

复方虎杖高效液相色谱指纹图谱的研究

李 淼, 楼一层*, 杨 翰, 胡佳兴, 苏峰平

(武汉理工大学化学工程学院, 武汉 430070)

摘 要: 采用高效液相色谱法,建立了复方虎杖指纹图谱的分析方法。色谱条件为:ZORBAX C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm),检测波长 310 nm,柱温:25℃,流动相:甲醇(0~85%):5%乙酸溶液(100%~15%),梯度洗脱 70 min。通过分析,确立了复方虎杖指纹图谱的 22 个共有峰。10 批样不同产地的药材指纹图谱具有较好的相似度。该方法准确可靠,重复性好,可用于复方虎杖药材及其制剂的质量控制。

关键词: 虎杖; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R931.5; Q949.744

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)04-0446-05

Study on the Fingerprint Chromatogram of the Compound Giant Knotweed Rhizome by High Performance Liquid Chromatography

LI Miao, LOU Yi-Ceng*, YANG Han, HU Jia-Xing, SU Feng-Ping

(College of Chemistry and Engineering, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070; China)

Abstract: The fingerprint chromatogram of the compound giant knotweed rhizome was established by using HPLC, and the sample was separated on a ZORBAX C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with the mobile phase of methanol (0 - 85%) and 5% acetic acid (100% - 15%), and apply the gradient elution for 70 minutes. The detection wavelength was 280 nm, and the column temperature was set up at 25℃. By analyzing the fingerprint chromatogram, 22 characteristic peaks were selected, and the fingerprint spectrum of 10 places of medicinal substances has high similarity. The HPLC method for fingerprint chromatogram showed high precision and excellent reproducibility, so it can be used in the quality control of the compound giant knotweed rhizome.

Key words: Giant knotweed rhizome; HPLC; Fingerprint chromatogram

虎杖为蓼科植物虎杖 *Reynoutria japonica* Houtt. 的干燥根茎和根^[1]。别名: 花斑竹、酸筒杆、酸汤梗、川筋龙、斑庄、斑杖根、大叶蛇总管、黄地榆。具有祛风利湿、散瘀定痛、止咳化痰之功效。临床上用于水火烫伤、关节痹痛、湿热黄疸、咳嗽痰多、跌扑损伤、痈肿疮毒、经闭、癥瘕等症^[2-4]。复方虎杖是武汉市东湖医院多年临床的医院协定处方,该方以虎杖为君药,配以石榴皮、黄柏、地榆、乌梅、诃子 5 味药,具有清热解毒、活血止痛、收敛止血、消肿生肌的功效,将其开发为涂膜剂,临床上可用于治疗各种烧伤及烫伤。高效液相色谱指纹图谱具有整体性和模糊性的特点,能较全面反映中药品质,已成为中药质量评价和控制研究的重要手段^[3]。如今,对该复方质量标准的研究仅限于虎杖中有效成分的含量测定,而对于该复方指纹图谱的建立,相关报道还很

少。本文研究并建立了 10 批复方虎杖的高效液相色谱指纹图谱,以期从整体上为复方虎杖的质量控制建立客观、有效的方法,并为复方虎杖的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

主要仪器: Agilent 1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),KQ3200 超声波清洗器(上海洁净超声波设备厂),电磁炉(天津环津电子器材厂),电热套(上海予华仪器有限公司)。

试剂: 甲醇,乙腈,乙酸(上海试一化学试剂有限公司,均为色谱纯),蒸馏水。

药材: 于全国不同地区采购的 10 批复方虎杖,每批包括:虎杖(*Reynoutria japonica* Houtt.) 35 g、黄

收稿日期: 2008-09-11, 修回日期: 2009-02-17。

基金项目: 国家自然科学基金(30570184, 30772761, 30870249); 湖北省自然科学基金(2004ABA216)。

作者简介: 李淼(1987-), 男, 白族, 2006 级本科生, 现就读于武汉理工大学制药工程系; 楼一层(1960-), 男, 博士, 教授。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: louyiceng@163.com)。

柏 10 g、地榆 15 g、乌梅 5 g、诃子 10 g、石榴皮 10 g), 药材具体来源及采购日期见表 1。

色谱条件: ZORBAX C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 检测波长 310 nm^[5,6], 柱温: 25℃, 流动相: 甲醇(0 ~ 85%): 5% 乙酸溶液(100% ~ 15%), 进行线性梯度洗脱 70 min(见表 2), 进样量 10 μL。

表 1 药材来源及采购日期
Table 1 Source and stocking time of medicinal materials

复方虎杖 The compound giant knotweed rhizome	批号 Batch No.	药材来源 Source of medicinal materials	采购日期 Stocking time
虎杖 35 g、黄柏 10 g、 地榆 15 g、乌梅 5 g、 诃子 10 g、石榴皮 10 g	1	云南昆明	2007 年 12 月
	2	四川乐山	2007 年 12 月
	3	陕西西安	2007 年 12 月
	4	安徽亳州	2008 年 5 月
	5	河南许昌	2008 年 5 月
	6	湖北十堰	2008 年 5 月
	7	湖北武汉	2007 年 5 月
	8	江西宜春	2007 年 5 月
	9	江苏南京	2007 年 5 月
	10	山东枣庄	2007 年 5 月

表 2 流动相梯度
Table 2 Eluent gradient

时间 Time (min)	流动相 Mobile phase	
	甲醇(%) Methanol	乙酸(%) Acetic acid
0	0	100
5	12	93
10	20	85
15	33	72
25	45	65
35	56	50
50	60	35
60	70	20
70	85	15

1.2 方法

供试品溶液的制备: 用 75% 乙醇分别回流提取上述 10 批药材, 每批药材提取 3 次^[7,8]。第 1 次加乙醇 800 mL, 提取 60 min, 第 2 次加乙醇 800 mL, 提取 50 min, 第 3 次加乙醇 600 mL, 提取 30 min, 合并提取液, 过滤, 滤液静置过夜; 取上清液浓缩至相对密度 1.26, 分别取所得浓缩液各 5 mL 注入 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过(0.45 μm 微孔滤膜), 取滤液, 标号, 即得 10 份供试品。

指纹图谱的测定: 按照上述色谱条件进样分析

10 批样品, 得到指纹图谱。对各样品的各个峰进行对比分析, 找到共有峰。以主峰为参考, 计算各峰的相对保留时间及相对峰面积。

方法学考察: ①**精密度试验** 取 4 号供试品溶液连续进样 5 次, 记录指纹图谱, 以主峰为参照峰, 记录共有峰的相对保留时间及相对峰面积。②**重复性试验** 取第 7 批复方虎杖药材 5 份, 分别按照前述供试品溶液的制备方法制备 5 份供试品溶液, 进样进行测定, 记录指纹图谱, 以主峰为参照峰, 记录共有峰的相对保留时间及相对峰面积。③**稳定性试验** 取 4 号供试品溶液分别于制备后 0、3、6、9、12 h 进样分析, 记录色谱图, 以主峰为参照, 记录共有峰的相对保留时间及相对峰面积。

2 结果与分析

2.1 复方虎杖指纹图谱测定结果与分析

按照中药指纹图谱研究技术^[9-13]要求, 以药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(A 版)”^[14]分析各样品的各个峰, 根据匹配结果确定了 22 个共有峰(见图 1)。因 7 号峰的峰面积在色谱图中所占的比例较大, 且较稳定, 因此选其为参照峰(S 峰)。以其为参考, 计算各峰的相对保留时间及相对峰面积(见表 3、表 4)。

经计算各色谱图中共有峰总面积占有所有色谱峰面积比均在 95% 以上, 10 批供试品色谱图与对照指纹图谱相似度均大于 0.97, 供试品批间相似度均大于 0.96, 说明本品的制备工艺稳定, 质量可控。指纹图谱叠加图见图 2。

2.2 方法学考察结果

精密度试验结果: 计算各主要色谱峰相对峰面积的相对标准偏差(relation standard deviation, RSD)在 0.06% ~ 0.25%, 相对保留时间的 RSD 在 0.122% ~ 1.149%。

重复性试验结果: 各主要色谱峰相对峰面积的 RSD 在 0.041% ~ 1.128%, 相对保留时间的 RSD 在 0.06% ~ 2.22%。表明方法重复性良好。

稳定性试验结果: 记录色谱图, 结果各主要色谱峰相对峰面积的 RSD 在 0.093% ~ 2.248%, 相对保留时间的 RSD 在 0.15% ~ 1.84%, 表明样品在 12 h 内稳定。

表 3 各共有峰的相对保留时间
Table 3 Relative retention time of common peaks

峰号 Peak No.	10 个样品相对保留时间 Relative retention time										均值 Mean	相对标准偏差 RSD* (%)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10		
1	0.0492	0.0503	0.0501	0.0487	0.0522	0.0488	0.0509	0.0519	0.0483	0.0517	0.0502	2.86
2	0.0697	0.0716	0.0738	0.0745	0.0738	0.0728	0.0734	0.0740	0.0714	0.0730	0.0728	2.00
3	0.0956	0.1001	0.1004	0.1015	0.1017	0.1016	0.1008	0.1030	0.1024	0.1025	0.1010	2.07
4	0.1284	0.1319	0.1321	0.1342	0.1355	0.1388	0.1327	0.1350	0.1278	0.1310	0.1327	2.50
5	0.5229	0.5472	0.5520	0.5587	0.5510	0.5425	0.5521	0.5590	0.5473	0.5503	0.5483	1.87
6	0.6005	0.6297	0.6209	0.6382	0.6294	0.6282	0.6356	0.6377	0.6345	0.6298	0.6284	1.77
7(S)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
8	1.2551	1.3065	1.3224	1.3130	1.3338	1.3100	1.3246	1.3467	1.3260	1.3461	1.3184	1.99
9	1.5120	1.5779	1.6006	1.5852	1.6129	1.5843	1.5997	1.6109	1.5892	1.6101	1.5883	1.86
10	1.6007	1.6633	1.7011	1.6706	1.7014	1.6680	1.6857	1.7009	1.6766	1.6990	1.6767	1.83
11	1.6573	1.7316	1.7508	1.7340	1.7674	1.7315	1.7512	1.7659	1.7407	1.7644	1.7395	1.85
12	1.6897	1.7684	1.7846	1.7733	1.8024	1.7657	1.7851	1.8013	1.7758	1.7986	1.7745	1.84
13	1.7096	1.7862	1.8029	1.7926	1.8278	1.7845	1.8064	1.8202	1.7952	1.8191	1.7944	1.85
14	1.7382	1.8113	1.8322	1.8236	1.8542	1.8158	1.8358	1.8534	1.8271	1.8514	1.8243	1.86
15	1.8121	1.8824	1.9151	1.8977	1.9288	1.8918	1.9100	1.9253	1.8989	1.9240	1.8986	1.80
16	1.8404	1.8960	1.9402	1.9221	1.9599	1.9038	1.9403	1.9375	1.9243	1.9394	1.9204	1.76
17	1.8619	1.9396	1.9583	1.9549	1.9677	1.9191	1.9576	1.9575	1.9303	1.9558	1.9403	1.61
18	1.8917	1.9819	2.0004	1.9836	2.0214	1.9786	1.9964	2.0184	1.9929	2.0162	1.9881	1.87
19	1.9083	1.9922	2.0113	1.9972	2.0329	1.9941	2.0120	2.0337	2.0060	2.0339	2.0022	1.83
20	1.9553	2.0382	2.0643	2.0469	2.0871	2.0439	2.0654	2.0840	2.0716	2.0994	2.0556	1.97
21	2.0159	2.1039	2.1371	2.1122	2.1565	2.1124	2.1350	2.1534	2.1231	2.1516	2.1201	1.94
22	2.0549	2.1394	2.1704	2.1484	2.1926	2.1478	2.1711	2.1882	2.1578	2.1867	2.1557	1.85

* Relation standard deviation.

表 4 各共有峰的相对峰面积
Table 4 Relative area of common peaks

峰号 Peak No.	10 个样品相对峰面积 Relative area of common peaks										均值 Mean	相对标准偏差 RSD(%)
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10		
1	0.0191	0.0190	0.0186	0.0191	0.0193	0.0194	0.0190	0.0194	0.0191	0.0182	0.0190	1.94
2	0.0080	0.0077	0.0078	0.0081	0.0079	0.0080	0.0078	0.0082	0.0082	0.0080	0.0080	1.98
3	0.0588	0.0592	0.0601	0.0592	0.0597	0.0598	0.0602	0.0597	0.0605	0.0607	0.0598	1.01
4	0.0147	0.0157	0.0157	0.0155	0.0154	0.0157	0.0156	0.0156	0.0161	0.0160	0.0156	2.41
5	0.0103	0.0103	0.0102	0.0105	0.0105	0.0105	0.0103	0.0103	0.0106	0.0107	0.0104	1.60
6	0.0088	0.0090	0.0095	0.0093	0.0091	0.0090	0.0087	0.0093	0.0091	0.0089	0.0091	2.69
7(S)	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00
8	0.0259	0.0259	0.0254	0.0263	0.0259	0.0260	0.0258	0.0258	0.0249	0.0250	0.0257	1.79
9	0.0475	0.0478	0.0487	0.0477	0.0476	0.0486	0.0475	0.0476	0.0477	0.0488	0.0479	1.12
10	0.0049	0.0047	0.0049	0.0051	0.0048	0.0049	0.0047	0.0048	0.0051	0.0047	0.0049	2.91
11	0.0035	0.0037	0.0036	0.0037	0.0037	0.0037	0.0035	0.0037	0.0037	0.0035	0.0036	2.11
12	0.0031	0.0032	0.0031	0.0032	0.0032	0.0032	0.0032	0.0033	0.0032	0.0033	0.0032	2.49
13	0.0037	0.0037	0.0038	0.0038	0.0037	0.0038	0.0038	0.0039	0.0038	0.0040	0.0038	2.67
14	0.0062	0.0064	0.0063	0.0063	0.0062	0.0064	0.0062	0.0063	0.0063	0.0061	0.0063	1.32
15	0.0056	0.0055	0.0056	0.0055	0.0057	0.0055	0.0056	0.0057	0.0059	0.0058	0.0056	2.20
16	0.0016	0.0017	0.0016	0.0017	0.0017	0.0017	0.0016	0.0017	0.0018	0.0017	0.0017	2.60
17	0.0134	0.0137	0.0135	0.0137	0.0136	0.0131	0.0135	0.0132	0.0135	0.0136	0.0135	1.36
18	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0012	0.0013	0.0012	0.0013	0.0012	2.42
19	0.0093	0.0091	0.0091	0.0094	0.0092	0.0094	0.0092	0.0093	0.0092	0.0092	0.0092	1.24
20	0.0119	0.0121	0.0121	0.0120	0.0120	0.0118	0.0118	0.0121	0.0118	0.0122	0.0120	1.28
21	0.0125	0.0127	0.0127	0.0125	0.0125	0.0126	0.0127	0.0127	0.0125	0.0128	0.0126	0.69
22	0.0129	0.0130	0.0128	0.0131	0.0130	0.0131	0.0130	0.0128	0.0131	0.0131	0.0130	0.93

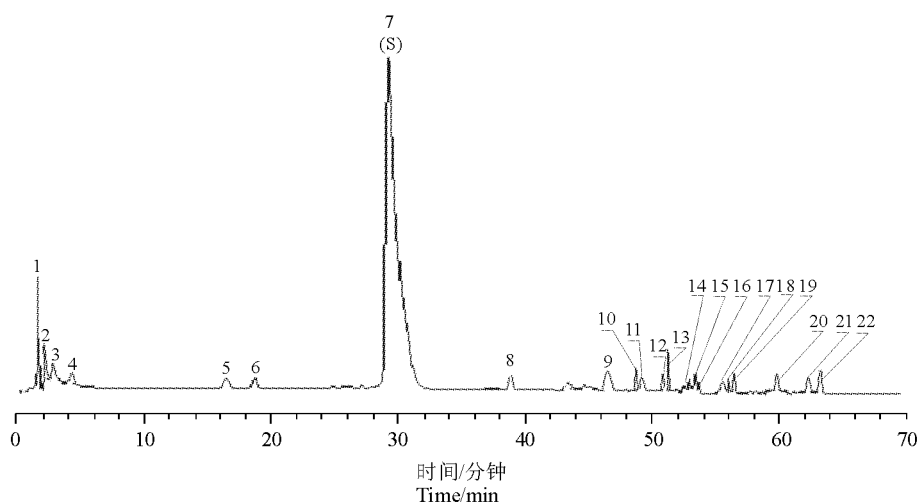


图1 复方虎杖的HPLC对照指纹图谱

Fig. 1 HPLC-FPS of the compound giant knotweed rhizome

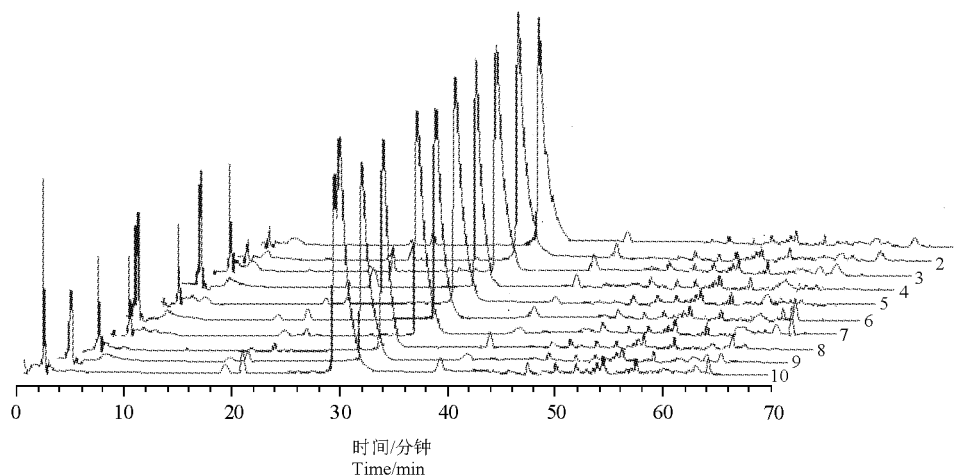


图2 10批复方虎杖HPLC指纹图谱

Fig. 2 The chromatograms of 10 batches of the compound giant knotweed rhizome

3 讨论

3.1 检测波长的选择

实验过程中查阅了相关资料,选择了多个波长进行分析,发现检测波长为 310 nm 时,色谱峰的峰强度普遍比较强,基线也比较平稳,而且复方虎杖中的多数成分在此波长下均有吸收,所以选择 310 nm 作为指纹图谱的检测波长。

3.2 流动相的选择

流动相的选择过程中共计比较了 5 种条件:甲醇:水、甲醇:5% 乙腈、甲醇:5% 乙酸、5% 乙腈:水、5% 乙腈:5% 乙酸。结果表明甲醇:5% 乙酸系统效果最佳,采用该系统各色谱峰的峰型和分离度较好,且乙酸可有效抑制复方虎杖提取物中部分有效成分(主要呈弱酸性)的解离,故选定该系统作为复方虎杖药材指纹图谱检测的流动相。

3.3 提取溶媒的选择

提取溶媒的选择要依据药物的性质、剂型的特点和临床治疗的需要而决定。虎杖的主要成分蒽醌类(如大黄素,大黄酚等)易溶于乙醇。有学者研究报道,比较虎杖水提和醇提实验,结果表明,虎杖用醇提取的总蒽醌和大黄素含量远大于用水提取物的,分别可以达到 96.7% 和 96.1%^[15]。因此从复方虎杖处方中所用药物的性质可以认为用乙醇作为提取溶媒较好,同时乙醇具有一定的防腐、杀菌的功效,很适合烧烫伤创面的杀菌、抗炎治疗。且乙醇作为提取溶媒,淀粉、蛋白质等杂质成分浸出较少,乙醇提取液清亮,很适合涂膜剂剂型的需要。

3.4 小结

本实验中,复方虎杖 HPLC 指纹图谱测定方法的精密性、重复性及稳定性良好,相似度高,该方法简便、快捷、准确,所得结果能较全面地反映复方虎

杖药材中各主要成分的分布特征。该方法可作为复方虎杖质量控制的标准,且对于完善复方虎杖的研究,建立复方虎杖药材与国际接轨的质量控制标准具有重要意义。

中药的质量控制是中药现代化的一个重要组成部分,指纹图谱质控技术是保证中药制剂最终功效,实现中药现代化的关键。长期以来,中药及其复方质量难以控制,成分较为复杂,因客观指标不明、重现性差等原因而难以在国际市场上流通。美国FDA(食品药品监督管理局)已经明确表示,如果中药有了指纹图谱,达到了质量可控的基本要求,美国就将为中药及中成药敞开大门^[16-18]。随着各种分析技术的创新和提高,以及世界各国对天然药物了解和研究的不断深入,中药指纹图谱将会从方法学的研究层面逐渐向实际规范标准的方向发展,使其在方法学和技术方面都更趋成熟和完善,其研究成果将大大提升中药质量控制的水平,为加速实现中药的现代化和国际化奠定坚实的技术基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005: 145.
- [2] 牛忻群. 虎地烧伤配在烧伤中的运用[J]. 新疆中医药,1995(1): 50.
- [3] 王琪,王玲. 自制V号烧伤膏治疗大面积烧伤临床观察[J]. 湖北中医杂志,2006(1): 224.
- [4] 杨家辉,刘建华,王燕. 中医治疗烧伤概况[J]. 中国中西医结合外科杂志,2006(1): 157.
- [5] 王磊,黄澜,张勉,王峰涛. 虎杖商品药材中白藜芦醇苷的含量测定[J]. 中国中药杂志,2002,27(5): 344-347.
- [6] 郭青,鲁静. 高效液相色谱法测定何首乌及其炮制品中的蒽醌类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2000,20(5): 326.
- [7] 刘晓秋,于黎明,吴立军. 虎杖化学成分研究(I)[J]. 中国中药杂志,2003,28(1): 47-49.
- [8] 谢扬,朱秋华,刘瑞源,等. 正交实验筛选虎杖甙提取工艺[J]. 中药材,2004,27(9): 678-679.
- [9] 陈怡,罗顺德,宋金春,等. 莲子心中酚性生物碱3种主要成分定量分析及其特征图谱研究[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(4): 205-208.
- [10] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京:化学工业出版社,2002: 108-109.
- [11] 唐琛霞,阮金兰. 指纹图谱技术在中药研究中的应用[J]. 医药导报,2003,22(7): 479-481.
- [12] 易中宏,胥秀英,郑一敏,王龙. 茯苓药材指纹图谱模糊模式识别研究[J]. 重庆中草药研究,2005(1): 62.
- [13] 李磊,张宏桂,孙毅坤,等. 土茯苓药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中华中医药杂志,2007,22(4): 206-208.
- [14] 国家药典委员会. 中药色谱指纹图谱相似度评价系统(A版)[CP/DK]. 北京:国家药典委员会,2004.
- [15] 苏子仁,曾慧芳. 虎杖提取工艺初探[J]. 中国实验方剂学杂志,1998,4(1): 9.
- [16] 谢培山. 中药制剂色谱指纹图谱(图像)鉴别[J]. 中成药,2000,22(6): 391-395.
- [17] 石志红,何建涛,常文保. 中药指纹图谱技术[J]. 大学化学,2004,19(1): 33-39.
- [18] 严琳,高健,侯莉莉. 中药指纹图谱的方法学研究概述[J]. 泸州医学院学报,2004(1): 87-88.