

# 高效液相色谱法同时测定虎杖中五种活性成分

张清峰, 付莹娟, 陈继光, 上官新晨

(江西农业大学食品科学与工程学院, 江西省高等学校天然产物开发与利用重点实验室, 江西南昌 330045)

**摘要:** 本文建立了虎杖中五种活性成分: 虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的高效液相色谱分析方法。色谱柱为 Agilent Zorbax SB C18 柱 (4.6×250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为乙腈 (A) 和水 (B), 梯度洗脱程序为: 0~40 min, 15.0~50.0% A; 40~60 min, 50.0~90.0% A。柱温为 40  $^{\circ}$ C, 检测波长为 290 nm, 流速为 1.0 mL/min。五种成分线性良好 (R>0.999), 保留时间相对标准偏差 (RSD) 介于 0.14~1.67%, 峰面积 RSD 介于 0.96~2.96%, 加标回收率介于 96.8~104.7%。优化了虎杖的提取条件, 最佳条件为 60%乙醇超声提取 30 min。对 10 批虎杖样品分析结果表明: 虎杖苷和大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷是虎杖乙醇提取物中两种含量最高的活性成分, 含量范围分别为 9.80~20.42 mg/g 和 5.56~24.45 mg/g。白藜芦醇和大黄素的含量范围分别为 1.07~5.94 mg/g 和 3.79~17.85 mg/g, 而大黄素甲醚含量为 0.57~1.69 mg/g。该高效液相色谱法重复性好、精密度高, 可用于虎杖中五种活性成分的同时测定。

**关键词:** 虎杖; 活性成分; 测定; 高效液相色谱法

文章编号: 1673-9078(2014)3-216-219

## Simultaneous Determination of Five Bioactive Compounds in *Polygonum cuspidatum* by HPLC

ZHANG Qing-feng, FU Ying-juan, CHEN Ji-guang, SHANGGUAN Xin-chen

(Key Laboratory of Jiangxi Provincial Department of Education in Natural Product Research and Development, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** Five bioactive compounds namely polydatin, resveratrol, emodin-8-O- $\beta$ -D-glucoside, emodin and physcion in *Polygonum cuspidatum* were determined by HPLC. An Agilent Zorbax SB C18 column (250 mm×4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and water (B) with linear gradient program of 15.0~50.0% (A) in 0~40 min and 50.0~90.0% (A) in 40~60 min. The column temperature, detection wavelength and flow rate were set at 40  $^{\circ}$ C, 290 nm and 1.0 mL/min respectively. The calibration curve of each analyte was constructed under six concentrations. The correlation coefficients were all more than 0.999, and the RSD of  $t_R$  ranged from 0.14% to 1.67%, while RSD of the peak area was from 0.96% to 2.96%. The spike recovery of the five analytes was 96.8~104.7%. The extraction condition was optimized, and ultrasonic extraction with 60% ethanol for 30 min was chosen. The method was successfully applied for analysis of ten *Polygonum cuspidatum* samples. The results showed that polydatin and emodin-8-O- $\beta$ -D-glucoside were the two most dominant constituents in *Polygonum cuspidatum* with contents ranges of 9.80~20.42 mg/g and 5.56~24.45 mg/g, respectively. The method has good repeatability and high precision, and can be used for simultaneous analysis of the five constituents in *Polygonum cuspidatum*.

**Key words:** *Polygonum cuspidatum*; bioactive constituents; determination; high performance liquid chromatography

虎杖为蓼科植物虎杖的干燥根茎, 是我国传统中药, 也是卫生部允许在保健食品中使用的中草药之一。虎杖提取物具有消炎<sup>[1]</sup>、抑菌<sup>[2]</sup>及抗氧化<sup>[3]</sup>等作用。这些生物活性主要来源于虎杖中芪类和蒽醌类有效成分<sup>[2]</sup>, 如虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖

收稿日期: 2013-10-14

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目 (20122BAB214005); 江西农业大学青年基金资助项目 (QN201108)

作者简介: 张清峰 (1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为功能性食品成分, 天然产物开发与利用

苷、大黄素、大黄素甲醚等。大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷在体内脑缺血再灌注损伤模型中有保护神经的功能<sup>[4]</sup>。大黄素具有抗病毒、抑菌、扩张血管及利尿等多种作用<sup>[5]</sup>。白藜芦醇是虎杖苷的苷元, 属于多羟基芪类化合物, 具有降血脂、抗肿瘤、促进健康和延长生命等多种生物活性<sup>[6-7]</sup>。

近年来, 随着临床应用的深入研究, 虎杖日益受到人们的重视。为更好的开发利用虎杖资源及控制其质量, 建立其主要活性成分的定性定量分析方法非常有必要。目前, 对虎杖中白藜芦醇、虎杖苷和大黄素

等一种或数种成分含量测定方法的研究较多,如陈志强等建立了虎杖中大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的 HPLC 测定方法<sup>[8]</sup>;Chu 等应用毛细管电泳法测定了虎杖中白藜芦醇、大黄素、大黄酸和大黄酚等四种成分<sup>[9]</sup>;Lu 等通过 HPLC-DAD 法优化了虎杖中大黄素的提取条件并建立了其定量方法<sup>[10]</sup>。2010 版《中国药典》建立了虎杖中虎杖苷和大黄素的 HPLC 测定方法,要求虎杖苷含量不低于 0.15%,大黄素含量不低于 0.6%。但两种成分的液相色谱条件不同,需要分开单独测定<sup>[11]</sup>。本文建立了同时测定虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚等 5 种有效成分的 HPLC 方法。方法重现性好、操作简便、快速、精密度高,为科学客观评价虎杖的质量提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

HPLC 系统为 Waters 1525 系统,配备双波长检测器及在线脱气系统。色谱纯甲醇、乙腈购自国药集团化学试剂有限公司(沃凯牌),水为超纯水。虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚标准品购自上海同田生物有限公司,具体化学结构见图 1。10 批虎杖购自南昌市不同中药店,粉碎后过 40 目筛。

### 1.2 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax SB C18 柱(4.6 $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m),流动相为纯乙腈(A)和水(B),流速为 1 mL/min,进样量为 10  $\mu$ L,检测波长为 290 nm,柱温为 40  $^{\circ}$ C。线性梯度洗脱程序为:0~40 min, 15.0~50.0% A; 40~60 min, 50.0~90.0% A。

### 1.3 虎杖最佳提取条件的优化

**提取溶剂优化:**精密称取虎杖样品 1 粉末 0.2 g,分别加入 100%乙醇、80%乙醇、60%乙醇、40%乙醇、20%乙醇、水和甲醇 25 mL,超声提取 30 min,经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后进行液相分析。

**提取时间优化:**精密称取虎杖样品 1 粉末 0.2 g,用 60%乙醇作为提取剂,超声提取时间分别为 0 min、5 min、10 min、20 min、30 min 和 40 min,经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后进行液相分析。

### 1.4 虎杖样品液制备

精密称取虎杖粉 0.2 g,置具塞锥形瓶中,精密加

25 mL 60%乙醇,密塞后称定重量,然后水浴超声(功率为 500 W,频率为 40 kHz)处理 30 min,再称重,用 60%乙醇补足减失的重量,经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤,作为供试品溶液。

### 1.5 数据统计

数据统计和作图软件为 origin 6.0。每个样品平行测定三次,结果表示为平均值 $\pm$ 标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HPLC 分离条件优化



图 1 5 种成分化学结构图

Fig.1 Chemical structures of the five constituents

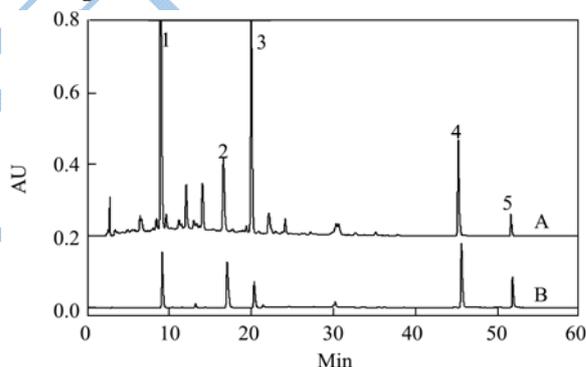


图 2 虎杖样品 (A) 及标准品色谱图 (B)

Fig.2 The HPLC chromatograms of *Polygonum cuspidatum* sample (A) and standard markers (B)

注: 1: 虎杖苷, 2: 白藜芦醇, 3: 大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷, 4: 大黄素, 5: 大黄素甲醚。

经过比较甲醇和乙腈作为流动相在不同线性梯度洗脱程序下的分离效果,最佳的分离条件是以乙腈(A)及水(B)作为流动相,线性梯度洗脱程序为 0~40min, 15.0~50.0% A; 40~60 min, 50.0~90.0% A,流速为 1 mL/min。根据五种标准品的紫外-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- $\beta$ -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。标准品和虎杖样品分离结果见图 2,可以看到整个分离可以在 60 min 内完成,峰与峰之间可以完全分开。通过与标准品保留时间对照,

虎杖样品色谱图中峰 1、2、3、4、5 分别鉴定为虎杖苷、白藜芦醇、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚。

## 2.2 虎杖提取条件优化

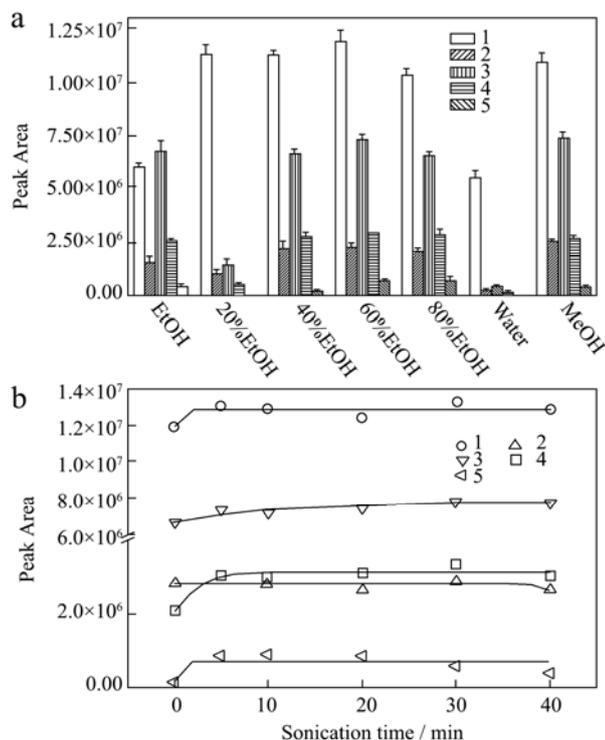


图 3 不同提取溶剂提取效果 (A) 及不同超声时间影响 (B);

Fig.3 The effect of extraction solvents (A) and sonication time (B)

注: EtOH: 乙醇, MeOH: 甲醇, 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。

比较了水、甲醇、20%、40%、60%、80%及 100% 乙醇对虎杖中五种成分的提取效果。由图 3A 可知,

水是效果最差的提取溶剂, 几乎不能提取白藜芦醇、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚。综合比较, 60%乙醇对虎杖中五种成分的提取效果最好, 所以选择 60%乙醇作为提取剂。

以 60%乙醇为提取溶剂, 分别超声 0 min、5 min、10 min、20 min、30 min 和 40 min 后, 进行 HPLC 分析, 比较各峰的面积情况。由图 3B 可知: 虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚经 5 min 超声处理后峰面积达到最大, 之后保持不变。大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷在 0~30 min 内, 随超声时间延长峰面积逐渐上升, 而白藜芦醇经过不同超声时间处理峰面积几乎没变化, 所以综合选择 30 min 作为提取时间。

## 2.3 定量分析方法学考察

在 0~100 μg/mL 浓度范围内, 配制 6 个浓度的标准品溶液进行 HPLC 分析, 采用二元线性回归法得到标准品浓度(X)对峰面积(Y)的回归方程。表 1 结果表明, 五种成分的浓度与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数 R 均大于 0.999。

将浓度为 20 μg/mL 的标准品溶液连续进样 6 次, 计算各标准品保留时间及峰面积的相对标准偏差。表 1 结果表明五种成分的保留时间相对标准偏差介于 0.14~1.67%, 峰面积的相对标准偏差介于 0.96~2.96% 之间, 表明本方法的精密度良好。

回收率: 往已知浓度的样品溶液中加入等体积的 20 μg/mL 的标准品溶液, 根据标准曲线, 测定各物质含量。回收率=100×(测定浓度-初始浓度)/加样浓度。测试结果表明五种化合物的加标回收率介于 96.8~104.7%。

表 1 检测方法线性、精密度实验结果

Table 1 Precision and linearity of HPLC method of different analytes

样品	RSD/%		回归方程 <sup>a</sup>	线性范围 (μg/mL)	R	回收率 /% <sup>b</sup>
	t <sub>r</sub>	峰面积				
虎杖苷	1.67	1.57	Y=34736X-68291	0~100	0.9997	102.3±1.9
白藜芦醇	0.71	1.82	Y=65964X+53455	0~100	0.9996	96.8±3.1
大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷	0.71	2.96	Y=15275X+18394	0~100	0.9998	98.9±2.3
大黄素	0.38	1.78	Y=32151X-63485	0~100	0.9998	104.7±2.1
大黄素甲醚	0.14	0.96	Y=33996X-11134	0~100	0.9991	102.2±1.6

注: Y 为峰面积, X 为浓度。

## 2.4 样品含量分析

将建立的定量分析方法用于 10 批虎杖样品中五种成分的定量分析, 测定结果如表 2。在 10 批虎杖样品乙醇提取物中, 虎杖苷和大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷

是含量最高的两种成分, 含量范围分别介于 9.80~20.42 mg/g 和 5.56~24.45 mg/g。白藜芦醇和大黄素的含量范围分别为 1.07~5.94 mg/g 和 3.79~17.85 mg/g, 而大黄素甲醚含量为 0.57~1.69 mg/g, 五种成分在不同样品中含量差异较大, 反映出虎杖质量参差

不齐,这可能是由于虎杖不同生长环境或采收时间引起的,但虎杖苷和大黄素的含量均符合《中国药典》

表2 10批次虎杖样品乙醇提取物中5种成分含量 (mg/g, n=3)

Table 2 Content of the five constituents in different *Polygonum cuspidatum* samples (mg/g, n=3)

样品	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
样品 1	11.62±0.79	4.63±0.24	24.45±1.68	9.08±0.32	1.67±0.08
样品 2	11.22±1.01	3.13±0.31	16.52±0.77	5.33±0.17	1.44±0.10
样品 3	20.43±1.61	3.68±0.15	21.00±1.35	6.96±0.21	1.76±0.11
样品 4	13.85±1.22	3.80±0.20	18.20±1.29	7.45±0.19	1.56±0.06
样品 5	9.80±0.93	1.76±0.18	5.56±0.36	17.85±0.98	1.69±0.09
样品 6	12.07±0.74	5.94±0.29	22.21±1.54	9.91±0.67	1.42±0.02
样品 7	16.61±0.68	2.92±0.11	19.57±1.27	5.49±0.45	0.85±0.03
样品 8	10.97±0.53	1.07±0.09	16.13±0.66	3.79±0.23	0.57±0.02
样品 9	13.65±1.17	1.15±0.07	19.77±1.02	7.11±0.31	1.15±0.10
样品 10	13.14±0.86	3.46±0.21	17.31±0.89	8.50±0.33	1.38±0.07

### 3 结论

本实验优化了虎杖提取条件,最佳条件为 60%乙醇作为提取剂并水浴超声 30 min;建立了虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷和大黄素甲醚等五种活性成分的 HPLC 定量分析法。方法学考察结果表明本方法具有很好的重复性好、精密度和回收率。对 10 批虎杖样品测定结果表明,虎杖苷及大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷是虎杖乙醇提取物中最主要的两种活性成分。

### 参考文献

- [1] Bralley E E, Greenspan P, Hargrove J L, et al. Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation [J]. *Journal of Inflammation*, 2008, 5:1-7
- [2] Shan B, Cai Y Z, Brooks J D, et al. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents [J]. *Food Chemistry*, 2008, 109: 530-537
- [3] Pan Y, Zhang X, Wang H, et al. Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil [J]. *Food Chemistry*, 2007, 105: 1518-1524
- [4] Wang C, Zhang D, Ma H, et al. Neuroprotective effects of emodin-8-O-β-D-glucoside in vivo and in vitro [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 577: 58-63
- [5] Lu H M, Ni W D, Liang Y Z, et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of emodin and physcion from *Polygonum cuspidatum* and subsequent isolation by semipreparative chromatography [J]. *Journal of Separation Science*, 2006, 29: 2136-2142
- [6] Aggarwal B B, Bhardwaj A, Aggarwal R S, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies [J]. *Anticancer Research*, 2004, 24: 2783-840
- [7] Baur J A, Pearson K J, Price N L, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet [J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 337-342
- [8] 陈志强,栾颖. HPLC法测定虎杖中大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷的含量[J].*中国药房*, 2009, 20(9):688-689
- [9] 陈志强,栾颖. HPLC法测定虎杖中大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷的含量[J].*中国药房*, 2009, 20(9): 688-689
- [9] Chu Q, Peng Y, Ye J. Determination of Active Ingredients of *Polygonum cuspidatum* Sied. et Zucc. by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection [J]. *Electroanalysis*, 2004, 16: 1434-1438
- [10] Lu H M, Liang Y Z, Ni W D, et al. Optimization of extraction and determination of emodin from *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. products by HPLC-DAD [J]. *Journal of Central South University of Technology*, 2006, 13: 658-662
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2010版第一部[M].北京:中国医药科技出版社,2010
- National Commission of Chinese Pharmacopoeia. *Pharmacopoeia of Peoples Republic of China: 2010, Vol. 1* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010