

中药虎杖特征指纹图谱研究

张明昶,彭小冰,苗旭辉,邵进明*

(贵阳中医学院,贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的:建立虎杖药材 HPLC 指纹图谱研究方法,为虎杖的质量控制提供依据。方法:色谱柱为 DIKMA C₁₈ (4.6 mm×200 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液线性梯度洗脱,流速为 1.0 mL·min⁻¹,柱温为 30 ℃,检测波长为 303 nm。结果:测定 13 批虎杖药材有 13 个共有峰,各共有峰面积之和大于总峰面积的 90%,13 批虎杖药材相似度评价结果均大于 0.9。结论:建立的虎杖药材 HPLC 指纹图谱,可较全面的反映虎杖药材中化学成分的信息,为虎杖药材的质量控制提供了科学实验依据。

[关键词] 虎杖;高效液相色谱;指纹图谱;质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)01-0053-03

Study of Chromatographic Fingerprint of Polygonum Herbs

ZHANG Ming-chang, PEN Xiao-bing, MIAO Xu-hui, SHAO Jin-ming*

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for studying HPLC chromatographic fingerprint of *Polygonum cuspidate*, and to control the quality of *P. cuspidate*. **Method:** The DIKMA-C₁₈ (4.6 mm×200 mm, 5 μm) column was used. The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid of water solution with gradient elution of linear, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was set at 303 nm. **Result:** Thirteen batches samples of *P. cuspidate* were analyzed and the chromatographic fingerprint was constructed with 13 common fingerprint peaks, whose area is larger than 90% of the total peak area. The similarity evaluation of 13 batches samples of *P. cuspidate* was more than 0.9. **Conclusion:** The HPLC chromatographic fingerprint of *P. cuspidate* can express the chemical information completely and provide a scientific basis for controlling the quality of *P. cuspidate*.

[Key words] *Polygonum cuspidate*; HPLC; chromatographic fingerprint; quality control

虎杖为蓼科多年生草本植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的根及根茎,是使用悠久的常用中药之一,具有祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰等功效,用于关节痹痛、跌扑损伤等疾病^[1]。本实验根据国家食品药品监督管理局对注射剂中中药材指纹图谱研究的技术要求,采用 HPLC 法对 13 批虎杖药材进行指纹图谱研究,并采用中国药典委员会推荐使用的“中药色谱指纹图谱相似度评价软件

(2004A) 进行相似度评价,建立了虎杖药材的 HPLC 指纹图谱分析方法。

1 材料

1.1 仪器 日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, UVD 检测器等; AG135 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); CSF-4B 超声波清洗仪(上海超声波仪器厂); 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A、B 版(中国药典委员会,以下简称指纹图谱软件)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈为色谱纯;水为重蒸水;其余试剂均为分析纯。

1.3 样品 虎杖药材购于四川广安,陕西大荔,安徽金寨,甘肃武威,湖南湘西,云南怒江,贵州贵定、

[收稿日期] 2010-06-18

[基金项目] 贵阳中医学院青年基金项目(2008010)

[通讯作者] * 邵进明, Tel: 13765151608. E-mail: jinmingshao@126.com

余庆、遵义、兴义、赤水、仁怀、都匀,经贵阳中医学院何顺志教授准确鉴定为蓼科植物虎杖 *P. cuspidatum* Sieb. et Zucc.,干燥,粉碎过三号筛,置干燥器中备用。白藜芦醇对照品(批号 111535-200502),虎杖苷对照品(批号 111575-200502),大黄素对照品(批号 110756-200110),大黄素甲醚对照品(批号 110758-200610),以上对照品均购于中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 DIKMA C_{18} (4.6 mm × 200 mm, 5 μ m);流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹;检测波长 303 nm;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L。流动相梯度见表 1。

表 1 流动相比梯度洗脱变化

时间/min	0.1% 磷酸 / %	乙腈 / %
0	85	15
15	80	20
25	70	30
40	50	50
41	20	80
51	20	80
52	85	15

2.2 对照品溶液的制备 分别取大黄素、大黄素甲醚、虎杖苷、白藜芦醇对照品适量,精密称定,加 85% 甲醇溶解,分别制成 0.2 g·L⁻¹ 的对照溶液,即得对照品溶液^[2]。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取虎杖药材粉末(过 60 目筛)0.1 g,置于具塞锥形瓶中,加入 30 mL 甲醇,冷浸过夜(12 h),超声提取 30 min,滤过,用少量甲醇洗涤,合并滤液,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 10 mL 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取陕西大荔同一批次供试品溶液按上述色谱条件,连续进样 6 次,考察色谱峰相似度的一致性,用指纹图谱软件计算,结果相似度大于 0.9,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取陕西大荔同一批次供试品溶液按上述色谱条件,连续进样 6 次,考察色谱峰相似度的一致性,用指纹图谱软件计算,结果相似度大于 0.9,表明实验重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取陕西大荔同一批次供试品溶液按上述色谱条件分别在 0, 3, 6, 9, 12 h 进行测试,用指纹图谱软件计算,结果相似度大于 0.9,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.5 样品测定 分别取 13 个批次不同产地的虎杖药材样品,按上述供试品溶液制备方法制备供试液,照上述色谱条件分别测定,记录其 HPLC 色谱图。

2.6 指纹图谱及技术参数

2.6.1 指纹图谱的建立 根据 13 批次供试品溶液测定结果所给出的峰数、峰值(积分值)和峰位(相对保留时间)等相关参数,进行分析比较,选择虎杖供试品溶液(四川广安虎杖)色谱图作为相似度计算时的校正参照图谱,时间窗宽度 0.50。采用多点校正方式生成指纹图谱^[3]。本品色谱图中色谱峰在 0~60 min 内分布均匀,为保证不同批次虎杖药材提取物指纹图谱匹配时校正时间的准确性,选择了 4 个主要成分的峰作为校正的 Mark 峰。不同批次虎杖提取物供试品的色谱叠加图见图 1。

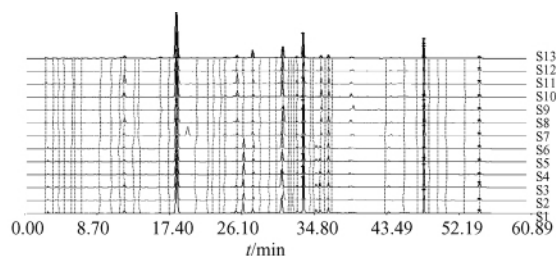


图 1 13 批虎杖药材提取物供试品 HPLC 指纹图谱叠加
s₁. 四川广安; s₂. 贵州都匀; s₃. 陕西大荔; s₄. 安徽金寨;
s₅. 甘肃武威; s₆. 湖南湘西; s₇. 云南怒江; s₈. 贵州贵定;
s₉. 贵州余庆; s₁₀. 贵州遵义; s₁₁. 贵州兴义; s₁₂. 贵州赤水;
s₁₃. 贵州仁怀

2.6.2 对照图谱生成 采用中位数算法,由 13 批虎杖提取物供试品色谱图生成对照指纹图谱,建立共有模式。见图 2。

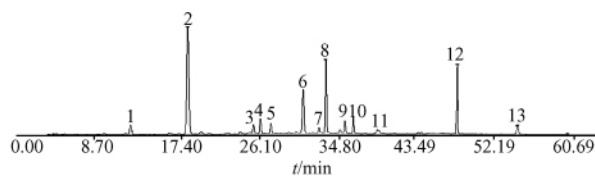


图 2 虎杖提取物 HPLC 对照指纹图谱

2.6.3 共有指纹峰的保留时间和峰面积 虎杖提取物经 HPLC 可分离出 70 多个色谱峰,经与白藜芦醇参照物对比以及比较所有测定记录的色谱图,选取其中 13 个峰作为指纹图谱的特征峰。其保留时间和峰面积值见表 2。

2.6.4 共有指纹峰面积比 2 号共有指纹峰(虎杖苷)峰面积超过总峰面积的 10%,占 32%,故以此为参照峰(S),计算其他 12 个共有指纹峰相对保留时间及峰面积比,见表 3。

2.6.5 相似度评价 将13批次虎杖提取物供试品 HPLC 测试数据导入指纹图谱软件,经选峰,设定匹配模板,以均值法生成对照指纹图谱,建立共有模式

(图2),测得各批次虎杖提取物供试品与共有模式间的相似度,结果均大于0.9,说明各产地虎杖有较好的相关性,相似度计算结果见表4。

表2 共有指纹峰保留时间(min)、峰面积

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
t_R	11.586	17.712	24.537	25.862	27.040	30.470	33.176	34.742	35.191	36.198	43.570	47.829	54.221
A	383 605	5 296 631	77565	1 133 362	436 354	1591206	2663392	400 894	503 672	553 472	162 923	1 413 319	373 584

表3 共有指纹峰面积比

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
相对保留时间	0.654 1	1	1.385	1.460	1.527	1.720	1.873	1.961	1.987	2.044	2.460	2.700	3.061
峰面积比	0.072 4	1	0.014 6	0.021 4	0.082 4	0.300	0.503	0.075 7	0.095 1	0.104	0.030 8	0.267	0.070 5

表4 13批次虎杖提取物 HPLC 指纹图谱相似度

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	对照指纹图谱
相似度	0.983	0.975	0.982	0.951	0.976	0.986	0.939	0.985	0.929	0.981	0.989	0.984	0.978	1

2.6.6 色谱峰的确认 取上述各对照品溶液,按上述色谱条件进行测定,根据与虎杖提取物供试品 HPLC 色谱图对应色谱峰的保留时间比较,确认色谱峰。可知虎杖提取物 HPLC 对照指纹图谱中2号峰为虎杖苷,6号峰为白藜芦醇,12号峰为大黄素、13号峰为大黄素甲醚,见图3。

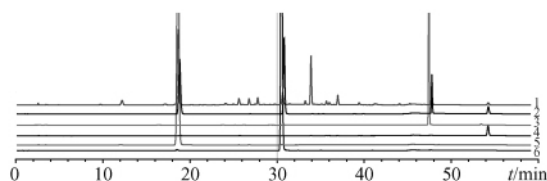


图3 虎杖提取物 HPLC 对照指纹图谱

1. 虎杖药材提取物;2. 混合对照品;3. 大黄素;
4. 大黄素甲醚;5. 虎杖苷;6. 白藜芦醇

2.6.7 指纹图谱专属性验证 由于大黄的化学成分与虎杖化学成分有相似之处,本实验选择大黄药材照上述供试品溶液制备方法制备大黄提取物,按上述实验条件检测,其 HPLC 测试数据导入指纹图谱软件,与虎杖药材对照指纹图谱进行相似度比较,结果为相似度小于0.5。说明本实验所建立的虎杖指纹图谱具有较强的专属性,可用于虎杖药材的质量控制。

3 讨论

3.1 供试品提取方法的选择 采用单因素考察及文献^[6]确定甲醇为提取溶剂时,提取效果较好,有效成分分离度较好,色谱图峰形较好。

3.2 色谱条件的选择 采用乙腈-水(18:82)梯度

洗脱^[4],分离度差,出峰少,且拖尾;乙腈-0.4%冰醋酸(18:82)梯度梯度洗脱时^[5],易拖尾,采用本实验的色谱条件,结果分离度较好,出峰数目较多。

综上所述,13批虎杖药材指纹图谱中主要色谱峰的整体图貌基本一致,各样品 HPLC 指纹图谱虽存在一定差异,但均具有相同的特征指纹峰,从相似度评价结果表明,不同产地的相似度计算结果均在0.9以上,相似度较高,说明地域性差异不明显。本试验所研究建立的虎杖药材的 HPLC 指纹图谱分析方法简便稳定,重现性好,能够较全面地反映中药材虎杖的内在质量,为虎杖药材质量的客观评价提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] 中国药典.一部[S].2005:145.
- [2] 马云桐.虎杖药材 HPLC 指纹图谱研究[J].中国中药杂志,2006,31(12):972.
- [3] 中国药典委员会. [M/CD] 中药色谱指纹图谱相似度评价系统的操作规范.2004.
- [4] 金雪梅,金光洙.虎杖的化学成分研究[J].中草药,2007,38(10):1446.
- [5] 肖凯,徐亚明.中药材质量标准研究[M].北京:医药科技出版社,2006:345.
- [6] 陈芳.虎杖中蒽醌类成分提取工艺优选[J].时珍国医国药,2007,18(1):114.

【责任编辑 顾雪竹】