

HPLC法比较狼毒大戟 不同产地游离蒽醌和总蒽醌的质量分数^①

杨勤^{1,2}, 杨德全¹

1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; 2. 重庆市抗肿瘤天然药物工程技术研究中心, 重庆 404120

摘要: 建立了同时测定狼毒大戟中芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄酸和大黄素甲醚5种蒽醌类成分的HPLC法。采用Venusil MP C₁₈(2)柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 以甲醇-0.2%磷酸溶液(79:21)为流动相, 流速1.0 mL/min, 检测波长254 nm, 柱温30 ℃。测定了16批狼毒大戟根和地上部分中5种蒽醌类成分的质量分数, 结果表明, 在线性范围内的线性关系($r > 0.9993$)及分离度($R > 1.5$)均良好; 游离蒽醌平均回收率为96.59%~99.13%, RSD≤1.36%; 总蒽醌平均回收率为97.60%~99.46%, RSD≤1.52%。16批狼毒大戟样品中5种蒽醌类成分均可检测到, 不同产地、不同部位的狼毒大戟中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚量及组成结构比存在较大差异; 由聚类分析可知, 同一产地、不同居群狼毒大戟根的总蒽醌质量分数并没有聚集在一枝上; 同时根的总蒽醌质量分数高于地上部分, 云南省香格里拉市格咱乡除外。由此表明, 这不仅能比较云南产狼毒大戟不同产地、不同部位中游离蒽醌和总蒽醌的质量分数及组成的差异性, 为其药材质量评价和资源合理利用提供科学依据; 也为狼毒大戟地上部分的综合利用提供了理论依据。

关键词: 狼毒大戟; 游离蒽醌; 总蒽醌; 质量分数测定; 聚类分析; 根; 地上部分; 高效液相色谱

中图分类号: S567

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2019)02-0041-08

狼毒大戟为大戟科植物狼毒大戟(*Euphorbia fischeriana* Steud.)的干燥根, 被《中华人民共和国药典》(2015年版)记载为中药狼毒的原植物之一, 具有散结、杀虫之功效, 临床上常用于治疗肿瘤患者、结核病、慢性支气管炎、皮肤病、乳腺增生和癫痫等, 为单味制剂结核灵片的原料药^[1-3]。现代生物活性研究表明, 狼毒大戟具有抗肿瘤、抗结核杆菌、抗白血病、细胞毒、免疫调节等生物活性^[3-5]。

现行版《中华人民共和国药典》以狼毒大戟中醇溶性浸出物(稀乙醇)的质量分数来控制狼毒药材的质量, 规定其质量分数不得少于18.0%, 但未明确特征性活性成分的鉴别和质量分数测定^[1]。据文献报道, 狼毒大戟含有萜类、苯乙酮类、鞣质、酚酸类、黄酮类、蒽醌类等化合物^[3-6]。而蒽醌类化合物是一类重要的次生代谢产物, 具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒等多种生物活性, 是一类潜在抗肿瘤分子^[7-10], 与狼毒大戟的生物活性具有一定的关联性, 可作为狼毒药材的质量评价指标之一。目前未见狼毒大戟中5种蒽醌类化合物质量分数的同时测定报道。为此, 本实验采用HPLC法同时测定云南省不同产地、不同部位狼毒大戟中5种蒽醌类物质的质量分数, 以期全面客观地认识狼毒药材物质基础、丰富和发展狼毒药材多指标评

① 收稿日期: 2018-01-01

基金项目: 重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ1602503)。

作者简介: 杨勤(1980), 女, 副教授, 硕士, 主要从事中药抗肿瘤的研究。

通信作者: 杨德全, 教授。

价体系研究提供科学的依据.

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

日本岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪; 宁波新芝 SB-5200DTN 型超声波清洗机; 德国赛多利斯 CP225D 型分析天平.

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110795-201609, 110757-201607, 110756-201512, 110796-201621, 110758-201616); 德国默克产色谱纯甲醇, 水为娃哈哈牌纯净水, 甲醇、盐酸均为分析纯.

狼毒大戟于 2016 年 10 月采自云南省香格里拉市小中甸等地, 经大理大学药学与化学学院张德全副教授鉴定为大戟科植物狼毒大戟(*Euphorbia fischeriana* Steud.) 的干燥根(表 1), 留样凭证存放于重庆市抗肿瘤天然药物工程技术研究中心.

表 1 样品来源

No.	采集地点	生境	经纬度	海拔	采集日期
S1	云南省香格里拉市小中甸	灌丛	25°40'743"/100°09'228"	3 085 m	2016-10-13
S2	云南省香格里拉市格咱乡	草地	27°53'614"/099°43'672"	3 332 m	2016-10-13
S3	云南省香格里拉市格咱乡	灌丛	27°53'820"/099°43'601"	3 110 m	2016-10-13
S4	云南省香格里拉市纳帕海 214 国道旁	草地	27°53'526"/099°39'122"	3 255 m	2016-10-13
S5	云南省香格里拉市普达措	草地	27°49'056"/099°47'655"	3 369 m	2016-10-13

1.2 色谱条件与系统适用性实验

色谱柱为 Venusil MP C₁₈(2) 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2% 磷酸溶液(79:21); 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 30 °C.

1.3 溶液制备

1.3.1 对照品溶液制备

分别精密称取减压干燥至恒质量的芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得各对照品储备液质量浓度分别为芦荟大黄素 600 μg/mL, 大黄酸 500 μg/mL, 大黄素 200 μg/mL, 大黄酚 400 μg/mL, 大黄素甲醚 500 μg/mL. 分别量取上述对照品储备液适量, 逐级稀释, 加甲醇制成每 1 mL 各含 60, 50, 20, 40, 25 μg 的混合溶液(I). 分别量取上述对照品储备液适量, 并逐级稀释, 加甲醇制成每 1 mL 各含 4, 5, 2, 0.4, 0.5 μg 的混合溶液(II).

1.3.2 供试品溶液制备

游离蒽醌供试品溶液: 取狼毒大戟粉末(过 3 号筛)约 2.0 g, 精密称定, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇 60 mL, 室温浸泡 2 h, 密塞, 超声 45 min, 滤过, 减压回收溶剂至干, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL, 即得.

总蒽醌供试品溶液: 取狼毒大戟粉末(过 3 号筛)约 2.0 g, 精密称定, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇-盐酸(10:0.4)60 mL, 室温浸泡 2 h, 密塞, 超声 45 min, 滤过, 减压回收溶剂至干, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL, 即得.

1.4 标准曲线的制备

分别精密吸取 1.3.1 项下混合溶液(I)1, 2, 5, 10, 15, 20 μL 和混合溶液(II)1, 2, 5, 10, 15, 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以各对照品的峰面积(y)与其相应的对照品质量浓度(x)进行线性回归, 得回归方程、相关系数和线性范围.

1.5 精密度实验

分别取 1.3.1 项下混合溶液(I), 按 1.2 项下的条件连续进样 6 次. 通过各对照品所得的峰面积来计

算RSD,以此考察仪器的精密度.

1.6 重复性实验

取S4-4(根)号样品,依1.3.2项下方法平行制备供试品溶液各6份,依1.2项下条件进行测定与分析.记录各对照品的峰面积并计算其RSD,以此来考察本实验方法的重复性.

1.7 稳定性实验

取S4-4(根)号样品,依1.3.2项下方法制备供试品溶液各1份,室温条件下密闭放置,分别在0,4,8,12,16,24 h依1.2项下条件进行测定与分析,用于考察样品的稳定情况.

1.8 加样回收率实验

精密称取已知质量分数的S4-4(根)号样品约1.0 g,共12份,分别依次精密量取1.3.1项下芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚对照品储备液适量,依1.3.2项下方法平行制备供试品溶液各6份,依1.2项下条件进行测定与分析,计算各成分的加样回收率和RSD,并验证本方法的准确性.

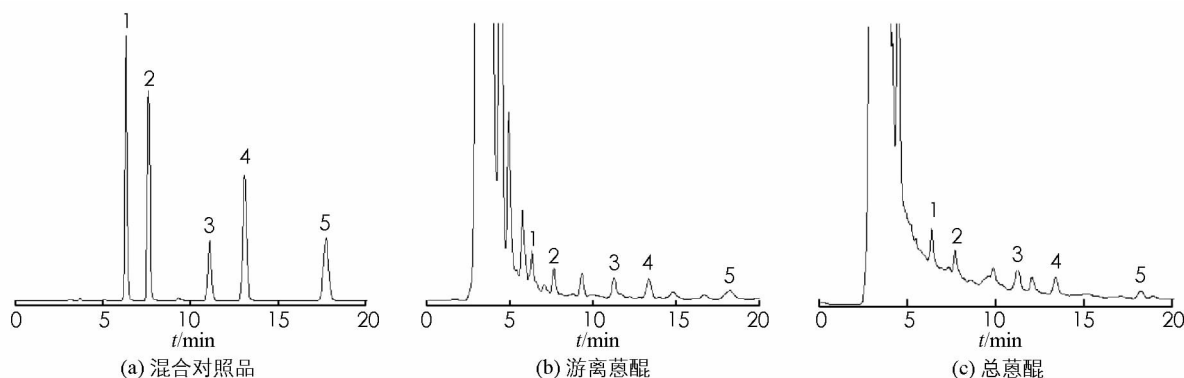
1.9 样品质量分数测定

取16份不同产地、不同部位的狼毒大戟,按1.3.2项下方法制备供试品溶液,平行3份,按1.2项下条件进行测定,测定狼毒大戟中5种蒽醌类化合物的质量分数.

2 结果与分析

2.1 对照品和供试品色谱分离图

按照1.2项下色谱条件进行分析,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚能在18 min内分析完毕,峰形较好,并与其他化合物分离完全($R>1.5$),理论塔板数按大黄素甲醚峰计算不低于5 000,说明此色谱条件具有可行性,结果见图1.



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

图1 混合对照品及S4-4号(根)狼毒大戟样品的HPLC图谱

2.2 线性回归方程

5种蒽醌类成分的线性回归方程、相关系数、线性范围结果见表2.

表2 对照品的线性关系和范围

成分	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
芦荟大黄素	$y=70081x+1321.3$	0.999 9	0.20~60.00
大黄酸	$y=78880x-3629.3$	0.999 8	0.25~50.00
大黄素	$y=72861x-1838.7$	0.999 9	0.10~20.00
大黄酚	$y=83613x-2634$	0.999 7	0.02~40.00
大黄素甲醚	$y=44901x-2566.1$	0.999 3	0.05~25.00

2.3 精密度实验

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的RSD分别为0.22%,0.23%,0.23%,0.26%,0.26%,证明本方法精密度良好.

2.4 重复性实验

游离蒽醌中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的 *RSD* 分别为 2.06%, 2.33%, 2.25%, 2.50%, 1.65%, 总蒽醌中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的 *RSD* 分别为 2.71%, 2.06%, 2.22%, 2.31%, 2.69%, 证明该样品制备方法的重复性良好。

2.5 稳定性实验

游离蒽醌中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的 *RSD* 分别为 2.75%, 2.13%, 1.76%, 1.50%, 1.38%, 总蒽醌中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的 *RSD* 分别为 2.63%, 1.41%, 2.85%, 2.24%, 1.30%, 证明该供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 加样回收率实验

由表 3、表 4 可知, 狼毒大戟 S4-4(根) 中 5 种游离蒽醌的平均回收率在 96.59%~99.13%, *RSD* 0.80%~1.36%, 符合分析要求; 狼毒大戟 S4-4(根) 中 5 种总蒽醌的平均回收率在 97.60%~99.46%, *RSD* 0.72%~1.52%, 符合分析要求. 表明上述实验方法的准确度较高, 能应用于狼毒大戟中游离蒽醌和总蒽醌的检测与分析.

表 3 狼毒大戟中 5 种游离蒽醌的加样回收率实验 ($n=6$)

化合物	加入量/ μg	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
芦荟大黄素	4.00	97.53	1.31
大黄酸	3.00	96.59	0.80
大黄素	3.00	96.99	0.89
大黄酚	2.00	97.53	1.36
大黄素甲醚	30.00	99.13	1.32

表 4 狼毒大戟中 5 种总蒽醌的加样回收率实验 ($n=6$)

化合物	加入量/ μg	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
芦荟大黄素	13.12	97.90	1.52
大黄酸	180.00	99.46	0.72
大黄素	30.00	97.60	0.78
大黄酚	6.00	98.60	0.82
大黄素甲醚	50.00	97.88	0.95

2.7 样品质量分数测定

用标准曲线法计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚的质量分数, 结果见表 5.

表 5 不同产地、不同部位狼毒大戟药材中 5 种蒽醌类的质量分数 ($n=3$) / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

No. 居群	部位	化合物					游离蒽醌总量	结合蒽醌总量	总蒽醌
		芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚			
1	根	0.022 3±0.000 7f	0.053 5±0.001 7f	0.013 5±0.000 4fg	0.004 9±0.000 1d	0.009 6±0.000 7ghi	0.103 9b	0.073 2ghijk	0.177 1de
		0.030 5±0.001 9e	0.080 9±0.007 1de	0.014 8±0.000 5efg	0.027 1±0.009 1c	0.023 8±0.006 1cdef			
	地上部分	0.029 2±0.004 4jkl	0.016 3±0.004 0ijk	0.001 8±0.000 2bcd	0.003 4±0.000 0bdef	0.013 5±0.007 5def	0.064 1e	0.019 3kl	0.083 4ghi
SI 2	根	0.005 1±0.000 1k	0.016 3±0.000 2ghi	0.005 1±0.000 5hijk	0.003 8±0.000 1d	0.002 9±0.000 2i	0.033 2ghijk	0.0725ghijk	0.105 7fg
		0.011 5±0.001 0ghi	0.055 0±0.004 2f	0.016 7±0.000 4ef	0.008 6±0.002 4d	0.013 9±0.000 2fghi			
	地上部分	0.003 8±0.000 2m	0.002 4±0.000 1o	0.002 3±0.000 1bcd	0.000 5±0.000 1g	0.001 5±0.000 7f	0.010 5n	0.078 6ghij	0.089 1gh
平均值	根	0.013 7	0.034 9	0.009 3	0.004 3	0.006 3	0.068 6	0.072 9	0.141 4
		0.021 0	0.068 0	0.015 7	0.017 9	0.018 8			
	地上部分	0.016 5	0.009 3	0.002 0	0.002 0	0.007 5	0.044 1	0.049 0	0.086 3
	部分	0.048 9	0.010 4	0.005 4	0.004 2	0.017 4			

续表 5 不同产地、不同部位狼毒大戟药材中 5 种蒽醌类的质量分数 ($n=3$)/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

No.	居群	部位	化合物					游离蒽醌总量	结合蒽醌总量	总蒽醌
			芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚			
S2	1	根	0.049 0±0.001 0c	0.062 1±0.004 6ef	0.010 4±0.001 1fghij	0.002 9±0.000 2d	0.000 5±0.000 1i	0.125 0a	0.085 4fghi	0.210 4cd
			0.058 4±0.003 1b	0.084 1±0.004 7de	0.012 2±0.000 3fgh	0.033 0±0.006 7c	0.022 8±0.009 3cdef			
		地上部分	0.072 3±0.000 0cde	0.008 2±0.000 3klmno	0.001 3±0.000 4cd	0.001 0±0.000 5efg	0.006 7±0.002 3ef	0.089 6c		
			0.114 1±0.020 7b	0.108 2±0.003 3b	0.001 9±0.000 3bcd	0.001 9±0.000 2cdefg	0.028 9±0.010 6ab	0.165 4cd		
	2	根	0.006 1±0.000 4jk	0.096 2±0.015 6cd	0.009 8±0.000 8fghijk	0.002 1±0.000 1d	0.002 8±0.000 4i	0.116 9a	0.129 6def	0.246 5bc
			0.029 0±0.000 9e	0.094 7±0.001 7cd	0.012 3±0.000 5fgh	0.058 7±0.019 6b	0.051 9±0.012 8b			
		地上部分	0.001 7±0.000 1m	0.012 2±0.000 1jklmn	0.001 1±0.000 1cd	0.000 4±0.000 3g	0.000 7±0.000 2f	0.016 2mn		
			0.051 4±0.001 4fgh	0.015 7±0.000 3ijkl	0.002 3±0.000 2bcd	0.001 0±0.000 1efg	0.007 3±0.001 2def	0.061 4hijkl		
	3	根	0.003 9±0.000 6k	0.052 2±0.006 9f	0.002 2±0.000 1jk	0.003 8±0.000 0d	0.001 5±0.000 5i	0.063 6e	0.150 7de	0.214 3cd
			0.064 0±0.001 1a	0.060 2±0.005 6ef	0.009 4±0.001 1fghijk	0.056 2±0.016 0b	0.024 5±0.004 2cdef			
		地上部分	0.039 3±0.002 5hij	0.005 9±0.001 2mno	0.001 2±0.000 1cd	0.001 4±0.000 3defg	0.001 9±0.000 2f	0.049 7f		
			0.066 7±0.010 2def	0.069 0±0.009 0d	0.001 9±0.000 4bcd	0.004 2±0.000 7bc	0.016 3±0.011 5cde	0.1083efgh		
4	根	0.020 0±0.000 3f	0.006 4±0.001 2hi	0.004 3±0.000 9hijk	0.009 3±0.000 3d	0.007 0±0.001 1hi	0.046 9fg	0.131 4def	0.178 3de	
		0.064 2±0.001 6a	0.018 8±0.000 3ghi	0.008 2±0.000 5ghijk	0.059 4±0.007 8b	0.027 8±0.005 3cde				
	地上部分	0.018 5±0.002 2klm	0.007 0±0.000 0lmno	0.001 6±0.000 1bcd	0.001 6±0.000 0defg	0.000 4±0.000 1f	0.029 2ijklm			
		0.040 6±0.003 0hij	0.010 8±0.000 4jklmno	0.002 1±0.000 2bcd	0.001 9±0.000 2cdefg	0.001 4±0.000 8f	0.027 6ijkl			
平均值	根	0.019 7	0.054 2	0.006 7	0.004 5	0.003 0	0.088 1	0.124 3	0.212 4	
		0.053 9	0.064 4	0.010 5	0.051 8	0.031 7				
	地上部分	0.030 5	0.008 5	0.001 3	0.001 1	0.002 2	0.046 2			
		0.057 6	0.041 7	0.001 8	0.001 9	0.012 2	0.091 4			
S3	1	根	0.011 7±0.000 0ghi	0.020 2±0.000 6ghi	0.002 1±0.000 5k	0.001 2±0.000 1d	0.001 1±0.000 7i	0.036 2ghij	0.037 4ijkl	0.073 6ghi
			0.031 7±0.002 0e	0.032 8±0.000 5fghi	0.005 6±0.000 2hijk	0.001 4±0.000 1d	0.002 2±0.000 3i			
		地上部分	0.036 7±0.000 6hij	0.009 5±0.000 1jklmno	0.002 5±0.000 2bcd	0.001 0±0.000 1efg	0.011 4±0.000 4def	0.061 1e		
			0.048 7±0.004 8ghi	0.012 2±0.000 5jklmn	0.003 4±0.000 2bcd	0.001 2±0.000 1defg	0.023 7±0.007 6bc	0.028 1jkl		
	2	根	0.012 9±0.000 1gh	0.052 2±0.009 4f	0.002 7±0.000 1ijk	0.004 3±0.000 7d	0.007 6±0.000 9ghi	0.079 6d	0.100 1efgh	0.179 7de
			0.018 8±0.002 6f	0.108 4±0.033 3c	0.013 9±0.001 2efg	0.009 3±0.000 8d	0.029 4±0.003 0cde			
		地上部分	0.003 1±0.000 3m	0.015 9±0.000 6ijkl	0.001 3±0.000 4cd	0.000 3±0.000 1g	0.001 1±0.000 0f	0.021 6klmn		
			0.007 6±0.000 2m	0.022 5±0.000 7hij	0.002 7±0.000 0bcd	0.000 9±0.000 1fg	0.013 3±0.004 7def	0.025 3jkl		
	3	根	0.003 0±0.000 1k	0.041 6±0.002 9fg	0.010 0±0.004 5fghijk	0.002 6±0.000 2d	0.008 0±0.000 7ghi	0.065 3e	0.039 5ijkl	0.104 8fg
			0.010 3±0.001 7hi	0.047 3±0.004 8f	0.020 9±0.002 4de	0.008 2±0.004 1d	0.018 1±0.001 4efgh			
		地上部分	0.001 2±0.000 1m	0.016 1±0.000 8ijkl	0.003 1±0.000 2bcd	0.000 5±0.000 0g	0.001 2±0.000 4f	0.022 0klmn		
			0.209 1±0.000 3a	0.025 7±0.004 1gh	0.003 9±0.000 3bcd	0.003 7±0.000 8bcd	0.012 0±0.000 6def	0.232 4b		
平均值	根	0.009 2	0.038 0	0.005 0	0.002 7	0.005 6	0.060 4	0.059 0	0.119 4	
		0.020 2	0.062 8	0.013 5	0.006 3	0.016 6				
	地上部分	0.015 2	0.013 6	0.002 2	0.000 6	0.005 0	0.034 9			
		0.047 4	0.017 7	0.003 3	0.001 5	0.015 9	0.095 3			

续表 5 不同产地、不同部位狼毒大戟药材中 5 种蒽醌类的质量分数 ($n=3$)/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

No.	居群	部位	化合物					游离蒽醌总量	结合蒽醌总量	总蒽醌		
			芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚					
	1	根	0.010 3±0.000 3hi	0.004 3±0.000 0hi	0.003 3±0.000 0ijk	0.001 9±0.000 1d	0.020 8±0.000 7defg	0.040 6fghi	0.195 9c	0.236 5bc		
			0.014 7±0.000 4g	0.137 0±0.024 1b	0.030 3±0.002 3bc	0.007 3±0.000 9d	0.047 3±0.005 8b					
		地上部分	0.001 7±0.000 0m	0.008 6±0.001 3klmno	0.002 1±0.001 5bcd	0.001 3±0.000 2defg	0.004 2±0.000 8f	0.017 9lmn			0.028 3jkl	0.046 2hi
			0.004 9±0.000 6m	0.013 8±0.000 9jklm	0.007 8±0.000 2a	0.001 5±0.000 4defg	0.018 2±0.009 1cd					
	2	根	0.006 5±0.001 4jk	0.013 4±0.000 3ghi	0.002 9±0.000 2ijk	0.001 1±0.000 0d	0.013 7±0.001 1fghi	0.037 7fghij	0.109 8efgh	0.147 5e		
			0.020 1±0.000 3f	0.033 9±0.004 6fghi	0.031 5±0.007 6ab	0.027 3±0.018 9c	0.034 7±0.010 4c					
		地上部分	0.001 0±0.000 1m	0.016 7±0.001 9ijk	0.004 3±0.000 1bc	0.000 7±0.000 2fg	0.002 4±0.000 1f	0.025 1jklm			0.039 2ijkl	0.064 3ghi
			0.004 5±0.000 0m	0.029 8±0.000 6g	0.010 0±0.000 6a	0.008 0±0.001 6a	0.012 0±0.003 3def					
S4	3	根	0.003 9±0.000 5k	0.059 5±0.002 4ef	0.008 1±0.000 8ghijk	0.000 7±0.000 1d	0.026 8±0.002 0cdef	0.098 9bc	0.140 0de	0.238 9bc		
			0.009 1±0.000 9ij	0.111 9±0.037 4c	0.036 1±0.010 7a	0.002 2±0.000 9d	0.079 6±0.003 3a					
		地上部分	0.003 8±0.000 1m	0.009 3±0.000 7jklmno	0.001 2±0.000 0cd	0.001 0±0.000 5efg	0.003 4±0.000 8f	0.018 7lmn			0.017 3l	0.036 0i
			0.005 1±0.000 4m	0.018 4±0.001 7ij	0.004 6±0.001 4b	0.002 1±0.000 2cdefg	0.005 9±0.000 1ef					
	4	根	0.004 1±0.001 5k	0.003 3±0.000 3i	0.003 2±0.000 9ijk	0.002 2±0.000 2d	0.031 8±0.003 6cd	0.044 6fgh	0.235 6b	0.280 2b		
			0.013 1±0.002 1gk	0.179 60±.011 9a	0.029 6±0.003 0bc	0.006 2±0.000 6d	0.051 7±0.013 8b					
		地上部分	0.006 2±0.000 7m	0.006 3±0.002 5mno	0.002 9±0.001 0bcd	0.003 3±0.000 5bcdef	0.028 4±0.002 5ab	0.047 1fg			0.164 8cd	0.211 9cd
			0.016 4±0.003 5lm	0.144 3±0.008 0a	0.010 1±0.004 5a	0.007 1±0.001 2a	0.034 0±0.004 9a					
平均值		根	0.006 2	0.020 1	0.004 4	0.001 5	0.023 3	0.055 5	0.170 3	0.225 7		
			0.014 3	0.115 6	0.031 8	0.010 8	0.053 3					
		地上部分	0.003 2	0.010 2	0.002 6	0.001 6	0.009 6	0.027 2			0.062 4	0.089 6
			0.007 7	0.051 5	0.008 2	0.004 6	0.017 5					
	1	根	0.003 6±0.000 3k	0.035 2±0.002 8fgh	0.013 9±0.002 8efg	0.003 0±0.001 2d	0.007 8±0.001 7ghi	0.063 5e	0.340 7a	0.404 2a		
			0.035 9±0.003 7d	0.185 5±0.011 2a	0.015 7±0.004 3efg	0.119 4±0.020 5a	0.047 7±0.004 5b					
		地上部分	0.058 1±0.000 3efg	0.007 0±0.000 4lmno	0.000 6±0.000 1d	0.004 6±0.000 5b	0.003 4±0.000 4f	0.073 8de			0.134 6def	0.208 4cd
			0.109 2±0.026 4b	0.084 1±0.008 8c	0.003 1±0.000 4bcd	0.008 0±0.000 6a	0.003 9±0.001 0f					
	2	根	0.019 0±0.000 5f	0.004 0±0.000 2hi	0.007 5±0.000 3ghijk	0.002 5±0.000 3d	0.002 8±0.000 4i	0.035 9ghij	0.041 1ijkl	0.077 0ghi		
			0.021 0±0.000 8f	0.012 1±0.002 6hi	0.010 7±0.002 2fghi	0.028 5±0.003 3c	0.004 7±0.001 7hi					
		地上部分	0.086 1±0.004 1c	0.005 3±0.000 6mno	0.002 6±0.001 0bcd	0.002 1±0.000 0cdefg	0.001 1±0.000 3f	0.097 1bc			0.066 8hijkl	0.163 9e
			0.114 5±0.010 8b	0.035 7±0.001 1f	0.003 5±0.000 9bcd	0.003 7±0.000 6bcde	0.006 6±0.001 9ef					
S5	3	根	0.006 9±0.001 0jk	0.006 1±0.001 7hi	0.014 3±0.002 2efg	0.001 5±0.000 2d	0.002 7±0.000 1i	0.031 4hijkl	0.241 0b	0.272 4b		
			0.020 6±0.003 2f	0.142 2±0.009 6b	0.025 2±0.000 9cd	0.037 8±0.014 8c	0.046 7±0.011 5b					
		地上部分	0.013 8±0.000 6lm	0.004 1±0.001 3no	0.000 9±0.000 1d	0.000 4±0.000 1g	0.001 3±0.000 1f	0.020 3klmn			0.119 8defg	0.140 1ef
			0.074 8±0.011 1cd	0.058 0±0.001 5e	0.001 6±0.000 2bcd	0.002 8±0.000 1bcdefg	0.002 9±0.000 4f					
平均值		根	0.009 8	0.015 1	0.011 9	0.002 3	0.004 4	0.047 0	0.207 6	0.251 2		
			0.025 8	0.113 3	0.017 2	0.061 9	0.033 0					
		地上部分	0.052 7	0.005 5	0.001 4	0.002 4	0.001 9	0.063 4			0.107 1	0.170 8
			0.099 5	0.059 3	0.002 7	0.004 8	0.004 5					

注:小写字母不同表示差异有统计学意义($P<0.05$),小写字母相同表示差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.8 聚类分析

取 5 个采集地点 16 个居群狼毒大戟根的总蒽醌结果进行聚类分析,以表 5 中狼毒大戟根的总蒽醌为依据,通过 SPSS 23.0 版本软件欧式距离平方(squared Euclidean distance)计算样品间的相似系数,并用离差平方和法(Ward 法)进行系统聚类,结果见图 2。

由图 2 知,当分类距离为 5 时,可分为 3 类:第一类有 4 份样品,即 S1-2, S3-1, S3-3, S5-2;第二类有 11 份样品,即 S1-1, S2-4, S3-2, S4-2, S4-4, S5-3, S2-1, S2-3, S4-1, S4-3, S2-2;第三

类有1份样品,即S5-1。

3 讨论与结论

3.1 流动相与检测波长的条件优化

以狼毒大戟的供试品溶液为研究对象,考察了甲醇-磷酸和甲醇-水不同比例的等度与梯度洗脱,结果显示采用甲醇-0.2%磷酸溶液(79:21)为流动相系统时,目标峰分离度良好,且峰形对称、无拖尾,故甲醇-0.2%磷酸溶液系统较适合狼毒大戟中蒽醌类成分的分析。5种蒽醌类物质均在254 nm波长下有较大的吸收,故选定254 nm为本实验检测波长。

3.2 供试品溶液制备的条件优化

为了快速从狼毒大戟中提取尽可能多的蒽醌类化合物,本实验采用文献中常见的超声提取法^[11]和回流提取法^[12],以获得最佳的提取量,结果显示超声波辅助提取法的提取率较佳。比较了不同体积分数提取溶液(三氯甲烷、甲醇、乙醇、甲醇-盐酸)、提取时间(15,30,45,60 min)、料液比(1:30,1:60,1:120,1:240 g/mL)及提取次数(1,2,3次)的提取率效果。结果表明狼毒大戟中游离蒽醌以甲醇为提取溶液,料液比1:30 g/mL,超声提取1次,提取45 min,即可将5种游离蒽醌类成分基本提取完全;狼毒大戟中总蒽醌以甲醇-盐酸(10:0.4)为提取溶液,料液比1:30 g/mL,超声提取1次,提取45 min,即可将5种总蒽醌类成分基本提取完全。

3.3 样品质量分数测定结果分析

本实验以狼毒大戟中5种蒽醌类化合物进行质量综合评价,由表5可知,16份狼毒大戟均含有芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚成分,表明不同产地、不同部位狼毒大戟中蒽醌类化合物较为相似,说明该样品所含的蒽醌类化合物分布及比例较稳定。狼毒大戟根中游离蒽醌的质量分数是结合蒽醌质量分数的0.23~1.02倍,表明不同产地狼毒大戟根中游离蒽醌和结合蒽醌的质量分数存在一定差异,但部分产地游离蒽醌质量分数超过或接近结合蒽醌质量分数,可能与S3(云南省香格里拉市格咱乡)、S1(云南省香格里拉市小中甸)的生长环境为灌丛、海拔较低有关^[12],其原因有待进一步研究。狼毒大戟地上部位中游离蒽醌的质量分数是结合蒽醌的0.37~0.90倍,表明不同产地狼毒大戟地上部位中游离蒽醌和结合蒽醌的质量分数差异较大,且结合蒽醌的质量分数均大于游离蒽醌的质量分数。

因药用植物的不同植株即使是同一采收期其质量分数也有所差异,故本实验采用单株采样分析,以减少样品导致的实验误差^[11]。由表5可知,5个不同产地、不同部位各16份狼毒大戟药材中5种蒽醌类成分的量各不相同,其中S5样品根中总蒽醌质量分数最高、S3样品根中总蒽醌质量分数最低,而S3样品地上部位中总蒽醌质量分数最高、S1样品地上部位中总蒽醌质量分数最低,且不同产地、不同部位中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚5种成分间量的比(内在的结构比)均有较大差异;同样,由聚类分析结果(图2)可知,同一产地不同居群没有全部聚集在一枝上,这2项结果都进一步说明狼毒大戟药材因产地、居群不同其蒽醌类成分量及结构比均具有较大差异,5种蒽醌类化合物质量分数存在显著性差异,这种成分结构比的差异可能是造成狼毒药材生物活性差异的根本原因。

前期文献报道,狼毒大戟中大黄素甲醚对人体宫颈癌细胞具有较强的抑制作用^[6]、大黄素甲醚对耐药型和非耐药型结核杆菌均有显著的抑制作用^[4],与狼毒大戟药效(抗肿瘤、抗结核杆菌等)具有一定的关联性^[3-5]。因此,狼毒大戟中蒽醌类物质质量分数可作为其质量控制指标之一。由表5可知,狼毒大戟地上部位的游离蒽醌、结合蒽醌和总蒽醌质量分数部分超过传统入药部位根的质量分数,如果在充分利用狼毒药材传统入药部位的同时,再充分利用地上部位的生物资源,将对有限的生物资源的节约产生重要价值,这也为狼毒大戟地上部位资源的合理利用和开发创造了可能性。

本实验建立同时测定狼毒大戟不同产地、不同部位中芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素

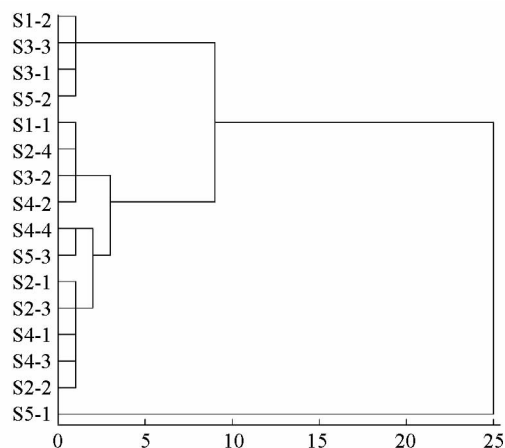


图2 狼毒大戟根中总蒽醌质量分数的聚类分析树状图

甲醚 5 种蒽醌类成分的 HPLC 法, 不仅简单可靠, 且方法学验证结果符合分析要求, 可为狼毒大戟质量的综合评价提供参考依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 286—287.
- [2] 严小红, 王灿坚, 毕福钧, 等. 狼毒质量标准改进研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 321—324.
- [3] 金贤兰. 中药狼毒的药理作用及临床应用 [J]. 现代医药卫生, 2008, 24(20): 3101—3102.
- [4] 吴起成, 尤奋强, 丁安伟, 等. 白狼毒化学成分和生物活性研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2009, 17(2): 125—131.
- [5] 王宏伟, 王海香, 顾雅静. 狼毒大戟化学成分和药效作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(12): 1853—1856, 1843.
- [6] 刘文桢, 何风雷, 阮子镛, 等. 狼毒大戟蒽类和蒽醌类化合物的分离鉴定 [J]. 中药材, 1997, 20(7): 351—353.
- [8] 魏泽英, 虎春艳, 李树全. 蒽醌类似物的合成及其生物活性研究进展 [J]. 中国药房, 2015, 26(25): 3581—3583.
- [9] 曾雯, 李晓飞, 黄玉珊, 等. 望江南蒽醌类成分的提取及抗肝癌活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(9): 2231—2235.
- [10] 王景富, 王静霞, 滕云, 等. 药食两用植物酸模蒽醌类成分含量测定研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(4): 199—205.
- [11] 周浓, 王光志, 刘文燕. 栽培掌叶大黄不同部位中蒽醌类衍生物的含量分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 670—675.
- [12] 杨娟艳, 王珍珍, 茅向军, 等. HPLC 法比较 3 种土大黄中游离蒽醌和总蒽醌的含量 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 615—623.

Comparison of Contents of Free and Total Anthraquinones in *Euphorbia Fischeriana* Steud. from Different Habitats by HPLC

YANG Qin^{1,2}, YANG De-quan¹

1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China;

2. Chongqing Engineering Technology Research Center of Natural Antineoplastic, Chongqing 404120, China

Abstract: A new HPLC method has been established in order to simultaneously detect five kinds of anthraquinones (aloe-emodin, emodin, chrysophanol, rhein and physcion) in *Euphorbia fischeriana* Steud.. The Venusil MP C₁₈(2) column (4.6 mm×250 mm, 5μm) has been used. The methanol—0.2% phosphoric acid solution (79 : 21) have been applied as the mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min. The detector wavelength has been set at 254 nm, and the column temperature has been set at 30°C. The results show that the new method had a good linear relationship within the linear range ($r > 0.9993$) and good resolution ($R > 1.5$). The average recovery rate was in the ranges of 96.59%~99.13% with the RSD less than or equal to 1.36% for free anthraquinone and in the ranges of 97.60%~99.46% with the RSD less than or equal to 1.52% for the total anthraquinone. The contents of five kinds of anthraquinones in the 16 batch samples of *Euphorbia fischeriana* Steud. were determined by the new HPLC method. And it shows significant difference among the composition structure ratios of aloe-emodin, emodin, chrysophanol, rhein and physcion in different parts of *Euphorbia fischeriana* Steud. from different habitats. According to the cluster analysis, that the total anthraquinone content of *Euphorbia fischeriana* Steud. of root in the same habits from different populations did not accumulate on one branch. Moreover, the contents of total anthraquinone in roots were higher than that on the ground except for the samples of GeZa town of Yunnan city of Shangri-La province. Therefore, this new method can not only be used for comparing the difference of contents and compositions of free and total anthraquinones in different parts of Yunnan *Euphorbia fischeriana* Steud. from different habitats, providing a scientific basis for the quality assessment and reasonable utilization, but also affords a theoretical basis for the comprehensive utilization of aboveground parts of *Euphorbia fischeriana* Steud..

Key words: *Euphorbia fischeriana* Steud.; free anthraquinone; total anthraquinone; content determination; cluster analysis; root; aboveground; HPLC

责任编辑 周仁惠