

· 基础研究 ·

HPLC 定量分析千斤拔药材中染料木苷
和染料木素的含量[△]张鹏¹, 彭开锋¹, 李伏君¹, 龚云¹, 刘逆夫¹, 付卡利¹, 杨秀伟^{2*}, 王龙³

(1. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000;

2. 北京大学药学院天然药物学系/天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191;

3. 约翰霍普金斯大学, 美国 巴尔的摩 21218)

[摘要] 目的: 建立千斤拔药材的质量控制方法。方法: 采用高效液相色谱法测定其中的染料木苷和染料木素的含量; 色谱柱为 Kromasil 100-5 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 梯度洗脱, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 流速为 1 mL · min⁻¹, 检测波长为 260 nm。结果: 染料木苷和染料木素分别在质量浓度 17.483 ~ 279.720 μg · mL⁻¹ 和 4.088 ~ 65.406 μg · mL⁻¹ 与峰面积线性关系良好。平均回收率, 染料木苷为 104.27%, RSD 为 2.61% (n=9); 染料木素为 97.16%, RSD 为 5.54% (n=9)。不同产地千斤拔药材中染料木苷和染料木素的含量有明显差异。结论: 建立的含量测定方法操作简便、分离效果好、准确, 能满足千斤拔药材中染料木苷和染料木素含量的准确测定, 为千斤拔药材的质量评价以及合理开发利用提供了科学依据。

[关键词] 千斤拔; 染料木苷; 染料木素; 高效液相色谱; 质量标准

Quantitative Determination of Genistin and Genistein in *Moghania* Medicinal Material by HPLCZHANG Peng¹, PENG Kai-feng¹, LI Fu-jun¹, GONG Yun¹, LIU Ni-fu¹, FU Ka-li¹,YANG Xiu-wei^{2*}, WANG Long³

(1. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou 412003, China;

2. Department of Natural Medicines, State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs,
School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China;

3. Johns Hopkins University, Baltimore 21218, America)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the quality control of *Moghania* medicinal material. **Methods:** An HPLC method for quantitative analysis of genistin and genistein in the *Moghania* medicinal material, including the roots of *Moghania macrophylla* (Willd.) O. Kuntze and *M. philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li, was carried out. The method was used by HPLC with Kromasil 100-5 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using gradient elution with acetonitrile and 0.1% aqueous phosphoric acid as the mobile phase at a flow rate of 1 mL · min⁻¹, and the detection wavelength was 260 nm. **Results:** Genistin and genistein showed good linearity in the ranges of 17.483-279.720 μg · mL⁻¹ and 4.088-65.406 μg · mL⁻¹, respectively. The average recoveries were 104.27% with RSD 2.61% (n=9) for genistin and 97.16% with RSD 5.54% (n=9) for genistein. The contents of genistin and genistein in *Moghania* medicinal material from different habitats showed remarkable difference. **Conclusion:** The developed method is simple, well efficiency and precise, which can be used to determine content of genistin and genistein in *Moghania* medicinal material and provided the scientific basis for the quality evaluation as well as rational development and utilization of *Moghania* medicinal material.

[Keywords] *Moghania* medicinal material; genistin; genistein; HPLC; quality standard

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180315001

[△] [基金项目] 国家中药标准化项目(2YB2H-C-HUN-21)

* [通信作者] 杨秀伟, 教授, 博士生导师, 研究方向: 天然产物化学与药物代谢; Tel: (010)82801569, E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

妇科千金片和妇科千金胶囊是收载于《中华人民共和国药典》(《中国药典》)2015版一部的现代中药复方制剂,具有清热除湿、益气化瘀之功效;用于湿热瘀阻所致的带下病、腹痛,症见带下量多、色黄质稠、臭秽,小腹疼痛,腰骶酸痛,神疲乏力,慢性盆腔炎、子宫内膜炎、慢性宫颈炎见上述证候者。组方药味包括千斤拔、金樱根、穿心莲、功劳木、单面针、当归、鸡血藤和党参^[1]。君药千斤拔,《中国药典》2015版四部收载的基原植物有蔓性千斤拔 *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li、大叶千斤拔 *M. macrophylla* (Willd.) O. Kuntze 和锈毛千斤拔 *M. ferruginea* (Wall. ex Benth.) Li.^[2]。千斤拔性温,味甘、辛,民间多用于治疗风湿骨痛、慢性肾炎、跌打损伤、白带多和痛经等^[3-5]。已有研究表明,千斤拔含有大量的黄酮类化合物^[6-9],其中的染料木苷(genistin)和染料木素(genistein)具有显著的抗氧化、类激素、抗菌、抗癌和保护心血管等作用^[10-12]。而有关以千斤拔作为君药的中成药妇科千金片、妇科千金胶囊、金鸡胶囊等治疗妇科疾病和风湿病的作用基础,正是该味药中起激素作用和抗炎、抗氧化作用的化学成分。因此,本研究选取染料木苷和染料木素2个活性成分作为含量测定的指标,建立测定方法,为评价该药材质量优劣提供方法学。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪[沃特世科技(上海)有限公司], AB204-S 型十万分之一电子分析天平(德国梅特勒-托利多仪器有限公司), KQ5200DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), FZ102 微型植物粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂和试药

对照品染料木苷(供含量测定用,批号:111709-201702)和染料木素(供含量测定用,批号:111704-201302)购于中国食品药品检定研究院。色谱纯乙腈(美国 Merck 公司),分析纯甲醇和乙酸乙酯(天津市科密欧化学试剂有限公司),分析纯三氯甲烷(天津市富宇精细化工有限公司),分析纯冰醋酸和磷酸(湖南汇虹试剂有限公司)。

9 批次千斤拔样品信息见表1,经株洲千金药业股份有限公司刘逆夫副教授分别鉴定为蔓性千斤拔 *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li 和大叶千斤拔 *M. macrophylla* (Willd.) O. Kuntze 的根。

表1 千斤拔样品信息

批次	采样时间/年-月-日	基原植物	产地	批号
1	2014-03-10	蔓性千斤拔	云南勐仑	141201
2	2014-03-25	蔓性千斤拔	缅甸	141202
3	2014-03-25	蔓性千斤拔	广西柳州	140204
4	2014-04-04	蔓性千斤拔	湖南炎陵	140205
5	2014-04-20	大叶千斤拔	广东佛山	140206
6	2014-04-20	大叶千斤拔	广西桂林	140208
7	2014-04-21	大叶千斤拔	云南西双版纳	140209
8	2014-04-22	大叶千斤拔	河北邢台	140209
9	2014-04-22	大叶千斤拔	福建泉州	140210

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱程序见表2,柱温为35℃,进样量为10 μL;理论塔板数以染料木苷和染料木素计,不低于5000;分离度以染料木苷和染料木素计算,大于1.50。

表2 千斤拔中染料木苷和染料木素含量测定的

流动相梯度洗脱程序

t/min	乙腈(%)	0.1%磷酸水(%)
0	23	77
14	23	77
15	36	64
20	36	64
25	41	59
26	80	20
35	80	20

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取染料木苷对照品约17.5 mg,置于25 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成699.3 μg·mL⁻¹的染料木苷对照品贮备溶液;精密称取染料木素对照品约16.5 mg,置10 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成1 635.15 μg·mL⁻¹的染料木素对照品贮备

溶液。

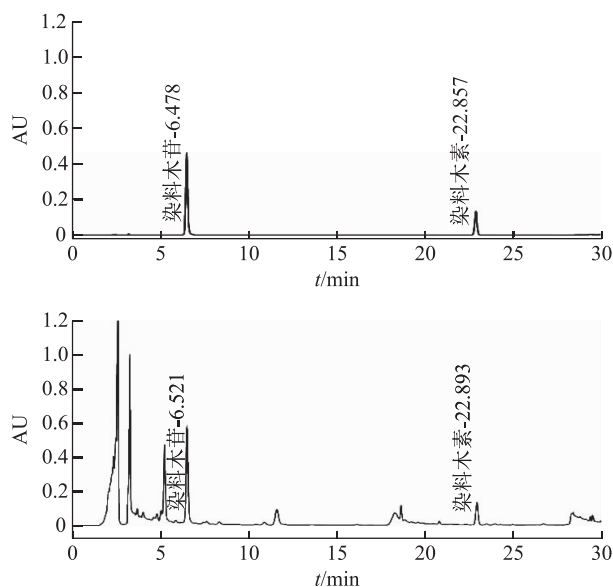
分别精密量取对照品贮备液,染料木苷 20 mL 和染料木素 2 mL,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成染料木苷质量浓度为 $559.44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和染料木素质量浓度为 $130.81 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

将混合对照品溶液精密稀释成染料木苷质量浓度分别为 17.483、34.965、69.930、139.860、279.720 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,染料木素质量浓度分别为 4.088、8.176、16.352、32.703、65.406 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取大叶千斤拔药材粉末(过 40 目筛)5.00 g,加入 50% 乙醇水溶液 75 mL,称定质量,于水浴中在 85 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取 1 h,取出,放冷,再称定质量,用 50% 乙醇水补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

2.3 专属性试验

分别吸取对照品和供试品溶液,按 2.1 色谱条件测定,记录色谱图,详见图 1。结果表明,供试品色谱图中,具有与对照品溶液色谱图中相同保留时间的色谱峰,供试品中分析物色谱峰与其相邻色谱峰均能达到基线分离,分离度符合要求。



注: A. 对照品; B. 供试品。

图 1 千斤拔及对照品 HPLC 图

2.4 线性关系考察

取 2.2.1 项下的混合对照品溶液梯度溶液,用

0.45 μm 的微孔滤膜滤过,分别注入液相色谱仪,按 2.1 色谱条件测定,记录色谱峰面积。以各组份质量浓度(X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,以峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。染料木苷的回归方程为 $Y = 53167X + 151520$ ($r = 0.9997$),染料木素的回归方程为 $Y = 7259X + 48586$ ($r = 0.9998$),染料木苷在质量浓度 17.483 ~ 279.720 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好;染料木素在质量浓度 4.088 ~ 65.406 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液,按 2.1 色谱条件分析,重复进样 6 次,记录色谱峰面积。结果,染料木苷和染料木素峰面积的 RSD 分别为 0.40% 和 1.09% ($n = 6$),表明本方法精密度良好。

2.6 稳定性试验

取 2.2.2 项下的供试品溶液,分别在放置 0、2、4、8、12、24 h 时按 2.1 色谱条件进样分析,记录色谱峰面积。结果表明,染料木苷和染料木素峰面积的 RSD 分别为 0.76% 和 0.58% ($n = 6$),表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取大叶千斤拔样品(批号: 141208)6 份,精密称定,按 2.2.2 方法制备供试品溶液,按 2.1 色谱条件进样分析,记录色谱峰面积,分别测定 6 份样品中染料木苷和染料木素的含量,计算 RSD 值。结果 RSD 值分别为 1.08% 和 3.16% ($n = 6$),表明本方法重复性良好。

2.8 中间精密度试验

同 2.7 操作,分别由两名不同的分析人员使用不同的仪器对本品进行含量测定,计算 RSD 值。结果表明,染料木苷和染料木素含量测定的 RSD 值分别为 5.78% 和 3.15% ($n = 12$),表明本方法中间精密度良好。

2.9 加样回收率试验

取大叶千斤拔粉末(批号: 141208)约 2.5 g(共 9 份),精密称定,分置具塞锥形瓶中,分别加入对照品溶液量为样品量对应化合物量的 50% ~ 150%,设 3 次重复,按 2.2.2 方法制备供试品溶液,按 2.1 色谱条件进样分析,计算回收率,结果见表 3 和 4。

2.10 样品含量测定

取 9 批次千斤拔样品各 5.0 g,精密称定,分别

按2.2.2方法制备供试品溶液,并按2.1色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中各待测物质的含量,结果见表5。

表3 千斤拔中染料木苷加样回收率试验结果($n=9$)

编号	测得量/ mg	药材中含 量/mg	对照品加 入量/mg	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	4.594	3.193	1.430	97.95	104.27	2.61
2	4.702	3.194	1.430	105.43		
3	4.692	3.193	1.430	104.77		
4	6.377	3.420	2.861	103.36		
5	6.402	3.420	2.861	104.22		
6	6.382	3.421	2.861	103.5		
7	7.958	3.337	4.292	107.68		
8	7.892	3.335	4.292	106.17		
9	7.858	3.335	4.292	105.39		

表4 千斤拔中染料木素加样回收率试验结果($n=9$)

编号	测得量/ mg	药材中含 量/mg	对照品加 入量/mg	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
1	0.814	0.533	0.315	89.32	97.16	5.54
2	0.870	0.533	0.315	107.04		
3	0.836	0.533	0.315	96.28		
4	1.210	0.575	0.630	100.68		
5	1.206	0.575	0.630	100.04		
6	1.145	0.576	0.630	90.35		
7	1.498	0.571	0.945	98.08		
8	1.492	0.571	0.945	97.47		
9	1.470	0.570	0.945	95.16		

表5 千斤拔样品含量测定结果($n=3$)

批次	基原植物/产地	染料木苷		染料木素	
		平均质 量分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD (%)	平均质 量分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD (%)
1	蔓性千斤拔/云南勐仑	1.16	2.13	0.50	1.46
2	蔓性千斤拔/缅甸	0.14	2.96	0.15	2.16
3	蔓性千斤拔/广西柳州	0.13	1.99	0.29	1.63
4	蔓性千斤拔/湖南炎陵	1.05	1.67	0.49	2.21
5	大叶千斤拔/广东佛山	0.33	1.74	0.13	2.10
6	大叶千斤拔/广西桂林	0.21	1.08	0.22	2.13
7	大叶千斤拔/云南西双版纳	0.21	1.60	0.08	2.43
8	大叶千斤拔/河北邢台	0.26	1.42	0.15	1.21
9	大叶千斤拔/福建泉州	0.56	1.48	0.29	2.84

3 讨论

3.1 检测波长的选择

文献报道^[13],染料木苷和染料木素在261 nm波长处有最大吸收,本文对染料木苷和染料木素进行紫外扫描,发现染料木苷和染料木素在260 nm波长处有最大吸收,故最终将其测定波长定为260 nm。

3.2 提取方法选择

本方法考察不同质量分数乙醇水及不同质量分数甲醇水作为提取溶剂对染料木苷和染料木素提取率的影响,结果随着有机溶剂比例从30%增加到50%,染料木苷和染料木素的提取率增加,有机溶剂比例从50%增加到95%,染料木苷和染料木素的提取率下降,且50%乙醇水提取出的染料木苷和染料木素的总量最高,故选定50%乙醇水作为提取溶剂。提取时间采用热回流提取30、60、90 min,发现随时间的推移含量增加,但是增加不大,故选择50%乙醇水热回流提取60 min。

3.3 流动相选择

本方法在杨启明等^[13]所使用的相关方法上进行优化,采用乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相梯度洗脱,能使待测组分得到很好分离。

3.4 不同产地各成分含量测定结果分析

通过对不同产地蔓性千斤拔和大叶千斤拔的含量测定结果分析,蔓性千斤拔以云南勐仑和湖南炎陵两个地区产的染料木苷和染料木素的含量最高,大叶千斤拔以福建泉州产的染料木苷和染料木素的含量最高,提示其可能是最适合千斤拔生长的环境,结合其他研究可以进一步确定千斤拔属植物产地的道地性。

本研究所建立的含量测定方法能够用于同时测定千斤拔中染料木苷和染料木素的含量,方法操作简便、精密度高、分离效果好,可为千斤拔药材的质量评价以及合理开发利用提供依据。

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,2015:902-904.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:418.

- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第41卷[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 313-331.
- [4] 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.
- [5] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1996: 35-39.
- [6] Lai W C, Tsui Y T, Singab A N B, et al. Phyto-SERM constituents from *Flemingia macrophylla* [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(8): 15578-15594.
- [7] 李华, 杨美华, 马小军. 千斤拔黄酮类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(6): 724-726.
- [8] 李昌松, 张丽霞, 赵俊凌, 等. 云南地区大叶千斤拔不同种质的异黄酮含量比较[J]. 中国现代中药, 2011, 13(10): 30-32.
- [9] 李帅霖, 孙琳, 富艳彬, 等. 蔓性千斤拔的化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2017, 27(6): 462-465.
- [10] 翁春艳, 杨艳, 李晓波. 染料木素抗动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中国医药指南, 2016, 14(7): 33-35.
- [11] 李朋收, 刘洋洋, 范冰舵, 等. 鹰嘴豆化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(11): 235-238.
- [12] 张泉洋, 马富超, 王帅, 等. 染料木苷药理作用的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(4): 315-318.
- [13] 杨启明, 张春风, 杨中林. HPLC 测定不同产地蔓性千斤拔中染料木苷和染料木素的含量[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(8): 744-748.

(收稿日期 2018-03-15)

(上接第935页)

- [32] Ko S R, Choi K J, Suzuki K, et al. Enzymatic preparation of ginsenosides Rg₂, Rh₁, and F₁ [J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(4): 404-408.
- [33] Dou D Q, Chen Y J, Liang L H, et al. Six new dammarane-type triterpene saponins from the leaves of *Panax ginseng* [J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49(4): 442-446.
- [34] Namba T, Matsushige K, Morita T, et al. Saponins of plants of *Panax* species collected in central Nepal and their chemotaxonomical significance. I [J]. Chem Pharm Bull, 1986, 34(2): 730-738.
- [35] Tran Q L, Adnyana I K, Tezuka Y, et al. Triterpene saponins from Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis*) and their hepatocytoprotective activity [J]. J Nat Prod, 2001, 64(4): 456-461.
- [36] Takemoto T, Arihara S, Nakajima T, et al. Studies on the constituents of fructus momordicae. III. Structure of mogrosides [J]. Yakugaku Zasshi, 1983, 103(11): 1167-1173.
- [37] Takemoto T, Arihara S, Nakajima T, et al. Studies on the constituents of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. I. Structure of gypenoside I-XIV [J]. Yakugaku Zasshi, 1983, 103(2): 173-185.
- [38] Chen J, Zhao R, Zeng Y M, et al. Three new triterpenoid saponins from the leaves and stems of *Panax quinquefolium* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(3): 195-201.

(收稿日期 2018-04-02)