0.079、0.077、0.028、0.048、0.027 mg/mL 的各对照品储备液。分别精密量取各对照品储备液 1 mL,置于 10 mL 容量瓶,甲醇补足至刻度,得到相应质量浓度的混合对照品储备液。4 ℃ 保存备用。

2.3 供试品溶液制备

参考文献^[8],取大黄干燥样品,粉碎成细粉(过四号筛),混匀,精密称定 1.000 g,置具塞锥形瓶中,精密吸取 45.0 mL 甲醇,称定质量。超声处理 30 min(功率 500 W,频率 40 kHz),放至室温,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,10 500 rpm 离心 12 min,取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,待测。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

精密吸取“2.2”项下混合对照品储备液 2、4、6、8、10、15、20 μL 测定并记录色谱图。分别以对照品溶液进样量为横坐标(*X*),峰面积为纵坐标(*Y*),绘制标准曲线,结果表明线性关系良好。线性回归方程、线性范围和相关系数(R^2)见表 1。

2.4.2 精密度试验

取“2.2”项下混合对照品溶液,连续进样 6 次,每次进样 10 μL,记录没食子酸、番泻苷 B、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的峰面积积分

值,计算得 RSD 分别为 1.16%、1.58%、0.98%、1.36%、0.75%、1.28%、0.32%、0.88%、0.35%,均小于 2.00%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验

取 3 年生根(ZY1503)供试品溶液,分别于制备后的 0、2、4、8、12、16、24 h 进样 10 μL 测定,记录色谱峰面积,计算其 RSD。没食子酸、番泻苷 B、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 RSD 分别为 1.39%、1.73%、1.43%、1.21%、1.95%、1.85%、1.26%、1.11%、1.16%,均小于 2.00%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验

取 3 年生根(ZY1503)大黄干燥粉末约 1 g,精密称定,共 6 份,按“2.3”项下方法平行制备供试品溶液,分别进样,测定峰面积,计算各成分质量分数。没食子酸、番泻苷 B、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均质量分数的 RSD 分别为 1.81%、1.25%、1.13%、1.88%、1.32%、1.15%、1.08%、1.39%、1.44%,表明方法的重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验

取 3 年生根(ZY1503)大黄干燥粉末约 1 g,精密称定,按“2.3”项下方法平行制备 2 份供试品溶液,一份加入等体积的甲醇,另一份加入等体积已知质量浓度的对照品混合溶液,分别进样,测定峰面积,计算各成分的加样回收率。没食子酸、番泻苷 B、

表1 9种成分的标准曲线和线性范围

Table 1 Regression equations and linear ranges of nine constituents

成分 Contents	回归方程 Regression equation	线性范围 μg Linear range	相关系数 R^2
没食子酸 Gallic acid	$Y = 61\ 645.16X + 1\ 036.27$	0.45 ~ 4.50	0.996
番泻苷 B Senna glycoside B	$Y = 42\ 381.93X - 5\ 464.77$	0.90 ~ 9.00	0.997
大黄酚-8-O-葡萄糖苷 Chrysophanol-8-O-glucoside	$Y = 27\ 686.53X + 10\ 132.35$	0.34 ~ 3.44	0.995
大黄素-8-O-葡萄糖苷 Emodin-8-O-glucoside	$Y = 41\ 194.38X + 9\ 331.15$	0.46 ~ 4.68	0.999
芦荟大黄素 Aloe-emodin	$Y = 42\ 358.49X + 10\ 820.62$	0.16 ~ 1.58	0.998
大黄酸 Rhein	$Y = 37\ 043.21X + 14\ 102.39$	0.15 ~ 1.54	0.997
大黄素 Emodin	$Y = 17\ 087.48X + 2\ 037.81$	0.56 ~ 5.60	0.999
大黄酚 Chrysophanol	$Y = 34\ 973.24X + 4\ 419.23$	0.96 ~ 9.60	0.997
大黄素甲醚 Physcion	$Y = 8\ 334.88X + 3\ 742.81$	0.54 ~ 5.40	0.996

大黄酚-8-O-葡萄糖苷、大黄素-8-O-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均回收率分别为 99.70%、98.10%、97.30%、102.10%、103.60%、99.70%、108.20%、101.40%、100.60%。RSD 分别为 0.58%、1.96%、1.38%、1.74%、0.59%、1.76%、1.46%、0.67%、1.56%，表明方法准确度良好。

2.5 样品定量测定

取各待测掌叶大黄干燥粉末样品约 1 g，精密称定，平行 3 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件进行 9 种化学成分定量分析，测定各成分峰面积，计算各成分在样品中的质量分数。结果见表 2。

表2 大黄样品中 9 种成分质量分数

Table 2 Determination of nine constituents composition in *R. palmatum* L.

部位 Parts	批号 Sample No.	质量分数 Mass fraction (mg/g)								
		没食子酸 Gallic acid	番泻苷 B Senna glycoside B	大黄酚-8-O-葡萄糖苷 Chrysophanol-8-O-glucoside	大黄素-8-O-葡萄糖苷 Emodin-8-O-glucoside	芦荟大黄素 Aloe-emodin	大黄酸 Rhein	大黄素 Emodin	大黄酚 Chrysophanol	大黄素甲醚 Physcion
5 年根 Roots of 5th year	ZY1301	0.060	5.748	3.668	0.838	0.423	0.265	0.278	0.022	1.619
	ZY1302	0.058	4.902	3.818	0.833	0.769	0.248	0.254	0.005	1.435
	ZY1303	0.070	7.682	3.848	1.018	0.265	0.124	0.256	0.009	0.912
	ZY1304	0.060	5.671	2.555	0.777	0.245	0.176	0.263	0.002	0.563
	ZY1305	0.060	7.953	5.277	0.554	0.667	0.111	0.442	0.038	1.890
	ZY1306	0.049	7.758	5.395	0.508	0.522	0.041	0.415	0.037	1.228
	ZY1307	0.078	2.692	1.776	0.930	0.417	0.210	0.342	0.003	0.512
	ZY1308	0.048	8.253	1.789	0.891	0.758	0.100	0.830	0.397	0.344
	ZY1309	0.042	7.227	1.578	0.150	0.719	0.055	0.797	0.376	0.347

续表 2(Continued Tab. 2)

部位 Parts	批号 Sample No.	质量分数 Mass fraction (mg/g)								
		没食子酸 Galic acid	番泻苷 B Senna glycoside B	大黄酚-8-O-葡萄糖苷 Chrysophanol-8-O-glucoside	大黄素-8-O-葡萄糖苷 Emodin-8-O-glucoside	芦荟大黄素 Aloe-emodin	大黄酸 Rhein	大黄素 Emodin	大黄酚 Chrysophanol	大黄素甲醚 Physcion
5 年根茎 Rhizomes of 5th year	ZY1301	0.090	4.747	3.620	1.803	0.439	0.126	0.239	0.175	0.188
	ZY1302	0.095	3.776	3.804	1.250	0.489	0.081	0.236	0.171	0.178
	ZY1303	0.049	5.832	2.916	1.475	0.250	0.088	0.175	0.076	0.113
	ZY1304	0.049	5.336	3.268	1.521	0.192	0.086	0.169	0.070	0.132
	ZY1305	0.064	2.632	2.093	0.761	0.187	0.035	0.130	0.044	0.143
	ZY1306	0.069	2.236	1.609	0.615	0.167	0.107	0.166	0.054	0.153
	ZY1307	0.070	4.379	2.376	1.900	0.238	0.174	0.315	0.099	0.290
	ZY1308	0.041	5.403	6.224	1.044	0.512	0.068	0.371	0.186	0.184
	ZY1309	0.041	4.567	5.807	0.745	0.532	0.061	0.374	0.185	0.178
5 年叶片 Leaves of 5th year	ZY1301	0.075	3.109	0.516	1.964	0.150	0.011	0.005	0.005	0.025
	ZY1302	0.081	2.953	0.507	1.022	0.209	0.022	0.017	0.004	1.434
	ZY1303	0.115	2.106	1.125	2.404	0.251	0.022	0.022	0.008	0.043
	ZY1304	0.073	2.075	1.216	1.280	0.338	0.027	0.024	0.004	0.026
	ZY1305	0.103	2.888	1.448	7.112	0.182	0.045	0.053	0.003	0.029
	ZY1306	0.115	3.127	1.818	4.306	0.425	0.037	0.054	0.006	0.024
	ZY1307	0.099	3.457	0.610	4.644	0.086	0.009	0.011	0.004	0.063
	ZY1308	0.059	4.348	1.055	4.476	0.113	0.023	0.043	0.005	0.026
	ZY1309	0.062	4.495	1.204	3.723	0.189	0.028	0.043	0.006	0.023
4 年根 Roots of 4th year	ZY1401	0.032	3.425	1.229	0.094	0.918	0.166	0.416	0.190	0.313
	ZY1402	0.039	3.207	1.239	0.179	0.759	0.057	0.383	0.173	0.312
	ZY1403	0.087	4.492	1.034	0.123	0.632	0.209	1.248	0.303	0.595
	ZY1404	0.066	4.631	0.992	0.231	0.591	0.187	1.257	0.301	0.578
	ZY1405	0.044	3.497	1.458	0.481	0.542	0.190	0.208	0.054	0.127
	ZY1406	0.052	3.958	1.521	0.112	0.502	0.191	0.765	0.349	0.357
	ZY1407	0.047	3.500	1.224	0.109	0.451	0.162	0.758	0.328	0.335
	ZY1408	0.017	2.833	0.948	0.360	0.586	0.103	0.274	0.065	0.190
	ZY1409	0.028	2.369	0.959	0.372	0.595	0.136	0.290	0.084	0.205
4 年根茎 Rhizomes of 4th year	ZY1401	0.023	0.825	0.671	0.424	0.361	0.084	0.111	0.062	0.109
	ZY1402	0.026	0.681	0.671	0.366	0.338	0.069	0.112	0.061	0.090
	ZY1403	0.058	0.980	0.776	0.766	0.351	0.082	0.743	0.105	0.404
	ZY1404	0.067	0.876	0.604	0.614	0.315	0.169	0.807	0.151	0.483
	ZY1405	0.017	1.098	0.864	0.469	0.280	0.125	0.109	0.014	0.075
	ZY1406	0.034	0.553	0.372	0.456	0.266	0.094	0.544	0.176	0.280
	ZY1407	0.037	0.613	0.379	0.469	0.262	0.055	0.537	0.163	0.281
	ZY1408	0.030	0.793	0.681	0.538	0.158	0.095	0.087	0.009	0.058

续表 2(Continued Tab. 2)

部位 Parts	批号 Sample No.	质量分数 Mass fraction (mg/g)								
		没食子酸 Gallic acid	番泻苷 B Senna glycoside B	大黄酚-8-O-葡萄糖苷 Chrysophanol-8-O-glucoside	大黄素-8-O-葡萄糖苷 Emodin-8-O-glucoside	芦荟大黄素 Aloe-emodin	大黄酸 Rhein	大黄素 Emodin	大黄酚 Chrysophanol	大黄素甲醚 Physcion
4 年叶片 Leaves of 4th year	ZY1409	0.026	0.781	0.690	0.518	0.176	0.117	0.087	0.014	0.073
	ZY1401	0.053	2.810	0.228	0.049	0.060	0.094	0.045	0.003	0.020
	ZY1402	0.054	2.574	0.367	0.037	0.029	0.076	0.045	0.004	0.028
	ZY1403	0.087	3.225	0.858	0.388	0.003	0.114	0.074	0.002	0.010
	ZY1404	0.091	3.292	0.843	0.445	0.008	0.106	0.072	0.003	0.010
	ZY1405	0.055	3.312	0.971	0.474	0.115	0.116	0.015	0.004	0.025
	ZY1406	0.047	3.240	0.981	0.474	0.418	0.159	0.014	0.004	0.025
	ZY1407	0.068	5.698	1.089	0.032	0.311	0.172	0.115	0.014	0.025
3 年根 Roots of 3rd year	ZY1408	0.049	0.258	0.369	0.113	0.277	0.037	0.018	0.002	0.013
	ZY1409	0.056	0.202	0.269	0.113	0.451	0.034	0.018	0.002	0.015
	ZY1501	0.107	1.393	1.176	0.297	0.517	0.107	0.704	0.007	0.482
	ZY1502	0.091	2.099	1.844	0.269	0.406	0.108	0.287	0.005	0.445
	ZY1503	0.188	1.018	1.087	0.348	0.288	0.063	0.466	0.065	0.282
	ZY1504	0.197	1.346	1.050	0.621	0.213	0.064	0.531	0.063	0.314
	ZY1505	0.037	1.888	1.152	0.766	0.100	0.036	0.570	0.074	0.273
	ZY1506	0.056	1.182	1.149	0.225	0.078	0.057	0.189	0.009	0.261
3 年根茎 Rhizomes of 3rd year	ZY1507	0.059	1.114	1.208	0.291	0.072	0.050	0.187	0.005	0.252
	ZY1508	0.090	1.325	1.376	0.749	0.179	0.081	0.079	0.009	0.518
	ZY1509	0.091	1.149	1.429	0.510	0.178	0.089	0.116	0.008	0.529
	ZY1501	0.029	1.460	1.194	0.377	0.294	0.063	0.452	0.005	0.880
	ZY1502	0.022	1.527	1.408	0.462	0.153	0.079	0.450	0.005	0.874
	ZY1503	0.059	0.649	1.642	0.745	0.045	0.018	0.208	0.006	0.161
	ZY1504	0.065	0.587	0.550	0.461	0.057	0.037	0.215	0.006	0.155
	ZY1505	0.023	0.991	0.879	0.829	0.105	0.055	0.102	0.002	0.206
3 年叶片 Leaves of 3rd year	ZY1506	0.032	0.880	0.906	0.751	0.137	0.089	0.110	0.002	0.195
	ZY1507	0.048	0.882	0.830	0.282	0.075	0.045	0.246	0.003	0.243
	ZY1508	0.044	1.726	2.433	0.721	0.042	0.046	0.631	0.003	0.426
	ZY1509	0.045	1.473	0.965	0.668	0.098	0.037	0.600	0.003	0.406
	ZY1501	0.028	0.321	1.046	0.142	0.135	0.131	0.029	0.002	0.017
	ZY1502	0.038	0.303	0.931	0.127	0.126	0.109	0.030	0.002	0.012
	ZY1503	0.053	0.389	1.064	0.740	0.099	0.022	0.039	0.003	0.028
	ZY1504	0.042	0.200	0.874	0.782	0.234	0.070	0.029	0.003	0.0288
ZY1505	0.032	0.236	1.071	0.886	0.294	0.063	0.037	0.006	0.033	
ZY1506	0.042	0.112	0.158	0.732	0.122	0.017	0.007	0.005	0.008	
ZY1507	0.035	0.097	0.151	0.778	0.168	0.033	0.010	0.003	0.018	
ZY1508	0.066	0.728	0.242	1.574	0.031	0.157	0.052	0.004	0.023	
ZY1509	0.069	0.753	0.148	1.208	0.065	0.178	0.053	0.003	0.030	

含量测定结果表明,大黄 9 种主要成分在所有待测样品中均能检出,每一样品类型中各成分含量变化不大,同一部位不同年限或同一年限不同部位大黄样品中各成分含量存在差异。利用 SPSS 对不同年限和不同部位大黄样品各成分含量进行单因素方差分析和多重比较,结果见表 3、表 4。

同一部位样品在不同年限间的含量呈现动态积累(表 3)。根中除没食子酸的含量相对稳定外,其他 8 种成分的含量均随年限增加而增加两倍左右或者 4 年含量增加两倍左右($P < 0.05$)、5 年变化不显著;根茎中除了大黄素的含量相对稳定外,其他 8 种成分的含量均随年限增加而增加或者仅第 4 年增加($P < 0.05$);叶片中大黄酚的含量无显著差异,没食子酸、番泻苷 B、大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、芦荟大黄素的含量随年限增加而增加($P < 0.05$),而大黄酸和大黄素的含量 4 年最高($P < 0.05$)、5 年与 3 年相当。

表 4 为同一年限不同部位各成分含量积累变化情况。3 年生掌叶大黄没食子酸、番泻苷 B、大黄酚-

8-*O*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的含量次序为根 > 根茎 > 叶片($P < 0.05$);大黄酚的含量根中最高,根茎与叶片无显著差异且为根的 1/10;芦荟大黄素叶片含量与根中相当且均高于根茎($P < 0.05$);大黄酸、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷的含量在不同部位中无显著差异。4 年生大黄根与叶片中没食子酸、番泻苷 B 的积累量相当且均高于根茎($P < 0.05$);芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量次序为根 > 根茎 > 叶片($P < 0.05$),其中根中大黄酚含量为叶片中的 42 倍左右,大黄素和大黄素甲醚为叶片中 10 倍;根中大黄酚-8-*O*-葡萄糖苷、大黄酸的含量最高,根茎及叶片中的含量相当($P < 0.05$);根茎中大黄素-8-*O*-葡萄糖苷含量高,叶片与根相当。5 年生大黄中大黄素-8-*O*-葡萄糖苷的含量次序为叶片 > 根茎 > 根($P < 0.05$);叶片中没食子酸含量最高,根与根茎中的含量相当且高于叶片;根与根茎中大黄酚含量相当且高于叶片;其他各成分含量次序均为根 > 根茎 > 叶片($P < 0.05$)。

表 3 同一部位不同年限掌叶大黄样品中 9 种成分含量的比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of nine components' contents of the same part of *R. palmatum* L. from different growth years ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

部位 Parts	年限 Years	质量分数 Mass fraction(mg/g)								
		没食子酸 Galic acid	番泻苷 B Senna glycoside B	大黄酚-8- <i>O</i> -葡萄糖苷 Chrysophanol-8- <i>O</i> -glucoside	大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷 Emodin-8- <i>O</i> -glucoside	芦荟大黄素 Aloe-emodin	大黄酸 Rhein	大黄素 Emodin	大黄酚 Chrysophanol	大黄素甲醚 Physcion
根 Roots	3	0.067 ± 0.012a	1.314 ± 0.110c	1.136 ± 0.178b	0.366 ± 0.095b	0.206 ± 0.067b	0.077 ± 0.011b	0.292 ± 0.088a	0.023 ± 0.015b	0.371 ± 0.053b
	4	0.065 ± 0.007b	3.210 ± 0.495b	1.244 ± 0.071b	0.257 ± 0.086c	0.549 ± 0.053a	0.152 ± 0.020a	0.662 ± 0.193a	0.219 ± 0.051a	0.310 ± 0.079b
	5	0.062 ± 0.007b	6.000 ± 1.008a	4.626 ± 1.250a	0.929 ± 0.259a	0.489 ± 0.098a	0.154 ± 0.036a	0.423 ± 0.103a	0.092 ± 0.074b	0.939 ± 0.254a
根茎 Rhizomes	3	0.045 ± 0.006b	1.004 ± 0.163b	1.080 ± 0.176b	0.549 ± 0.098b	0.084 ± 0.012b	0.047 ± 0.007b	0.259 ± 0.101a	0.003 ± 0.001b	0.223 ± 0.053a
	4	0.030 ± 0.005b	0.846 ± 0.092b	0.711 ± 0.102b	0.459 ± 0.022b	0.247 ± 0.036a	0.102 ± 0.012a	0.241 ± 0.089a	0.078 ± 0.031a	0.117 ± 0.041b
	5	0.064 ± 0.009a	4.239 ± 0.535a	3.411 ± 0.723a	1.254 ± 0.194a	0.340 ± 0.067a	0.103 ± 0.022a	0.250 ± 0.043a	0.116 ± 0.027a	0.185 ± 0.028b
叶片 Leaves	3	0.031 ± 0.005c	0.446 ± 0.198b	0.691 ± 0.165b	0.663 ± 0.133b	0.169 ± 0.025a	0.054 ± 0.019a	0.018 ± 0.006a	0.003 ± 0.000a	0.025 ± 0.005b
	4	0.062 ± 0.007b	2.489 ± 0.575a	0.710 ± 0.169b	0.215 ± 0.096b	0.179 ± 0.067a	0.116 ± 0.029a	0.052 ± 0.018a	0.005 ± 0.002a	0.019 ± 0.003b
	5	0.088 ± 0.008a	3.199 ± 0.377a	1.024 ± 0.199a	3.488 ± 0.795a	0.209 ± 0.038a	0.025 ± 0.005b	0.028 ± 0.008a	0.004 ± 0.000a	0.180 ± 0.138a

注:同一因素不同处理间不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

Note: Different lower case letters represent significant differences among the different treatments under the same factor at the 0.05 level; the same as follow.

表4 同一年限不同部位大黄样品9种成分含量的比较($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of nine components' contents of the same growth year of *R. palmatum* L. from different parts ($n=10, \bar{x} \pm s$)

年限 Years	部位 Parts	质量分数 Mass fraction(mg/g)								
		没食子酸 Galic acid	番泻苷 B Senna glycoside B	大黄酚-8-O-葡萄糖苷 Chrysophanol-8-O-glucoside	大黄素-8-O-葡萄糖苷 Emodin-8-O-glucoside	芦荟大黄素 Aloe-emodin	大黄酸 Rhein	大黄素 Emodin	大黄酚 Chrysophanol	大黄素甲醚 Physcion
3	根 Roots	0.068 ± 0.012a	1.314 ± 0.110a	1.136 ± 0.178a	0.366 ± 0.095a	0.206 ± 0.067a	0.077 ± 0.011a	0.292 ± 0.088a	0.023 ± 0.015a	0.371 ± 0.053a
	根茎 Rhizomes	0.045 ± 0.006b	1.004 ± 0.163a	1.080 ± 0.176a	0.549 ± 0.098a	0.084 ± 0.012b	0.047 ± 0.007a	0.259 ± 0.101a	0.003 ± 0.001b	0.223 ± 0.053a
	叶片 Leaves	0.031 ± 0.005b	0.446 ± 0.198b	0.691 ± 0.165b	0.663 ± 0.133a	0.169 ± 0.025a	0.054 ± 0.016a	0.018 ± 0.006b	0.003 ± 0.000b	0.025 ± 0.005b
4	根 Roots	0.065 ± 0.007a	3.210 ± 0.495a	1.244 ± 0.071a	0.257 ± 0.086b	0.549 ± 0.053a	0.152 ± 0.020a	0.662 ± 0.193a	0.219 ± 0.051a	0.310 ± 0.079a
	根茎 Rhizomes	0.030 ± 0.005b	0.846 ± 0.092b	0.711 ± 0.102b	0.459 ± 0.022a	0.247 ± 0.036b	0.102 ± 0.012b	0.241 ± 0.089b	0.078 ± 0.031b	0.118 ± 0.041b
	叶片 Leaves	0.062 ± 0.007a	2.489 ± 0.575a	0.710 ± 0.169b	0.215 ± 0.095b	0.180 ± 0.067b	0.116 ± 0.029b	0.052 ± 0.018c	0.005 ± 0.002c	0.019 ± 0.003c
5	根 Roots	0.062 ± 0.007a	6.000 ± 1.008a	4.626 ± 1.250a	0.929 ± 0.259b	0.489 ± 0.098a	0.154 ± 0.036a	0.423 ± 0.103a	0.092 ± 0.074a	0.939 ± 0.254a
	根茎 Rhizomes	0.064 ± 0.009a	4.239 ± 0.535b	3.411 ± 0.723a	1.254 ± 0.194b	0.340 ± 0.067b	0.103 ± 0.022b	0.250 ± 0.043b	0.116 ± 0.027a	0.185 ± 0.028b
	叶片 Leaves	0.088 ± 0.008b	3.199 ± 0.377c	1.024 ± 0.199b	3.488 ± 0.795a	0.210 ± 0.038b	0.025 ± 0.005c	0.028 ± 0.008c	0.004 ± 0.000b	0.180 ± 0.138b

3 讨论

HPLC 作为中药质量控制与评价最常用分析手段,被广泛运用于中药材含量分析和指纹图谱研究等。其核心部分为指标性有效成分筛选,从而合理进行中药质量评价。HPLC 已在大黄成分含量测定、指纹图谱、道地性及资源化学研究方面广泛应用。本研究在前期建立方法^[8]基础上选择没食子酸、番泻苷 B、大黄酚-8-O-葡萄糖苷、大黄素-8-O-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚 9 种成分;将流动相醋酸水更换为磷酸水,相较之下,磷酸水作为缓冲盐酸性更强,对紫外的响应值更低且为不挥发性酸,能够很好地维持流动相的 pH 值;改良分析体系具有更好分离效果,其精密度高、准确度好、稳定性强。各批样品中 9 种成分均能被检测到,保证了大黄质量评价的客观性和真实性。

中药材质量由种质与环境共同作用,选择合适的种源与产地是保证中药材质量的首要环节。研究显示四川地区种植环境可能有利于掌叶大黄游离蒽醌类成分的积累,而甘肃种植环境可能有利于结合蒽醌类、酚酸类和二蒽酮苷类成分的积累^[7]。掌叶大黄根、根茎、须根、叶片、种子等不同部位蒽醌类衍

生物含量差异较大,游离蒽醌总量地下部分远高于地上部分而结合蒽醌总量与之相反,蒽醌总量地下部分略高于地上部分^[10]。此外,不同年限大黄有效成分含量分析表明大黄种植不低于三年^[8,14]。基于此,为深入探究掌叶大黄质量形成的本质,本研究将 3、4、5 年生掌叶大黄分别分为根、根茎、叶片 3 个部位进行有效成分含量差异比较;结果发现,9 种成分中番泻苷 B 的含量最高,大黄酚-8-O-葡萄糖苷次之,大黄酚含量最低;除没食子酸外,大多数成分的含量随年限增加而增加,但含量差异不尽相同,同一年限大黄根及根茎各成分含量高于叶片,且叶片中结合型蒽醌含量高,这与已有地上部分含量检测结果一致^[10,13],据此推断该基地有利于掌叶大黄二蒽酮苷类以及叶片中结合型蒽醌的积累。

除根及根茎入药外,大黄叶片、叶柄等也含有大量活性成分,占大黄总资源的 50% 左右,被视为资源开发的良好原料^[15]。有研究表明掌叶大黄叶片中大黄素含量大致为根中的 5 倍,叶柄、叶片中还含有一定量的纤维素、可溶性多糖类及人体所需微量元素等^[2,11]。也有研究对掌叶大黄叶片成分进行检测将其开发为减肥剂和治疗褥疮的制剂^[16]。本研

究结果表明3年生掌叶大黄叶片中大黄素-8-O-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸都与根中相当或者较高。4、5年生掌叶大黄叶片中没食子酸、大黄素-8-O-葡萄糖苷的含量与根中相当或较高,说明该基地产掌叶大黄叶片具有一定的开发价值。

中药材发挥功效的物质基础为其主要有效成分,然而药用部位有效成分积累的生物学本质尚不清楚。本研究选用掌叶大黄生药揭示其9种有效成分在不同部位中差异积累,根、根茎中各成分含量高、叶片中含量较低,与药典规定一致,符合大黄根及根茎为入药部位的认识。掌叶大黄含量测定表明地上部位较规定用药部位结合型蒽醌含量较高,但游离型蒽醌达不到药典规定标准,大黄如何通过生理代谢合成并转运有效成分至药用部位贮藏,将是亟待解决的基础科学问题。课题组在本文工作基础上,进行了大黄转录组学基因表达研究,初步揭示了大黄蒽醌类成分生物合成途径基因表达谱特征^[17],有助于理解掌叶大黄品质形成机理,为高品质道地掌叶大黄的定向培育、质量控制及高效生产提供支撑。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2015.
- 2 Zheng JH, Guo DA. Modern research on Rhubarb[M]. Peking Univ Med Press(北京大学医学出版社),2007.
- 3 Wei WT, Chen H, Ni ZL, et al. Antitumor and apoptosis-promoting properties of emodin, an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill., against pancreatic cancer in mice via inhibition of Akt activation[J]. Int J of Oncol, 2011, 39:1381-1390.
- 4 Tan LS, Zhao HP, Zhao YL, et al. Protection and bidirectional effect of Rhubarb anthraquinone and tannins for rats' livers[J]. Chin J Integr Tradit West Med(中国中西医结合杂志),2014, 34:698-703.
- 5 Jun KO, Kil CB, Young LJ, et al. Protective effect of Rhei Rhizoma on reflux esophagitis in rats via Nrf2-mediated inhibition of NF- κ B signaling pathway[J]. BMC Complem Altern M,2016, 16:1-7.
- 6 Yao Q, Zhao MJ, Zhang L, et al. Ultrasonic-assisted aqueous

- 7 Meng L, Hu HJ, Shang T, et al. Genotype, environment and their interactions of functional components in *Rheum palmatum*[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志),2018, 43:2495-2502.
- 8 Yan YG, Wang HY, Deng C, et al. Effects of growth years, altitude, and light factors on contents of eight components in *Rheum officinale*[J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药), 2017, 48:2285-2291.
- 9 Zhang XQ, Liu CS, Yan XL, et al. Sequence analysis and identification of a chloroplast matK gene in Rhei Rhizoma from different botanical origins[J]. Acta Pharm Sin(药学学报),2013, 48:1722-1728.
- 10 Zhou N, Wang GZ, Liu WY. Content analysis of anthraquinones from different medicinal parts of cultivated *Rheum palmatum* L.[J]. Tradit Chin Drug Res Pharmacol(中药新药与临床药理),2012, 23:670-675.
- 11 Liu J, Liu P, Guo S, et al. Main components analysis in different parts of *Rheum palmatum*[J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药),2017, 48:567-572.
- 12 Zhou N, Wang GZ, Liu ZM. Pharmacognostical study on leaf of *Rheum palmatum*[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2013, 24:148-150.
- 13 Tan YZ. Study on the development and utilization of the aboveground parts of Rhubarb[D]. Chengdu:Chengdu University of TCM(成都中医药大学),2012.
- 14 Jing Y. Evaluation on quality of Rhubarb seeds and herbs[D]. Chengdu:Chengdu University of TCM(成都中医药大学),2013.
- 15 Chen YY, Tang YP, Chen JQ, et al. Research progress and utilization strategy on resource chemistry of Rhei Radix et Rhizoma[J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药),2018, 49:5170-5178.
- 16 Huang J, Liu WG, Fan WJ, et al. Developing and utilizing the leaf of *Rheum palmatum* L. [J]. Res Dev Mar(资源开发与市场),2004, 20:271-272.
- 17 Li H, Zhang N, Li YM, et al. High-throughput transcriptomic sequencing of *Rheum palmatum* L. seedlings and elucidation of genes in anthraquinone biosynthesis[J]. Acta Pharm Sin(药学学报),2018, 53:1908-1917.