

## HPLC 法测定栽培亚大黄中 3 种成分的含量

耿家玲<sup>1</sup> 沈勇<sup>2</sup> 康绍建<sup>1</sup> (1. 云南省食品药品检验所 昆明 650011; 2. 昆明植物研究所)

**摘要 目的:** 建立 HPLC 法分离和测定亚大黄药材中虎杖苷、白藜芦醇、甲基虎杖苷的含量。**方法:** 色谱柱:  $C_{18}$  柱 (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈-甲醇-0.1% 磷酸 (16:8:76) 梯度洗脱, 检测波长: 306 nm。**结果:** 虎杖苷在 0.009 1~0.454 0  $\mu$ g; 白藜芦醇在 0.000 6~0.030 4  $\mu$ g; 甲基虎杖苷在 0.047 4~2.370 0  $\mu$ g 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 98.82% ( $RSD=1.2\%$ ), 98.33% ( $RSD=2.1\%$ ), 99.40% ( $RSD=1.5\%$ )。**结论:** 本方法可作为亚大黄药材质量控制手段之一。

**关键词** 亚大黄; 虎杖苷; 白藜芦醇; 甲基虎杖苷; HPLC 法

**中图分类号:** R927.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-049X(2011)05-0666-03

### Determination of three Compositions in Cultivated Rheum Ihasaense by HPLC

Geng Jialing<sup>1</sup>, Shen Yong<sup>2</sup>, Kang Shaojian<sup>1</sup> (1. Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650011, China; 2. Kunming Institute for Plant Study)

**ABSTRACT Objective:** To establish a method for the determination of polydatin, resveratrol and deoxyrhapontin in Rheum Ihasaense. **Method:** On a  $C_{18}$  column (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m), acetonitrile-methanol-0.1% phosphoric acid (16:8:76) was used as the mobile phase with gradient elution and UV detection wavelength was set at 306 nm. **Result:** There was a good linear relationship within the range of 0.009 1-0.454 0  $\mu$ g, 0.000 6-0.030 4  $\mu$ g and 0.047 4-2.370 0  $\mu$ g for polydatin, resveratrol and deoxyrhapontin, respectively. The average recovery for polydatin was 98.82%, 98.33% for resveratrol and 99.40% for deoxyrhapontin. **Conclusion:** The method can be applied in the determination of polydatin, resveratrol and deoxyrhapontin in Rheum Ihasaense.

**KEY WORDS** Rheum Ihasaense; Polydatin; Resveratro; Deoxyrhapontin; HPLC

亚大黄系蓼科植物拉萨大黄 (*Rheum Ihasaense* A. T. Li et P. K. Haiao) 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, 口舌生疮等。主要产于西藏中部偏东<sup>[1]</sup>, 云南西北部的香格里拉县有栽培, 种植区域共约 3 公顷, 其中种苗繁育区域约 0.5 公顷, 引种栽培区域约 2.5 公顷, 秋季采挖。在分离提取亚大黄药材的化学成分中发现, 亚大黄根中富含二苯乙烯类成分, 其中含量较高的成分是甲基虎杖苷 (去氧土大黄苷, 4'-甲氧基-5-羟基芪-3-O- $\beta$ -葡萄糖苷, 4'-methoxy-5-hydroxy-stilbene-3-O- $\beta$ -glucoside)。许多藏药 (青鹏涂剂、流感丸) 和蒙药 (勒比巴勒珠尔、哈布德仁-9 系列制剂) 中就有亚大黄, 但对亚大黄

药材及其制剂的质量控制研究几乎没有。为能更准确的控制药材质量, 本文以甲基虎杖苷、虎杖苷、白藜芦醇为指标成分进行了 HPLC 定量检测。经查阅资料, 未见关于甲基虎杖苷 HPLC 测定的相关报道。本文的研究为亚大黄药材的质量控制及合理开发利用提供了科学依据。

#### 1 仪器与试剂

HP-1100 型高效液相色谱仪 (HP-1100 四元泵、VWD 紫外检测器、G1313A 自动进样器、在线真空脱气机、智能柱温箱、HP 化学工作站); 虎杖苷对照品 (111575-200301)、白藜芦醇对照品 (批号: 111535-200502)、土大黄苷对照品 (批号: 794-200103) 均由中国药品生物制品检定所提供; 甲基虎杖

通讯作者: 耿家玲 Tel: 13708702580 E-mail: ynkmgjl@126.com

酸卢帕他定有关物质检查时, 应注明“供试品溶液如显杂质峰 (富马酸峰除外), 杂质峰面积总和不得大于对照溶液主峰面积 (1.0%)”。

#### 3.3 流动相的选择

通过对富马酸卢帕他定片剂和破坏后样品的测定, 发现采用甲醇-2.5 mmol·L<sup>-1</sup> 庚烷磺酸钠溶液 (100 ml 加三乙胺 4.0 ml, 用冰醋酸调节 pH 4.0) (75:25) 为流动相时, 富马酸卢帕他定的峰型对称, 与其有关物质和降解产物均能得到很好的分离。因此, 采用本方法可有效测定富马酸卢帕他定片剂中的含量和有关物质, 可以作为该药的质量控制方法。

#### 参 考 文 献

- 1 陈建华, 李劲, 苏为科. 富马酸卢帕他定的合成 [J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(10): 686-688
- 2 王建平, 郝光涛, 颜耀东, 等. 富马酸卢帕他定片的人体药理学研究 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(10): 768-771
- 3 符传山. HPLC 法测定富马酸卢帕他定的含量 [J]. 中国热带医学, 2009, 9(7): 1352-1353
- 4 宋玉英, 付鑫, 贾首时. HPLC 法测定芦丁片的含量和有关物质 [J]. 中国药师, 2010, 13(8): 1216-1217
- 5 沈映冰, 朱彩燕. HPLC 法测定盐酸坦洛新的含量及有关物质 [J]. 中国药师, 2010, 13(8): 1141-1143

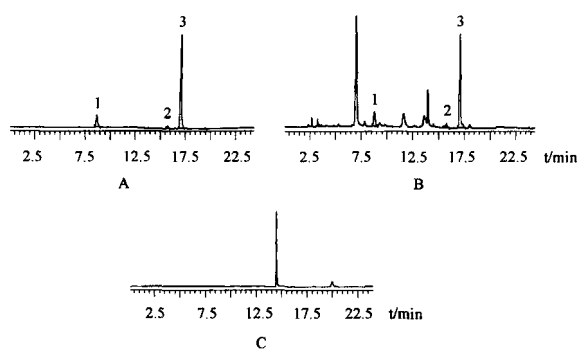
(2010-09-10 收稿 2011-01-24 修回)

苷对照品由昆明植物研究所提供(鉴定依据:比旋度、紫外光谱、质谱、氢谱、碳谱;纯度检查方法:HPLC归一化质量浓度大于99%);亚大黄药材经中国科学院昆明植物研究所标本馆鉴定为蓼科植物拉萨大黄(*Rheum Ihasaense* A. T. Li et P. K. Haiao)的干燥根。流动相中乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,磷酸为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为汉邦 C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);以乙腈(A)-甲醇(B)-0.1 磷酸(C)为流动相,梯度洗脱,洗脱程序:0~10 min,16% A,8% B,76% C;10~11 min,28% A,13% B,59% C;11~20 min,28% A,13% B,59% C;检测波长306 nm;柱温30℃;进样量各10 μl。结果见图1。



A. 对照品 B. 供试品 C. 土大黄苷对照品  
1. 虎杖苷 2. 白藜芦醇 3. 甲基虎杖苷

图1 HPLC 色谱图

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取以五氧化二磷为干燥剂减压干燥24 h的虎杖苷9.08 mg置100 ml棕色量瓶中,加稀乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,备用;白藜芦醇12.16 mg置20 ml棕色量瓶中,稀乙醇溶解并稀释至刻度,精密量取1 ml置100 ml棕色量瓶中,加稀乙醇稀释至刻度,摇匀,备用;甲基虎杖苷对照品9.48 mg置20 ml棕色量瓶中,加稀乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,备用。取上述三种备用液各1 ml和2 ml分别置10 ml棕色量瓶中,加稀乙醇至刻度,摇匀,即得对照品混合溶液A(虎杖苷9.08 μg·ml<sup>-1</sup>、白藜芦醇0.608 μg·ml<sup>-1</sup>、甲基虎杖苷47.4 μg·ml<sup>-1</sup>)和对照品混合溶液B(虎杖苷18.16 μg·ml<sup>-1</sup>、白藜芦醇1.216 μg·ml<sup>-1</sup>、甲基虎杖苷94.800 μg·ml<sup>-1</sup>)。

### 2.3 供试品溶液的制备

取药材细粉(过三号筛)0.1 g,精密称定,置50 ml棕色量瓶中,加稀乙醇适量,超声处理(250 W,40 kHz)30 min,放冷,稀乙醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 标准曲线的制备

取对照品混合溶液A 1,5,10,20 μl 和对照品混合溶液B 15,25 μl 进样,记录色谱图。以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算。虎杖苷、白藜芦醇和甲基虎杖苷的标准曲线回归方程分别为:虎杖苷:Y =

3 361.9X + 16.461 0 (r = 0.999 9)、白藜芦醇:Y = 7 133.1X - 0.794 4 (r = 0.999 6)、甲基虎杖苷:Y = 3 821.9X + 5.827 1 (r = 0.999 9),表明虎杖苷、白藜芦醇、甲基虎杖苷分别在0.009 1~0.454 0 μg、0.000 6~0.030 4 μg、0.047 4~2.370 0 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

### 2.5 精密度试验

取“2.2”项下的对照品混合溶液A 10 μl,连续进样6次,测定虎杖苷、白藜芦醇、甲基虎杖苷的峰面积,RSD 分别为0.3%、1.5%、0.7% (n=6),表明仪器精密度良好。

### 2.6 重复性试验

取云南香格里拉尼西产亚大黄药材粉末(批号:20091003),照“2.3”项下方法操作,分别测定含量。结果虎杖苷、白藜芦醇、甲基虎杖苷的平均含量分别为0.454%、0.038%、2.103%;虎杖苷、白藜芦醇、甲基虎杖苷的RSD 分别为0.9%、1.7%、0.6% (n=6)。

### 2.7 稳定性试验

取新制备的同一份供试品溶液,室温下放置,分别在0,1,2,4,8,24,48 h 测定峰面积,结果虎杖苷、白藜芦醇、甲基虎杖苷在48 h 内稳定,RSD 分别为0.7%、1.3%、0.5% (n=7)。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取9份已知含量(亚大黄药材,批号:20091003,虎杖苷、白藜芦醇、甲基虎杖苷的平均含量分别为0.454%、0.038%、2.103%)的药材粉末0.05 g,分置9个50 ml棕色量瓶中。精密量取浓度为0.230 8 mg·ml<sup>-1</sup>的虎杖苷、0.019 3 mg·ml<sup>-1</sup>的白藜芦醇和1.041 2 mg·ml<sup>-1</sup>的甲基虎杖苷对照品混合液0.8,1,1.2 ml 各3份,依次加入上述9个棕色量瓶中,照“2.3”项下方法操作,按上述色谱条件测定,计算回收率。结果虎杖苷的平均回收率为98.82%,RSD = 1.2%;白藜芦醇的平均回收率为98.33%,RSD = 2.1%;甲基虎杖苷平均回收率为99.40%,RSD = 1.5% (n=9)。

### 2.9 样品含量测定

取亚大黄样品,照“2.3”项下方法操作,进样量10 μl,以外标法计算各成分的量,结果见表1。

表1 样品测定结果(% , n=2)

产地	批号	虎杖苷 (%)	白藜芦醇 (%)	甲基虎杖苷 (%)
云南香格里拉尼西	20080901	0.461	0.037	2.124
云南香格里拉尼西	20090915	0.477	0.038	2.129
云南香格里拉尼西	20091003	0.454	0.038	2.103
云南香格里拉尼西	20101010	0.496	0.039	2.251
青海海西	-	0.772	0.051	2.933
青海海西	-	0.579	0.043	2.780

## 3 讨论

3.1 对待测成分进行了紫外扫描,虎杖苷和甲基虎杖苷在306 nm 和319 nm 波长处均有较大吸收,白藜芦醇在306 nm 波长处有最大吸收。因药材中白藜芦醇的含量较低,故

选择白藜芦醇响应值较高的 306 nm 为本实验的检测波长。结果,亚大黄药材中虎杖苷的保留时间为 8.7 min,白藜芦醇的保留时间为 15.7 min,甲基虎杖苷的保留时间为 17.0 min。

3.2 试验中以虎杖苷、白藜芦醇和甲基虎杖苷为考察指标,对供试品溶液的制备进行了方法学研究:①对同一批亚大黄样品,分别采用超声提取 20,30,40 min;加热回流 0.5,1,2 h。经试验证明:超声提取 30 min 能够完全将虎杖苷、白藜芦醇和甲基虎杖苷提出;②提取溶剂曾用甲醇、乙醇和稀乙醇,结果差别不明显。从环保角度考虑,选择稀乙醇为提取溶剂;③所用稀乙醇 25,50,100 ml,结果 50 ml 已能充分提取完全虎杖苷、白藜芦醇和甲基虎杖苷。

3.3 流动相考察了①甲醇-水(36:64)梯度洗脱;②乙腈-水(20:80)<sup>[2]</sup>梯度洗脱;③乙腈-0.1%磷酸(20:80)梯度洗脱;乙腈-甲醇-水(16:8:76)<sup>[3]</sup>梯度洗脱。结果表明,当使用乙腈-甲醇-0.1%磷酸(16:8:76)梯度洗脱时,虎杖苷、白藜芦醇和甲基虎杖苷峰形良好,供试品中测定的 3 个色谱峰与杂质峰均达到基线分离,最终确定乙腈-甲醇-0.1%磷酸(16:8:76)梯度洗脱为本文流动相。

3.4 试验中曾选用 Phenomenex C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm)、依利特 ODS2 C<sub>18</sub>(200 mm×4.6 mm,5 μm)、汉邦 Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm)等色谱柱。结果由于品

牌、柱长及柱新旧程度不同,分离效果也不相同,但均可通过调整流动相比例达到较为理想的分离效果。

3.5 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。

3.6 本试验对栽培亚大黄中的虎杖苷、白藜芦醇和甲基虎杖苷 3 种成分进行了测定。其中甲基虎杖苷含量最高,约占三者总量的 80% 以上;虎杖苷次之,白藜芦醇最低,且同一产地中 3 种成分含量相对稳定。从测定结果来看,青海海西产栽培亚大黄的品质优于云南香格里拉西产栽培亚大黄。

3.7 因本试验只收集到栽培亚大黄药材,对野生亚大黄药材中虎杖苷、白藜芦醇、甲基虎杖苷三者含量之间的相互关系,还有待收集更多的药材做进一步的研究。

#### 参 考 文 献

- 1 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1998,180-181
- 2 赵跃刚,刘永宏,王隶书,等. 消癯闭颗粒中虎杖苷的 HPLC 法测定[J]. 中国药师,2008,11(11):1280-1281
- 3 陈志强,李贞景,傅志良,等. HPLC 测定河套大黄中的土大黄苷含量[J]. 分析实验室,2009,28(1):101-103  
(2010-12-14 收稿 2011-02-02 修回)

## 《中国新药杂志》2011 年征订启事

《中国新药杂志》(ISSN 1003-3734,CN11-2850/R)是由国家食品药品监督管理局主管的国家级药学核心期刊,为中国科技核心期刊、中文核心期刊、“中国期刊方阵‘双效’期刊”、“《CAJ-CD 规范》执行优秀期刊”。《中国新药杂志》已被《美国化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EmBase)《国际药文学文摘》等众多国际权威数据库收录;同时被中国生物医学期刊引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库等国内权威检索数据库收录。2008 年被评为中国精品科技期刊。

《中国新药杂志》以我国自主研发的新药为重点,主要报道我国新药创制研究和临床试验的创新性研究成果,是我国生物药、中药、化药新药创制的国内外学术交流的重要平台。该刊为半月刊,辟有世界新药之窗、新药述评、新药研发论坛、新药申报与审评技术、重大新药创制专项巡礼、综述、临床研究、实验研究、药师与临床、不良反应、批准信息、年度新药点评等栏目。国内外公开发行人。国内订价:12 元/期,全年 288 元。邮发代号:82-488。联系人:达娃卓玛,联系电话:(010)82282303,传真:(010)82282289,E-mail:xyzz711@sohu.com。欲了解详细情况请登录该刊网址:<http://www.newdrug.cn>。

## 《中国现代应用药学》征订启事

《中国现代应用药学》由中国药学会主办,中国科协主管,国内外公开发行人,为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》药学类核心期刊(全国中文核心期刊),中国科学引文数据库入选期刊,并被美国《化学文摘》、《剑桥科学文摘(自然科学)》、《国际药文学文摘》、《乌利希期刊指南》、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》等国际重要检索系统收录。设有论著、综述、专栏,专栏包括药理、中药与天然药、药物化学、药剂、药物分析与检验、医院药学、临床、不良反应、药事管理等栏目。月刊,每月 28 日出刊,大 16 开本,铜版纸精美印刷,每期订价 15.00 元,全年 180 元,国内统一刊号:CN 33-1210/R,国际标准出版物编号:ISSN 1007-7693,邮发代号:32-67,国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱,100044),欢迎广大读者通过当地邮局或直接向该刊编辑部订阅。编辑部地址:杭州市中河中路 250 号改革月报大楼 10 楼,邮编:310003,电话:0571-87297398,传真:0571-87245809,E-mail:xydy@chinajournal.net.cn,网址:<http://www.chinajournal.com>。