

## 虎杖药材 UPLC 特征图谱研究

马培, 许利嘉, 刘延泽, 彭勇, 张鑫瑶, 肖培根\*

(中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所 中草药物质基础  
与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193)

**[摘要]** **目的:**建立虎杖药材的超高效液相色谱(UPLC)特征图谱的质量评价方法。**方法:**采用 Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.5% 乙酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 35 °C, 检测波长 290 nm。采用聚类分析, 主成分分析, 特征图谱相似度分析 3 种方法对 38 批不同产地的虎杖药材 UPLC 特征图谱进行评价。**结果:**建立了虎杖药材的 UPLC 特征指纹图谱共有模式, 共标定了 11 个共有峰, 指认其中 4 个共有峰为虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚。36 批虎杖药材相似度 > 0.9; 2 批药材相似度为 0.733, 0.896。聚类分析和主成分分析结果表明可将药材分为 3 类, 不同类别间质量有差异。**结论:**本研究建立的虎杖药材的特征图谱特征性和专属性强, 且方法快速、简便、可靠, 可用于全面控制市场流通虎杖药材的质量。

**[关键词]** 虎杖; 特征图谱; 超高效液相色谱; 主成分分析; 聚类分析; 质量控制

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0072-05

## Studies on the UPLC Fingerprint and Quality Evaluation of Crude Drug of *Polygonum cuspidatum*

MA Pei, XU Li-jia, LIU Yan-ze, PENG Yong, ZHANG Xin-yao, XIAO Pei-gen\*

(Chinese Academy of Chinese Medical Sciences & Peking Union Medical College, Institute of Medicinal Plant Development, Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Beijing 100193, China)

**[Abstract]** **Objective:** A method of UPLC fingerprinting analysis was developed for the quality evaluation of crude drug of *Polygonum cuspidatum*. **Method:** The Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) column was used. Acetonitrile and water containing 0.5% acetic acid were used as mobile phase of UPLC with gradient elution, monitored with the wavelength of 290 nm. Flow rate was set at 0.3 mL·min<sup>-1</sup> and column temperature was 35 °C. Thirty eight batches of *P. cuspidatum* samples collected from different areas and markets were analyzed for similarity analysis (SA), hierarchical clustering analysis (HCA) and principle component analysis (PCA). **Result:** The chromatographic fingerprint was completed with eleven recognizable peaks and four of them (polydatin, resveratrol, emodin, physcion) determined. Thirty eight batches of samples were classified as three clusters by HCA and PCA, and thirty six of them exhibited similarity more than 0.900 by similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2004B Version). **Conclusion:** The established method could rapidly attain the identification and quality evaluation of crude drug of *P. cuspidatum*.

**[Key words]** *Polygonum cuspidatum*; chromatographic fingerprint; ultra-performance liquid chromatography (UPLC); principal component analysis; hierarchical cluster analysis; quality control

**[收稿日期]** 20110623(001)

**[基金项目]** 国家科技重大专项(2008ZX10005-004)

**[第一作者]** 马培, 在读博士生, 从事药用植物亲缘学研究, Tel:010-62818235, E-mail: mapei@implad.ac.cn

**[通讯作者]** \*肖培根, 博士, 研究员, 从事药用植物亲缘学研究, Tel:010-62894462, E-mail: xiaopg@public.bta.net.cn

虎杖为蓼科多年生草本植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎,中医用其祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰等<sup>[1]</sup>。虎杖中均二苯乙烯类成分如虎杖苷、白藜芦醇等是其主要活性成分,近年来研究表明这类成分具有良好的抗菌活性<sup>[2]</sup>、抗 HIV 活性<sup>[3-4]</sup>,因此虎杖的药用研究和质量控制越来越重要。

中药特征图谱是中药整体性的化学表征,该项研究是近年来中药质量控制方法的一个研究热点。目前,虎杖 HPLC 特征图谱已有不少报道,但由于许多成分极性相近而导致色谱分析时段普遍在 60 min 左右<sup>[4,6,8]</sup>;特征图谱分析样品数目普遍在 10 ~ 15 个<sup>[6-8]</sup>,分析样本多集中在一个省市<sup>[5,8]</sup>。而虎杖在我国广泛分布,各产地的虎杖药材可能的品质差异未能反映出来。因此特征图谱的构建需要大量不同产地的样品,才能较为全面反映药材市场上流通虎杖药材的情况。本实验采用超高效液相色谱,15 min 完成 38 批不同产地的虎杖药材的 UPLC 特征图谱和质量评价方法,显著缩短了分析时间,提高了峰间分辨率,为虎杖药材的质量评价提供了依据。

## 1 仪器与试剂

美国 Waters 公司 Acquity 超高效液相系统,包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 全波长检测器以及 Waters Empower 2 数据处理工作站;AL204 型电子天平 (Mettler Toledo 公司)。

虎杖苷 (批号 111575-200502)、白藜芦醇 (批号 111535-200502)、大黄素 (批号 110756-200110)、大黄素甲醚 (批号 110758-201013) 对照品购自中国药品生物制品检定所,纯度 >98%。色谱用乙腈购自美国 Honeywell B & J ACS, 实验用水为娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯;所有试剂用前均经 0.22 μm 微孔滤膜滤过。38 批虎杖药材样品购于 2010 年 6 ~ 9 月,经中国医学科学院药用植物研究所刘延泽教授鉴定核实,并存放于中国医学科学院药用植物研究所亲缘室。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 柱温 35 °C, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 290 nm, 进样 0.6 μL, 流动相 A 为 0.5% 乙酸, B 为乙腈, 梯度洗脱 (0 ~ 3.5 min, 8% ~ 20% B; 3.5 ~ 6 min, 20% ~ 40% B; 6 ~ 8 min, 40% ~ 60% B; 8 ~ 10 min, 60% ~ 65% B; 10 ~ 12 min, 65% ~ 95% B; 12 ~ 13 min, 95% B)。以大黄素甲醚峰计算理论塔板数不低于 49 910。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取白藜芦醇、虎杖苷、大黄素和大黄素甲醚对照品适量, 色谱甲醇溶解并定容 5 mL, 摇匀, 置于 4 °C 的冰箱中保存备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取自然干燥虎杖粉末 (过 80 目筛) 0.1 g, 置 10 mL 量瓶中, 加入 80% 甲醇约 10 mL, 超声 30 min, 摇匀, 静置放冷, 补重。样品用前经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液做供试品溶液。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度** 取同一份供试品溶液 (HZ7), 按 2.1 项下方法连续进样 6 次, 各色谱峰 (单峰面积 > 5% 总峰面积) 峰面积的 RSD 是 0.093% ~ 0.878%, 说明仪器精密度良好。

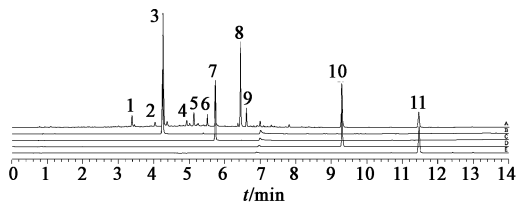
**2.4.2 重复性** 取同一样品 (HZ7) 共 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试液, 按 2.1 项下方法进样, 计算各色谱峰峰面积 RSD 1.430% ~ 2.623%, 说明方法重复性良好。

**2.4.3 样品稳定性** 将样品 (HZ7) 供试品溶液按 2.1 项下方法分别在 0, 2, 4, 8, 24 h 进样分析, 计算各色谱峰峰面积的 RSD 0.092% ~ 2.188%, 说明样品溶液在 24 h 内稳定。

**2.5 样品测定** 取 38 批虎杖药材样品, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件依次进样进行检测, 记录色谱图及峰面积积分。确定在 38 批虎杖特征图谱中出峰时间基本一致、峰面积较大 11 个峰为共有特征色谱峰。以样品 (26 号) 为例, 其保留时间和峰面积值见表 1。样品 (26 号) 特征色谱图的 11 个共有峰的情况见图 1。在相同的色谱条件下, 将标准品溶液进样分析, 并与样品特征图谱中相应色谱峰进行比较, 确定样品特征图谱中

表 1 26 号样品共有峰保留时间、峰面积

Peak	t <sub>R</sub> /min	A
1	3.409	100 039.5
2	4.106	56 286.77
3	4.286	1 058 144
4	4.965	126 144.9
5	5.141	173 234.2
6	5.495	78 093.71
7	5.739	1 726 816
8	6.405	299 427.0
9	6.518	137 221.2
10	9.249	1 206 381
11	11.391	146 922.8



A. 虎杖药材; B. 虎杖苷; C. 白藜芦醇;  
D. 大黄素; E. 大黄素甲醚

峰 1 ~ 11. 38 批虎杖药材特征图谱共有特征色谱峰

图 1 虎杖药材 UPLC 特征图谱

的峰 3, 7, 10, 11 分别为虎杖苷、白藜芦醇、大黄素和大黄素甲醚。

## 2.6 虎杖质量评价方法的确立

**2.6.1 参比峰的选择** 在各批次样品图谱中虎杖苷的色谱峰(3号峰)分离良好,峰面积较大且为所有样品共有,所以确定为参照峰,计算其他 10 个共有峰相对保留时间和峰面积比,见表 2。

表 2 26 号样品共有峰峰面积比

Peak	t/min	峰面积比
1	0.795	0.094 5
2	0.958	0.053 2
3	1	1
4	1.158	0.119 2
5	1.199	0.163 7
6	1.282	0.073 8
7	1.339	1.631 9
8	1.494	0.283 0
9	1.521	0.129 7
10	2.158	1.140 1
11	2.658	0.138 8

**2.6.2 数据处理** 将 38 批不同产地的虎杖样品的 UPLC 特征图谱 11 个主要色谱峰的峰面积相对药材称样量之比,即单位质量药材峰面积进行量化,得到 38 × 11 阶的数据矩阵。所有数据经标准化后应用 SPSS (18.0) 进行聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA)。

**2.6.3 聚类分析** 聚类分析选择离差平方和法(Ward's method)为聚类方法、欧氏距离平方方法(squared Euclidean distance)为测量距离方法。38 批虎杖样品聚为 3 组,聚类谱系图见图 2。

通过 3 类所含 4 个主要成分的峰面积积分值的分析来推测它们含量的高低,发现由 22 个样品聚为第一类是陕西、湖北和河南等地虎杖,仅大黄素甲醚含量较高(体现在峰面积积分值较大);由 7 个样品

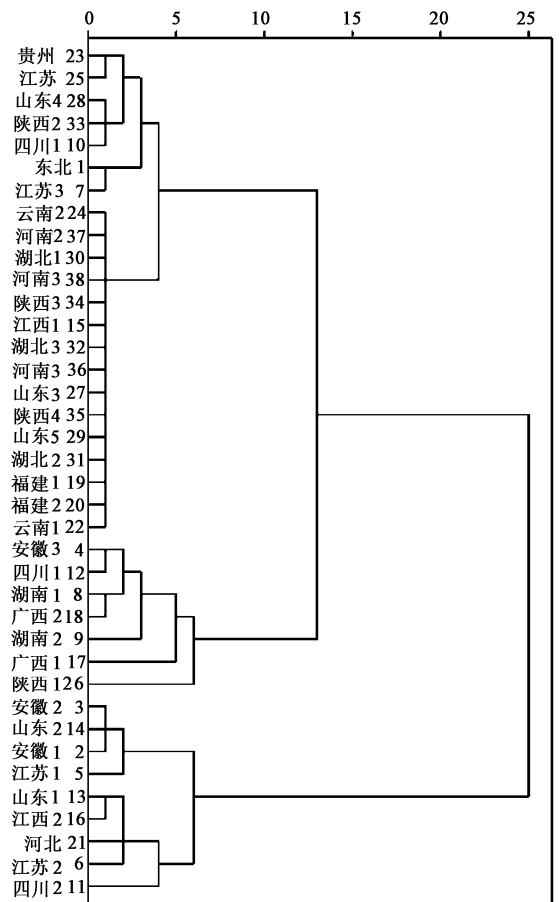


图 2 聚类谱系图

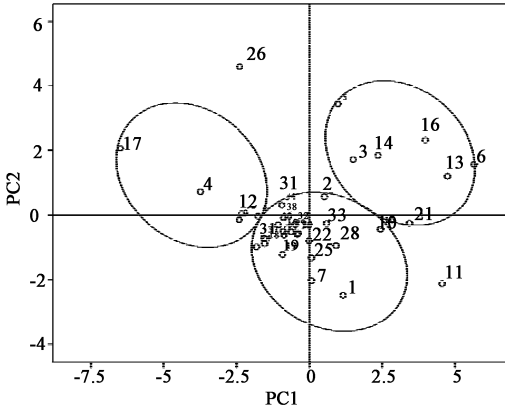
聚为第二类是湖南和广西等地虎杖,它们的白藜芦醇含量稍高,但是它们的虎杖苷含量明显较低;由 9 个样品聚为第三类是安徽、江苏等地虎杖,它们的虎杖苷和大黄素含量均较高,结果见表 3。

表 3 聚类分析结果中 3 类虎杖的描述性统计

Ward Method	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素	大黄素甲醚
1 均值	1.016 8E6	528 866.382 6	808 725.138 3	142 258.166 2
极大值	1 305 005.74	619 848.13	934 851.07	170 113.36
极小值	704 517.94	283 430.35	481 215.80	98 176.53
2 均值	711 999.330 2	732 451.037 8	908 306.436 0	112 241.482 9
极大值	1 058 143.701	726 816.04	1 258 546.37	149 673.32
极小值	139 667.21	402 621.25	528 586.77	68 861.90
3 均值	1.649 7E6	682 315.898 3	911 486.086 5	105 090.291 9
极大值	2 676 971.351	043 121.21	1 165 748.18	141 533.23
极小值	1 153 749.16	438 062.82	565 090.99	75 822.94

**2.6.4 主成分分析** 以特征值大于 1 为提取标准,得到 3 个主成分(PC1, PC2, PC3),主成分分析 PC1, PC2, PC3 贡献率分别是 52.27%, 19.66%, 10.54%, 累积贡献率达到 82.46%。其中,PC1 是 1, 2, 3(虎杖苷), 4, 5, 6 和 8 号峰的综合指标; PC2

是 7 号峰(白藜芦醇)和 10 号峰(大黄素)的综合指标;PC3 主要体现了 11(大黄素甲醚)号峰。选取代表总差异约 72% 的 PC1 和 PC2 绘制主成分得分图如图 3 所示。其中,大多数成分主要分布在 3 个区域,Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ 区域的样品基本与聚类分析的



Ⅰ类: 1. 东北; 2. 安徽 1; 7. 江苏 3; 10. 四川 1; 15. 江西 1; 18. 广西 2; 19. 福建 1; 20. 福建 2; 22. 云南 1; 23. 贵州; 24. 云南 2; 25. 江苏 4; 27. 山东 3; 28. 山东 4; 29. 山东 5; 30. 湖北 1; 31. 湖北 2; 32. 湖北 3; 33. 陕西 2; 34. 陕西 3; 35. 陕西 4; 36. 河南 1; 37. 河南 2; 38. 河南 3; Ⅱ类: 4. 安徽 3; 8. 湖南 1; 9. 湖南 2; 12. 四川 3; 17. 广西 1; Ⅲ类: 3. 安徽 2; 5. 江苏 1; 6. 江苏 2; 13. 山东 1; 14. 山东 2; 16. 江西 2; 21. 河北; 三类范围外: 11. 四川 2; 26. 陕西 1

图 3 主成分分析法分析不同产地虎杖药材的主成分得分

3 类一致。Ⅲ 区域的样品在前 2 个主成分的得分均较高,体现了这类样品质量较好,与聚类结果对第 3 类样品的描述基本相同。

2.6.5 特征指纹图谱的建立及相似度评价 根据聚类分析和主成分分析结果,本实验选取主成分含量较高的第 3 类 9 个样品(编号 3,14,2,5,13,16,21,6,11)建立共有模式。将 9 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”,选取 16 号样品做参照谱图,时间窗宽度选取 0.1 min,采用中位数方法生成对照图谱,多点校正和自动匹配后,得到对照图谱。再将对照图谱与 38 批样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004B 版”,得到样品与对照图谱的匹配图(图 4),软件计算出样品与对照图谱的相似度数据(表 4)。

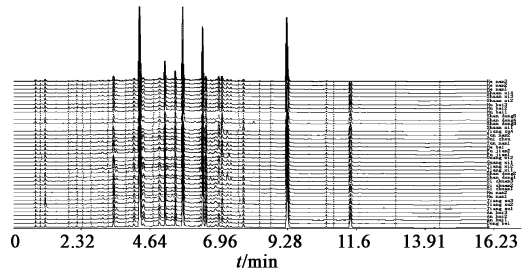


图 4 38 批不同产地虎杖药材样品特征图谱与对照图谱的匹配

表 4 不同产地虎杖药材样品与对照图的相似度 (n=2)

No.	药材来源	相似度	No.	药材来源	相似度	No.	药材来源	相似度	No.	药材来源	相似度
1	东北	0.985	11	四川 2	1.000	21	河北	0.985	31	湖北 2	0.990
2	安徽 1	0.936	12	四川 3	0.943	22	云南 1	0.946	32	湖北 3	0.994
3	安徽 2	0.989	13	山东 1	0.960	23	贵州	0.986	33	陕西 2	0.989
4	安徽 3	0.952	14	山东 2	0.967	24	云南 2	0.972	34	陕西 3	0.991
5	江苏 1	0.944	15	江西 1	0.971	25	江苏 4	0.981	35	陕西 4	0.980
6	江苏 2	0.967	16	江西 2	0.991	26	陕西 1	0.931	36	河南 1	0.988
7	江苏 3	0.920	17	广西 1	0.988	27	山东 3	0.896	37	河南 2	0.992
8	湖南 1	0.953	18	广西 2	0.733	28	山东 4	0.986	38	河南 3	0.989
9	湖南 2	0.985	19	福建 1	0.964	29	山东 5	0.987			
10	四川 1	0.987	20	福建 2	0.988	30	湖北 1	0.990			

本研究相似度分析结果显示,36 批药材相似度在 0.900 以上,药材质量较好;18 号广西产虎杖和 27 号山东产虎杖相似度分别是 0.733,0.896,药材质量一般。

### 3 讨论

本实验分别用 50% 甲醇、80% 甲醇、甲醇、50% 乙醇、70% 乙醇、乙醇作提取溶剂,0.5,1 h 作提取时

间,超声和热回流作提取方式,采用 50,100 倍量 (mL·g<sup>-1</sup>) 试剂作提取体积考察不同提取条件所获得的图谱,结果表明,100 倍量 80% 甲醇超声提取 0.5 h 提取效率较高且方法简便。

本实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙酸水和乙腈-乙酸水 4 个流动相系统,结果发现采用乙腈-乙酸水流动相系统,各峰的分度度较好,且基线

平稳,有利于指纹图谱的分析,因此最终采用乙腈-乙酸水系统作为流动相系统。

本实验采用 DAD 检测器作全波长扫描并结合以往研究,发现 290 nm 处各成分具有较好的紫外吸收,色谱信息丰富,大部分色谱峰得到极限分离且基线平稳。

目前对指纹图谱主要有以下 3 种评价方法,即:药典委员会推荐的指纹图谱相似度评价法<sup>[9-10]</sup>,衡量指纹图谱特征变量上变化模式的相似度,提供样品鉴别真伪相似性的信息;欧式距离聚类分析法<sup>[9]</sup>,侧重于描述指纹图谱特征变量值大小差异的样品之间亲疏程度的相似性;主成分分析<sup>[11]</sup>,将多个主要成分峰转化为几个综合指标来评价各图谱并将其聚类和分组。由于商品虎杖来源复杂,本实验在通过聚类分析和主成分分析的基础上,选取了 9 批虎杖药材建立共有模式,有一定的科学性和代表性。38 批虎杖样品相似度评价的结果表明市场流通药材多数质量均较好,有个别质量较差情况存在。

本实验中相似度评价结果表明药材虎杖的 UPLC 特征图谱很相似,但是通过聚类分析和主成分分析可以看到不同来源的虎杖在主要成分含量上有一定差别,并根据这种差别可以将其分为 3 大类,造成这种差异可能与采集地的地理位置、气候有关。本实验使用相似度评价、聚类分析和主成分分析等化学计量学手段,较为客观和成功的区分了样品。本实验建立的虎杖 UPLC 特征图谱和质量评价方法,显著缩短了分析时间,提高了峰间分辨率,为虎杖药材的质量评价提供了依据。

### [参考文献]

- [ 1 ] 中国药典. 一部[S]. 2010:145.
- [ 2 ] Shan B, Cai Y Z, Brooks J D, et al. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents [J]. Food Chem, 2008, 109(3): 530.
- [ 3 ] Lin H W, Sun M X, Wang Y H, et al. Anti-HIV activities of the compounds isolated from *Polygonum cuspidatum* and *Polygonum multiflorum* [J]. Planta Med, 2010, 76(9): 889.
- [ 4 ] 贾玉梅,王君明,崔瑛. 基于二苯乙烯类为主要活性成分的虎杖药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):263.
- [ 5 ] 马云桐,万德光,宋良科. 虎杖药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(12):972.
- [ 6 ] 雷海民,毕葳,李强,等. 虎杖药材指纹图谱研究[J]. 中草药,2006,37(7):1084.
- [ 7 ] 李宇翔,王丽,唐书明,等. 虎杖 HPLC 指纹图谱研究与应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):78.
- [ 8 ] 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.
- [ 9 ] 王玺,王文宇,张克荣,等. 中药 HPLC 指纹图谱相似性研究的探讨[J]. 沈阳药科大学学报,2003,20(5): 360.
- [ 10 ] 孟庆华,刘永锁,蒋淑敏,等. 色谱指纹图谱综合信息指数在中药质量控制中的应用研究[J]. 中国天然药物,2004,2(6):359.
- [ 11 ] Xie G X, Ni Y, Su M M, et al. Application of ultra-performance LC-TOF MS metabolite profiling techniques to the analysis of medicinal *Panax* herbs [J]. Metabolomics, 2008, 4(3): 248.

[责任编辑 蔡仲德]