

## 虎杖 HPLC 指纹图谱研究与应用

李宇翔<sup>1</sup>, 王丽<sup>2</sup>, 唐书明<sup>2</sup>, 李清禄<sup>2\*</sup>

(1. 福建农林大学食品科学学院, 福州 350002; 2. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002)

[摘要] 目的: 研究中药材虎杖的指纹图谱, 并对虎杖苷、白藜芦醇及大黄素进行含量测定, 为科学评价及有效控制虎杖质量提供了新的方法。方法: 利用反相高效液相色谱法分析了 10 个不同产地的虎杖样品, 采用国家食品药品监督管理局推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”计算处理, 建立了由 13 个共有峰组成的虎杖指纹图谱, 确定了虎杖苷、白藜芦醇及大黄素 3 个主要的指纹峰。结果: 试验方法样品处理简单, 建立的虎杖指纹图谱稳定性、重复性好, 可以用来区别不同产地虎杖药材的优劣, 为控制虎杖的质量参考提供依据。

[关键词] 液相色谱; 指纹图谱; 虎杖; 质量控制

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0078-02

## Study on Chromatography Fingerprint of Polygonum Cuspidate by HPLC

LI Yu-xiang<sup>1</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, TANG Shu-ming<sup>2</sup>, LI Qing-lu<sup>2\*</sup>

(1. College of Food Science, Fujian University of Agriculture and Forestry, Fuzhou 350002, China;

2. College of Life Sciences, Fujian University of Agriculture and Forestry, Fuzhou 350002, China)

**[Abstract] Objective:** The chromatographic fingerprint of Polygonum Cuspidate was established and the content of polydatin, resveratrol and emodin was measured, which created a new method for evaluating and controlling the quality of Polygonum Cuspidate. **Method:** Using the Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version2004A) recommended by State Food & Drug Administration, 10 different original samples were analyzed and the chromatographic fingerprint of Polygonum cuspidate was constructed with 13 common fingerprint peaks, among which three main fingerprint peaks of polydatin, resveratrol and emodin were identified by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). **Result:** With the simple sample treating technique, the established fingerprint of Polygonum Cuspidate was stable and repeatable, which could be used to distinguish the superior polygonum cuspidate from the inferior polygonum cuspidate from different places and provide an important tool for further quality control of Polygonum Cuspidate.

**[Key words]** liquid chromatography (LC); fingerprint Chromatography; Polygonum cuspidate; quality control

虎杖为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根和根茎, 主要有效成分为蒽醌类和芪类化合物<sup>[1]</sup>。主产于江苏、浙江、安徽、四川、云南等省<sup>[2]</sup>。《中国药典》2005 版对虎杖的质量控制有性状、鉴别、虎杖苷和大黄素含量测定等。目前有文献报道用 HPLC 法测定虎杖中有效成分虎杖

苷、白藜芦醇和大黄素的量<sup>[3-5]</sup>, 或是用 HPLC 研究不同产地虎杖药材指纹图谱<sup>[6-7]</sup>。但未见到指纹图谱与药材质量控制相结合的应用研究。为了全面了解不同产地虎杖药材的质量, 确定虎杖药材质量标准的评价指标, 本文采用 HPLC 研究<sup>[8]</sup>了 10 个不同产地虎杖药材的指纹图谱, 用虎杖有效主成分虎杖苷、白藜芦醇和大黄素对指纹图谱峰进行了定位, 并确定了它们的含量范围, 提供了一个可量化的用于全面衡量和评价虎杖药材质量的参考依据。

[收稿日期] 20100111(008)

[通讯作者] \* 李清禄, E-mail: lql3388@126.com

## 1 实验部分

**1.1 仪器与试剂** 仪器: Agilent 1100 高效液相色谱仪、Agilent HPLC 泵、Agilent 色谱工作站。试剂: 大黄素对照品(中国药品生物制品检定所, 纯度 99%)、虎杖苷对照品(中国药品生物制品检定所, 纯度 99%)、白藜芦醇对照品(中国药品生物制品检定所, 纯度 99%)、乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯、分析纯)、水(超纯水)。虎杖药材共 10 个产地(1 - 山东, 2 - 江西, 3 - 浙江, 4 - 湖南, 5 - 湖北, 6 - 将乐, 7 - 龙岩, 8 - 莆田, 9 - 四川, 10 - 大别山。), 经福建中医学院王振登老师鉴定为蓼科植物虎杖 *P. cuspidatum* 的干燥根及根茎。

**1.2 色谱条件** Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相乙腈(A)和水(B); 洗脱程序为 0 ~10 min, 10% A-22% A 线性梯度; 10 ~15 min, 22% A-25% A 线性梯度; 15 ~15.01 min, 25% A-30% A 线性梯度; 15.01 ~20 min, 30% A-50% A 线性梯度; 20 ~25 min, 50% A 等度; 25 ~30 min, 50% A-100% A 线性梯度; 30 ~40 min, 100% A 等度; 流速 1.00 mL/min, 进样量 20 μL; 温度 30 ; 检测波长 287 nm。

**1.3 供试品溶液的制备** 称取虎杖药材粗粉 250 mg(过 40 目筛, 60 干燥至恒重), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 50 mL 甲醇, 称重, 超声处理 30 min, 自然冷却至室温, 称重并用甲醇补足所失质量, 0.45 μm 有机滤膜滤过 2 次, 滤液即为样品液, 置于 4 冰箱保存。

**1.4 对照品溶液的制备** 精密称取对照品虎杖苷、白藜芦醇和大黄素, 甲醇溶解定容。制成浓度分别为 0.504, 0.2 和 0.22 mg/mL 的对照品溶液。用甲醇稀释调配成不同质量浓度的对照品溶液。虎杖苷对照品溶液的浓度分别为: 0.050 4, 0.075 6, 0.100 8, 0.126, 0.151 2, 0.176 4 mg/mL; 白藜芦醇对照品溶液的浓度分别为: 0.005, 0.01, 0.02, 0.0, 0.04, 0.05 mg/mL; 大黄素对照品溶液的浓度分别为: 0.005 5, 0.011, 0.022, 0.033, 0.044, 0.055 mg/mL。

**1.5 各色谱峰相对保留时间和面积计算** 选定色谱图中第 5 号峰为参照峰, 令其保留时间和峰面积分别为 1, 其他各峰的保留时间和峰面积分别与参照峰的保留时间和峰面积相比, 比值作为各峰的相对保留时间(RT)和相对峰面积(RS)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 方法学考证

**2.1.1 精密度试验** 随机取 10 号样品(大别山虎杖药材)粉末, 精密称定, 按样品溶液制备方法制备, 连续进样 6 次, 结果各主要色谱的相对保留时间和其相对峰面积的 RSD 分别在 0.023% ~0.423% 和 0.024% ~1.067% 之间, 符合色谱指纹图谱要求, 精密度良好。

**2.1.2 稳定性试验** 随机取 10 号样品粉末, 精密称定, 按样品溶液制备方法制备, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36 h 检测指纹图谱, 结果各主要色谱的相对保留时间和其相对峰面积的 RSD 分别在 0.013% ~0.257% 和 0.013% ~0.603% 之间, 符合色谱指纹图谱要求, 稳定性良好。

**2.1.3 重复性试验** 随机取 10 号样品粉末 6 份, 精密称定, 按样品溶液制备方法制备、进样, 结果各主要色谱的相对保留时间和其相对峰面积的 RSD 分别在 0.109% ~0.818% 和 0.962% ~2.984% 之间, 符合色谱指纹图谱要求, 重复性良好。

**2.2 线性关系考察** 分别吸取虎杖苷、白藜芦醇和大黄素的不同质量浓度的溶液进样, 测定峰面积积分值, 以峰面积为纵坐标(Y), 以对照品浓度为横坐标(X)进行回归, 得到虎杖苷回归方程为  $Y = 4.05 \times 10^4 X + 4.39 \times 10^2$ ,  $r = 0.999 5$ , 线性范围 0.05 ~0.2 mg/mL; 白藜芦醇回归方程为  $Y = 1.70 \times 10^5 X - 2.13 \times 10^2$ ,  $r = 0.999 3$ , 线性范围 0.005 ~0.05 mg/mL; 大黄素回归方程为  $Y = 7.18 \times 10^4 X + 3.61$ ,  $r = 0.999 7$ , 线性范围 0.005 ~0.05 mg/mL。

**2.3 回收率试验** 称取已知质量分数的江西虎杖粉末 125 mg, 分别精密加入相当于 80%, 100% 和 120% 的虎杖苷、白藜芦醇、大黄素对照品各 2 份, 按“样品测定”项下的方法平行制备样品溶液, 测定并计算回收率, 结果虎杖苷、白藜芦醇和大黄素的回收率分别为 98.30%、98.56% 和 98.96%。

**2.4 虎杖指纹图谱的建立** 10 批虎杖药材按照同样方法制备供试品溶液, 分别进样, 进行了分析, 其色谱图见图 1。比较 10 个产地的虎杖药材, 确定了 13 个共有的指纹峰, 并通过对照品的保留时间和紫外光谱检测结果的比较, 确定了 3 个主要的指纹峰(图 1-b)。

**2.5 指纹图谱的相似度评价** 采用由国家药典委员会制定的中药色谱相似度评价系统 2004A 版软件

分析, 将全谱导入后, 经谱图处理, 随机设定大别山的药材图谱为参照谱, 多点校正将谱峰进行比较, 得到的相似度结果如表 1。从表中可以看出大别山与江西药材差别最大, 相似度为 0.869。10 个样品间相关性好, 相似度都在 0.91 以上, 但也有区别。

0.60%, 虎杖苷不得少于 0.15%。由表 2 可以看出, 10 个不同产地虎杖药材的虎杖苷质量分数均达到药典要求, 而大黄素的质量分数除将乐的低于药典要求外, 其余也均达到药典要求。

表 2 不同产地虎杖药材主要成分的质量分数 (均±s) /%

产地	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素	总和
大别山	3.24	0.44	0.90	4.57
山东	2.82	0.61	0.85	4.28
莆田	2.15	0.28	0.87	3.30
湖北	3.21	0.48	1.22	4.91
湖南	1.83	0.50	0.70	3.02
将乐	4.20	0.47	0.35	5.02
四川	2.10	0.49	1.51	4.10
浙江	3.15	0.76	1.09	5.01
龙岩	2.64	0.60	0.70	3.94
江西	2.69	0.80	1.55	5.04
平均含量	2.80	0.54	0.97	4.32

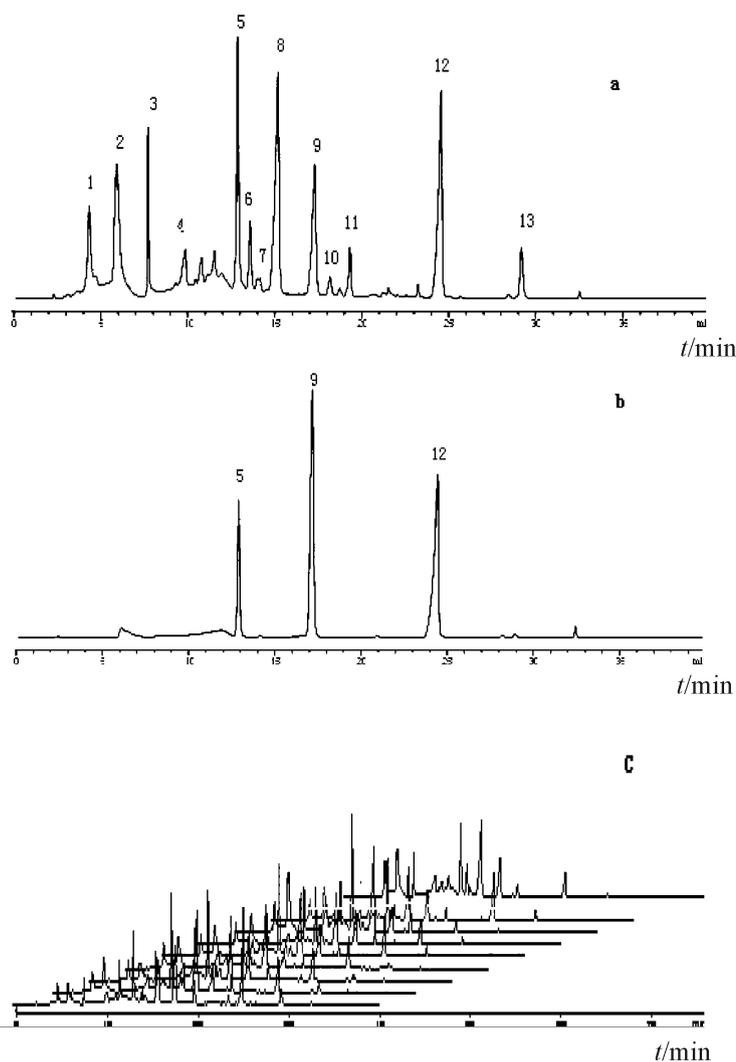


图 1 (a) 四川虎杖药材指纹图谱、(b) 对照品图谱、(c) 不同产地虎杖药材指纹图谱

表 1 不同产地虎杖药材的相似度分析 (均±s)

No.	相似度 <sup>1)</sup>	相似度 <sup>2)</sup>
1	0.961	0.963
2	0.869	0.931
3	0.939	0.986
4	0.934	0.991
5	0.928	0.982
6	0.897	0.952
7	0.925	0.970
8	0.914	0.961
9	0.912	0.973
10	1.000	0.960

注: <sup>1)</sup> 以 10 号样品为参照; <sup>2)</sup> 以 10 个样品的平均值为对照。

**2.6 主成分分析** 不同产地虎杖药材中虎杖苷、白藜芦醇和大黄素含量经分析结果如表 2。根据 2005 版药典要求: 按干燥品计, 含大黄素不得少于

其中山东、莆田、湖南、四川和将乐 3 种主成分和均低于平均质量分数, 说明质量较差。而湖北、江西、大别山、浙江、龙岩的虎杖药材质量较好。总体而言, 3 种成分在 10 个不同产地来源的药材中的含量虽有差异, 但不是十分悬殊。从质量分数测定结果总的趋势来看, 中部地区的 3 种成分的质量分数均高于其他地区, 表明药材的优劣与药材的产区关系密切。

### 3 结论

目前, 简单的测定一个或几个有效成分的质量分数为传统的传统的质量分析方法不能真正地反映中药材的质量, 也不能适应国内外对中药现代化越来越高的科学要求。因此, 建立全面、系统而又可以量化中药材的特征化学成分指纹图谱, 可以为中药材的质量评价和控制提供一个有效的参考方法。

本实验在虎杖的提取方法、提取溶剂和色谱条件上进行了大量的实验优化, 所建立的方法在精密度、重现性和稳定性方面完全符合指纹图谱研究的技术要求, 在回收率方面也完全符合质量分数测定的要求, 为虎杖质量控制提供了科学依据。当然, 由于采集时间的差异性、存放时间引起的化学成分变化等复杂因素对指纹图谱的影响还不能做出明确的结论, 有待进一步研究。