

反向高效液相色谱法同时测定千斤拔不同种、不同药用部位中 醋酸乙酯部位化学成分的含量

任朝琴^{1,2}, 戴先芝^{1,2}, 袁玮², 刘圆²

(1. 阿坝师范学院藏羌医药研究所, 四川汶川 623000; 2. 西南民族大学少数民族药物研究所, 四川成都 610041)

摘要:【目的】同时测定千斤拔的不同种、不同药用部位中醋酸乙酯部位化学成分的含量, 以期评价不同种药材的质量, 为寻找新药源和新的药用部位提供一定的实验数据。【方法】采用反向高效液相色谱法(RP-HPLC)进行测定。应用Kromasil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为甲醇-0.5%磷酸水(23:77, 10 min; 43:57, 11 ~ 55 min), 流速为1 mL/min, 柱温30 ℃, 检测波长为240 nm。【结果】千斤拔燃料木素在2.015 04 ~ 10.075 20 μg内呈良好的线性关系, 回收率为99.75%, 相对标准偏差(RSD)为0.92%; 5,7,2',4'-四羟基异黄酮在2.010 42 ~ 10.052 10 μg内呈良好的线性关系, 回收率为101.24%, RSD为1.13%; 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄酮在2.012 46 ~ 10.062 30 μg内呈良好的线性关系, 回收率为102.35%, RSD为1.48%。蔓性千斤拔根、茎中燃料木素和5,7,2',4'-四羟基异黄酮含量最高, 宽叶千斤拔的叶中富含3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄酮, 球穗千斤拔仅根、茎含有较少的燃料木素。蔓性千斤拔茎、叶中有效成分的含量远高于其他千斤拔茎、叶的含量。【结论】检测该方法简便、快速、准确。从有效化学成分角度考虑, 建议球穗千斤拔不宜替代药典品种蔓性千斤拔、大叶千斤拔入药; 从有效化学成分资源的综合及可持续利用角度考虑, 建议蔓性千斤拔的茎、叶可以与其根同等入药。

关键词: 反相高效液相色谱(RP-HPLC); 蔓性千斤拔; 大叶千斤拔; 宽叶千斤拔; 腺毛千斤拔; 球穗千斤拔

中图分类号: R282.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)04-0797-05

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.04.026

Simultaneous Determination of Contents of Acetic Ether-Extracted Chemical Constituents in Different Medical Parts of Different Species of Radix Flemingiae Philippinensis by RP-HPLC

REN Chao-Qin^{1,2}, DAI Xian-Zhi^{1,2}, YUAN Wei², LIU Yuan²

(1. Tibetan and Qiang Medicine Institute of Aba Teachers University, Wenchuan 623000 Sichuan, China; 2. Ethnic Medicine Institute, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041 Sichuan, China)

Abstract: Objective To simultaneously determine the acetic ether-extracted chemical constituents in different medical parts of different species of Radix Flemingiae Philippinensis, and to evaluate the medicinal material quality of the different species so as to provide references for seeking new medical resource and new medicinal parts. **Methods** Reversed-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method was performed on Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) chromatic column with methanol-0.5% phosphoric acid water (23:77, 10 min; 43:57, 11 - 55 min) as mobile phase, flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was 240 nm. **Results** Genistein displayed good linearity in the range of 2.015 04 - 10.075 20 μg, average recovery was 99.75%, and relative standard deviation (RSD) was 0.92%. 2'-Hydroxygenistein displayed good linearity in the range of 2.010 42 - 10.052 10 μg, average recovery was 101.24%, and RSD was 1.13%. Ouratecatechin displayed good linearity in the range of 2.012 46 - 10.062 30 μg, average recovery was 102.35%, and RSD was 1.48%. The contents of genistein and 2'-hydroxygenistein in *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe)

收稿日期: 2020-03-17

作者简介: 任朝琴(1982-), 女, 硕士, 副教授; E-mail: 13424328@qq.com

通讯作者: 刘圆, 博士, 教授, 博士研究生导师; E-mail: 499769896@qq.com

基金项目: 四川省教育厅一般项目(编号: 14ZB0334); 阿坝师范学院专项项目(编号: ASZ14-01)

Li roots and stems was highest, Ourateacatechin was rich in the leaves of ourateacatechin, and little genistein was only in *Moghania strobilifera* (Linn.) Ait roots and stems. The effective ingredients in stems and leaves of *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li were higher than those of other species. **Conclusion** The established method is simple, accurate, replicate and suitable. From the perspective of effective ingredients, it is suggested that *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li and *Moghania macrophylla* (Willd.) O. Kuntze recorded in pharmacopeia are not replaced with *Moghania strobilifera* (Linn.) Ait.. From the point of comprehensive and sustainable application of effective ingredients resource, it is also suggested that the stems, leaves and roots of *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li need to be used as medicine.

Keywords: reversed-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method; *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li; *Moghania Latifolia* Benth; *Moghania glutiaosa* (Prain) Y.T.Wei; *Moghania macrophylla* (Willd.) O. Kuntze; *Moghania strobilifera* (Linn.) Ait.

《中华人民共和国药典：一部》(2020年版)中收载千斤拔为豆科植物蔓性千斤拔 *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li 或大叶千斤拔 *Moghania macrophylla* (Willd.) O.Kuntze 的干燥根^[1], 具有镇痛、抗炎作用, 可治疗妇科病^[2]。地方药用的还有球穗千斤拔 *Moghania strobilifera* (Linn.) Ait.、宽叶千斤拔 *Moghania Latifolia* Benth、腺毛千斤拔 *Moghania glutiaosa* (Prain) Y.T.Wei. 等种。考察不同品种千斤拔的质量对千斤拔产业科学化、可持续发展具有重要的意义。千斤拔含有黄酮、多糖、生物碱、 β -谷甾醇等多种成分的测定已有报道^[3]; 但尚未有对千斤拔中醋酸乙酯部位化学成分燃料木素(genistein)、5,7,2',4'-四羟基异黄酮(2'-hydroxygenistein), 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷(ourateacatechin)含量测定的报道。本研究拟对上述5个不同种的千斤拔不同药用部位中燃料木素、5,7,2',4'-四羟基异黄酮、3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷的含量进行比较研究, 以期寻找到新的药源, 并进一步为临床上科学、合理和可控地使用该类药材提供一定的实验数据。现将研究结果报道如下。

1 材料

1.1 仪器 Waters2695 高效液相色谱(HPLC)仪(美国 Waters 公司); Waters2996 检测器(美国 Waters 公司); Empower 色谱工作站, 色谱柱 Diamonsil C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m)(北京迪科马科技有限公司); Unicam UV-500(美国 Thermo electron 公司); Milli-Q 超纯水系统仪, KQ-250B

型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); METTLER AE240 电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.2 试剂 对照品: 燃料木素、5,7,2',4'-四羟基异黄酮、3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷, 均为自制^[4], 纯度分别为 99.0%、98.3%、98.5%。甲醇为色谱纯(美国迪玛公司), 水为超纯水及蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材 大叶千斤拔(四川成都)、蔓性千斤拔(湖北宜昌)、球穗千斤拔(广西举城)、腺毛千斤拔(广西)、宽叶千斤拔(广西), 经刘圆教授鉴定为蔓性千斤拔 *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li、大叶千斤拔 *Moghania macrophylla* (Willd.) O. Kuntze、球穗千斤拔 *Moghania strobilifera* (Linn.) Ait.、宽叶千斤拔 *Moghania Latifolia* Benth、腺毛千斤拔 *Moghania glutiaosa* (Prain) Y. T. Wei. 的根、茎、叶。

2 方法与结果

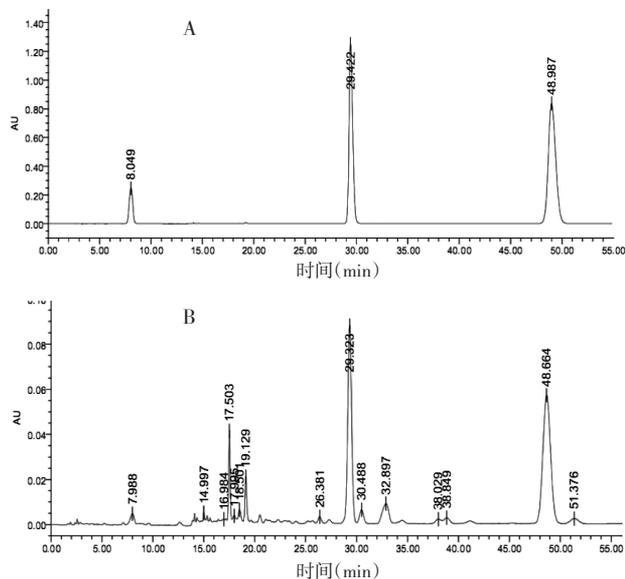
2.1 供试液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取“1.2”项中3种对照品, 用甲醇稀释成含燃料木素 1.007 52 mg·mL⁻¹、含 5,7,2',4'-四羟基异黄酮 1.005 21 mg·mL⁻¹、含 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷 1.006 23 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.1.2 样品溶液的制备 按照醋酸乙酯最佳提取工艺制备样品溶液: 料液比为 1:14, 提取温度 100 $^{\circ}$ C, 提取时间为 3 h, 水浴回流提取 2 次。

2.2 色谱条件的选择 经考察, 效果最佳的色谱

条件: 色谱柱 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.5%磷酸水 (23:77, 10 min; 43:57, 11~55 min); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 240 nm。HPLC 色谱图见图1。



A. 3种对照品混合溶液; B. 样品提取液

图1 高效液相色谱图

Figure 1 HPLC Chromatograms

2.3 线性关系的考察

2.3.1 标准曲线的制备 分别精密量取“2.1.1”项下混合对照品溶液2、4、6、8、10 μL, 按“2.2”项色谱条件进行测定, 以进样量(μg)的对数为横坐标, 峰面积值的对数为纵坐标, 绘制标准曲线。

2.3.1.1 燃料木素的标准曲线 按“2.3.1”项方法, 得到燃料木素的标准曲线方程为 $Y = 1.0116X + 6.6097$, $R^2 = 0.9996$, 其线性范围为 2.01504~10.0752 μg。具体结果见表1。

表1 燃料木素线性关系考察结果

Table 1 Investigation result for linear relationship of genistein

进样量(μg)	进样量对数	峰面积	峰面积对数
2.01504	0.30428	8195041	6.913551
4.03008	0.60531	17022753	7.231029
6.04512	0.78140	24987083	7.397716
8.06016	0.90634	33403954	7.523798
10.07520	1.00325	42149098	7.624788

2.3.1.2 5,7,2',4'-四羟基异黄酮的标准曲线 按“2.3.1”项方法, 得到5,7,2',4'-四羟基异黄酮的

标准曲线方程为 $Y = 1.0101X + 6.4862$, $R^2 = 0.9997$, 其线性范围为 2.01042~10.05210 μg。具体结果见表2。

表2 5,7,2',4'-四羟基异黄酮线性关系考察结果

Table 2 Investigation result for linear relationship of 2'-hydroxygenistein

进样量(μg)	进样量对数	峰面积	峰面积对数
2.01042	0.30329	6146497	6.788627
4.02084	0.60432	12748626	7.105463
6.03126	0.78041	18708784	7.272045
8.04168	0.90535	25003831	7.398007
10.05210	1.00226	31527285	7.498686

2.3.1.3 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷的标准曲线 按“2.3.1”项方法, 得到3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷的标准曲线方程为 $Y = 1.0062X + 5.7719$, $R^2 = 0.9997$, 其线性范围为 2.01246~10.06230 μg。具体结果见表3。

表3 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷线性关系考察结果

Table 3 Investigation result for linear relationship of ourateacetechin

进样量(μg)	进样量对数	峰面积	峰面积对数
2.01246	0.30373	1187758	6.074727
4.02492	0.60476	2442357	6.387809
6.03738	0.78085	3585111	6.554503
8.04984	0.90579	4797486	6.681014
10.06230	1.00269	6052482	6.781933

2.3.2 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下混合对照品溶液5 μL, 连续重复进样6次。结果显示: 燃料木素的相对标准偏差(RSD)为0.82%, 5,7,2',4'-四羟基异黄酮的RSD为0.75%, 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷的RSD为0.83%。表明精密度良好。

2.3.3 重复性试验 分别精密称取千斤拔药材6份, 按照“2.1.2”项下方法制备样品溶液, 按“2.2”项色谱条件进行测定, 结果显示: 燃料木素的RSD为0.87%, 5,7,2',4'-四羟基异黄酮的RSD为0.82%、3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷峰面积值的RSD为0.97%。表明重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 精密吸取同一批样品溶液10 μL, 按“2.2”项色谱条件于0、2、4、8、12、24 h测定, 结果显示: 燃料木素的RSD为0.91%,

5,7,2',4'-四羟基异黄酮的RSD为0.94%, 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷的RSD为1.11%。表明样品稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取千斤拔药材2.5 g, 共9份, 分为3组分别加入混合对照品10、20、30 μL , 按照“2.1.2”项下方法制备样品溶液, 按“2.2”项色谱条件进行测定。计算得到9份样品燃料木素平均回收率为99.75%, RSD为0.92%; 5,7,2',4'-四羟基异黄酮平均回收率为101.24%, RSD为1.13%; 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷平均回收率为102.35%, RSD为1.28%。

2.4 样品中3种有效成分含量的测定 按照醋酸乙酯最佳提取工艺(料液比为1:14, 提取温度100 $^{\circ}\text{C}$, 提取时间为3 h, 水浴回流提取2次), 以燃料木素、5,7,2',4'-四羟基异黄酮、3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷作为含量评价指标, 比较不同种千斤拔的药材质量。不同种千斤拔测定结果见表4。

表4 千斤拔样品中3种有效成分含量的测定结果
Table 4 Determination result for contents of 3 effective ingredients in various samples ($n=3$)

样品	部位	3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷		
		燃料木素 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	5,7,2',4'-四羟基 异黄酮($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
大叶千斤拔	根	0.045 024	0.017 053	0.053 827
	茎	0.079 590	0.026 833	0.224 668
	叶	*	0.010 165	0.828 405
蔓性千斤拔	根	0.367 352	0.379 682	0.104 608
	茎	0.297 226	0.253 235	0.117 529
	叶	0.059 915	0.025 051	0.122 858
球穗千斤拔	根	0.028 718	*	*
	茎	0.029 762	*	*
	叶	*	*	*
腺毛千斤拔	根	0.193 727	0.036 191	*
	茎	0.074 858	*	*
	叶	0.009 361	*	*
宽叶千斤拔	根	0.159 980	0.112 837	0.205 523
	茎	0.060 820	0.046 719	0.058 641
	叶	0.009 249	*	3.039 220

*: 未检测出

3 讨论

在本课题组前期对千斤拔进行了大量系统性

研究^[5-9]的基础上, 本研究对千斤拔的有效部位之一醋酸乙酯部位进行成分分离, 得到燃料木素、5,7,2',4'-四羟基异黄酮, 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷3个化合物, 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时测定千斤拔中燃料木素、5,7,2',4'-四羟基异黄酮, 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷的含量。本研究建立了千斤拔药材中有效成分的含量测定方法, 方法简便、准确, 重复性好, 可用于千斤拔的质量评价方法之一。

不同种千斤拔药材根部位的比较中: 蔓性千斤拔根中所含的燃料木素最高, 其次为腺毛千斤拔和宽叶千斤拔, 大叶千斤拔含量较低, 球穗千斤拔含量最低; 5,7,2',4'-四羟基异黄酮的含量, 仍以蔓性千斤拔根最高, 其次为宽叶千斤拔和腺毛千斤拔, 大叶千斤拔含量较低, 球穗千斤拔最低; 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷的含量, 以宽叶千斤拔最高, 其次为蔓性千斤拔, 大叶千斤拔最低, 但在球穗千斤拔和腺毛千斤拔中未检测出。

不同种千斤拔药材茎部位的比较中: 蔓性千斤拔茎中所含的燃料木素最高, 其次为大叶千斤拔和腺毛千斤拔, 宽叶千斤拔含量较低, 球穗千斤拔含量最低; 5,7,2',4'-四羟基异黄酮的含量, 以蔓性千斤拔茎最高, 其次为宽叶千斤拔和大叶千斤拔, 腺毛千斤拔和球穗千斤拔未检出; 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷的含量, 大叶千斤拔最高, 其次为蔓性千斤拔, 最低为宽叶千斤拔, 但在球穗千斤拔和腺毛千斤拔中未检测出。

不同种千斤拔药材叶部位的比较中: 蔓性千斤拔叶中所含的燃料木素最高, 其次为腺毛千斤拔和宽叶千斤拔, 大叶千斤拔和球穗千斤拔未检出; 5,7,2',4'-四羟基异黄酮的含量, 以蔓性千斤拔茎最高, 其次为大叶千斤拔, 宽叶千斤拔、腺毛千斤拔和球穗千斤拔未检出; 3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄烷的含量, 大叶千斤拔最高, 其次为宽叶千斤拔, 最低为蔓性千斤拔, 球穗千斤拔和腺毛千斤拔中未检测出。

本研究测定了蔓性千斤拔、大叶千斤拔、球穗千斤拔、宽叶千斤拔、腺毛千斤拔5个样品。结果显示蔓性千斤拔的根、茎在燃料木素和5,7,2',4'-四羟基异黄酮含量上远高于其他种, 宽叶千斤

拔的叶中富含3,5,7,3',5'-五羟基-4'-甲氧基黄酮,球穗千斤拔仅根、茎中含有较少的燃料木素。从有效化学成分角度考虑,建议球穗千斤拔不宜替代药典品种蔓性千斤拔、大叶千斤拔入药;从有效化学成分资源的综合及可持续利用角度考虑,建议蔓性千斤拔的茎、叶可以与其根同等入药。

本研究所用的药材均是采摘于国内不同地区的野生药材,很难确定其准确的生长年限。对于同产地、同采收期的千斤拔药材质量有待进一步研究。

本研究仅对5种千斤拔有效成分进行含量测定来评价药材质量,尚不够全面,有待今后进一步从千斤拔中分离出更多的有效成分来全面评价药材质量。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2020: 附录22.

- [2] 饶伟文, 黄建楷, 温志芳, 等. 千斤拔的品种调查与质量研究[J]. 中草药, 1999, 30(3): 219-222.
- [3] 宋立人, 洪恂, 丁续亮, 等. 中国中药学大辞典(上)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 195.
- [4] 任朝琴, 袁玮, 朱斌, 等. 蔓性千斤拔醋酸乙酯部位的化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1102-1103.
- [5] 任朝琴, 袁玮, 朱斌, 等. HPLC法筛选千斤拔中黄酮类成分的水提工艺[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(5): 571-573.
- [6] 任朝琴, 戴先芝, 刘圆. 千斤拔药材资源开发与利用调查报告[J]. 西南民族大学学报, 2011, 34(5): 610-613.
- [7] 任朝琴, 刘圆, 袁玮. HPLC-ELSD法测定腺毛千斤拔、宽叶千斤拔中根茎及不同产地大叶千斤拔、蔓性千斤拔根中 β -谷甾醇的含量[J]. 华西药学杂志, 2010, 25(2): 206-208.
- [8] 袁玮, 任朝琴, 朱斌, 等. RP-HPLC法筛选千斤拔有效成分的提取工艺[J]. 西南大学学报, 2012, 34(5): 152-156.
- [9] 刘圆, 任朝琴. HPLC-ELSD法测定千斤拔的不同种、不同药用部位中 β -谷甾醇的含量[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1891-1894.

【责任编辑: 侯丽颖】

冰片酯的合成、结构表征及工艺优化

陈传兵, 伍海涛, 宓穗卿, 王宁生
(广州中医药大学, 广东广州 510405)

摘要:【目的】研究冰片酯的合成工艺。【方法】采用FT-IR、¹³CNMR、¹HNMR证实冰片酯的结构,采用正交试验设计考察投料比、反应温度与反应时间对合成工艺的影响。【结果】正交实验结果显示,冰片酯的优化工艺条件为:冰片与酸投料比为1:1.2,反应温度为110℃,反应时间为6h。【结论】该工艺对于更多冰片酯类衍生物的开发,扩大冰片的应用范围有一定参考价值。

关键词: 冰片酯; 合成; 工艺优化; 冰片

中图分类号: R282.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)04-0801-05

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.04.027

收稿日期: 2020-10-10

作者简介: 陈传兵(1977-),男,博士,副教授; E-mail: henchuanbing@gzucm.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30701100); 广东省中药有效性与安全性研究重点实验室开放基金资助项目(编号: kf07005); 广州中医药大学创新基金资助项目(编号: 2007C002)