瑶药紫九牛中4种化学成分的提取分离、鉴定及含量测定Δ

阎雪晴[1*]，黄建猷[2,3#]，黄周锋[2]，高美美[1]，黄宏妙[1]，陆国寿[2]（1.广西中医药大学药学院，南宁 530200；2.广西壮族自治区中医药研究院，南宁 530022；3.广西中药质量标准研究重点实验室，南宁 530022）

中图分类号 R917；R284.1 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）05-0560-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.05.09

摘 要 目的 提取分离瑶药紫九牛中的4种化学成分并对其进行鉴定和含量测定。**方法** 采用溶剂提取、萃取和硅胶柱色谱分离法、制备液相色谱技术对紫九牛中的化学成分进行分离、纯化，根据化合物的波谱数据对分离得到的4种化学成分进行结构鉴定。采用高效液相色谱（HPLC）-一测多评（QAMS）法同时测定紫九牛中4种化学成分的含量，色谱条件为：以Echway Gowon™ C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）为色谱柱，以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱，检测波长为269 nm，柱温为25 ℃；以大黄素为内参物，建立该成分与其他3种成分的相对校正因子，利用相对校正因子计算含量；同时采用外标法计算各成分的含量，并比较2种方法所得结果的差异。**结果** 从紫九牛中分离得到的4种化学成分经鉴定分别为大黄素、欧鼠李苷A、pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷。HPLC-QAMS法结果表明，pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A的相对校正因子分别为1.147 2、0.874 7、0.644 4。上述4种成分在各自检测范围内线性关系良好（r≥0.999 6），精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.00%，平均加样回收率为99.41%～100.46%（RSD≤2.05%）。QAMS法与外标法得到的10批紫九牛样品含量测定结果无明显差异（RSD<3.00%）。**结论** 从紫九牛中分离得到了大黄素、欧鼠李苷A、pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷，其中后3种成分均为首次从该药材中分离得到。所建立的同时测定紫九牛中4种化学成分的HPLC-QAMS法准确、可靠，可用于该药材的质量控制。

关键词 紫九牛；化学成分；一测多评法；大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷；欧鼠李苷A；pleuropyrone A；大黄素；质量控制

Extraction, isolation, identification and content determination of four chemical components in Yao medicine *Ventilago leiocarpa*

XIA Xueqing[1], HUANG Jianyou[2,3], HUANG Zhoufeng[2], GAO Meimei[1], HUANG Hongmiao[1], LU Guoshou[2] (1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To extract and isolate the four chemical components of Yao medicine *Ventilago leiocarpa*, and to conduct identification and content determination for them. **METHODS** The chemical components of *V. leiocarpa* were separated and purified by solvent extraction, extraction, silica gel column chromatography and preparative liquid chromatography; then the chemical structures of four isolated compounds were identified based on their spectral data. The contents of four components were determined by high performance liquid chromatography (HPLC)-quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method, with the following chromatographic conditions: chromatographic column was Echway Gowon™ C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid for gradient elution; the detection wavelength was 269 nm, and the column temperature was 25 ℃. Using emodin as internal reference, the relative correction factors ($f_{i/s}$) between emodin and the other 3 components were established and used to calculate the content. At the same time, the content of each component was calculated with the external standard method (ESM), and the differences between these two methods were compared. **RESULTS** Four compounds were isolated from *V. leiocarpa*, and they were identified as emodin, frangulin A, pleuropyrone A, emodin-8-*O*-*β*-D-glucoside. The result of HPLC-QAMS showed that the $f_{i/s}$ of pleuropyrone A, emodin-8-*O*-*β*-D-glucoside and frangulin A were 1.147 2, 0.874 7 and 0.644 4, respectively. The content of these four components was measured as a good linearity (r≥0.999 6); relative standard deviation (RSD) of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.00%, and average recoveries were 99.41%-100.46% (RSD≤2.05%). There was no significant

Δ **基金项目** 广西自然科学基金面上项目（No.2020GXNSFAA259-076）；广西研究生联合培养基地资助项目（No.桂学位〔2021〕6号）

＊ **第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药化学成分的研究与应用。E-mail：2991005743@qq.com

\# **通信作者** 副主任药师。研究方向：中药药效物质基础。E-mail：dearhuangjianyou@126.com

difference between QAMS method and ESM (RSD<3.00%). **CONCLUSIONS** Emodin, frangulin A, pleuropyrone A and emodin-8-*O*-*β*-D-glucoside are isolated from *V. leiocarpa*; among them, the last three components are all isolated from for the first time. The established HPLC-QAMS method is accurate and reliable for the determination of 4 components in *V. leiocarpa*, and can used for quality control of *V. leiocarpa*.

KEYWORDS *Ventilago leiocarpa*; chemical component; quantitative analysis of multi-components by single-marker; emodin-8-*O*-*β*-D-glucoside; frangulin A; pleuropyrone A; emodin; quality control

紫九牛是中国传统的瑶药之一，来源于鼠李科植物翼核果 *Ventilago leiocarpa* Benth. 的干燥根和根茎，主要分布于中国广东、广西和云南等地区。其别名为血风藤、红穿破石、铁牛入石等，始载于《广西中草药》，是一味性温、味甘的药材，属瑶医所谓的“风药”，具有补气血、强筋骨、舒筋络等功效[1]，主要用于治疗气血虚弱、月经不调、血虚经闭、风湿疼痛、跌打损伤、腰肌劳损、四肢麻木等症状。其主要活性成分有蒽醌、萘醌、黄酮及其相应的糖苷类化合物。

目前已发表的关于紫九牛的质量控制研究大多是单个成分的含量测定[2-3]和指纹图谱研究[4]，对紫九牛药材的化学成分及质量控制研究相对薄弱。有研究证明，pleuropyrone A具有保肝等作用[5]，大黄素及其衍生物欧鼠李苷A、大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷等蒽醌类成分也具有一定的抗炎、抗氧化和抗肿瘤等药效作用[6-9]，这可能与紫九牛的药理作用[1,10]存在一定的相关性。因此，本研究拟采用溶剂萃取法、色谱技术对上述4种成分进行分离、纯化，并测定其含量。但pleuropyrone A和欧鼠李苷A 2种成分的对照品成本较高，不易购买。一测多评（quantitative analysis of multi-components by single-marker，QAMS）法使用单一的对照品就可以同时进行多种成分的含量测定[11]。因此，本研究以大黄素为内参物，建立该成分与其他3种化学成分的相对校正因子（f_{is}），采用QAMS法对紫九牛进行含量测定研究，以期达到降低实验成本、节约实验时间的目的，同时为该药材的质量控制提供参考依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有e2695型高效液相色谱（HPLC）仪、2489制备型HPLC仪（美国Waters公司），1260 Infinity Ⅱ型HPLC仪（美国Agilent公司），XS-205型十万分之一电子天平（瑞士Mettler Toledo公司），KS-3200DE型液晶超声波清洗器（昆山洁力美超声仪器有限公司），ZF-2型三用紫外仪（上海安亭电子仪器厂），HH-S2型数显恒温水浴锅（江苏金怡仪器科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

实验用10批紫九牛药材分别购自广西玉林（编号S1～S6，批号依次为20221025131、20221025081、20221025101、20221025132、20221025133、20221025102）和安徽亳州（编号S7～S10，批号依次为20221025082、20221024231、20221024232、20220510111），经广西壮族自治区中医药研究院陆国寿主任药师鉴定均为鼠李科植物翼核果 *V. leiocarpa* Benth. 的干燥根茎。

大黄素对照品（批号110756-201913，纯度≥98%）购自中国食品药品检定研究院；大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷对照品（批号220428，纯度≥98%）购自成都植标化纯生物技术有限公司；HPLC用甲醇、乙腈均为色谱纯，水为娃哈哈纯净水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 紫九牛中4种化学成分的提取分离与结构鉴定

2.1.1 提取分离

取紫九牛药材粗粉5 kg，加50%乙醇回流提取3次，每次1.5 h，浓缩，得浸膏。取浸膏过聚酰胺柱，依次用水和20%、40%、60%乙醇洗脱，分别浓缩，得20%乙醇洗脱物82.6 g、40%乙醇洗脱物285.4 g、60%乙醇洗脱物42.7 g。取40%乙醇洗脱物加水适量使分散混悬均匀，依次用乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取，分别得乙酸乙酯、水饱和正丁醇萃取部分15.6、1.87 g；取乙酸乙酯萃取部分，经硅胶层析柱分离，依次用氯仿-甲醇（100∶0→95∶5→90∶10→80∶20，*V*/*V*）洗脱，经薄层色谱检测，合并相同组分，再经反复硅胶层析柱色谱分离，得到化合物**1**。取40%乙醇洗脱物经水饱和正丁醇萃取后的水层部分，经硅胶层析柱分离，依次用乙酸乙酯-乙酸甲酯（80∶20→16∶5→127∶48→29∶13→69∶56→10∶10，*V*/*V*）洗脱，经薄层色谱检测，合并相同组分，再经反复硅胶层析柱色谱分离，得到化合物**2**、**3**；取水饱和正丁醇萃取后的水层部分，经硅胶柱层析分离得到的部分馏分再经制备型HPLC分离，得到化合物**4**。

2.1.2 结构鉴定

根据化合物的波谱数据及薄层色谱技术，鉴定得出化合物**1**、**2**、**3**、**4**分别为大黄素、欧鼠李苷A、pleuropy-

rone A、大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷。

化合物**1**：黄色细针状结晶（乙酸乙酯重结晶）；可溶于NaOH稀溶液并呈红色或紫红色，加HCl稀溶液后颜色由红变黄，再次加NaOH稀溶液时颜色恢复红色；与大黄素对照品进行薄层色谱对照，发现比移值（R_f值）一致，因此鉴定化合物**1**为大黄素（emodin）。

化合物**2**：黄色粉末固体。^{1}H-NMR（500 MHz，pyridine-d_5）：δ7.74（1H，s，H-7），7.66（1H，s，H-2），7.30（1H，s，H-5），7.10（1H，s，H-4），6.30（1H，s，H-1′），4.75（1H，s，H-5′），4.66（1H，d，J=7.4 Hz，H-2′），4.40（1H，t，J=9.1 Hz，H-4′），4.28～4.19（1H，m，H-3′），2.24（3H，s，H-15），1.62（3H，d，J=5.8 Hz，H-6′）。^{13}C-NMR（125 MHz，pyridine-d_5）：δ191.33（C-9），181.86（C-10），165.58（C-1），164.30（C-8），163.03（C-6），149.19（C-3），136.00（C-11），133.88（C-14），124.95（C-4），121.65（C-2），114.35（C-13），111.57（C-12），110.35（C-7），109.90（C-5），100.41（C-1′），73.80（C-4′），72.65（C-2′），71.97（C-3′），71.83（C-5′），22.13（C-15），18.92（C-6′）。以上数据与文献[12]一致，因此鉴定化合物**2**为欧鼠李苷A（franguline A）。经HPLC峰面积归一化法测定其纯度不低于98%，可以用作对照品。

化合物**3**：灰褐色粉末固体。^{1}H-NMR（500 MHz，Methyl sulfoxide-d_6）：δ7.27（1H，s，H-6），6.80（1H，d，J=2 Hz，H-9），6.77（1H，d，J=2 Hz，H-7），6.19（1H，s，H-3），5.06（1H，d，J=7.7 Hz，H-1′），3.73（1H，brd，J=10.8 Hz，H-6′b），3.55（1H，dd，J=10.8、5.4 Hz，H-6′a），3.48（1H，t，J=8.2 Hz，H-2′），3.39（1H，m，H-5′），3.36（1H，m，H-3′），3.27（1H，t，J=9.4 Hz，H-4′），2.74（3H，s，5-CH3），2.43（3H，s，2-CH3）。^{13}C-NMR（125 MHz，methyl sulfoxide-d_6）：δ178.59（C-4），164.01（C-2），158.98（C-8），156.24（C-10），156.05（C-1b），138.15（C-6a），134.74（C-5），124.60（C-6），116.87（C-4a），111.80（C-3），107.86（C-10a），102.77（C-7），102.38（C-9），100.65（C-1′），77.08（C-5′），76.99（C-3′），73.69（C-2′），69.42（C-4′），60.53（C-6′），22.95（5-CH3），19.15（2-CH3）。以上数据与文献[13]一致，因此鉴定化合物**3**为pleuropyrone A。

化合物**4**：黄色粉末固体；可溶于NaOH稀溶液并呈红色或紫红色，加HCl稀溶液后颜色由红变黄，再次加NaOH稀溶液时颜色恢复红色；与大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷对照品进行薄层色谱对照，发现二者R_f值一致；与该对照品进行HPLC对照，发现保留时间一致。因此，鉴定化合物**4**为大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷（emodin-8-*O*-*β*-D-glucoside）。经HPLC峰面积归一化法测定其纯度不低于98%，可以用作对照品。

2.2 紫九牛中4种化学成分的含量测定

2.2.1 色谱条件

采用Echway Gowon™ C_{18}色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），以乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0～10 min，15%A→30%A；10～15 min，30%A；15～20 min，30%A→35%A；20～35 min，35%A→45%A；35～40 min，45%A；40～50 min，45%A→80%A；50～55 min，80%A→15%A；55～60 min，15%A）；流速为1.0 mL/min；检测波长为269 nm；进样量为10 μL；柱温为25 ℃。

2.2.2 混合对照品溶液的制备

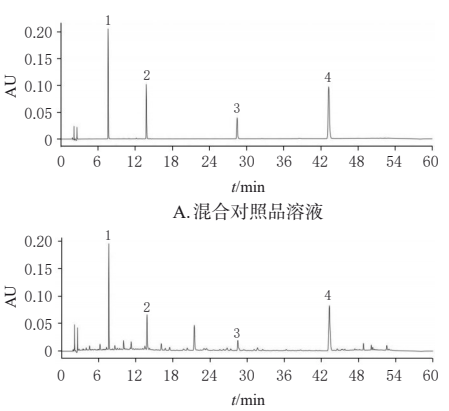
精密称取pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A、大黄素对照品各适量，加入甲醇制成质量浓度分别为140.40、90.20、67.00、229.40 μg/mL的对照品储备液。分别精密量取各对照品储备液5 mL，置于同一25 mL量瓶中，加甲醇制成含pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A、大黄素分别为28.08、18.04、13.40、45.88 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取紫九牛粉末（过60目筛）约0.2 g，精密称定，置具塞三角瓶中，精密加入甲醇25 mL，密塞，称定质量，超声（功率100 W，频率40 kHz）处理40 min，放至室温，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.2.4 专属性考察

分别取上述混合对照品溶液、供试品溶液10 μL，按“2.2.1”项下色谱条件进样检测。结果显示，供试品溶液色谱图中，在与混合对照品溶液色谱图相同出峰位置有色谱峰出现，且4种成分色谱峰的峰形对称，理论板数按各目标成分色谱峰计均不低于6 000，4种成分色谱峰与相邻色谱峰的分离度均大于1.5。色谱图见图1。



A.混合对照品溶液　B.供试品溶液

1：pleuropyrone A；2：大黄素-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷；3：欧鼠李苷A；4：大黄素。

图1　混合对照品溶液和紫九牛供试品溶液的HPLC图

2.2.5　线性关系考察

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液1、2、5、10、15、20 μL，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以各待测成分的进样量（X）为横坐标、对应峰面积（Y）为纵坐标建立回归方程，得到各成分的线性关系考察结果，详见表1。

表1　紫九牛中4种化学成分的线性关系考察结果

成分	回归方程	r	线性范围/μg
pleuropyrone A	Y=3 990 420.89X−42 750.43	0.999 7	0.028 1～0.561 6
大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷	Y=3 068 138.36X−21 006.97	0.999 6	0.018 0～0.360 8
欧鼠李苷A	Y=2 268 099.04X−13 734.12	0.999 6	0.013 4～0.268 0
大黄素	Y=3 545 410.20X−89 201.43	0.999 6	0.045 9～0.917 6

2.2.6　精密度试验

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液10 μL，按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果显示，pleuropyrone A、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A、大黄素峰面积的RSD分别为1.10%、1.13%、1.21%、0.28%（n=6），表明仪器精密度较好。

2.2.7　稳定性试验

取紫九牛粉末（S10）0.2 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，分别在室温放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示，pleuropyrone A、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A、大黄素峰面积的RSD分别为1.01%、1.30%、1.29%、1.21%（n=6），表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性较好。

2.2.8　重复性试验

取紫九牛粉末（S10）0.2 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并采用外标法（external standard method，ESM）计算样品中4种成分的含量。结果显示，pleuropyrone A、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A、大黄素的平均含量分别为2.476、1.536、1.203、4.163 mg/g，RSD分别为1.06%、0.51%、1.02%、0.85%（n=6），表明该方法重复性较好。

2.2.9　加样回收率试验

取已知成分含量的紫九牛粉末（S10）6份，每份0.1 g，精密称定，分别精密加入“2.2.2”项下各对照品储备液2 mL，按“2.2.3”项下方法制备加样回收供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，计算pleuropyrone A、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A、大黄素的平均加样回收率，结果见表2。由表2可知，上述4种化学成分的平均加样回收率为99.41%～100.46%，RSD均不大于2.05%，表明该方法准确度较好。

表2　加样回收率试验结果（n=6）

成分	取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
pleuropyrone A	0.115 4	0.286	0.281	0.564	98.93	99.41	1.64
	0.114 2	0.283	0.281	0.566	100.71		
	0.123 0	0.305	0.281	0.578	97.15		
	0.110 8	0.274	0.281	0.551	98.58		
	0.118 2	0.292	0.281	0.578	101.78		
	0.114 6	0.284	0.281	0.563	99.29		
大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷	0.115 4	0.177	0.180	0.353	97.78	100.46	1.62
	0.114 2	0.175	0.180	0.356	100.56		
	0.123 0	0.189	0.180	0.373	102.22		
	0.110 8	0.170	0.180	0.349	99.44		
	0.118 2	0.182	0.180	0.364	101.11		
	0.114 6	0.176	0.180	0.359	101.67		
欧鼠李苷A	0.115 4	0.139	0.134	0.276	102.24	99.50	2.05
	0.114 2	0.137	0.134	0.270	99.25		
	0.123 0	0.148	0.134	0.279	97.76		
	0.110 8	0.133	0.134	0.269	101.49		
	0.118 2	0.142	0.134	0.272	97.01		
	0.114 6	0.138	0.134	0.271	99.25		
大黄素	0.115 4	0.480	0.459	0.935	99.13	99.56	1.80
	0.114 2	0.475	0.459	0.938	100.87		
	0.123 0	0.512	0.459	0.960	97.60		
	0.110 8	0.461	0.459	0.931	102.40		
	0.118 2	0.492	0.459	0.942	98.04		
	0.114 6	0.477	0.459	0.933	99.35		

2.2.10　$f_{i/s}$的测定及影响因素考察

（1）$f_{i/s}$的测定。精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件分别进样1、2、5、10、15、20 μL，记录pleuropyrone A、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A、大黄素的峰面积，以大黄素为内参物计算$f_{i/s}$：$f_{i/s}$=（A_s/C_s）/（A_i/C_i）；式中，A_s为内参物峰面积，C_s为内参物质量浓度，A_i为待测成分峰面积，C_i为待测成分质量浓度。平行测定3次，计算平均值。结果显示，pleuropyrone A、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A的$f_{i/s}$平均值分别为1.147 2、0.874 7、0.644 4，RSD分别为2.15%、1.11%、0.78%（n=3）。

（2）不同仪器、色谱柱对$f_{i/s}$的影响。本研究分别考察了不同仪器、不同色谱柱对$f_{i/s}$的影响，实验重复3次。结果显示，分别采用Waters e2695型和Agilent 1260 Infinity Ⅱ型HPLC仪，以Agilent ZORBAX SB-C_{18}、Waters XBridge® C_{18}、ECHWAY GOWON™ C_{18}为色谱柱进行检测时，pleuropyrone A的$f_{i/s}$分别为1.151 3、1.126 1、1.134 4、1.163 5、1.136 5、1.134 3，平均值为1.141 0[RSD=1.20%（n=6）]；大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷的$f_{i/s}$分别为0.892 9、0.868 5、0.875 6、0.893 4、0.871 3、0.870 5，平均值为0.878 7[RSD=1.30%（n=6）]；欧鼠李苷A的$f_{i/s}$分别为0.629 4、0.640 1、0.633 8、0.637 4、0.645 1、0.639 8，平均值为0.637 6[RSD=0.86%（n=6）]。上述结果表明，不同品牌HPLC仪、不同色谱柱对$f_{i/s}$的影响不大。

（3）不同流速对$f_{i/s}$的影响。本研究考察了流速分别为0.80、0.85、0.90、0.95、1.00、1.05 mL/min时对$f_{i/s}$的影响，实验重复3次。结果显示，在上述不同流速下，pleuropyrone A的$f_{i/s}$分别为1.146 5、1.148 5、1.149 0、1.146 7、1.145 9、1.141 7，平均值为1.146 4[RSD=0.23%（n=3）]；大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷的$f_{i/s}$分别为0.880 0、0.871 2、0.878 3、0.876 7、0.876 4、0.873 7，平均值为0.876 1[RSD=0.36%（n=6）]；欧鼠李苷A的$f_{i/s}$分别为0.649 3、0.649 7、0.648 7、0.649 5、0.646 5、0.644 4，平均值为0.648 0[RSD=0.33%（n=6）]。上述结果表明，流速对$f_{i/s}$无显著影响。

（4）不同柱温对$f_{i/s}$的影响。本研究还考察了柱温分别为20、25、30、35 ℃时对$f_{i/s}$的影响，实验重复3次。结果显示。在不同柱温条件下，pleuropyrone A的$f_{i/s}$分别为1.137 3、1.124 0、1.127 0、1.122 0，平均值为1.127 6[RSD=0.60%（n=4）]；大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷的$f_{i/s}$分别为0.876 8、0.865 7、0.866 0、0.864 5，平均值为0.868 3[RSD=0.66%（n=4）]；欧鼠李苷A的$f_{i/s}$分别为0.636 9、0.638 3、0.639 5、0.631 8，平均值为0.636 6[RSD=0.53%（n=4）]。上述结果表明，柱温对$f_{i/s}$无显著影响。

2.2.11　色谱峰的定位

精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样检测，记录pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A、大黄素的保留时间，以大黄素为内参物计算各成分的相对保留值（R）：$R=t_{Ri}/t_{Rs}$；式中，t_{Ri}为待测成分的保留时间，t_{Rs}为内参物大黄素的保留时间。平行测定3次，取平均值。结果显示，分别采用Waters e2695型和Agilent 1260 Infinity Ⅱ型HPLC仪，以Agilent ZORBAX SB-C_{18}、Waters XBridge® C_{18}、ECHWAY GOWON™ C_{18}为色谱柱进行检测时，pleuropyrone A的R分别为0.197 7、0.192 4、0.178 3、0.198 0、0.194 0、0.177 1，平均值为0.189 6[RSD=4.99%（n=6）]；大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷的R分别为0.339 7、0.351 6、0.319 3、0.343 2、0.355 6、0.318 9，平均值为0.338 1[RSD=4.66%（n=6）]；欧鼠李苷A的R分别为0.673 5、0.700 1、0.656 4、0.682 6、0.709 2、0.661 5，平均值为0.680 6[RSD=3.08%（n=6）]。结果表明，不同品牌HPLC仪、不同色谱柱对R的影响较小，可对色谱峰准确定位。

2.2.12　样品中大黄素等4种化学成分的含量测定

取10批紫九牛药材样品，采用ESM对pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷A、大黄素进行含量测定，并与QAMS法计算的结果进行比较，以验证QAMS法用于紫九牛中4种成分含量测定的准确度及可靠性。平行测定3次，取平均值。结果显示，2种方法所测结果无明显差异（RSD<3.00%，n=3），详见表3。

表3　紫九牛中4种化学成分的含量测定结果（n=3）

编号	大黄素/（mg/g）	pleuropyrone A			大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷			欧鼠李苷A		
		QAMS法/（mg/g）	ESM/（mg/g）	RSD/%	QAMS法/（mg/g）	ESM/（mg/g）	RSD/%	QAMS法/（mg/g）	ESM/（mg/g）	RSD/%
S1	0.483	0.846	0.836	1.10	0.158	0.152	2.74	0.185	0.189	1.51
S2	0.974	0.679	0.666	1.37	0.366	0.358	1.56	0.167	0.162	2.15
S3	0.513	1.140	1.129	0.69	0.175	0.178	1.20	0.191	0.196	1.83
S4	0.612	0.790	0.803	1.15	0.175	0.172	1.22	0.141	0.139	1.01
S5	1.434	1.161	1.173	0.73	0.483	0.473	1.48	0.417	0.412	0.85
S6	1.118	1.194	1.174	1.19	0.441	0.436	0.81	0.265	0.269	1.06
S7	3.445	1.425	1.410	0.75	0.414	0.421	1.19	0.648	0.642	0.66
S8	2.841	1.181	1.177	0.24	0.416	0.408	1.37	0.467	0.461	0.91
S9	2.983	1.156	1.141	0.92	0.398	0.391	1.25	0.406	0.412	1.04
S10	4.163	2.453	2.476	0.66	1.531	1.536	0.23	1.212	1.203	0.53

3　讨论

3.1　供试品溶液制备方法与色谱条件的考察

本研究对供试品溶液的制备方法进行了单因素考察，包括不同提取溶剂（甲醇、50%乙醇、95%乙醇、无水乙醇）、不同提取方式（超声提取、回流提取）、不同取样量（0.2、0.5 g）、不同提取时间（20、40、60 min），最终确定了0.2 g紫九牛药材粉末用甲醇25 mL超声提取40 min的供试品溶液制备方法。

本研究考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液等流动相系统，最终选择乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱，此条件下所得4种化学成分色谱峰的分离度均大于1.5、峰形较好且干扰峰少。通过HPLC-光电二极管阵列检测器在210～400 nm波长范围内对4种化学成分进行全波长扫描，结果显示，在269 nm波长处的吸收较好，且各种条件均满足HPLC定量分析的要求，故选择269 nm作为最终的检测波长。

3.2　含量测定方法的考察

为了保证紫九牛中pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷、大黄素4个定量指标的准确性，本研究首先对其线性关系及范围、精密度、重复性、稳定性、加样回收率等进行了方法学考察，在确定各指标符合要求的情况下，继续考察不同流速、柱温、色谱柱以及不同仪器对各化学成分$f_{i/s}$的影响。结果发现，不同因素的改变对各化学成分$f_{i/s}$的影响较小，表明该方法具有较好的耐用性。同时，本研究对4种化学成分在紫九牛药材中的存在性进行了定性分析，以确证pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷、欧鼠李苷、大黄素存在于紫九牛药材中，并分别考察了在不同品牌HPLC仪、色谱柱条件下R的变化，结果显示R的变化较小；此外，本研究还对10批紫九牛药材中上述4种化学成分的色谱峰进行了定位，结果显示定位效果较好。上述内容确保了本研究中QAMS法的适用性和可行性。

综上所述，本研究从瑶药紫九牛中提取分离得到了大黄素、pleuropyrone A、大黄素-8-*O*-β-D-葡萄糖苷、欧

鼠李苷A 4种化学成分（其中后3种化学成分均为首次从该药材中分离得到），并以大黄素为内参物，采用QAMS法对紫九牛中上述4种化学成分进行了含量测定，同时与ESM所得结果进行了比较，结果显示2种方法的含量测定结果无明显差异。这表明所建立的HPLC-QAMS法稳定、可靠，可用于紫九牛中4种化学成分的含量测定和该药材的质量控制。

参考文献

[1] 刘纤纤，梁晓莲，李文莉，等. 民族药红穿破石的研究现状[J]. 湖北农业科学，2021，60(16)：5-8.
LIU Q Q，LIANG X L，LI W L，et al. Research status of ethnic drug *Ventilago leiocarpa* Benth.[J]. Hubei Agric Sci，2021，60(16)：5-8.

[2] 胡筱希，陆国寿，黄周锋，等. 瑶药翼核果中翼核果素和翼核果醌-Ⅰ的含量测定及抗氧化活性研究[J]. 中国现代应用药学，2019，36(7)：820-823.
HU X X，LU G S，HUANG Z F，et al. Determination and evaluation on anti-oxidant activity of ventilagolin and ventiloquinone-Ⅰ in *Ventilago leiocarpa* Benth.[J]. Chin J Mod Appl Pharm，2019，36(7)：820-823.

[3] 胡筱希，黄周锋，陆国寿，等. 响应曲面法优化翼核果中翼核果素及翼核果醌-Ⅰ的提取工艺[J]. 现代中药研究与实践，2019，33(1)：58-62.
HU X X，HUANG Z F，LU G S，et al. Optimization of ultrasonic extraction of ventilagolin and ventiloquinone-Ⅰ from *Ventilago leiocarpa* Benth. by response surface methodology[J]. Res Pract Chin Med，2019，33(1)：58-62.

[4] 黄建猷，胡筱希，黄周锋，等. 基于化学模式识别法的翼核果指纹图谱及抗氧化活性研究[J]. 中草药，2021，52(16)：5021-5027.
HUANG J Y，HU X X，HUANG Z F，et al. Chromatographic fingerprints and antioxidant activity of *Ventilago leiocarpa* based on chemical pattern recognition[J]. Chin Tradit Herb Drugs，2021，52(16)：5021-5027.

[5] 王佳佳，李希，冯建安，等. HPLC指纹图谱结合一测多评法控制马齿苋药材质量[J]. 中国药房，2023，34(9)：1081-1085.
WANG J J，LI X，FENG J A，et al. Quality control of *Portulaca oleracea* by HPLC fingerprint combined with quantitative analysis of multi-components by single-marker[J]. China Pharm，2023，34(9)：1081-1085.

[6] FRANCIS G W，AKSNES D W，HOLT. Assignment of the ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra of anthraquinone glycosides from *Rhamnus frangula*[J]. Magn Reson Chem，1998，36(10)：769-772.

[7] MIN B S，LEE J P，NA M K，et al. A new naphthopyrone from the root of *Pleuropterus ciliinervis*[J]. Chem Pharm Bull 2003，51(11)：1322-1324.

[8] 魏喜芹，魏世杰，马研妮. 一测多评法测定决明子中蒽醌苷元类和萘并吡喃酮苷类有效成分含量[J]. 中国生化药物杂志，2016，36(4)：189-192.
WEI X Q，WEI S J，MA Y N. Determination of naphthopyrone glycosides and anthraquinone aglycone in *Cassia tora* L. by quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Chin J Biochem Pharm，2016，36(4)：189-192.

[9] 王延海，张雷明，冯艳艳. 大黄素改善高糖条件中人肾小球血管内皮细胞炎症、氧化应激及凋亡作用的研究[J]. 中国临床药理学杂志，2023，9(10)：1422-1426.
WANG Y H，ZHANG L M，FENG Y Y. Effect of emodin on improving the inflammation，oxidative stress and apoptosis of human glomerular endothelial cells in high glucose conditions[J]. Chin J Clin Pharmacol，2023，9(10)：1422-1426.

[10] 陈浪，余武汉，陈海乐，等. 大黄素对肺部炎症性疾病的保护作用[J]. 生命的化学，2023，43(3)：428-434.
CHEN L，YU W H，CHEN H L，et al. Protective effect of emodin on lung inflammatory diseases[J]. Chem Life，2023，43(3)：428-434.

[11] 李轶群，梁桓熙，刘长振，等. 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷抑制肿瘤细胞迁移和转移的体内外实验研究[J]. 中国药物警戒，2019，16(12)：705-710.
LI Y Q，LIANG H X，LIU C Z，et al. Effects of emodin-8-O-β-D-glucopyranoside on tumor cell migration and metastasis *in vitro* and *in vivo*[J]. Chin J Pharmacovigil，2019，16(12)：705-710.

[12] 陈祎凡，皮佩仙，李继蕾，等. 大黄蒽醌类有效成分抗肿瘤作用研究进展[J]. 中成药，2022，44(11)：3587-3595.
CHEN Y F，PI P X，LI J L，et al. Research progress on anti-tumor effects of anthraquinones from *Rheum palmatum*[J]. Chin Tradit Pat Med，2022，44(11)：3587-3595.

[13] 周佳宁，肖倩，黎芳，等. 基于PI3K/AKT/mTOR信号通路研究瑶药紫九牛醇提物抗小鼠肝纤维化作用[J]. 中药材，2022，45(6)：1486-1490.
ZHOU J N，XIAO Q，LI F，et al. Study on the anti-hepatic fibrotic effect of Yao medicine *Ardisia japonica* alcohol extract in mice based on the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. J Chin Med Mater，2022，45(6)：1486-1490.

（收稿日期：2023-07-05　修回日期：2024-02-19）
（编辑：胡晓霖）