·基础研究·

HPLC 同时测定虎杖根不同部位中的 5 种活性成分△

孔德暄[1]，朱映睿[1]，朱蔚然[1]，傅敏[1]，王光忠[1,2*]

1. 湖北中医药大学 药学院，湖北　武汉　430065；

2. 湖北省中药炮制工程技术研究中心，湖北　武汉　430065

［摘要］ **目的**：测定虎杖不同根部位（根木质部、根茎木质部、根表皮、根茎表皮、根、根茎）中的 5 种活性成分含量，为虎杖的综合利用和质量控制提供科学依据。**方法**：色谱柱为 Agilent Extend C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈和水，柱温为 40 ℃，检测波长为 290 nm，流速为 1.0 mL·min^{-1}。**结果**：5 种成分线性良好（r > 0.999），平均加样回收率为 98.4% ~ 98.8%。虎杖苷在根茎表皮中含量最高，为 72.48 mg·g^{-1}；白藜芦醇和大黄素在根表皮中含量最高，分别为 8.83 mg·g^{-1} 和 23.96 mg·g^{-1}；大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷在根茎木质部中含量最高，为 40.57 mg·g^{-1}；大黄素甲醚在根茎木质部中含量最高，为 17.24 mg·g^{-1}。**结论**：该方法快速、准确，操作简单，专属性强，可为虎杖的质量评价提供参考依据。

［关键词］ 虎杖；虎杖苷；白藜芦醇；大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷；大黄素；大黄素甲醚

［中图分类号］ R284　　［文献标识码］ A　　［文章编号］ 1673-4890（2020）01-0053-05

doi：10.13313/j.issn.1673-4890.20190401003

Simultaneous Determination of Five Active Components in Different Parts of Polygonum Cuspidatum Root by HPLC

KONG De-xuan[1]，ZHU Ying-rui [1]，ZHU Wei-ran[1]，FU Min[1]，WANG Guang-zhong[1,2*]

1. *School of Pharmacy*，*Hubei College of Chinese Medicine*，*Wuhan* 430065，*China*；

2. *Hubei Engineering Technology Research Center of Chinese Medicine Processing*，*Wuhan* 430065，*China*

［**Abstract**］ **Objective**：The contents of five active ingredients in different parts of Polygonum cuspidatum（root xylem，rhizome xylem，root epidermis，rhizome epidermis，root，rhizome）were determined，providing scientific basis for the comprehensive utilization and quality control of Polygonum cuspidatum. **Methods**：The chromatographic column was Agilent Extend C_{18} column（250 mm × 4.6 mm，5 μm），the mobile phase was acetonitrile and water，the column temperature was 40 ℃，the detection wavelength was 290 nm，and the flow rate was 1.0 mL·min^{-1}. **Results**：The five components had a good linearity（r > 0.99），with an average recovery rate of 98.4%-98.8%. The highest content of polydatin in rhizome epidermis was 72.48 mg·g^{-1}，the highest content of resveratrol and emodin was 8.83 mg·g^{-1} and 23.96 mg·g^{-1} respectively，the highest content of emodin-8-*O*-β-*D*-glucoside in rhizome xylem was 40.57 mg·g^{-1}，and the highest content of physcion in rhizome xylem was 17.24 mg·g^{-1}. **Conclusion**：The established method is rapid，accurate，simple and specific，and can provide reference for the quality evaluation of Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix decoction pieces.

［**Keywords**］ Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix；polydatin；emodin-8-*O*-β-*D*-glucoside；emodin；physcion

虎杖为蓼科植物虎杖 *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、止咳化痰的功效。可用于湿热黄疸，风湿痹痛，跌打损伤，肺热咳嗽等病症[1]。现代研究发现，虎杖具有抗炎、抗菌、抗血栓、保护心肌、抗氧化、抗肿瘤等作用[2-6]，其主要含有二苯乙烯、蒽醌及黄酮类等成分，其中二苯乙烯类主要有白藜芦醇和虎杖苷及其衍生物；蒽醌类成分主要有大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素-8-单甲醚、蒽苷 A、蒽苷 B 等；黄酮类成分主要有槲皮素

△［基金项目］ 国家重点研发计划课题（2017YFC1701003）

*［通信作者］ 王光忠，教授，研究方向：中药饮片及其制剂物质基础和质量控制研究；E-mail：wgzhong4067@sina.com

及其苷等[7]。2015 版《中华人民共和国药典》中虎杖药材和饮片以虎杖苷、大黄素的含量作为控制质量的标准之一[1]，相关文献报道也多数对虎杖中的大黄素、虎杖苷及白藜芦醇的含量进行检测[8-9]，但是虎杖中还含有很多其他的有效成分，只选两三个有效成分并不能全面控制虎杖的质量。

近年来，随着人们对虎杖中主要活性成分白黎芦醇研究的不断深入，其开发利用的领域在不断扩展，资源消耗量日渐增大。虎杖的应用包括根（皮、木质部）、根茎（皮、木质部）、茎、叶等部位，不同部位质地、色泽、成分和作用均有差异。为此，本研究围绕虎杖根、根茎药用部位中含有的虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚等主要活性成分的分布进行分析评价[10-11]，旨在为虎杖资源的科学合理利用提供依据。

1　仪器与试药

1.1　仪器

安捷伦 1260 高效液相色谱仪（VWD 检测器）；Agilent Extend C_{18} 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；SK7200HP 超声清洗器（上海科导超声仪器有限公司）；XSE105DU 十万分之一分析天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司）；AL204 万分之一电子天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）。

1.2　试药

虎杖（批号分别为：151201、151202、151203、181012、181013、181014，采自湖北省房县），经湖北中医药大学生生药教研室余坤教授鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎和根。虎杖苷（批号：H-012-161216，纯度≥98.0%，成都瑞芬思生物科技有限公司）；白藜芦醇（批号：B-002-170426，纯度≥98.0%，成都瑞芬思生物科技有限公司）；大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷（批号：D-018-171216，纯度≥98.0%，成都瑞芬思生物科技有限公司）；大黄素（批号：151215，纯度≥98.0%，四川省维克奇生物科技有限公司）；大黄素甲醚（批号：151024，纯度≥98.0%，四川省维克奇生物科技有限公司）。水为重蒸馏水，乙腈、甲醇为色谱级乙腈，其他试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　溶液的配制

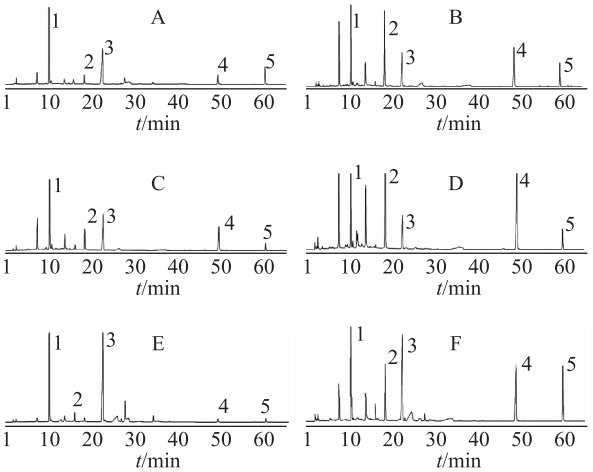
2.1.1　混合对照品溶液配制　分别称取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚适量，色谱甲醇溶解，配置成质量浓度分别为 1.022、0.203、0.95、0.45、0.48 mg·mL^{-1} 的对照品储备液。

分别精密吸取虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚对照品储备液适量，置 5 mL 容量瓶中，色谱甲醇定容至刻度，摇匀，即得虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚质量浓度分别为 204.4、40.6、190.0、90.0、96.0 μg·mL^{-1} 的混合对照品溶液。

2.1.2　供试品溶液制备　精密称取虎杖样品粉末 0.2 g，精密加入 60% 乙醇 25 mL，称质量，超声 30 min，冷却，称质量，补足减失质量，滤过，取续滤液过 0.45 μm 滤膜，即得供试品溶液。

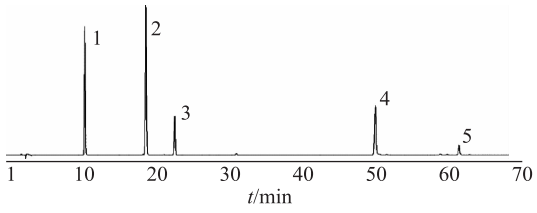
2.2　色谱条件

色谱柱为 Agilent Extend C_{18} 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm），流动相为纯乙腈（A）和水（B），流速为 1 mL·min^{-1}，进样量为 10 μL，检测波长为 290 nm，柱温为 40 ℃。线性梯度洗脱（0 ~ 40 min，15.0% ~ 50.0% A；40 ~ 60 min，50.0% ~ 90.0% A）。供试品溶液和混合对照品溶液色谱图见图 1 ~ 2。



注：A. 根茎；B. 根；C. 根茎表皮；D. 根表皮；E. 根茎木质部；F. 根木质部；1. 虎杖苷；2. 白藜芦醇；3. 大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷；4. 大黄素；5. 大黄素甲醚。

图 1　虎杖不同药用部位色谱图



注：1. 虎杖苷；2. 白藜芦醇；3. 大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷；4. 大黄素；5. 大黄素甲醚。

图 2　虎杖混合对照品色谱图

2.3　线性范围考察

吸取混合对照品溶液 0.25、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00 mL 分别置 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，混匀。按 **2.2** 项下色谱条件不同浓度对照品均进样 10 μL，测定峰面积。以质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*），进行线性回归，得回归方程。表 1 结果表明，5 种成分的质量浓度与峰面积呈良好的线性关系，*r* 均大于 0.999。

表 1　虎杖 5 种成分检测方法线性范围考察结果

样品	回归方程	线性范围/mg·mL^{-1}	*r*
虎杖苷	$Y=22\ 665X-126.47$	0.010 0～0.082 0	1.000 0
白藜芦醇	$Y=3\ 837.4X-58.45$	0.010 0～0.080 0	0.999 3
大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷	$Y=9\ 770.4X-3.284\ 8$	0.009 5～0.076 0	0.999 9
大黄素	$Y=28\ 319X+2.641\ 4$	0.005 0～0.039 6	1.000 0
大黄素甲醚	$Y=9\ 770.4X-3.284\ 8$	0.004 8～0.038 4	0.999 9

2.4　精密度试验

取混合对照品溶液 1 份，进样 10 μL，连续进样 6 次，测得峰面积，计算得虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚 RSD 分别为 0.3%、0.2%、0.4%、0.1%、0.2%，说明仪器的精密度良好。

2.5　稳定性试验

取 **2.1.2** 项下供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μL 进行分析，测定峰面积，得虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚峰面积的 RSD 分别为 0.8%、0.6%、0.4%、0.3%、1.2%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6　重复性试验

取同一批样品 6 份，按 **2.1.2** 项下方法制备供试品溶液，参照 **2.2** 项下色谱条件测定其含量，计算得虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚平均质量分数为 17.23、2.13、18.97、7.16、14.82 mg·g^{-1}，其 RSD 分别为 0.9%、0.8%、1.0%、0.7%、0.8%，说明该方法重复性良好。

2.7　加样回收试验

取同一批样品 6 份，每份 0.1 g，精密称定，分别加虎杖苷（1.022 mg·mL^{-1}）1.5 mL、白藜芦醇（0.203 mg·mL^{-1}）1 mL、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷（0.95 mg·mL^{-1}）1 mL、大黄素（0.45 mg·mL^{-1}）2 mL、大黄素甲醚（0.48 mg·mL^{-1}）3 mL，按 **2.1.2** 项下方法制备供试品溶液，参照 **2.2** 项下色谱条件分别测定峰面积，计算回收率，结果虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚的平均回收率分别为 98.8%、98.6%、98.5%、98.4%、98.6%，RSD 分别为 0.6%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%，结果见表 2。

表 2　虎杖 5 种成分加样回收率试验结果（*n*=6）

名称	加样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
虎杖苷	0.101 7	1.716	1.533	3.214	98.9	98.8	0.6
	0.100 5	1.706	1.533	3.179	98.1		
	0.102 9	1.727	1.533	3.198	98.1		
	0.100 4	1.705	1.533	3.227	99.6		
	0.101 9	1.723	1.533	3.234	99.3		
	0.101 7	1.718	1.533	3.204	98.5		
白藜芦醇	0.101 7	0.232	0.203	0.428	98.3	98.6	0.6
	0.100 5	0.209	0.203	0.409	99.2		
	0.102 9	0.221	0.203	0.415	97.8		
	0.100 4	0.218	0.203	0.419	99.5		
	0.101 9	0.215	0.203	0.411	98.3		
	0.101 7	0.223	0.203	0.420	98.5		

续表 2

名称	加样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷	0. 101 7	1. 888	1. 900	3. 715	98. 1	98. 5	0. 7
	0. 100 5	1. 877	1. 900	3. 721	98. 5		
	0. 102 9	1. 899	1. 900	3. 742	98. 5		
	0. 100 4	1. 876	1. 900	3. 746	99. 2		
	0. 101 9	1. 895	1. 900	3. 698	97. 4		
	0. 101 7	1. 890	1. 900	3. 761	99. 2		
大黄素	0. 101 7	0. 738	0. 900	1. 601	97. 7	98. 4	0. 8
	0. 100 5	0. 734	0. 900	1. 625	99. 5		
	0. 102 9	0. 743	0. 900	1. 627	99. 0		
	0. 100 4	0. 733	0. 900	1. 608	98. 4		
	0. 101 9	0. 741	0. 900	1. 614	98. 3		
	0. 101 7	0. 739	0. 900	1. 598	97. 5		
大黄素甲醚	0. 101 7	1. 486	1. 440	2. 846	97. 3	98. 6	0. 9
	0. 100 5	1. 477	1. 440	2. 897	99. 3		
	0. 102 9	1. 494	1. 440	2. 884	98. 3		
	0. 100 4	1. 476	1. 440	2. 852	97. 8		
	0. 101 9	1. 491	1. 440	2. 918	99. 5		
	0. 101 7	1. 487	1. 440	2. 905	99. 2		

2. 8　虎杖中 5 种化学成分的含量测定

精密量取 6 份不同批次的样品适量，按 **2. 1. 2** 项下方法制备供试品溶液，依次进样分析，测定峰面积，计算虎杖根不同部位中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的含量，结果见表 3。

表 3　虎杖不同药用部位 5 种成分含量测定结果

mg·g^{-1}

部位	样品批号	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷	大黄素	大黄素甲醚	药用部位	样品批号	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷	大黄素	大黄素甲醚
根茎	151201	57. 33	1. 26	34. 64	3. 76	15. 35	根表皮	151201	24. 15	8. 83	10. 26	23. 29	8. 89
	151202	57. 60	1. 22	35. 62	3. 55	14. 82		151202	23. 76	8. 65	9. 96	23. 25	9. 30
	151203	57. 24	1. 18	34. 94	3. 42	14. 52		151203	23. 66	8. 52	8. 33	23. 96	8. 79
	181012	56. 80	1. 25	35. 52	3. 59	14. 76		181012	23. 87	8. 76	9. 54	23. 54	9. 26
	181013	55. 76	1. 13	34. 71	3. 48	15. 12		181013	24. 25	8. 58	9. 68	23. 86	9. 42
	181014	57. 12	1. 21	34. 85	3. 65	14. 35		181014	23. 46	8. 64	10. 12	23. 68	9. 12
根	151201	27. 00	6. 04	14. 26	9. 76	13. 15	根茎木质部	151201	35. 75	0. 34	38. 27	0. 74	16. 21
	151202	26. 82	5. 99	13. 52	10. 20	14. 30		151202	36. 90	0. 36	40. 57	0. 71	17. 05
	151203	27. 18	6. 17	13. 83	10. 04	13. 44		151203	35. 73	0. 34	39. 52	0. 72	17. 14
	181012	26. 52	6. 12	14. 15	10. 32	14. 12		181012	35. 84	0. 31	40. 51	0. 64	16. 49
	181013	26. 94	6. 23	13. 68	9. 86	13. 85		181013	36. 72	0. 33	38. 54	0. 73	17. 24
	181014	27. 13	2. 84	13. 71	9. 94	14. 28		181014	36. 84	0. 35	39. 84	0. 78	16. 89
根茎表皮	151201	72. 18	4. 13	38. 24	13. 65	9. 59	根木质部	151201	17. 75	2. 26	19. 83	7. 32	15. 18
	151202	72. 22	4. 24	38. 95	13. 29	9. 54		151202	17. 02	2. 15	18. 72	7. 32	14. 73
	151203	72. 58	4. 30	36. 74	14. 82	9. 88		151203	17. 93	2. 25	19. 28	7. 38	14. 90
	181012	71. 35	4. 09	37. 58	14. 46	9. 64		181012	16. 85	2. 48	19. 53	7. 56	14. 89
	181013	70. 82	4. 36	38. 45	13. 87	9. 53		181013	17. 65	2. 16	20. 12	7. 68	15. 36
	181014	72. 48	4. 28	37. 08	14. 53	9. 91		181014	17. 84	2. 38	19. 45	7. 24	15. 49

3　讨论

3.1　色谱条件的选择

为了提高分析的灵敏度和精确度，本文考察了不同流动相组成（甲醇-水、乙腈-水）对实验结果的影响，结果表明，流动相采用乙腈-水梯度洗脱，能够获得良好的色谱分离效果。采用 UV 检测器对检测波长进行了考察，根据 5 种对照品的紫外-可见吸收光谱，虎杖苷和白藜芦醇在 310 nm 左右有最大吸收，而大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚在 290 nm 和 440 nm 左右有最大吸收。综合考虑，选择 290 nm 作为检测波长。

3.2　供试品溶液制备的优化

为了使 5 种活性成分能被更完全地提取出来，本研究对提取溶剂（80% 乙醇、60% 乙醇、40% 乙醇和甲醇）、提取时间（10、20、30、40 min）等影响因素进行考察，记录色谱图。结果显示，以 60% 乙醇为提取溶剂、超声提取 30 min 制备样品的色谱图峰面积相对较大，化合物总含量相对较高，故最终确定供试品的制备方法：60% 乙醇超声提取 30 min。

本实验对虎杖的根茎、根、根茎表皮、根表皮、根茎木质部、根木质部中的虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷和大黄素甲醚 5 种活性成分进行了定量分析。结果表明，虎杖苷在根茎表皮中质量分数最高，为 72.48 $mg\cdot g^{-1}$；白藜芦醇和大黄素在根表皮中质量分数最高，分别为 8.83 $mg\cdot g^{-1}$ 和 23.96 $mg\cdot g^{-1}$；大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷在根茎木质部中质量分数最高，为 40.57 $mg\cdot g^{-1}$；大黄素甲醚在根茎木质部中质量分数最高，为 17.24 $mg\cdot g^{-1}$。因此在采收虎杖药材时表皮尽量不要破损，要尽量保存其根及根茎的完整，最大程度上保留虎杖的有效成分。方法学考察结果表明本方法具有很好的重复性、稳定性、精密度和回收率，说明该方法准确、可靠。

白藜芦醇及虎杖苷具有抗肿瘤、降血脂、抑制血小板聚集、调节脂蛋白代谢、保肝、抗氧化、抑菌等多种药理作用，而以大黄素、大黄素甲醚为代表的蒽醌类化合物具有抗菌、保肝、泻下、抗癌等功能[12]。检测分析结果提示，为了更好利用虎杖活性成分、提高疗效，可根据临床需要选择不同部位入药。该研究为虎杖资源的合理利用提供了科学依据。

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：中国医药科技出版社，2015：208.

[2] 任丽. 虎杖提取物治疗痛风性关节炎的初步成药性研究[D]. 遵义：遵义医学院，2017.

[3] 时圣明，潘明佳，王文倩，等. 虎杖的化学成分及药理作用研究进展[J]. 药物评价研究，2016，39(2)：317-321.

[4] 夏婷婷，杨珺超，刘清源，等. 虎杖药理作用研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志，2016，26(3)：294-297.

[5] 黄海量. 中药虎杖药理作用研究进展[J]. 西部中医药，2012，25(4)：100-103.

[6] 裴莲花，吴学，金光洙. 虎杖化学成分及药理作用研究现状[J]. 延边大学医学学报，2006，29(2)：147-149.

[7] 朱春霞，韩彬. 虎杖的化学成分与抗痛风作用研究进展[J]. 深圳中西医结合杂志，2016，26(8)：191-193.

[8] 欧水平，任丽，王森，等. 虎杖提取物的制备及含量测定研究[J]. 药学研究，2017，36(10)：567-570，608.

[9] 黄尹，李国锋. 不同产地虎杖中各成分含量的比较[J]. 中医药信息，2015，32(5)：68-71.

[10] 张清峰，付莹娟，陈继光，等. 高效液相色谱法同时测定虎杖中 5 种活性成分[J]. 现代食品科技，2014，30(3)：216-219.

[11] 程茜菲，常青，刘琦，等. 高效液相色谱法同时测定维血宁中虎杖苷、大黄素-8-*O*-*β*-*D*-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的含量[J]. 中南药学，2013，11(9)：686-689.

[12] 余志芳，罗婷婷，欧泉，等. 虎杖生长发育过程中有效成分变化规律的研究[J]. 中药与临床，2016，7(2)：1-7.

（收稿日期：2019-04-01　　编辑：谢睿）