

· 研究报告 ·

虎杖饮片指纹图谱的研究及其耐用性考察

蔺红伟, 朴淑娟, 江春霞, 李静娴, 陆文铨, 陈万生 (第二军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003)

[摘要] **目的** 为用数据识别虎杖饮片的真伪及评价其质量提供技术支持。**方法** 采用高效液相色谱(HPLC)法分析虎杖饮片提取物的指纹图谱, 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(A-B); 梯度洗脱; 检测波长 306 nm; 流速 1 ml/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μl。**结果** 成功分离出虎杖饮片提取液中的虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚等有效成分。**结论** 该方法稳定有效, 具有良好的耐用性, 对虎杖饮片的数据识别具有指导意义。

[关键词] 虎杖; 中药饮片; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 耐用性

[中图分类号] R93 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)02-0174-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.02.019

The fingerprint and durability study on various regions of *Polygonum cuspidatum*

LIN Hongwei, PIAO Shujuan, JIANG Chunxia, LI Jingxian, LU Wenquan, CHEN Wansheng (Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective** To study the fingerprint of *Polygonum cuspidatum* from various regions by HPLC and provide technical support for the identification. **Methods** HPLC conditions: the chromatographic column was Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); the mobile phase was 0.1% formic acid in water and acetonitrile (A-B); gradient elution; the detection wavelength was 306 nm; the flow rate was 1 ml/min; the column temperature was 30 °C; injection volume was 20 μl. **Results** The HPLC gradient conditions could effectively separate polydatin, resveratrol, emodin and emodin ether, etc. **Conclusion** This method is stable, effective and durable, which is instructive to the herbs data identification of *Polygonum cuspidatum*.

[Key words] *Polygonum cuspidatum*; Chinese herbal medicine; HPLC; fingerprint; durability

虎杖, 别名斑杖, 为蓼科植物虎杖 (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et. Zucc.) 的干燥根茎和根, 具有利湿退黄、清热解毒、散瘀止痛、止咳化痰等功效^[1]。主要产于江苏、浙江、江西、福建、山东、河南等我国中南部地区^[2]。虎杖药材中含有蒽醌类和芪类化合物, 主要为虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚^[3]。近年来, 人们发现虎杖药材不仅具有显著的抗细菌、抗真菌、抗病毒活性, 而且还能抵抗脂质过氧化, 具有抗突变与清除自由基的作用, 故有效提高虎杖饮片的识别技术, 对选取优质的虎杖饮片有重要意义。本实验对我国 10 个地区虎杖中药饮片进行高效液相色谱(HPLC)指纹图谱研究, 并对该方

法的耐用性进行了严苛的探究, 以保证其重现性, 旨在为虎杖饮片的鉴别提供科学有效的理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 型(美国 Agilent 公司), Agilent SB-ZOBAX C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 梅特勒-托利多 XA205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器上海有限公司); 上海 BRANSON SB2200 超声仪。

1.2 试剂 甲醇(德国默克公司, 603-001-00-X), 乙腈(德国默克公司, 608-001-00-3), 甲酸(中国国药集团, T20100802), 虎杖苷对照品(中国食品药品检定所, 111575-200502); 白藜芦醇对照品(111535-200502)、大黄素对照品(110756-200110)、大黄素甲醚对照品(110758-200408)均购自中国药品生物制品检定所; 注射用水为实验室自制。中药饮片选取炮制方法, 鲜根洗净泥土, 切成半分厚斜片, 洗净, 投入酒缸内浸 2~3 d, 捞入筐内, 滤干, 上盖湿布, 次日

[作者简介] 蔺红伟, 药师. 研究方向: 药物质量控制及临床药理. E-mail: lhwayxsh@163.com

[通讯作者] 陈万生, 主任药师. 研究方向: 中药配伍机制、药物相互作用及天然产物的生物合成与调控研究. Tel: (021)65307133; E-mail: chenws126@126.com

取出,切片晒干^[4]。饮片来源:对照药材(中国食品药品检定研究所,120980-201005),实验样品分别采自江西赣州宁都县、江西南昌(荣庆堂)、山西太原、湖南怀化、湖北十堰市房县、湖北亳州、安徽六安(白鹿堂)、安徽六安市霍山县(雷允上)和安徽宣城(一德世民)。

1.3 方法与色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液-乙腈(A-B);梯度洗脱;检测波长:306 nm;流速:1 ml/min;柱温30℃;进样量:20 μl。梯度洗脱程序见表1。

1.4 溶液的配制

表1 流动相梯度洗脱程序

时间 (t/min)	A (%)	B (%)
0	80	20
15	80	20
20	60	40
30	30	70
35	20	80

1.4.1 对照品溶液 分别精密称取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚对照品4.50、2.46、2.26和2.18 mg,置10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,即得对照品溶液。

1.4.2 供试品溶液 取本品粉末(过7号筛)约0.15 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 ml,称定重量,超声处理(功率300 W,频率40 kHz)30 min,取出,放冷,再称定重量,用甲醇补足损失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

上述对照品和供试品溶液在“1.3.1”色谱条件下进样,结果如图1所示。

2 指纹图谱及其技术参数

2.1 指纹图谱的建立 10个产地的虎杖中药饮片按“1.4.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样分析,通过比较对照品的保留时间和紫外光谱检测结果,确定了4个指纹峰(图2)。

2.2 相似度评价 将不同产地10批次虎杖中药饮片提取液的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,

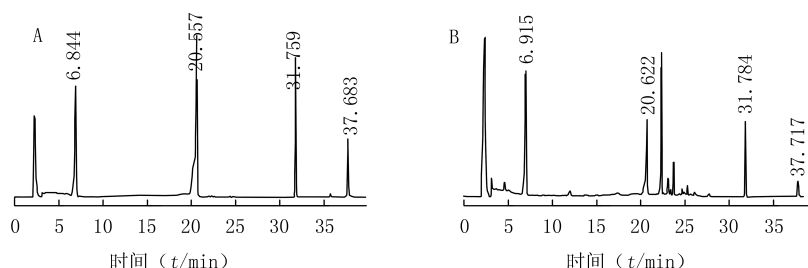


图1 虎杖饮片提取液 HPLC 指纹图谱

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液

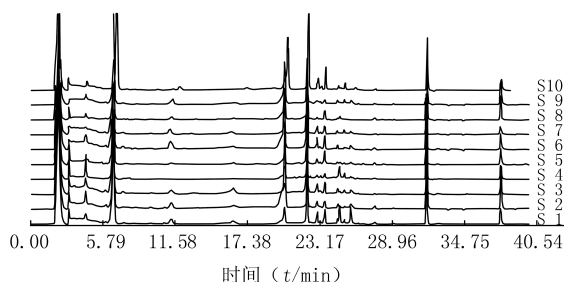


图2 10个产地虎杖中药饮片的指纹图谱

建立共有模式(图1A),测得各批次虎杖中药饮片提取液与共有模式间的相似度(表2)。从表2可以看出,S8和S10药材差别最大,其他8个样品间的相似度较高,都在0.9以上^[5]。

3 耐用性实验

耐用性系指当测定条件有微小变动时,测定结果不受其影响的承受程度。为使方法可为常规检验提供依据,《中华人民共和国药典》药品质量标准分析方法验证指导原则明确指出“开始研究分析方法时,就应考虑其耐用性。”笔者发现,只有个别文献的梯度条件可在5 μl进样量时重现,故本实验专门针对实验条件进行了耐用性研究,以期该色谱条件能够成为虎杖中药饮片经典的指纹图谱资料。

3.1 仪器、柱子的考察 按照国家药典委员会《中药分析方法验证指导原则实施细则》提出的要求,我们对3家不同制造商生产的不同品牌的色谱柱进行了考察。Agilent C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm,

柱号:588905-902), YMC C₁₈柱[4.6 mm×250 mm, 5 μm, 柱号:0425038912(w)], ZORBAX SB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 柱号:880975-902), 上述3种色谱柱均使用 Agilent 1200 高效液相色谱仪、G1311A 输液泵、手动进样器、G1316A 柱温箱、

G1315B-DAD 检测器、Chemstation 色谱工作站, 均获得较好结果(表3)。

3.2 进样量的考察 笔者分别尝试了20、10、5 μl 的进样量, 结果均可重现出完整的指纹图谱, 说明进样量的耐用性良好。

表2 10批虎杖饮片提取液相似度计算结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.939	0.989	0.967	0.993	0.983	0.988	0.879	0.967	0.716	0.989
S2	0.939	1.000	0.910	0.968	0.951	0.952	0.908	0.960	0.989	0.724	0.970
S3	0.989	0.910	1.000	0.958	0.989	0.980	0.996	0.822	0.941	0.730	0.980
S4	0.967	0.968	0.958	1.000	0.976	0.962	0.951	0.913	0.978	0.784	0.987
S5	0.993	0.951	0.989	0.976	1.000	0.987	0.987	0.882	0.974	0.740	0.994
S6	0.983	0.952	0.980	0.962	0.987	1.000	0.988	0.860	0.964	0.720	0.988
S7	0.988	0.908	0.996	0.951	0.987	0.988	1.000	0.812	0.939	0.722	0.978
S8	0.879	0.960	0.822	0.913	0.882	0.860	0.812	1.000	0.955	0.650	0.905
S9	0.967	0.989	0.941	0.978	0.974	0.964	0.939	0.955	1.000	0.729	0.985
S10	0.716	0.724	0.730	0.784	0.740	0.720	0.722	0.650	0.729	1.000	0.777
R	0.989	0.970	0.980	0.987	0.994	0.988	0.978	0.905	0.985	0.777	1.000

表3 不同色谱柱考察结果(n=3)

仪器	品牌及型号	出峰时间(t/min)	含量(%)
Agilent1200	Agilent C ₁₈	7.133	1.11
		22.671	0.18
		33.697	0.21
		45.291	0.27
Agilent1200	YMC C ₁₈	6.532	1.26
		20.005	0.19
		30.697	0.26
		36.911	0.32
Agilent1200	ZORBAX SB-C ₁₈	6.844	1.27
		20.567	0.20
		31.759	0.28
		37.683	0.31

3.3 高效液相色谱仪的更换 本实验使用 Agilent 1200 高效液相色谱仪, ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 柱号:880975-902), 可清晰完整地分析出高分离度的虎杖药材指纹图谱; 更换使用日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪检测, 同样可得到高分离度的虎杖指纹图谱, 说明变更仪器对实验结果影响不大。

3.4 柱温的变化 实验条件: Agilent 1200 高效液相色谱仪、G1311A 输液泵、手动进样器、G1316A 柱温箱、G1315B-DAD 检测器、Chemstation 色谱工作站、ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 柱号:880975-902), 在其他条件不变的情况下, 尝试柱温 25、30、35 °C, 结果表明, 柱温变化对结果影响

不大, 当柱温为 30 °C 时色谱显效最佳。

3.5 波长的微小变化 实验条件同“3.4”项, 在波长 305、308 nm 处测定, 均能得到较好的分离结果。

3.6 流动相的微小变化 实验条件同“3.4”项, 改变流动相的酸度, 尝试 0.15% 甲酸-乙腈和 0.10% 甲酸-0.10% 甲酸乙腈 2 种酸度, 均对结果无显著影响。

4 讨论

本实验采用 HPLC 法对不同地区的 10 批虎杖中药饮片进行了细致的指纹图谱研究, 在梯度摸索的过程中确定了虎杖饮片中的 4 种有效成分为虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚, 并以它们为标物判断指纹图谱的分离度, 最终确定实验条件。该洗脱梯度能够有效地将虎杖饮片提取液中的有效成分及特征峰分离开来, 分离度较好。

我们在现有虎杖指纹图谱研究论文的基础上, 主要对该方法的耐用性进行考察。通过查阅相关文献^[6-8], 依据文献提供的实验条件, 通过实验室的重复再现, 发现以下几方面问题: ①色谱分析柱对固有品牌的依赖度较高, 更换其他品牌则分离度很差^[6]; ②检测波长过于混乱, 所对应的检测波长下, 不同有效成分的响应值相差太大, 不利于定量分析和计算^[7,8]; ③可重复性不佳, 通过多方考察发现, 难以重现已发表文献的实验条件, 其原因主要与样品的

进药材保障实战化教学模式改革的有力举措。通过自行研制药材保障模拟训练器材与系统,搭建室内、室外2种训练环境,具备室内开展药材保障想定作业和药材保障指挥模拟训练,室外开展药材保障综合演练和参与卫勤演习的功能,基本满足了实践教学内容对信息化教学条件的需要,在教学训练中取得了较好的实际效果。

【参考文献】

- [1] 李捷玮,陈盛新.军队药材供应管理学(第二版)[M].上海:第二军医大学出版社,2012:1.
[2] 曾 璞,欧英立.院校实战化教学训练创新[J].国防科技,

2014,35(5):15-18.

- [3] 卢正升,李振东.信息化条件下后勤实战化训练保障的创新[J].国防,2015,(9):46-47.
[4] 吴计生,王红卫,朱卫锋.物流自动化实验教学平台研究与设计[J].实验技术与管理,2013,30(5):126-129.
[5] 张莹莹,黄 勤,郑 璐,等.物流工程专业教学模式的探索:构建协同教学平台[J].物流工程与管理,2009,31(12):130-132.
[6] 张明齐.云计算技术下物流专业教学平台方案设计研究[J].高等职业教育,2012,(9):45-46,51.
[7] 栾智鹏,舒丽芯,储文功,等.药材保障实战化教学演练的组织实施与体会[J].药学实践杂志,2015,33(6):570-572.

[收稿日期] 2015-10-10 [修回日期] 2016-01-04

[本文编辑] 顾文华

(上接第176页)

进样量关系密切,现有文献的进样量多为 $10\mu\text{l}$ ^[7,8],而当进样量为 $20\mu\text{l}$ 时几乎无法重现,文献方法的耐用性势必受到质疑。故本实验在可有效对虎杖中药饮片进行指纹图谱研究的基础上,提供一个耐用性相对良好的检测方法,以期对虎杖中药饮片的鉴别提供指导。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:194.
[2] 江苏新医学院.中药大词典[M].上海:上海科学技术出版社,1997:1329-1331.
[3] 肖 凯,宣利江,徐亚明,等.虎杖的化学成分研究[J].中药及

天然药物,2003,38(1):496-498.

- [4] 黄 拓,江海燕,卢忠朋,等.虎杖炮制的历史沿革及其饮片质量研究概况[J].中医药学刊,2005,23(9):1611.
[5] 笔雪艳,胡 畔,张胜波,等.用超高效液相色谱蒸发光散射检测桔梗流浸膏指纹图谱的研究[J].药学实践杂志,2015,33(2):153-155.
[6] 张明昶,彭小冰,苗旭辉,等.中药虎杖特征指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):53-55.
[7] 成守玲,廖彩霞,郑太华,等.虎杖药材的高效液相指纹图谱研究[J].世界中西医结合杂志,2014,9(2):165-168.
[8] 李 森,楼一层,杨 翰,等.复方虎杖高效液相色谱指纹图谱的研究[J].武汉植物学研究,2009,27(4):446-450.

[收稿日期] 2014-11-28 [修回日期] 2015-05-18

[本文编辑] 李睿旻