

蔓性千斤拔的指纹图谱及黄酮成分含量测定

孙辉¹, 李雅静^{1,2}, 方磊¹, 舒毕琼¹, 巫鑫³, 钟庆元^{1*} (1. 湖南省药品检验研究院, 湖南长沙 410001; 2. 中南大学湘雅药学院, 湖南长沙 410013; 3. 广东医科大学广东天然药物研究与开发实验室, 广东湛江 524023)

摘要: **目的** 建立蔓性千斤拔的指纹图谱及黄酮成分测定方法。**方法** 采用甲醇超声方法处理12批蔓性千斤拔药材, 利用HPLC建立指纹图谱, 并测定染料木素、染料木苷含量。**结果** 建立了以染料木苷峰为参照峰, 包含3个共有峰特征峰的指纹图谱, 12批药材指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.90。染料木素、染料木苷的回归方程分别为 $y = 6.371x + 23.023$ ($R^2 = 0.9963$)、 $y = 4.773x + 29.303$ ($R^2 = 0.9956$), 分别在10.36~1.036、10.59~1.059 ng 范围内线性关系良好。**结论** 建立的蔓性千斤拔HPLC指纹图谱简便、快速、专属性强, 黄酮成分测定方法快速可靠。

关键词: 蔓性千斤拔; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R 284

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2018)01-0044-05

Fingerprint and bioflavonoid measurement of *Moghania philippinensis*

SUN Hui¹, LI Ya-jing^{1,2}, FANG Lei¹, SHU Bi-qiong¹, WU Xin³, ZHONG Qing-yuan^{1*} (1. Hunan Institute for Drug Control, Changsha 41001, China; 2. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China; 3. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: **Objective** To establish the fingerprint and bioflavonoid measurement of *Moghania philippinensis*. **Methods** Twelve batches of *M. philippinensis* were treated by ultrasonic method with methanol. The HPLC fingerprint was established, and contents of genistein and genistin were determined. **Results** The HPLC fingerprint included 3 common peaks based on the reference peak of genistin. The fingerprint similarity between 12 batches of *M. philippinensis* and controls was more than 0.90. The regression equation and mass concentration were $y = 6.371x + 23.023$ ($R^2 = 0.9963$) and 10.36~1.036 ng for genistein; and $y = 4.773x + 29.303$ ($R^2 = 0.9956$) and 10.59~1.059 ng for genistin. **Conclusion** The HPLC fingerprint is simple, fast and specific for *M. philippinensis*, and the bioflavonoid measurement is quick and reliable.

Key words: *Moghania philippinensis*; HPLC; fingerprint

千斤拔又名金鸡落地、土黄鸡、老鼠尾、大力黄、三股丝、金牛尾等, 具有祛风除湿、活血止痛、强筋壮骨、消炎止痛等功效^[1-2], 广泛用于治疗妇科疾病、风湿痹痛等病症的中成药中, 是妇科千金片、金鸡片、壮腰健肾丸等中成药的主要原料药^[3-5]。《中国药典》2015年版附录中收录的千斤拔药材共有3种植物来源, 分别为豆科植物蔓性千斤拔[*Moghania philippinensis*(Merr. et Rolfe) Li.]、大叶千斤拔

[*Moghania macrophylla* (Willd.) O. Kuntze]和绣毛千斤拔[*Moghania ferruginea* (Walp. ex Benth.) Li.]的干燥根^[2]。由于自然界中绣毛千斤拔野生资源较少, 市场较难找到, 目前的主流品种主要为蔓性千斤拔和大叶千斤拔。虽然关于蔓性千斤拔的研究日益增多, 但其现行质量标准为地方药材标准, 仅有性状、显微、薄层色谱鉴别等, 缺少含量测定及指纹图谱分析, 较不完善。本文以蔓性千斤拔为研究对象, 建立了其专属的指纹图谱, 并且在相同色谱条件下建立了同时测定染料木苷和染料木素含量的方法, 为完善其质量控制标准提供依据。

1 仪器和材料

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 昆山KQ-S00DE超声仪(昆山市超声仪器有限公司)

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(No.81503226), 湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目(No.R201503)

收稿日期: 2017-10-30; **修订日期:** 2018-01-05

作者简介: 孙辉(1978-), 男, 博士, 主管药师。

通信作者: 钟庆元(1965-), 女, 本科, 主任药师。

司); Ms105DU万分之一天平(日本岛津); 超纯水仪 Milli-Q(Millipore公司)。

染料木苷对照品(中国食品药品检定研究院, 供含量测定用, 含量以99.1%计, 批号: 111709-201702), 染料木素对照品(中国食品药品检定研究院, 供含量测定用, 含量以99.1%计, 批号: 111704-201302); 乙腈为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司); 水为经Milli-Q水处理系统处理后的去离子水; 其余所用试剂均为分析纯。

实验用千斤拔药材共13批次, 其中12批为蔓性千斤拔, 分别采自广西(1~6号)、云南(7~8号)和湖南(9~12号), 经湖南省药品检验研究院舒毕琼主任中药师鉴定为蔓性千斤拔 *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) L.。剩余1批为大叶千斤拔, 采自湖南(13号)。

2 方法

2.1 含量测定^[6-7]

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C18(250 mm×4.6 mm×5 μm); 流动相为乙腈-水梯度洗脱(0~25 min, 15%~35%乙腈; 25~30 min, 35%~55%乙腈); 柱温为35℃; 流速为1 mL·min⁻¹; 检测波长为259 nm; 进样为10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取染料木素对照品10.46 mg、染料木苷对照品10.69 mg, 置50 mL容量瓶中, 精密加入100%甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 分别制成质量浓度为0.2072 g/L染料木素对照品储备液溶液和0.2118 g/L染料木苷对照品储备液溶液。精密量取上述染料木苷和染料木素对照品储备液溶液各5 mL, 置同一10 mL容量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取本品粉末(过四号筛)1 g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇25 mL, 称定质量, 超声处理(功率300 W, 频率50 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 即得。

2.1.4 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液, 分别加甲醇稀释0、2、5、10、20、50、100倍为系列梯度浓度的对照品溶液, 精密吸取10 μL注入高效液相色谱仪, 按“2.1.1”色谱条件测定, 记录色谱峰面积。

2.1.5 进样精密度试验 精密吸取同一供试品溶液10 μL, 重复进样6次, 测定并计算染料木素和染料

木苷的含量。

2.1.6 重复性试验 取同一蔓性千斤拔样品粉末6份, 按“2.1.3”制备供试品溶液, 2.1.1项色谱条件下, 分别测定并计算染料木素和染料木苷的含量。

2.1.7 稳定性试验 精密称取同一蔓性千斤拔样品粉末, 按“2.1.3”制备供试品溶液, “2.1.1”色谱条件下分别于配制后24 h内, 每隔2 h进样, 测定并计算。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已测定含量同一药材样品约0.50 g(共6份), 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入对照品适量, 依法制备供试品溶液, 测定并计算。

2.1.9 样品测定 依法测定12批样品。

2.2 指纹图谱的建立及相似度分析^[8]

取12批蔓性千斤拔样品, 分别按“2.1.3”制备供试品溶液, “2.1.1”色谱条件下测定, 记录指纹图谱。以染料木苷峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间。运用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.130723 版本)处理各批次样品指纹图谱, “时间窗宽度”为0.1 min, 采用中位数法进行计算, 对特征峰进行多点校正, 自动匹配, 生成包括染料木素和染料木苷在内的对照指纹图谱, 然后进行各样品的相似度评价。

3 结果

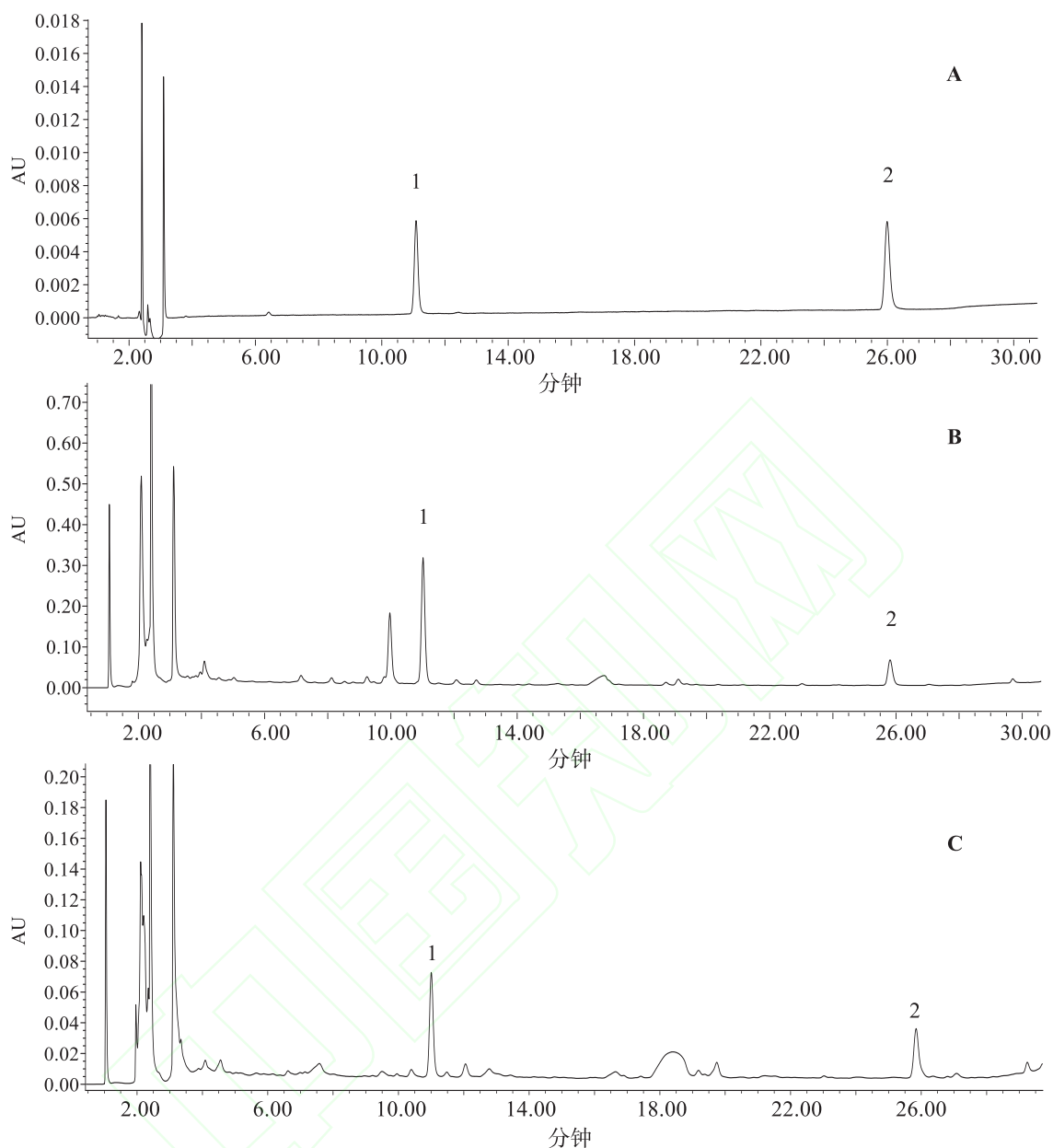
3.1 含量测定

3.1.1 色谱条件 在2.2.1色谱条件下, 理论塔板数按染料木苷计不得低于3 000, 染料木素计不得低于3 000, 色谱峰分离良好, 见图1。

3.1.2 线性关系 以峰面积积分值(y , mAU)为纵坐标, 进样量为(x , ng)为横坐标, 绘制标准曲线, 得染料木素和染料木苷的回归方程, 分别为 $y = 6371x + 23023$ ($R^2 = 0.9963$)、 $y = 4773x + 29303$ ($R^2 = 0.9956$), 分别在10.36~1036、10.59~1059 ng范围内线性关系良好。

3.1.3 进样精密度 在选定的色谱条件下, 连续进样6次后, 染料木素、染料木苷峰面积积分值的RSD分别为1.44%和1.58%, 且各共有峰相对保留时间和相对峰面积(参比峰为染料木苷峰)的RSD均小于2%, 表明仪器精密度较好。

3.1.4 重复性试验 6份供试品溶液进样后, 染料木素、染料木苷含量的RSD分别为2.66%和2.51%, 且各共有峰相对保留时间和相对峰面积(参比峰为染料木苷峰)的RSD均小于2%, 表明方法重复性较好。



A: 混合对照品溶液; B: 蔓性千斤拔供试品溶液; C: 大叶千斤拔供试品溶液

1: 染料木苷; 2: 染料木素

图1 千斤拔材及混合对照品HPLC

3.1.5 稳定性试验 同一供试品溶液进样24 h后, 染料木素、染料木苷峰面积的RSD分别为1.57%和1.86%, 且各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%, 表明供试品溶液在配制24 h内稳定, 符合指纹图谱的技术要求。

3.1.6 加样回收率试验 6份供试品溶液进样后, 测得平均加样回收率为98.7%, RSD为2.53%, 表明该方法加样回收率较好。

3.1.7 样品测试 样品含量测定结果详见表1。

3.2 指纹图谱

测得12批样品共有峰相对保留时间的RSD均小

于0.3%, 符合指纹图谱要求, S1~S12的相似度分别为0.925、0.931、0.900、0.960、0.992、0.991、0.999、1.000、0.999、0.989、0.993。12批药材指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.90, 说明各批次的药材具有较高的均一性, 但大叶千斤拔(13号样品)与蔓性千斤拔对照图谱的相似度仅为0.425。

4 讨论

4.1 提取溶剂的确定

本研究考察了100%甲醇、70%甲醇、50%甲醇、100%乙醇、70%乙醇和50%乙醇6种不同提取溶

表1 样品含量测定结果/(mg/g)

编号	染料木素	染料木苷
1	0.1013	0.2093
2	0.0449	0.1277
3	0.1012	0.0469
4	01532	0.2684
5	0.1444	0.0297
6	0.0901	0.0953
7	0.1352	0.1964
8	0.0112	0.0283
9	0.1021	0.4884
10	0.0942	0.6753
11	0.0766	0.3138
12	0.0868	0.2643

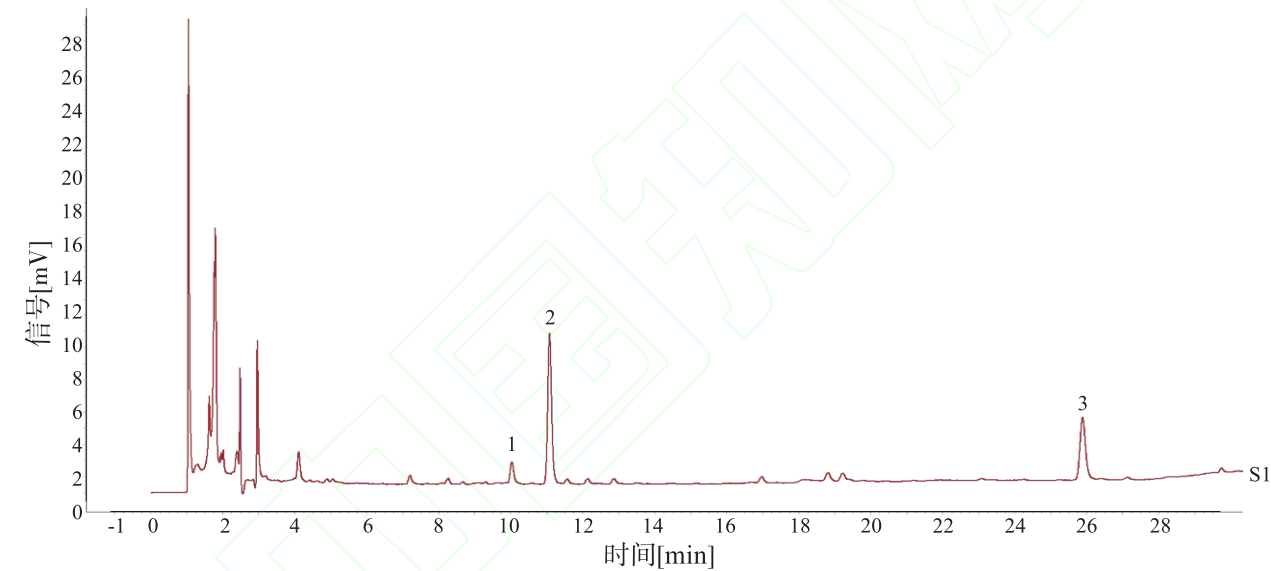
剂对染料木素和染料木苷的含量测定结果的影响,结果发现以100%甲醇为提取溶剂时,含量测定结果最高,故选取甲醇作为提取溶剂。

4.2 提取方式和提取时间的确定

本研究分别采用回流提取和超声提取两种方式,结果二者测定结果接近,考虑到操作的简便性,选取超声提取方式。同时考察了20、40、60和80 min的提取时间对含量测定结果的影响,结果发现提取20 min与延长提取时间测定的结果接近,因此选择20 min为提取时间。

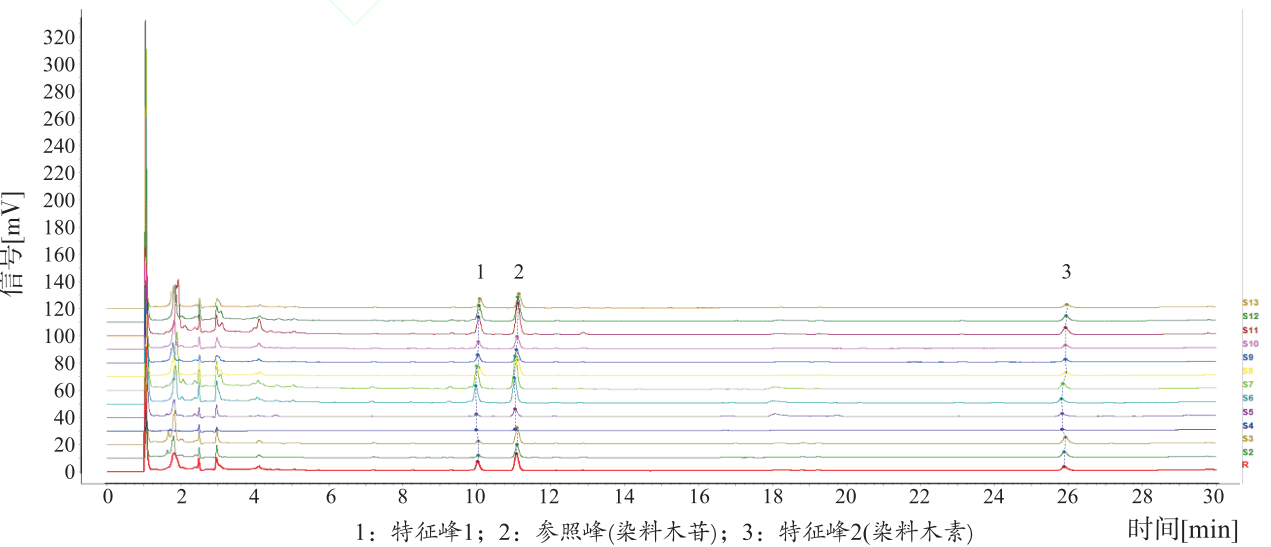
4.3 检测波长的确定

采用DAD检测器对染料木苷对照品溶液和染料木素对照品溶液进行了全波长扫描,结果发现染料



1: 特征峰1; 2: 参照峰(染料木苷); 3: 特征峰2(染料木素)

图2 染料木苷和染料木素对照指纹图谱



1: 特征峰1; 2: 参照峰(染料木苷); 3: 特征峰2(染料木素)

图3 12批蔓性千斤拔的指纹图谱

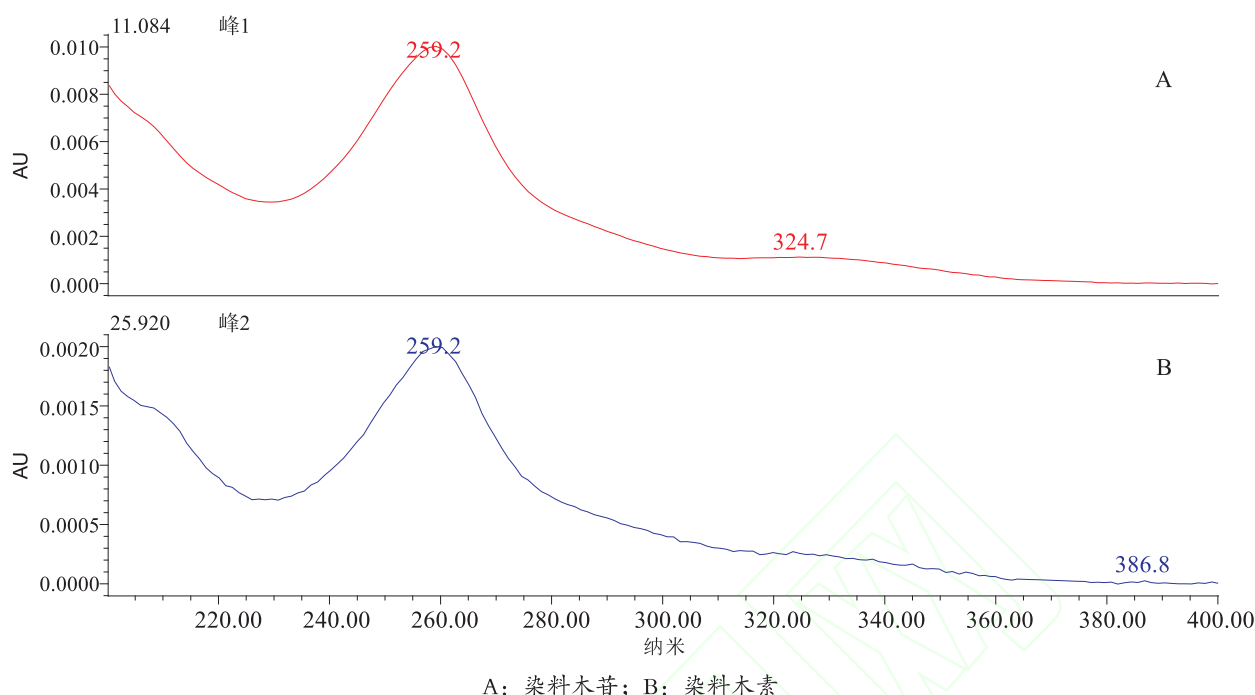


图4 染料木苷与染料木素紫外光谱图

木素和染料木苷均在259 nm呈现最大吸收,同时供试品溶液在259 nm处杂质峰干扰较少,故选取259 nm为检测波长。

4.4 指纹图谱的专属性

将建立的蔓性千斤拔标准图谱与大叶千斤拔进行比对,发现相似度仅有0.425,表明该标准图谱可以有效区分不同来源的千斤拔,具有较强的专属性,为药材的鉴别提供了科学可靠的方法。

千斤拔药材现行质量标准为湖南、上海、广东等地方药材标准,仅设置了性状、显微、薄层色谱鉴别等项目,均缺少含量测定及指纹图谱专属性较强的鉴别项目。本研究在同一色谱条件下,既建立了蔓性千斤拔黄酮类成分指纹图谱,又同时测定了两种黄酮成分的含量,方法简便快速,具备了定性和定量双重作用。测定的12批蔓性千斤拔样品相似度较好,且与大叶千斤拔区分明显,含量测定方法快速、可靠,对其质量控制具有重要的参考价值。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1999: 474-478.
- [2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [3] 张丽霞, 彭建明, 马洁. 千斤拔研究进展[J]. 中药材, 2007, 30(7): 887-890.
- [4] 彭开锋, 张鹏, 阳苗, 等. 千斤拔药理作用研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(1): 251.
- [5] 陈鹏, 李敏, 秦海洸, 等. 千斤拔药材质量控制研究进展[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(8): 601-606.
- [6] 林锦锋, 李清明, 朱玉芳, 等. 千斤拔药材的质量标准研究[J]. 中国药房, 2016, 27(24): 3400-3403.
- [7] 李莉, 刘志华, 秦民坚. HPLC法同时测定千斤拔属植物7种黄酮的含量[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(5): 54-65.
- [8] 任朝琴, 刘圆, 袁玮. 大叶千斤拔与蔓性千斤拔的高效液相色谱指纹图谱鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(11): 2945-2947.