

千斤拔根药材的 HPLC 特征图谱研究

钟佳^{1,2}, 李宝强^{1,2}, 李尚真¹, 宋启示^{1*}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 目的: 建立千斤拔药材 HPLC 特征图谱分析方法。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 以乙腈 (A) - 水 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~5 min, 0% → 5% A; 5~10 min, 5% → 10% A; 10~15 min, 10% → 30% A; 15~25 min, 30% → 40% A; 25~45 min, 40% → 80% A; 45~80 min, 80% A)。流速: 0~5 min 为 0.6 mL·min⁻¹, 5~10 min 为 0.8 mL·min⁻¹, 10~80 min 为 1.0 mL·min⁻¹。检测波长为 254 nm, 柱温为室温。以中药色谱特征图谱相似度评价系统的操作规范 (2004 A 版) 软件计算。结果: 13 批药材的相似度在 0.506~0.926, 确定了 12 个共有峰, 建立了大叶千斤拔的 HPLC 特征图谱。结论: 此方法简单、准确、重复性好, 为千斤拔的质量控制提供了有效的方法。

关键词: 千斤拔药材; 特征图谱; 高效液相色谱; 染料木素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0197-05

HPLC specific chromatogram analysis of Radix Flemingiae

ZHONG Jia^{1,2}, LI Bao-qiang^{1,2}, LI Shang-zhen¹, SONG Qi-shi¹

(1. Xishuangbanna Tropical Botanical Garden of Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Objective To establish a method of specific chromatogram analysis on Radix Flemingiae by HPLC. **Method** The HPLC method was used, chromatography condition were Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column, acetonitrile (A) - water (B) system as mobile phase with gradient elution (0~5 min, 0% → 5% A; 5~10 min, 5% → 10% A; 10~15 min, 10% → 30% A; 15~25 min, 30% → 40% A; 25~45 min, 40% → 80% A; 45~80 min, 80% A). The flow rate 0~5 min 0.6 mL·min⁻¹; 5~10 min 0.8 mL·min⁻¹; 10~80 min 1.0 mL·min⁻¹. Detective wavelength was at 254 nm, column temperature was at room temperature. Use similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM to evaluate. **Results** Similarity of 13 batches sample were 0.506~0.926, the specific chromatogram of Radix Flemingiae was established and 12 common peaks were indicated. **Conclusion** This method is accurate and simple. It can be used as a quality control method for Radix Flemingiae.

Key words Radix Flemingiae; specific chromatogram; HPLC; genistein

千斤拔药材 Radix Flemingiae 为豆科植物蔓性千斤拔 *Flemingia philippensis* Merr. et Rolfe 或大叶千斤拔 *Flemingia macrophylla* (Wall.) Merr. 的干燥根, 具有祛风湿、强腰膝的功效, 用于风湿性关节痛、腰腿痛、腰肌劳损、白带、跌扑损伤^[1]。千斤拔药材应用广泛, 是中成药妇科千金片、金鸡胶囊等的主要原料。随着生态环境的破坏, 药材资源濒临枯竭, 人们对中药材需求不断增大, 市场上药材以次充好现象屡有发生, 因而鉴别药材好坏, 制定药材质量控制

指标成为急需解决的问题。采用色谱特征图谱技术, 有望改善中药质量的可控性, 提高中药产品的现代化内涵和生产现代化程度^[2,3]。本文通过 HPLC 建立千斤拔药材的特征图谱分析方法, 为千斤拔药材的鉴别和质量控制提供参考。

1 材料与仪器

1.1 研究材料 供试 13 批千斤拔药材: 样品 A~C、E~M 为栽培 8 个月的大叶千斤拔药材, 具体情况如表 1; D 为广西多年生野生锈毛千斤拔 *F. fer-*

* 通讯作者 Tel: (0871) 5160902 E-mail: songqs@xtbg.ac.cn

ruginea Wall ex Benth 药材。药材样品由中国科学院西双版纳热带植物园陶国达教授鉴定。

表 1 大叶千斤拔药材样品及来源
Tab 1 Origins of *Flemingia macrophylla* Merr. samples

种植地 (cultivated places)	样品来源 (origins of samples)	样品号 (sample No.)
勐腊县关累镇红毛树村 (Hongn aoshu village, Guan lei town Mengla county)	勐仑镇 (Meng lun town)	A
	普洱县黎明 (Lin ing, Pu'er county)	B
	景谷县碧安 (B ian, Jinggu county)	C
勐腊县勐仑镇热带植物园 (tropical plants garden of Meng lun town Mengla county)	景洪市嘎洒南林山 (Nanlin Shan Gas a, Jinghong city)	E
	新平县扬武 (Yangwu Xin ping county)	F
	勐腊县易武 (Y iwu Mengla county)	G
	勐仑镇 (Meng lun town)	H
	丘北县江边 (Jiang bian Q iubei Menglan county)	I
勐腊县关累镇红毛树村 (Hongn aoshu village, Guan lei town Mengla county)	丘北县江边 (Jiang bian Q iubei Menglan county)	J
勐腊县勐仑镇热带植物园 (tropical plants garden of Meng lun town Mengla county)	普洱县黎明 (Lin ing, Pu'er county)	K
	澜沧县 (Lancang county)	L
	景谷县碧安 (B ian, Jinggu county)	M

1.2 仪器与试剂 Waters 1525 型高效液相色谱仪, 2847 双波长紫外检测器, Breeze 软件。乙腈为色谱纯 (Merck 公司), 水为超纯水, 其他试剂为分析纯。对照品系从大叶千斤拔中通过柱色谱制备得到, 借助波谱学方法确定结构^[7], 分别为 3, 4, 5-三甲氧基苯-O-β-D-葡萄糖苷、3, 5, 7, 3', 5'-五羟基-4'-甲氧基黄酮、5, 4'-二羟基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷、5, 7, 3', 4'-四羟基异黄酮、染料木素、5, 7, 4'-三羟基-6-异戊烯基异黄酮、5, 7, 4'-三羟基-8, 3'-二异戊烯基双氢黄酮、flam iflavanone C、flm ich in D、lespedezaflavanone A, 纯度均在 98% 以上。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 分别取晾干粉碎 (过 2 号筛) 的样品 100 g 用 85% 乙醇 500 mL 加热回流提取 12 h, 提取 2 次, 提取液合并, 浓缩, 蒸干称重。精确称取干膏 1.0000 g 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 (功率 200 W、频率 40 kHz) 处理 30 min, 放至室温, 甲醇定容后静置。上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得供试品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温为室温。流动相为乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱 (0~5 min 0% → 5% A; 5~10 min 5% → 10% A; 10~15 min 10% → 30% A; 15~25 min 30% → 40% A; 25~45 min 40% → 80% A; 45~80 min 80% A)。流速: 0~5 min 0.6 mL·min⁻¹; 5~10 min 0.8 mL·min⁻¹; 10~80 min 1 mL·min⁻¹。检测波长为 254 nm, 进样量为 10 μL。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 5 次, 主要峰 1~12 相对峰面积和相对保留时间的 RSD 值小于 3%, 表明精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一样品同样方法制备 3 份溶液, 分别进样, 主要峰 1~12 相对峰面积和相对保留时间的 RSD 小于 5%, 表明重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 主要峰 1~12 相对峰面积和相对保留时间的 RSD 值小于 5%, 说明该溶液在 12 h 内稳定。

2.4 含量计算方法 各批次药材用 85% 乙醇提取得到的提取物的量除以原药材的量为药材的提取率; HPLC 中各色谱峰的含量采用面积归一化法来确定, 即所有色谱峰面积总和设为 1, 各单个色谱峰面积百分比为提取物中各化合物的百分含量; 药材的提取率乘以提取物中各化合物的百分含量即得药材中各化合物的百分含量; 总异黄酮百分含量为单个异黄酮百分含量的加和; 总黄酮百分含量为单个异黄酮、黄烷醇、二氢黄酮等黄酮类化合物百分含量的加和。

2.5 结果

2.5.1 共有指纹峰的标定

精密吸取按“2.1”项下方法制备的供试品溶液 10 μL, 进样, 分别对上述 13 批千斤拔样品进行 HPLC 检测, 结果表明, 峰 1~12 在 11 批样品的色谱图中均出现 (样品 C 无峰 12, 样品 D 无峰 9 及峰 12), 且共有峰面积和大于总峰面积的 90%; 以 5 号染料木素峰为内参比峰, 分别计算其他各峰的相对

保留时间和相对峰面积值。12个共有峰的相对保留时间分别为: 峰 1 (0.106)、峰 2 (0.160)、峰 3 (0.640)、峰 4 (0.827)、峰 5 (1.000)、峰 6 (1.254)、峰 7 (1.366)、峰 8 (1.386)、峰 9 (1.544)、峰 10

(1.666)、峰 11 (1.737)、峰 12 (1.983), 13批样品各共有峰相对保留时间的 RSD 小于 2%。共有峰的相对峰面积见表 2。标定此 12个峰作为可以构成指纹图谱稳定的特征峰, 色谱图见图 1。

表 2 各批次药材共有峰的相对面积

Tab 2 Relative area of common peaks in different samples

样品号 (sample No)	峰号 (peak No)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.305	2.406	0.050	0.098	1.000	0.063	0.046	0.056	0.122	0.456	0.198	0.473
B	3.456	1.604	0.071	0.291	1.000	0.061	0.090	0.100	0.095	0.523	0.194	0.702
C	2.495	0.348	3.177	0.082	1.000	0.229	0.258	0.137	0.059	0.285	0.254	—
D	10.857	2.245	3.615	0.136	1.000	0.112	0.393	0.018	—	0.089	0.578	—
E	3.202	1.676	2.791	0.042	1.000	0.073	0.152	0.168	0.122	0.729	0.199	0.717
F	3.638	1.694	0.102	0.604	1.000	0.120	0.176	0.165	0.164	0.475	0.116	0.513
G	4.890	3.540	0.049	0.332	1.000	0.057	0.125	0.126	0.132	0.926	0.188	1.032
H	2.679	1.156	1.893	0.290	1.000	0.065	0.157	0.220	0.117	0.573	0.133	0.467
I	2.125	0.733	1.469	0.361	1.000	0.090	0.159	0.143	0.111	0.360	0.138	0.328
J	2.203	0.660	1.557	0.366	1.000	0.079	0.141	0.126	0.109	0.363	0.123	0.298
K	4.340	2.912	0.099	0.284	1.000	0.124	0.175	0.143	0.113	0.577	0.132	0.740
L	0.592	0.342	0.603	0.285	1.000	0.163	0.246	0.161	0.220	0.980	0.403	0.602
M	2.130	1.283	0.088	0.238	1.000	0.091	0.081	0.070	0.084	0.182	0.097	0.171

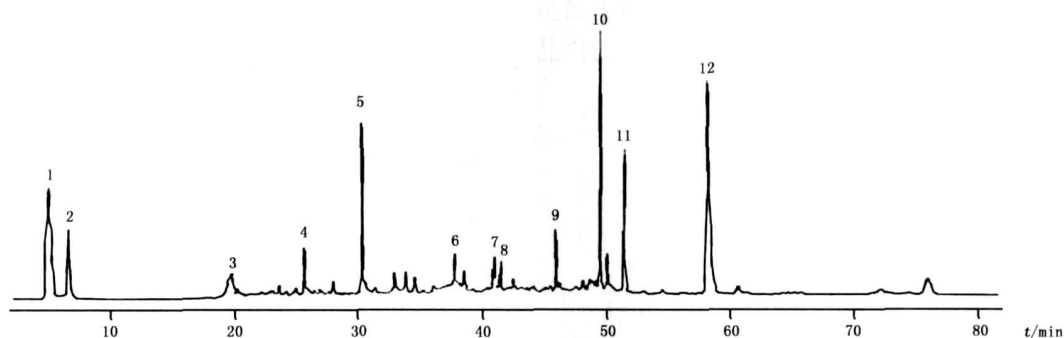


图 1 千斤拔 (样品 M) HPLC 谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of Radix Flemingiae (sample No M)

以保留时间和标样添加方法来定性, 对这些共有峰中的 10个给予了归属, 它们分别是峰 1: 3, 4, 5 — 三甲氧基苯 — O — β — D — 葡萄糖苷; 峰 2: 3, 5, 7, 3', 5' — 五羟基 — 4' — 甲氧基黄烷; 峰 3: 5, 4' — 二羟基异黄酮 — 7 — O — β — D — 葡萄糖吡喃糖苷; 峰 4: 5, 7, 3', 4' — 四羟基异黄酮; 峰 5: 染料木素; 峰 8: 5, 7, 4' — 三羟基 — 6 — 异戊烯基异黄酮; 峰 9: 5, 7, 4' — 三羟基 — 8, 3' — 二异戊烯基双氢黄酮; 峰 10: flemiflavanone C; 峰 11: flemichin D; 峰 12: lespedezaflavanone A。

2.5.2 相似度评价 将所得到的色谱图数据导入国家药典委员会中药指纹图谱评价系统 (2004A

版), 设定参照图谱, 将谱峰自动匹配, 然后生成对照图谱, 进行相似度评价, 结果见图 2。13批千斤拔药材与对照特征图谱相似度在 0.506~0.926, 平均 0.830, RSD 为 12.9%。13批药材中 9批药材的相似度达 0.85 以上, 相似度较好。13批药材的图谱与对照特征图谱的相似度差异较大, 主要是因为各药材中共有特征峰的相对峰面积存在偏差。

2.5.3 不同批次药材中异黄酮、总黄酮含量的比较

按“2.4”项下方法计算各批次药材中单个异黄酮的含量, 发现: 各药材的 4种异黄酮 [I (峰 3): 5, 4' — 二羟基异黄酮 — 7 — O — β — D — 葡萄糖吡喃糖苷, II (峰 4): 5, 7, 3', 4' — 四羟基异黄酮, III (峰 5):

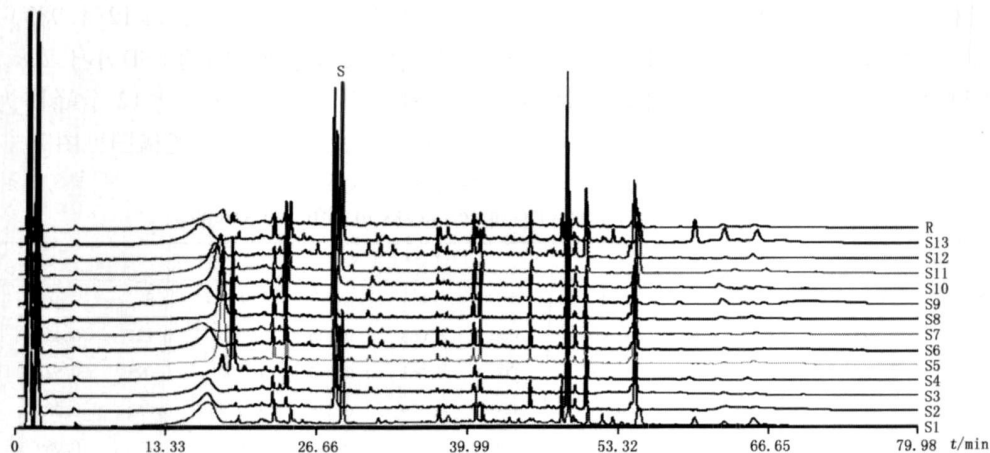


图 2 13批样品匹配色谱图

Fig 2 The matched chromatograms of thirteen patches sample

S1~ S13. 样品 A~M (Samples A~M) R 对照特征图谱 (reference specific chromatogram) S 染料木素 (genistein)

染料木素, IV (峰 8): 5, 7, 4'-三羟基-6-异戊烯基异黄酮]含量差异明显 (见图 3), 其中样品 J (种源来自丘北县江边, 栽培种植于勐腊县关累镇红毛树村) 中所含 4 种异黄酮成分每种的含量都最高, 因而其总异黄酮含量也最高, 为 4.83%, 其次为样品 E (种源来自景洪市嘎洒南林山, 栽培种植于勐腊县勐仑热带植物园), 含量为 3.34%, 而其他的样品中总异黄酮的含量都低于 2%。

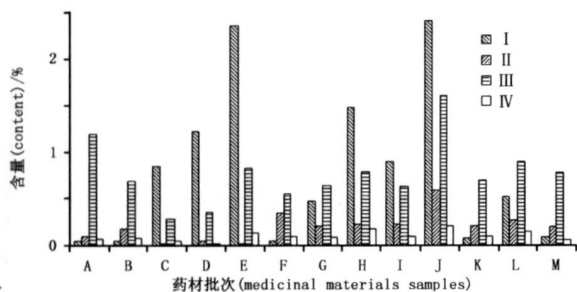


图 3 不同批次药材中 4 种异黄酮百分含量

Fig 3 Four isoflavones content in different samples

I. 5, 4'-二羟基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷 (5, 4'-dihydroxy isoflavone-7-O-β-D-glucopyranoside) II. 5, 7, 3', 4'-四羟基异黄酮 (5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyisoflavone) III. 染料木素 (5, 7, 4'-trihydroxyisoflavone) IV. 5, 7, 4'-三羟基-6-异戊烯基异黄酮 (5, 7, 4'-trihydroxy-6-prenylisoflavone)

对药材中的总黄酮 (异黄酮, 双氢黄酮及黄酮醇) 进行了综合统计, 总黄酮平均含量在 4% 左右, 见图 4 样品 J 总黄酮含量远高于其他样品, 达到 7.9%, 样品 E 次之, 为 5.78%。由此看来, 样品 J 和 E 无论是异黄酮还是总黄酮, 含量都是比较高的, 好于其他批次。

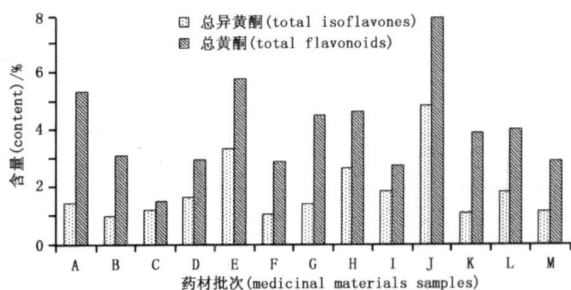


图 4 不同批次药材中总异黄酮、总黄酮百分含量

Fig 4 Total isoflavones and flavonoids content in different samples

3 讨论

3.1 本实验室对大叶千斤拔的化学成分进行研究, 发现黄酮类化合物较多^[7]。对黄酮苷和极性较大的苷元如羟基黄酮、双氢黄酮、查耳酮等常用某些极性较大的溶剂提取。本实验采用 85% 乙醇溶液加热回流萃取, 此条件下黄酮的提取率较高。

3.2 色谱条件的选择 千斤拔药材黄酮类的成分比较多, 已知的成分染料木素在 260 nm 处有最大紫外吸收峰, 其他成分分别在 215, 234, 275 nm 处有最大紫外吸收峰。综合考虑各化合物的最佳紫外检测波长, 选择 254 nm 为检测波长。结果显示以 254 nm 为检测波长检出的峰数较多, 其分离度、峰形和柱效及出峰的稳定性较为满意。实验中比较了多种梯度洗脱系统, 发现药材中各主要组分在乙腈-水系统中比在其他系统中得到更好的分离, 而且色谱分离有更好重现性。

3.3 本试验所用千斤拔药材品种来源于不同地方, 种植地也不同, 所得特征图谱共有峰的相对峰面积存在偏差, 反映了同一物种个体在不同地域条件

下化学成分含量上的差异。但各图谱共有峰的个数及相对保留时间无差别,说明其 HPLC 特征图谱在不同产地千斤拔样品中有大的相似性,具有专属性,可用于鉴定千斤拔的真伪。

3.4 本实验共标定出 12 个共有峰,其中峰 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 为黄酮类成分,峰 3, 4, 5, 8 为异黄酮,黄酮类化合物是千斤拔药材的主要成分。药理活性实验表明黄酮类化合物具有很强的生物活性,具有多种药理作用^[8]。不同种源、生态环境的千斤拔药材中黄酮类化合物的含量差异很大,通过本实验可筛选出黄酮类化合物含量高的千斤拔药材。

3.5 小结 本文建立了千斤拔药材特征图谱的测定方法。结果表明有少量批次的药材特征图谱与对照特征图谱比较相似度较低,为今后在生产过程中有效地控制药材的质量提供了检测依据。

参考文献

- 1 Standard of Chinese Medicinal Materials in Guangxi Province 1992 (1992年版广西中药材标准). 1992. 37
- 2 ZHOU Yu-xin (周玉新), LEI Hai-min (雷海民), XU Yong-

- hong (徐永红), *et al* Research Technology for Fingerprints of TCM (中药指纹图谱研究技术). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2002
- 3 HONG Xiao-kun (洪筱坤), WANG Zhi-hua (王智华). Digital Chromatographic Fingerprinting Spectrum of Traditional Chinese Medicines (中药数字化色谱指纹谱). Shanghai (上海): Shanghai Science and Technology Publishers (上海科学技术出版社), 2003
- 4 CDER of FDA Guidelines for Industry Botanical Drug Products (Draft Guidance). 2000
- 5 WHO. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines 1996
- 6 EMEA. Final Proposals for Revision of the Note for Guidance on Quality of Herbal Remedies 1998
- 7 LI Bao-qiang (李宝强). Research on chemical constituents of *Kopsia officinalis* and *Flemingia macrophylla* and the HPLC fingerprints of *Radix Flemingiae* (云南蕊木、大叶千斤拔化学成分及千斤拔指纹图谱研究). Kunming (昆明): Xishuangbanna Tropical Botanical Garden of Chinese Academy of Sciences (中国科学院西双版纳热带植物园), 2007
- 8 ZHOU Xin (周新), LI Hong-jie (李宏杰). Bioactivities and clinical applications of flavonoids (黄酮类化合物的生物活性及临床应用进展). *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2007, 16 (5): 350

(本文于 2007 年 12 月 9 日收到)

欢迎订阅 2009 年《药物分析杂志》

《药物分析杂志》是由中国科学技术协会主管,中国药学会主办,中国药品生物制品检定所药物分析杂志编辑部编辑出版的学术性期刊。主要栏目有研究论文、交流、综述等。报道化学药物、中药与天然药物、抗生素、蛋白质、多肽类药物、生物技术药物等的分析、质量标准研究、临床药物分析、药物分析基础理论与实践以及新方法、新技术的应用,并及时报道国家重大研究课题的最新成果。

本刊获 2006 年、2007 年、2008 年中国科协精品科技期刊工程项目 C 类资助。

本刊为我国自然科学核心期刊,被国内外主要检索系统收录。

本刊坚持质量第一、面向广大读者,以其独具的深度与广度展示我国药物分析的现状与发展。

本刊 2005 年开始由双月刊改为月刊,大 16 开本,每期 160 页,国内外公开发行。每期定价 20 元,全年定价 240 元,国内邮发代号:2-237,国外读者请同中国国际图书贸易总公司(中国国际书店,北京 399 信箱)联系。欢迎广大读者到当地邮局订阅,并欢迎有关专业人员集体订购,价格从优。

本刊已将创刊以来的文章制成光盘,需要者请与本刊联系。

希望为本刊推广发行者,价格另议。

地址:北京市天坛西里 2 号(100050) 联系人:刘小帅

电话:(010) 67058427 传真:(010) 67012819

编辑部网址:www.ywfxzz.cn 浏览网址:www.nicpbp.org.cn E-mail: ywfx@nicpbp.org.cn

《药物分析杂志》编辑部