

超高效液相色谱法测定拉萨大黄中三种化学成分的含量

安利贞¹, 陈云建^{2△}, 方芳², 杨兆祥²

(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650500; 2. 昆明制药集团股份有限公司药物研究院, 云南昆明 650100)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱(UPLC)法分离和测定拉萨大黄药材中虎杖苷、甲基虎杖苷、曲札芪苷的含量。方法 色谱柱: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (2.1×50mm, 1.7μm); 流动相: 乙腈-水 (15:85), 梯度洗脱; 流速: 0.4mL/min; 检测波长: 319nm; 柱温: 30℃; 进样量: 0.4μL。结果 虎杖苷在 1.0225~204.5μg/mL; 甲基虎杖苷在 1.02~204μg/mL; 曲札芪苷在 1~200μg/mL 的范围内与峰面积呈良好的线性关系。平均回收率分别为 101.35% (RSD=3.7%), 98.36% (RSD=1.81%), 99.33% (RSD=3.64%)。结论 较之普通 HPLC 法, UPLC 法在不影响分离效果的情况下可大大提高分析速度, 改善分析效果; 本方法可以作为拉萨大黄药材质量控制的手段之一。

关键词: 拉萨大黄; 曲札芪苷; 虎杖苷; 甲基虎杖苷; 超高效液相色谱法(UPLC)

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)01-0031-04

超高效液相色谱法(UPLC)是分离科学中的一个全新类别, UPLC 借助于 HPLC(高效液相色谱法)的理论及原理, 涵盖了小颗粒填料、非常低系统体积及快速检测手段等全新技术, 增加了分析的通量、灵敏度及色谱峰容量。研究^[1-2]发现 UPLC 技术非常适宜用于中药复杂体系的分析检测, 但目前国内将 UPLC 法应用于中药分析的相关研究尚不多见。本文以拉萨大黄药材为研究对象, 将 UPLC 法应用于中药的分析测试中, 为中药的质量研究及控制提供一种新的参考方法。

蓼科植物拉萨大黄 (*Rheum lhasaense* A.J.Liet P.K.Hsiao) 的干燥根, 具有泻热毒, 破积滞, 行瘀血等功效。用于治疗食积腹胀, 水火烫伤, 口舌生疮。主产于拉萨、林周、曲松。本种的根中不含蒽醌与其他种不同。西藏大黄 (*Rheum tibeticum* Maxim.ex Hook.f.) 也是蓼科植物产于西藏西部。分布于巴基斯坦、阿富汗、克什米尔地区^[3]。中华藏本草亦有记载: 亚大黄(藏语曲匝)是蓼科大黄属 8 种植物的根及根茎。其中包括拉萨大黄及西藏大黄等^[4]。曲札芪苷是一种芪类化合物, 目前为止只从西藏大黄及拉萨大黄中分离提取到此化合物。本实验目的在于建立

一种快速、准确、可靠的液相色谱方法同时检测药材中曲札芪苷、虎杖苷、甲基虎杖苷的含量。不仅可以为进一步合理开发提取曲札芪苷的药材提供科学依据。亦可考察不同亚大黄品种中曲札芪苷、虎杖苷及甲基虎杖苷的含量, 为进一步开发利用亚大黄提供科学支持。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC H-class 液相色谱仪 (QSM 四元溶剂管理器、TUE 检测器、FTN 样品管理器、EMPOWER 3 软件工作站); BRANSON 5510 型超声仪; 梅特勒 XP-205 型分析天平; 日本岛津 UV-2450 型紫外/可见分光光度计。

1.2 试剂与材料

曲札芪苷对照品(昆明制药集团股份有限公司药物研究院自制); 虎杖苷(购于中国药品生物检定所, 批号: 111575-200502); 甲基虎杖苷(昆明制药集团股份有限公司药物研究院自制); 流动相中乙腈为西格玛公司色谱纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择及系统适用性

收稿日期: 2012-09-11 修回日期: 2012-11-20

作者简介: 安利贞(1987~), 女, 河南洛阳人, 在读研究生, 主要从事中药质量标准研究。

△通信作者: 陈云建, E-mail: chyjkm@163.com.

2.1.1 检测波长的选择

对曲札茛苈、虎杖苈、甲基虎杖苈进行紫外扫描,虎杖苈及甲基虎杖苈在 306nm 及 319nm 波长处均有较大吸收^[5],曲札茛苈在 319nm 波长处有最大吸收。但考虑到要同时测定 3 种化合物的含量最终选择 319nm 为检测波长。

2.1.2 流动相的选择

实验中首先选择乙腈-水混合溶剂为流动相。因为药材中的成分比较复杂等度洗脱难以将其分开,参考文献^[6-7]使用梯度洗脱,通过对梯度的调整最终选择本实验中所使用的梯度条件。在该流动相系统中虎杖苈、曲札茛苈和甲基虎杖苈峰型良好,供试品中测定的 3 个色谱峰均与杂质峰达到基线分离,达到药典^[8]要求。

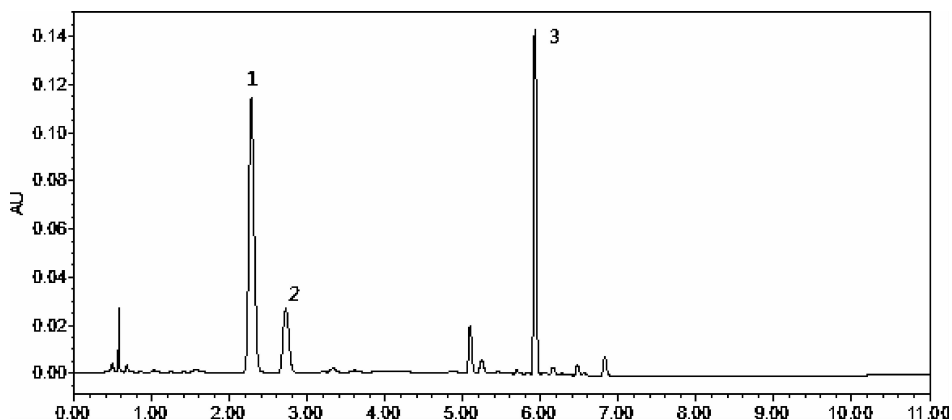
2.1.3 系统耐用性试验

试验中曾考察了 25℃、30℃、35℃等不同柱温对测定结果的影响,结果改变柱温对测定结果无明显影响。

2.1.4 色谱条件

色谱柱为 Waters 超高效液相色谱仪专用柱,型号为 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1.7μm 2.1×50mm Column;以乙腈(A)-水(B)为流动相,流速 0.41mL/min,梯度洗脱,洗脱程序:0~2.8min, A 15%~20%;2.8~5.0min, A 20%~50%;5.0~8.5min, A 50%~30%;8.5~9.0min, A 30%~15%;9.0~11min, A 15%~15%;检测波长 319nm;柱温 30℃;进样量 0.4μL。理论板数按甲基虎杖苈计算大于 10 000,结果见图 1。

2.2 对照品储备溶液的制备



1. 曲札茛苈; 2. 虎杖苈; 3. 甲基虎杖苈

图 1 混合对照品的 UPLC 图

分别精密称取曲札茛苈、虎杖苈、甲基虎杖苈对照品适量,置于 3 个 100mL 容量瓶中,配制成浓度为 200μg/mL 的对照品储备溶液。

2.3 供试品储备溶液的制备

精密称取药材约 0.1g 于 100mL 具塞锥形瓶,精密加入 75%甲醇 50mL,超声(490W,40kHz)30min,过 0.22μm 微孔滤膜,作为供试品储备溶液。

2.4 线性范围考察

取对照品储备溶液,分别配制成浓度为 1,2,3,4,8,10,16,20,40,100,200μg/mL 的曲札茛苈对照品溶液;浓度为 1.0225,2.045,3.067,4.09,8.18,10.225,16.36,20.45,40.9,102.25,204.5μg/mL 的虎杖苈对照品溶液;浓度为 1.02,2.04,3.06,4.08,

8.16,10.2,16.32,20.4,40.8,102,204μg/mL 的甲基虎杖苈对照品溶液,精密量取各对照品溶液 0.4μL 注入超高效液相色谱仪,记录各峰的峰面积。以峰面积(y)对进样浓度(x,μg/mL)做线性回归,得到 3 个回归方程。见表 1。结果表明曲札茛苈、虎杖苈、甲基虎杖苈均在所配制浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

表 1 三种化学成分线性考察

化合物名称	线性范围/ μg/mL	线性回归方程	相关系数
曲札茛苈	1~200	$y=9729.3x-1491.5$	0.9998
虎杖苈	1.0225~204.5	$y=9167x+907.59$	0.9998
甲基虎杖苈	1.02~204	$y=7937.3x+289.42$	0.9999

2.5 精密度试验

分别“取 2.4”项下浓度为 40 μ g/mL 的曲札芪苷对照品溶液、浓度为 40.9 μ g/mL 的虎杖苷对照品溶液、浓度为 40.8 μ g/mL 的甲基虎杖苷对照品溶液各 0.4 μ L,连续进样 6 次,测定曲札芪苷、虎杖苷、甲基虎杖苷的峰面积,RSD 分别为 2.9%,2.0%,1.9%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取拉萨大黄药材粉末,照“2.3”项下的方法操作,分别测定含量。结果曲札芪苷、虎杖苷、甲基虎杖苷的平均含量分别为 2.30%,1.7%,4.12%;曲札芪苷、虎杖苷、甲基虎杖苷的 RSD 分别为 1.4%,2.3%,2.0%($n=6$)

2.7 稳定性试验

取同一份供试品溶液,室温下放置,分别在 0,2,4,8,12,24,36,48h 测定其峰面积,结果曲札芪苷、虎杖苷、甲基虎杖苷在 48h 内稳定,RSD 分别为 1.7%,0.9%,1.4%($n=8$)。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的药材粉末,照“2.3”项下的方法操作,分别精密量取 2mL 置于 9 个 50mL 容量瓶中。精密量取浓度为 40 μ g/mL 的曲札芪苷、虎杖苷、甲基虎杖苷混合对照品溶液 1,1.5,2mL 各 3 份,依次加入上述 9 个容量瓶中,用 75%甲醇定容,照“2.1”项下的色谱条件测定,计算回收率。结果曲札芪苷的平均回收率 99.33%,RSD=3.64%;虎杖苷的平均回收率 101.35%,RSD=3.7%;甲基虎杖苷的平均回收率为 99.36%,RSD=1.81%($n=9$)。

2.9 样品含量测定

取拉萨大黄样品,按照“2.3”项下的方法操作,进样量 0.4 μ L,以外标法计算各成分的量,结果见表 2。

表 2 样品测定结果

批号	曲札芪苷/%	虎杖苷/%	甲基虎杖苷/%
拉萨大黄 1 号	3.7	1.27	3.14
拉萨大黄 2 号	3.71	1.39	5.91
拉萨大黄 3 号	2.57	0.99	5.13
西藏大黄 1 号	6.17	2.15	9.32
西藏大黄 2 号	7.78	2.36	8.97
西藏大黄 3 号	4.06	1.79	6.47

3 讨论

从实验结果可以看出:不同产地大黄中曲札芪苷含量存在差异,西藏大黄中所含曲札芪苷的量总体比拉萨大黄高。此结果为进一步评价大黄药材药材质量提供了数据支持。

本实验用 UPLC 法进行拉萨大黄中 3 种化学成分的含量测定,与普通 HPLC 方法相比具有分析时间短的优势,在 11min 内对 3 种待测成分进行了分离,分析速度提高了 6 倍,同时该方法具有良好的准确度和精密度。

UPLC 与普通的 HPLC 法相比只是改变了色谱柱的粒径,其分离原理并没有改变,因此我们可以将传统的 HPLC 分析方法通过转换而应用于 UPLC,不仅可以合理利用原有的 HPLC 方法,亦可以为 UPLC 方法的开发与优化节约时间。

该方法简单、合理、有效,可以作为控制拉萨大黄药材质量的方法;同时也体现了 UPLC 法在中药复杂成分分析和中药质量标准化方面的广阔应用前景,为中药的分析与检测提供了一种强大而有效的分析工具,是对中药研究领域是一个极大促进,相信在不久的将来 UPLC 法必将在研究领域获到更大的发展与应用。

参考文献

- [1] 金高娃,章飞芳,薛兴亚,等.超高效液相色谱在复杂体系中药分离分析中的应用[J].世界科学技术:中药现代化,2006,8(3):106-111.
- [2] 杨义芳.超高效/高分离度快速/超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用[J].中草药,2008,9(8):1259-1263.
- [3] 吴征.西藏植物志[M].北京:科学出版社,1983:592-593.
- [4] 罗达尚.中华藏本草[M].北京:民族出版社,1997:49-50.
- [5] 耿家玲,沈勇,康绍建.HPLC 法测定栽培大黄中 3 种成分的含量[J].中国药师,2011,14(5):666-668.
- [6] 蔡丽芬,钟国跃,张倩,等.HPLC 测定不同生长年限采收期何首乌二苯乙烯苷和蒽醌类成分的含量[J].中国中药杂志,2010,35(10):1221-1225.
- [7] 黄慧莲,果德安,李萍.反向高效液相色谱法测定中药菝葜中芪类成分的含量[J].中国新药杂志,2008,17(24):2122-2124.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国科技出版社,2010:附录 37.

(编辑:岳胜难)

Determination of three Compositions in Rheum Ihasaense by UPLC

AN Li-zhen¹, CHEN Yun-jian², FANG-Fang², YANG Zhao-xiang²

(1. Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2. Institute for Drug Research and Development of Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming Yunnan 650100)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for the determination of polydatin, deoxyrhapontin and piceatannol 3'-O-β-D-glucopyranoside by ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Methods** The assay was performed on a ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 1.7 μm 2.1×50mm Column with acetonitrile-water (15:85) as mobile phase in gradient elution at a flow of 0.4 ml/min. The detection wavelength was set at 319nm. The column temperature was 30 °C. **Results** polydatin, deoxyrhapontin and piceatannol 3'-O-β-D-glucopyranoside showed good linearity in the ranges of 1.0225~204.5, 1.02~204, 1~200 μg·mL⁻¹, respectively. The average recoveries of polydatin was 101.35% (RSD=3.7%), 98.36% (RSD=1.81%) for deoxyrhapontin and 99.33% (RSD=3.64%) for piceatannol 3'-O-β-D-glucopyranoside. **Conclusion** UPLC method may greatly improve the separation efficiency and analysis speed; This method can be applied in the determination of polydatin, deoxyrhapontin and piceatannol 3'-O-β-D-glucopyranoside in Rheum Ihasaense.

KEY WORDS: Rheum Ihasaense; piceatannol 3'-O-β-D-glucopyranoside; polydatin; deoxyrhapontin; UPLC

(原文见第 22 页)

The Origin and Development of “Treating the Same Syndrome with Different Methods”

SHEN Hong-chun¹, WANG Hao-zhong², TAO Yi², YAN Shi-lin²

(1. Luzhou Medical College, Luzhou Sichuan 646000; 2. Chengdu Chinese medicine University, Chengdu Sichuan 610075)

ABSTRACT: The author thinks that “treating same pattern with different method” widespread and ancient literature and clinical practice, points out that the “treating same pattern with different method” and “different disease pathogenesis” differences and relations. The kidney Yang deficiency syndrome as the research object respectively from the formula, clinical various immunity-lower disease analyzed the “treating same pattern with different method” connotation, this is not only different from disease pathogenesis in theory of supplement, but also enriched the clinical syndrome differentiation thinking.

KEY WORDS: “treating same pattern with different method”; Yang-deficiency syndrome

《云南中医学院学报》欢迎网上注册投稿

网址: <http://www.ynzyxyxb.cn>