

虎杖多指标成分测定及质量控制方法研究

夏爱军¹, 张海², 贾静², 柴逸峰³, 张国庆²

1. 中国人民解放军第303医院, 广西 南宁 530021

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438

3. 第二军医大学药学院, 上海 200433

摘要: 目的 采用 HPLC-DAD 和 HPLC-TOF/MS 对虎杖中二苯乙烯类、蒽醌类和黄酮类等化合物进行快速分析, 将多指标成分的测定和明晰化指纹图谱共同应用于中药质量控制的研究模式中。方法 采用 Agilent SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 分别采用 HPLC-DAD 和 HPLC-TOF/MS 两种分析方法对虎杖中化学成分进行分离测定。结果 共从虎杖鉴别出中 2 个二苯乙烯类、10 个蒽醌类和 10 个黄酮类成分, HPLC-DAD 法可以同时测定虎杖药材中的虎杖苷、白藜芦醇和大黄素、大黄素甲醚。结论 采用 HPLC-DAD 和 HPLC-TOF/MS 对虎杖中二苯乙烯类、蒽醌类和黄酮类成分进行快速分析测定, 有效地控制虎杖的质量。

关键词: 虎杖药材; 二苯乙烯; 蒽醌; HPLC-DAD; HPLC-TOF/MS

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1761-05

Determination of multi-index components and quality control of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*

XIA Ai-jun¹, ZHANG Hai², JIA Jing², CHAI Yi-feng³, ZHANG Guo-qing²

1. Department of Pharmacy, No.303 Hospital of PLA, Nanning 530021, China

2. Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

3. College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Key words: *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*; stilbene; anthraquinone; HPLC-DAD; HPLC-TOF/MS

虎杖为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根和茎^[1], 其中主要的药效成分为二苯乙烯类、蒽醌类、萘醌类、甾醇类和黄酮类等, 具平肝潜阳、祛痰息风之功, 用于治疗肝阳上亢、高血压、头晕等症^[2-3]。HPLC-DAD 分离效率高、速度快、重现性好, 特别适用于具有紫外吸收的化学成分的分析鉴别, 现已成为中药研究的普遍方法。HPLC-TOF/MS 可准确测定化合物的相对分子质量, 通过计算 C、H、O 等原子的个数, 可得到待测物质的分子式, 从而可直接鉴定出各个色谱峰分别代表的化学成分^[4-10]。本实验采用 HPLC-DAD 和 HPLC-TOF/MS 两种分析技术对虎杖中黄酮类、蒽醌类、萘醌类、二苯乙烯类化学成分进行鉴别和测定, 建立快速、全面分析虎杖中化学成分的方法, 为虎杖的质量控制与药效研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

大黄素(批号 110654-200609)、大黄素甲醚(批号 110758-200509)、白藜芦醇(批号 111535-200301)、虎杖苷(批号 111575-200301)对照品购于中国药品生物制品检定所。虎杖药材购自上海雷允上药店, 经第二军医大学药学院生药教研室孙莲娜鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的根茎。乙腈和甲醇均为色谱纯, 水为纯净水, 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 包括在线脱气机、四元泵、高性能自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器; 安捷伦 6210 高分辨飞行时间质谱仪, 配有标准的电喷雾离子源 (ESI), 及 Masshunter 工作站和 Analyst QS 质谱分析软件(美国安捷伦公司);

收稿日期: 2011-01-12

作者简介: 夏爱军(1964—), 男, 江苏省镇江市人, 主任药师, 研究方向为中药质量控制。Tel: (0771)2870266 E-mail: xiaaijun_2010@yahoo.com.cn

SK2200H 超声发生器 (上海科导超声仪器公司); Mettler AE240 型十万分之一电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); DJ-04 药材粉碎机 (中药机械制造有限公司); DK-S12 型电热恒温水浴锅 (上海华连医疗器械有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 甲酸 (A) - 乙腈 (B) 梯度洗脱, 0 min, 5%B; 3 min, 10%B; 15 min, 30%B; 25 min, 45%B; 34 min, 70%B; 50 min, 95%B。进样量 5 μL; 进样前以流动相梯度初始条件平衡 10 min; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 225 nm; 运行时间 50 min。

2.2 质谱条件

采用 ESI 离子源, 正离子模式 (ESI⁺)。具体参数: 毛细管电压 4 000 V, 雾化气压力 0.206 7 MPa, 干燥气体积流量 9 L/min, 干燥气温度 350 °C, 碎片电压 180 V; 参比离子 *m/z* 922.009 798; 扫描范围 *m/z* 105~1 500。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚各适量于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 分别制成 19 720、970、1 070、1 290 μg/mL 对照品溶液。

再分别取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚对照品溶液于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇稀释并定容至刻度, 分别制成 2 465、48.50、53.50、32.35 μg/mL 混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

虎杖药材粗粉 0.3 g (过 40 目筛, 60 °C 干燥至恒定质量), 置锥形瓶中, 精密加 10 mL 甲醇和 100 μL NaOH, 称质量, 水浴超声处理 30 min, 放冷。再用甲醇补足质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5 指标性成分的测定

2.5.1 方法专属性考察 将混合对照品溶液和供试品溶液分别按“2.1”项色谱条件进样, 测定, 色谱图见图 1。

2.5.2 标准曲线、最低检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别吸取 6 个质量浓度的对照品溶液 10 μL, 其中虎杖苷 98.60、131.5、197.2、394.4、986.0、1 972 μg/mL; 白藜芦醇 1.940、3.990、7.980、39.90、199.5、399.0 μg/mL; 大黄素 10.70、26.75、53.50、

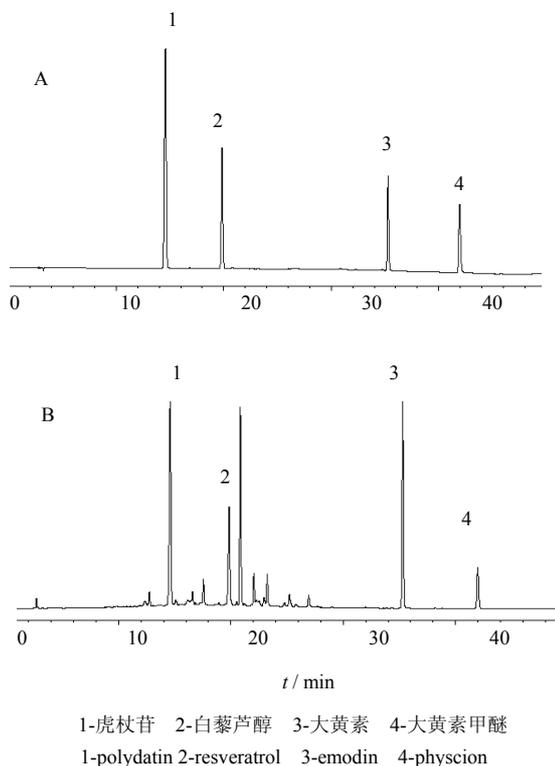


图 1 混合对照品溶液 (A) 和虎杖药材样品溶液 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of four mixed reference solutions (A) and sample solution (B)

107.0、267.5、535.0 μg/mL; 大黄素甲醚 1.290、3.236、16.18、32.36、80.90、161.8 μg/mL, 注入 HPLC 分析, DAD 检测器检测, 以各对照品溶液的质量浓度为横坐标, 以各成分色谱峰面积为纵坐标, 计算 4 个成分的线性回归方程; 将对照品溶液加甲醇依次逐级稀释, 以信噪比 3:1 确定为 LOD, 以信噪比 10:1 确定为 LOQ, 结果见表 1。结果表明 4 个成分在相应的线性范围内呈良好的线性关系。

2.5.3 精密度试验 分别精密吸取低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液, 其中虎杖苷 98.60、394.4、1 972 μg/mL; 白藜芦醇 1.940、39.90、399.0 μg/mL; 大黄素 10.70、53.50、535.0 μg/mL; 大黄素甲醚 1.290、16.18、161.8 μg/mL。按“2.1 项”色谱条件于 1 d 内连续进样 3 次, 以及连续 3 d 分别进样, 计算各成分质量浓度的 RSD, 进行日内精密度和日间精密度考察, 结果测定的 RSD 均小于 2%。

2.5.4 稳定性试验 取虎杖供试品溶液称定, 分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的峰面积, 计算得 RSD 分别为 0.47%、0.30%、0.72%、1.09%, 4 个成分峰

表 1 4 个成分的线性回归方程及 LOD 和 LOQ

Table 1 Linear regression equation, LOD, and LOQ of four chemical constituents

对照品	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r	LOD/ng	LOQ/ng
虎杖苷	$Y=1.0664X-77.996$	98.60~1972	0.9998	164.3	328.70
白藜芦醇	$Y=26.535X+44.358$	1.940~399.0	0.9997	6.47	27.71
大黄素	$Y=26.435X+114.92$	10.70~535.0	0.9999	26.75	71.33
大黄素甲醚	$Y=29.971X+21.918$	1.29~161.8	0.9991	6.45	25.80

面积的 RSD 均小于 2%，表明各成分在 24 h 内稳定。

2.5.5 重现性试验 取虎杖药材粉末 5 份，各约 0.3 g，精密称定，按照“2.4”项方法制备供试品溶液。测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的质量分数分别为 183.16、2.31、6.79、0.62 mg/g，其 RSD 分别为 0.33%、0.27%、0.52%、1.78%，各成分保留时间与峰面积的 RSD 均小于 2%。

2.5.6 回收率试验 取同一虎杖药材粉末 9 份，各约 0.15 g，精密称定，分别精密加入 3 个质量浓度的对照品混合溶液，其中虎杖苷 197.2、394.4、986.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；白藜芦醇 3.990、39.90、199.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；大黄素 26.75、53.50、267.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；大黄素甲醚 3.236、16.18、80.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，每个质量浓度 3 份，测定其回收率。虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的回收率分别为 98.52%、99.72%、101.2%、99.33%，RSD 分别为 0.43%、0.95%、1.27%、1.88%。

2.5.7 样品测定 精密称取虎杖药材粉末 0.3 g，制备供试品溶液，平行进样 3 次，计算平均质量分数及其 RSD。结果虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的质量分数分别为 183.30、2.31、6.80、0.62 mg/g；RSD 值分别为 0.36%、0.31%、0.59%、1.91%。

2.6 HPLC-TOF/MS 定性检测

根据虎杖化学成分的相关研究文献，收集到虎杖药材中二苯乙烯类、蒽醌类、萘醌类和黄酮类等化学成分，根据化合物名称、分子式、精确相对质量等信息，建立 HPLC-TOF/MS 在线获取的化合物离子的精确质荷比，比对自建的化学成分数据库，可对虎杖药材中相应的虎杖药材化学成分进行初步鉴别，利用 Agilent Qualitative Analysis 数据分析软件的计算工具 (calculator) 对所鉴别化合物进行验证。所得虎杖药材样品溶液的 HPLC-TOF/MS 总离子流图，见图 2，结果见表 2。

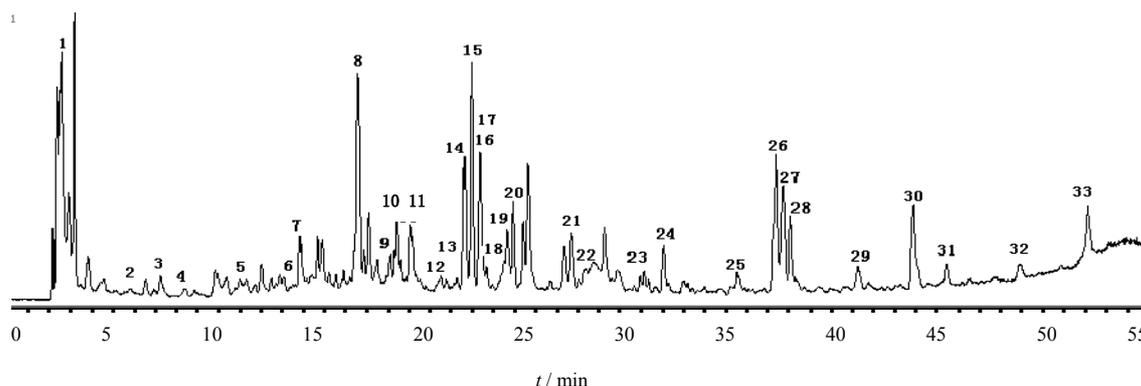


图 2 虎杖药材样品溶液的 HPLC-TOF/MS 总离子流图

Fig. 2 HPLC-TOF/MS TIC chromatogram of sample solution of *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*

3 讨论

3.1 流动相的选择

本实验采用了 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B) 梯度洗脱的方法，实现了虎杖药材中化学成分的快速分离，所建立的方法在 55 min 内能够同时测定虎杖药材中 4 个化学成分的量。

3.2 虎杖药材中化学成分的 TOF/MS 分析

通过自建虎杖药材的化学成分数据库，利用在

TOF/MS 上得到的化合物的精确质量数，与数据库中已知化合物的理论相对分子质量对比，可对虎杖药材中化学成分进行快速分析，利用 Agilent Qualitative Analysis 数据分析软件的 Calculator 计算工具对化学成份进行二次验证后，可对化学成分进行明晰化鉴别，共鉴别出虎杖药材中 24 个成分。

4 结论

本实验在系统考察了色谱、质谱条件和样品前

表 2 虎杖药材中化学成分的 HPLC-TOF/MS 鉴别结果

Table 2 HPLC-TOF/MS identification of chemical constituents in *Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix*

峰号	化合物	保留时间/min	M+X	<i>m/z</i> 实验值	<i>m/z</i> 计算值	误差值×10 ⁻⁶
1	儿茶素	2.382	M+H	290.079 3	290.079 0	0.902 57
2	它乔糖苷	5.933	M+Na	325.089 4	325.089 9	-1.651 34
3	1-β-O-β-D-吡喃葡萄糖基-4,5-二羟基-苯基-乙酮	7.309	M+Na	353.084 2	353.084 9	-1.845 04
4	5,7-羟基-1(3H)-异苯并呋喃酮	8.396	M+H	167.034 1	167.034 4	-1.997 87
5	山柰酚	10.939	M+H	355.103 5	355.102 9	1.669 35
6	木犀草素-7-葡萄糖苷	13.643	M+H	463.123 9	463.124 0	-0.294 91
7	儿茶精/儿茶酚	13.819	M+H	291.087 6	291.086 9	2.531 15
8	虎杖苷	16.554	M+Na	413.120 8	413.121 2	-1.057 71
9	没食子酸	18.393	M+H	171.029 4	171.029 3	0.302 08
10	槲皮素-3-鼠李糖苷	18.889	M+H	449.108 2	449.108 4	-0.415 31
11	大黄酚	19.257	M+H	255.064 6	255.065 7	-4.445 29
12	(+)-儿茶素-5-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	20.505	M+H	468.126 3	468.126 8	-1.017 32
13	2,5-二甲基-7-羟基色原酮	20.776	M+H	191.070 3	191.070 8	-2.717 42
14	白藜芦醇	21.624	M+H	229.085 4	229.086 5	-4.667 60
15	决明松-8-O-D-葡萄糖糖苷	21.912	M+Na	431.132 6	431.131 8	1.851 76
16	大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	22.296	M+Na	455.095 6	455.095 4	0.404 00
17	大黄素	22.312	M+H	271.061 4	271.060 6	2.772 58
18	7-羟基-4-甲氧基-5-甲基香豆精	22.632	M+H	207.065 2	207.065 7	-2.578 13
19	大黄素甲醚/大黄素-8-甲醚	24.615	M+H	285.076 9	285.076 3	2.109 86
20	大黄素-6-甲醚-8-β-D-葡萄糖苷	24.631	M+Na	469.110 9	469.111 1	-0.354 30
21	决明松-8-O-(6'-乙酰基)葡萄糖苷	26.998	M+Na	473.142 4	473.142 4	0.071 15
22	6-羟基芦荟大黄素	27.366	M+H	287.056 1	287.055 6	1.870 42
23	大黄素甲醚-8-O-(6'-乙酰基)葡萄糖苷	29.910	M+Na	511.122 2	511.121 6	1.113 45
24	迷人醇/6-羟基芦荟大黄素-8-甲醚	31.589	M+H	301.071 3	301.071 2	0.288 47
25	未知成分	34.452	—	304.300 3	—	—
26	未知成分	36.372	—	283.097 9	—	—
27	未知成分	36.675	—	247.098	—	—
28	未知成分	37.043	—	337.105 9	—	—
29	未知成分	40.210	—	319.130 6	—	—
30	未知成分	42.786	—	285.077 8	—	—
31	未知成分	44.433	—	317.115 1	—	—
32	未知成分	47.968	—	377.266 3	—	—
33	未知成分	51.103	—	413.267 2	—	—
34	未知成分	54.110	—	413.267 1	—	—

处理方法的基础上,根据虎杖药材中化学成分的性
质特点,分别采用 HPLC-DAD 法和 HPLC-MS 法同
时测定虎杖中 2 个二苯乙烯类成分和 2 个蒽醌类成
分的量;采用 HPLC-TOF/MS 对虎杖药材中其他化
学成分进行了明晰化分析,共鉴别出虎杖药材中 24
个化学成分;综合定量和定性测定两方面,对虎杖
药材的质量进行综合评价,建立能够全面控制虎杖
药材质量的方法与模式。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 李世学, 刘建利, 张楠, 等. 处理方法对虎杖不同部
位白藜芦醇和虎杖苷量的影响 [J]. 中草药, 2009,
40(3): 469-471.
- [3] 饶又启, 阮金兰, 周道年, 等. 高效液相色谱法测定虎杖
中白藜芦醇的含量 [J]. 医药导报, 2008, 27(6): 715-716.
- [4] 董静, 王弘, 万乐人, 等. 高效液相色谱/电喷雾-
离子阱-飞行时间质谱分析鉴定中药虎杖中的主要化
学成分 [J]. 色谱, 2009, 27(4): 425-430.
- [5] 王云霞, 王梅. 乙肝清热解毒胶囊中虎杖苷的含量
测定 [J]. 现代中医, 2008, 28(4): 65-66.
- [6] 石心红, 徐德然. HPLC-MS3 法分析准噶尔大戟叶有
效部位的化学成分 [J]. 中草药, 2010, 41(9):
1435-1437.
- [7] 彭娟, 马辰. 对中国药典 2005 版虎杖中大黄素测
定方法的商榷与改进 [J]. 北京中医, 2007, 26(4):
234-237.
- [8] 李育川, 郭巧生, 房海灵, 等. 小桐子果壳抑菌活性部
位的分离及其 HPLC-MS 分析 [J]. 中草药, 2010,
41(9): 1445-1448.
- [9] 伍晓春, 陆豫. HPLC 法测定虎杖中主要蒽醌的含量
[J]. 中医药学刊, 2005, 23(9): 1644-1645.
- [10] 潘莹, 江海燕, 黄拓, 等. 虎杖不同酒制品大黄素
及大黄酸含量比较 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10):
2375-2376.

《华西药理学杂志》2012 年征订与征稿启事

《华西药理学杂志》是由教育部主管,四川大学和四川省药学会联合主办的药理学类综合性学术刊物。国内外公开发行, CN 51-1218/R, ISSN 1006-0103。

本刊于 1988 年至今被中国科技情报研究中心作为科技论文期刊源期刊; 1993 年起被美国《化学文摘》(CA) 收录并进入千刊表, 被俄罗斯《文摘杂志》及英国皇家化学学会系类数据库收录; 被《中国药理学文摘》《医学文摘》、《中国生物学文摘》等摘录; 入选中国期刊方阵双效期刊; 为药理学类中文核心期刊。

主要内容有药物化学、天然药物化学、中药学、药剂学和生物药剂学、临床药理学、药理与毒理、药物分析、生化药物、药事管理、药理学教育及部分边缘学科。同时, 还报道国内外药理学领域的最新研究成果、动向及信息。欢迎从事药物研究的科学工作者、医药院校师生、工程技术人员、医师、药师和药事管理干部及其它药理学工作者订阅和投稿。

投稿时请将投稿打印件、单位介绍信和 50 元审稿费一起寄往编辑部。请在稿件上注明详细通讯地址、联系手机及电子邮箱。编辑部收到这三样后, 文章才能尽快进入审稿程序。本刊为双月刊, 大 16 开, 100 个版面, 每期定价 10 元。可到当地邮局办理订购手续, 邮发代号 62-79; 也可直接汇款到编辑部订购, 全年订价 60 元。为准确投递, 务请工整书写详细地址、姓名和邮编。

电话: 028-85501400 E-mail: hxyxzz@scu.edu.cn 网址: <http://www.sbcpa.org.cn>

地址: 成都市武侯区人民南路 3 段 17 号华西药理学杂志编辑部 (610041)