

一测多评法测定虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、 大黄素及大黄素甲醚的含量

范玲¹, 严冬^{1*}, 李爽¹, 马兴苗¹, 钱玉良², 刘志辉²

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的: 在建立虎杖中 4 种成分同步测定方法的基础上, 建立一测多评法的方法学考察模式, 验证该方法在虎杖中应用的可行性和技术适应性。方法: 以虎杖为研究对象, 建立大黄素与虎杖苷、白藜芦醇、大黄素甲醚的相对校正因子, 并用该校正因子进行虎杖苷、白藜芦醇、大黄素甲醚的含量计算, 实现一测多评; 同时采用外标法测定饮片虎杖苷、白藜芦醇、大黄素及大黄素甲醚的含量, 并比较计算值与实测值的差异。结果: 11 批虎杖饮片中 3 种成分含量的计算值与实测值的 RSD < 3%, 表明两者无显著差异。结论: 以虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚同步测定的一测多评法控制虎杖饮片的质量是可行的、准确的。

[关键词] 一测多评法; 相对校正因子; 虎杖; 虎杖苷; 白藜芦醇; 大黄素; 大黄素甲醚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0103-05

[doi] 10.11653/zgxyfjxzz2013070103

Simultaneous Quantitative Analysis of Polygonin, Resveratrol, Archen and Emodin Monomethyl Ether in Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix by Multi-Components Assay and Single Marker

FAN Ling¹, YAN Dong^{1*}, LI Shuang¹, MA Xing-miao¹, QIAN Yu-liang², LIU Zhi-hui²

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a new method of quality evaluation and validate its feasibilities by the simultaneous quantitative assay of four components in Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix. **Method:** A HPLC method was developed as QAMS to determine polygonin, resveratrol, archen and emodin monomethyl ether in Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix. The relative correction factor (RCF) of other three components was determined by HPLC using archen as the internal reference substance. Content of the four components in 11 batches of samples, collected from different areas, was determined by both external standard method and QAMS. The method was evaluated by comparison of the quantitative results between external standard method and QAMS. **Result:** RSD of QAMS method and external standard method was less than 3%, which indicated that no significant differences between the quantitative results of QAMS method and external standard method were observed. **Conclusion:** It is feasible and suitable to evaluate the quality of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix by QAMS.

[Key words] quantitative analysis multi-components by single marker (QAMS); relative correction factor (RCF); Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix; polygonin; resveratrol; archen; emodin monomethyl ether

[收稿日期] 20120727(008)

[基金项目] 江苏省科技支撑计划项目(BE2011816)

[第一作者] 范玲, 药剂学硕士研究生, 从事中药新药开发研究, Tel: 13770596786, E-mail: fl1861031@126.com

[通讯作者] * 严冬, 硕士生导师, 从事中医临床及中药新药开发研究, Tel: 025-86529291, E-mail: y12d12@163.com

虎杖具有祛风利湿、祛痰止咳、清热解毒、活血化痰等功效,临床用于治疗湿热黄疸、肺热咳嗽、疮痍肿毒、关节痹痛、经闭经痛、水火烫伤、跌打损伤等。蒽醌类和二苯乙烯类化合物是虎杖饮片中的有效成分,现行版的《中国药典》也以虎杖苷和大黄素含量作为质量控制指标^[1]。白藜芦醇和大黄素甲醚也是虎杖中的主要成分,白藜芦醇具有抗氧化、抗肿瘤、抗血小板凝聚、保护心血管、调节雌激素等多种功效^[2],大黄素甲醚具有显著的抗白色念球菌、新生隐球菌、毛癣菌、曲霉菌等抗菌活性^[3],二者与虎杖的临床功效密切相关^[4],亦可作为其质量控制的指标。已有文献报道采用 HPLC 测定这 4 个成分的含量^[5],但因虎杖苷、白藜芦醇对照品不稳定,易分解^[6],限制了同时对虎杖中这 4 个主要成分进行含量测定在实际工作中的应用供应。“一测多评”的研究思路已经在黄连^[7]、干姜^[8]等饮片中得到验证。本文采用一测多评的方法,以性质相对稳定、价格低廉的大黄素为内参物,通过建立其与虎杖苷、白藜芦醇和大黄素甲醚间的相对校正因子,来同步测定 4 个有效成分的含量,这样不仅能大幅度降低检测成本和时间,还能提高方法的实用性和更有效地控制饮片的质量。

1 仪器与试药

Waters 2695-2996 高效液相色谱系统,Empower 工作站(Waters 公司),Agilent 1100 高效液相色谱系统,Agilent 1260 高效液相色谱系统,Agilent Chem Station 工作站;Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),Agilent Extend C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),Hedera C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),Sunfire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Discovery C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),BP-211D 型电子分析天平(德国赛多利斯公司),KQ-1000 型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。虎杖苷(批号 110509,含量 >98%),白藜芦醇(批号 110609,含量 >98%)两者均购自四川维克奇生物科技有限公司。大黄素(批号 100756-200211,含量 >98%)、大黄素甲醚(批号 110758-200006 含量 >98%)均购自中国药品生物制品检定所。虎杖饮片购于江苏、湖北、安徽等地,经江苏省中医院刘志辉主任中药师检验,均符合 2010 年版《中华人民共和国药典》(一部)项下相关要求和规定。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 结果与分析

2.1 原理 一测多评法(quantitative analysis multi-components by singlemarker, QAMS)是指在多指标质量评价时,以饮片中某一典型组分(有对照品供应者)为内标,建立该组分与其他组分之间的相对校正因子,通过校正因子计算其他组分的含量^[9]

$$fk_m = f_k/f_m = W_k \times A_m/W_m \times A_k \quad (1)$$

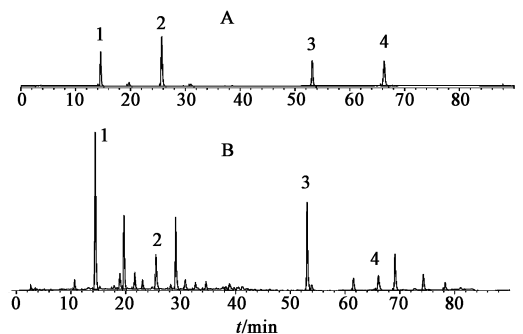
A_k 为内标物峰面积, W_k 为内标物浓度; A_m 为其他组分 m 峰面积, W_m 为其他组分 m 浓度。

2.2 一测多评方法学考察

2.2.1 色谱条件 Hypersil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B) (洗脱程序见表 1),柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长采用 306 nm, 280 nm 程序控制改变波长,见表 1;理论塔板数以大黄素计不低于 3 000,上述色谱条件下,各组分分离度良好。对照品与样品色谱图见图 1。

表 1 流动相及检测波长梯度程序

t/min	A/%	t/min	检测波长/nm
0	15	0	306
30	35	30	306
50	65	40	280
80	90	80	280
85	15	85	280
90	15	90	280



1. 虎杖苷(306 nm); 2. 白藜芦醇(306 nm);
3. 大黄素(280 nm); 4. 大黄素甲醚(280 nm)

图 1 虎杖对照品(A)和样品(B)

2.2.2 对照品溶液制备 取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚对照品适量,精密称定,加甲醇配制成浓度分别为 64.50, 11.34, 26.75, 7.74 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取虎杖饮片粉末(过 80 目筛)0.1 g,精密称定,置于 100 mL 锥形瓶,精密加入 25 mL 甲醇,称重,超声 40 min,再称定质量,用

甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液。

2.2.4 线性关系 精密吸取上述混合对照品溶液 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20 μL 进样分析,以进样量对峰面积积分值进行回归处理,分别得虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚的回归方程见表 2,各标准曲线在线性范围内线性良好。

表 2 虎杖饮片中 4 种有效成分的标准曲线

成分	线性方程	r	线性范围/ μg
虎杖苷	$Y = 3 \times 10^6 X - 29\ 184$	0.999 5	0.129 0 ~ 1.290 0
白藜芦醇	$Y = 6 \times 10^6 X - 21\ 203$	1.000 0	0.022 7 ~ 0.226 8
大黄素	$Y = 5 \times 10^6 X - 40\ 298$	0.999 9	0.053 5 ~ 0.535 0
大黄素甲醚	$Y = 6 \times 10^6 X - 18\ 820$	1.000 0	0.015 5 ~ 0.154 8

2.2.5 精密度 精密吸取混合对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,记录虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚的峰面积,RSD 分别为 1.3%, 2.4%, 1.2%, 1.5%。表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性 取同一产地的虎杖粉末(过 80 目筛)0.1 g,平行 6 份,精密称定,按供试品溶液处理方法制备样品,精密吸取上述供试品溶液 10 μL ,测定虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚平均含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)为 14.296, 1.176, 3.842, 0.717, RSD 分别为 1.8%, 0.9%, 0.6%, 1.4%。

2.2.7 稳定性 精密吸取同一供试品溶液 10 μL ,分别于配制后的 0, 4, 8, 12, 24 h 测定峰面积积分值,虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 2.8%, 1.6%, 1.9%, 1.4%, 表明处理后的供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率 取同一批已知含量的虎杖饮片粉末(过 80 目筛)约 0.1 g 共 6 份,精密称定,分别按样品含量-对照品量(1:1)的大致比例加入一定量的虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚混合对照品溶液,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,精密吸取上述供试品溶液 10 μL ,依法测定,计算回收率。虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的加样回收率分别为 98.4%, 97.4%, 100.6%, 99.7%, RSD 分别为 2.5%, 1.9%, 2.1%, 2.8%。见表 3。

2.3 相对校正因子的确定

2.3.1 虎杖中待测指标相对校正因子的计算 在虎杖的多指标质量评价时,以饮片中的大黄素为内标物,建立大黄素与虎杖苷、白藜芦醇和大黄素甲醚之间的相对校正因子,按 2.1 公式(1),分别计算大黄素对虎杖苷、白藜芦醇和大黄素甲醚的校正因子,见表 4。

表 3 虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的加样回收率

化学成分	饮片 中量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
虎杖苷	1.394	1.431	2.762	95.6	98.4	2.5
	1.448	1.431	2.863	98.9		
	1.455	1.431	2.892	100.4		
	1.435	1.431	2.812	96.2		
	1.402	1.431	2.796	97.4		
	1.442	1.431	2.860	101.9		
白藜芦醇	0.115	0.119	0.230	96.5	97.4	1.9
	0.119	0.119	0.233	96.2		
	0.120	0.119	0.238	98.8		
	0.118	0.119	0.237	100.3		
	0.115	0.119	0.231	97.4		
	0.119	0.119	0.233	95.4		
大黄素	0.375	0.402	0.773	99.1	100.6	2.1
	0.389	0.402	0.791	99.8		
	0.391	0.402	0.790	99.3		
	0.386	0.402	0.803	103.7		
	0.377	0.402	0.789	102.6		
	0.388	0.402	0.785	98.8		
大黄素甲醚	0.070	0.074	0.143	98.1	99.7	2.8
	0.073	0.074	0.145	97.1		
	0.073	0.074	0.146	98.2		
	0.072	0.074	0.148	102.6		
	0.070	0.074	0.147	103.7		
	0.072	0.074	0.145	98.4		

表 4 大黄素对虎杖苷、白藜芦醇和大黄素甲醚的校正因子

进样体积/ μL	$f_{\text{大黄素}}/f_{\text{虎杖苷}}$	$f_{\text{大黄素}}/f_{\text{白藜芦醇}}$	$f_{\text{大黄素}}/f_{\text{大黄素甲醚}}$
2	0.509	1.049	0.997
3	0.503	1.079	1.037
5	0.507	1.097	1.058
8	0.509	1.086	1.074
10	0.514	1.098	1.088
15	0.508	1.091	1.084
20	0.496	1.093	1.086
mean	0.507	1.085	1.061
RSD/%	1.1	1.6	3.2

2.3.2 相对校正因子重现性考察

2.3.2.1 不同仪器及不同色谱柱考察 精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 2, 3, 5, 8, 10, 15, 20 μL ,进样分析。按 2.1 项下方法计算大黄素对虎杖

苷、白藜芦醇和大黄素甲醚的校正因子。试验分别考察了 Waters 2695-2998, Agilent1100, Agilent1260 3 种高效液相色谱系统和 Heder a C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Hypercil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Discovery C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Agilent Eclipse C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Sunfire C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Agilent Extend C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 6 种不同品牌和型号的色谱柱, 所得的相对校正因子及其相对标准差见表 5, 结果表明各成分相对校正因子重复性良好 (RSD < 5%)。

表 5 不同仪器和色谱柱测得校正因子

仪器	色谱柱	$f_{\text{大黄素}}$	$f_{\text{大黄素}}$	$f_{\text{大黄素}}$
		$/f_{\text{虎杖苷}}$	$/f_{\text{白藜芦醇}}$	$/f_{\text{大黄素甲醚}}$
Agilent1100	Extend C ₁₈	0.537	1.105	1.053
	Discovery C ₁₈	0.529	1.128	1.089
Agilent1260	Sunfire C ₁₈	0.534	1.153	1.061
	Eclipse C ₁₈	0.537	1.168	1.094
waters2695-2998	Heder a C ₁₈	0.505	1.085	1.032
	Hypercil C ₁₈	0.507	1.085	1.061
mean		0.525	1.121	1.065
RSD/%		3.2	3.5	2.1

2.4 待测组分色谱峰的定位 分别计算各待测组分与内参物大黄素的相对保留值(r)和保留时间差(Δt_R) 2 种参数作为色谱峰定位标准, 结果表明相对保留值波动较小, 保留时间差波动较大, 因此认为本实验中选用相对保留值作为目标色谱峰的定位指标比较合适, 并考察了其在不同品牌仪器和不同型号色谱柱上的重复性, 见表 6。

表 6 不同仪器和色谱柱测得相对保留值

仪器	色谱柱	$t_{\text{大黄素}}$	$t_{\text{大黄素}}$	$t_{\text{大黄素}}$
		$/t_{\text{虎杖苷}}$	$/t_{\text{白藜芦醇}}$	$/t_{\text{大黄素甲醚}}$
Agilent1100	Extend C ₁₈	4.094	2.275	0.805
	Discovery C ₁₈	3.896	2.268	0.816
Agilent1260	Sunfire C ₁₈	3.711	2.130	0.828
	Eclipse C ₁₈	4.023	2.093	0.826
waters2695-2998	Heder a C ₁₈	3.792	2.117	0.804
	Hypercil C ₁₈	3.725	2.373	0.831
mean		3.874	2.209	0.818
RSD/%		4.1	5.1	1.4

2.5 一测多评法与外标法结果比较研究 为了验证一测多评法的准确性, 笔者收集了 11 批来自不同

产地的饮片, 采用常规的有对照品作为外标的方法进行验证。将制备好的供试品溶液逐批进样分析, 分别采用一测多评法和传统外标法测定虎杖饮片中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚的含量, 2 种方法所得的各批次饮片的含量情况见表 7。结果显示, 从其含量间的相对标准偏差来看, 在 3% 以内; 表明 2 种含量测定方法得到的含量值之间差异不大, 说明在虎杖的蒽醌类和二苯乙烯类之间应用“一测多评”法进行质量评价是可行的。

表 7 不同产地所得虎杖饮片中四种成分的含量比较

产地	mg · g ⁻¹							
	大黄素		虎杖苷		白藜芦醇		大黄素甲醚	
	a	b	a	b	a	b	a	b
江苏	3.202	10.234	9.934	1.710	1.656	0.693	0.699	
山东	1.588	11.606	11.266	0.749	0.726	0.481	0.485	
湖北	3.842	14.296	13.878	1.176	1.139	0.717	0.724	
安徽	3.943	12.562	12.194	3.215	3.115	0.714	0.720	
江西	5.854	8.809	8.551	2.924	2.832	0.804	0.811	
浙江	3.341	11.117	10.791	0.964	0.933	0.792	0.799	
贵州	3.032	9.905	9.615	1.034	1.001	0.828	0.835	
四川	5.938	26.870	26.084	4.351	4.215	1.095	1.104	
福建	3.868	26.354	25.583	4.520	4.379	1.051	1.060	
陕西	2.968	27.786	26.97	1.879	1.821	1.017	1.025	
云南	3.084	30.880	29.977	2.000	1.938	1.113	1.123	

注: a. 外标一点法测得含量; b. 一测多评法测得含量。

3 讨论

考察了水、50% 甲醇、50% 乙醇、70% 甲醇、70% 乙醇、甲醇和乙醇不同提取溶剂, 以及超声、回流不同提取方法, 发现采用甲醇超声 40 min 提取, 能够兼顾上述苷及苷元类成分, 使得目标成分的提取效率较高, 分离度较好, 干扰的杂质峰较少, 且方法简单, 成本较低。

比较了甲醇-水、乙腈-水, 加入冰醋酸、磷酸等流动相系统, 及其不同比例洗脱系统, 结果发现, 乙腈-0.1% 磷酸水分离效果好, 目标峰达基线分离, 且重复性好。流动相中加入磷酸可以改善分离效果, 防止拖尾, 使峰形尖锐、对称。

虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素甲醚是虎杖中的主要特征性成分, 在饮片中含量较高, 药理活性显著, 且与虎杖的功效具有相关性, 是评价虎杖饮片质量的适宜指标。因此本文选取它们作为质控指标, 并建立它们之间的相对校正因子。考虑到虎杖苷、白藜芦醇稳定性不好, 而大黄素对照品廉价易得, 本试验选用大黄素为内参物, 建立该成分与其他

3种成分间的相对校正因子。本文首次将一测多评法应用于虎杖的质量评价中,一测多评所得成分含量的计算值与传统的外标法所得实测值间没有显著性差异,不同实验条件下各成分间的校正因子重现性良好(RSD < 5%)。说明一测多评法在对照品缺乏的前提下,可以作为一种方便、快捷、准确的好方法应用于饮片多成分的含量测定。

虎杖、白藜芦醇为二苯乙烯类,最大吸收波长均为306,215 nm,大黄素、大黄素甲醚为蒽醌类,最大吸收波长均为220,280 nm,为兼顾4个成分的吸收强度和吸收峰的平稳程度,曾选择230 nm作为检测波长,虎杖中不同类成分的相对校正因子与同类成分间相对校正因子的RSD比较,不同类成分间相对校正因子($f_{\text{大黄素}}/f_{\text{虎杖苷}} \cdot f_{\text{大黄素}}/f_{\text{白藜芦醇}}$)的RSD远>5%,且在不同液相色谱仪之间,表现更明显。这是因为在选择检测波长230 nm时,为兼顾多个成分的强吸收以及它们色谱峰分离度,并不能选择各成分的最大吸收,因此在不同的仪器上测定时,与同类成分相比,不同类成分间相对校正因子误差增大。所以在梯度洗脱过程中采用可变波长(306,280 nm)检测,发现大黄素对其他3种成分的校正因子重现性均较好,RSD < 5%。

通过考察相对保留值和保留时间差在不同品牌仪器和不同型号色谱柱中的重现性,选择相对保留时间作为色谱峰定位依据。由实验数据见表5的统计中可以发现, $t_{\text{大黄素}}/t_{\text{白藜芦醇}}$ 略>5%,因此用此相对保留时间定位不同类型化合物缺乏准确性。为了保证QAMS待测色谱峰的准确定位,可结合光谱法定位。王瑞等^[10]根据内参物芍药苷的保留时间,通过相对保留值结合待测组分色谱峰的紫外吸收特征,能够正确判断目标峰的准确峰位置。对于同一色谱条件下,色谱峰较复杂的中药或复方制剂,可采用光谱相关光谱法进行色谱峰的定位,同一组分在不同

色谱柱及色谱仪器中的保留时间存在差异,但他们的光谱(或质谱)相同或相似^[11]。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:11.
- [2] 冯永江,许实波. 白藜芦醇药理作用研究进展[J]. 国外医药. 植物药分册,1996,11(4):155.
- [3] AGARWAL S K, SINGH S S, VERMA S, et al. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from rheum emodi [J]. J Ethnopharmacol, 2000, 72 (1/2):43.
- [4] 伍晓春,陆豫. 虎杖的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医药信息,2005,22(2):22.
- [5] 卢燕,李华丽,林牡丹,等. 微波萃取-HPLC同时测定虎杖中5种主要活性成分的含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(13):1994.
- [6] 齐辉,张勉. HPLC同时测定虎杖中4种成分的含量[J]. 中国药学杂志,2006,31(23):2003.
- [7] 匡艳辉,朱晶晶. 一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J]. 中国药学杂志,2009,44(5):390.
- [8] 孟江,卢国勇. 一测多评法同时测定干姜中4种姜酚类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,18(7):77.
- [9] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):192.
- [10] 王瑞,黄山君,王峥涛. 一测多评法测定赤芍中不同类型成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(8):594.
- [11] 黄帅,马森,黄倩倩,等. 一测多评法同步测定柴胡饮片中3种皂苷的含量[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):838.

[责任编辑 顾雪竹]