

瑶药金沙藤特征图谱及不同部位主要成分含量对比研究

闵建国¹, 李 鹤^{1,2}, 周艳林¹, 钟小清¹, 邹 准¹, 邹节明^{1*}

1. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

2. 桂林医学院, 广西 桂林 541001

摘要: 目的 建立金沙藤药材的 HPLC 特征图谱方法, 并评价药材不同部位的成分差异。方法 色谱柱为 Waters symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 354 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。收集广西不同产地 12 批金沙藤药材进行分析, 建立药材的特征图谱, 并对其茎和叶中芦丁、异槲皮苷和紫云英苷含量进行了测定, 进而评价药材的茎和叶化学成分差异。结果 从金沙藤药材特征图谱中分析得出 7 个共有峰, 其中 1 号峰为咖啡酸, 2 号峰为芦丁, 3 号峰为异槲皮苷, 5 号峰为紫云英苷。经分析, 其中 11 批药材的相似度在 0.900 以上, 1 批药材的相似度在 0.900 以下; 金沙藤茎比叶的化学成分丰富, 且测定的 3 种成分含量高。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可为有效控制金沙藤药材的质量提供科学依据, 药材采收季节以秋冬为佳。

关键词: 金沙藤; HPLC; 特征图谱; 芦丁; 异槲皮苷; 紫云英苷

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2708-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.030

Study on HPLC characteristic spectra of *Lygodii Herba* and chemical compositions of different parts from *Lygodii Herba*

MIN Jian-guo¹, LI He^{1,2}, ZHOU Yan-lin¹, ZHONG Xiao-qing¹, ZOU Zhun¹, ZOU Jie-ming¹

1. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China

2. Guilin Medical University, Guilin 541001, China

Abstract: Objective To establish the HPLC characteristic spectrum of *Lygodii Herba* from different habitats in Guangxi Province, and to evaluate the difference of components in different parts of medicinal materials. **Methods** HPLC was performed on Waters symmetry C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, with the mobile phase of acetonitrile-0.2% phosphoric acid at flow rate of 1.0 mL/min; Detection wavelength was 354 nm; The column temperature was 30 °C and the sample size was 20 μL. Twelve batches of *Lygodii Herba* samples were determined and the characteristic spectrum of those were established, and the content of rutin, isoquercetin, and astragalin were determined to evaluate the difference of chemical components in different parts of medicinal materials. **Results** There were seven characteristic peaks identified in the characteristic spectra of *Lygodii Herba* samples. peak 1 was caffeic acid, peak 2 was Rutin, peak 3 was Isoquercitrin and peak 5 was astragalin. The similarities of 11 batches of samples were proved to be higher than 0.900 and one batch of them was proved to be less than 0.900. The chemical component of stem was richer than that of leaves of *Lygodii Herba*, and the content of the component was higher in the stem than that of the leaves. **Conclusion** The method is simple, accurate, and reproducible, which can provide the scientific evidence for controlling the internal quality standards effectively. The preferred harvest season of *Lygodii Herba* is autumn and winter.

Key words: *Lygodii Herba*; HPLC; characteristic spectrum; rutin; isoquercitrin; astragalin

金沙藤为海金沙科海金沙属多年生蕨类植物海金沙 *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw.、小叶海金沙 *L. microphyllum* (Cav.) R. Br. 或曲轴海金沙 *L.*

flexuosum (L.) Sw. 的干燥地上部分, 又称迷离网、鸡胶莽、洗碗藤、金砂蕨等^[1]。其主产于广东、广西、江西、湖南、湖北等地区, 属两广常用中药材。

收稿日期: 2018-11-26

基金项目: 广西医药产业人才小高地资助项目 (201703); 广西科技重大专项 (桂科 AA17202045)

作者简介: 闵建国 (1984—), 男, 研究方向为中药化学与质量控制。Tel: (0773)5843106 E-mail: 67493023@qq.com

*通信作者 邹节明, 男, 教授级高工, 博士生导师。Tel: (0773)5842588 E-mail: zjm@sanjin.com.cn

金沙藤具有清热解毒、利尿通淋的功效, 药理活性研究表明在抑菌、抗炎和镇痛等方面优于其孢子海金沙^[2]。金沙藤主要含有咖啡酸及衍生物、异槲皮苷、紫云英苷等成分^[3], 也有文献对金沙藤中部分有机酸、黄酮类成分进行测定^[4-5], 但尚未见多指标的特征图谱对比研究报道。本实验采用 HPLC 法建立了金沙藤药材特征图谱的评价方法, 并测定主要成分芦丁、异槲皮苷和紫云英苷的含量, 为金沙藤药材全面质量标准的建立提供参考, 也为金沙藤药材资源可持续开发利用奠定理论基础。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱(HPLC)系统(配 996PAD 检测器, 美国); 安捷伦 1260 液相系统(配 PAD 检测器, 美国); S7500 超声仪(必能信有限公司); XP404s 电子天平(梅特勒有限公司)。

咖啡酸(批号 110885-201408)、芦丁(批号 100080-201610)、异槲皮苷(批号 111809-201403)购自中国食品药品检定研究院, 质量分数大于 98%; 紫云英苷(自制, 质量分数为 98.5%); 水为 Milli-Q 超纯水; 乙腈为色谱纯试剂, 其他试剂均为分析纯。

所有不同基原的金沙藤药材采自广西不同地区, 经过桂林三金药业股份有限公司钟小清高级工程师鉴定为海金沙 *L. japonicum* (Thunb.) Sw.、小叶海金沙 *L. microphyllum* (Cav.) R. Br.、曲轴海金沙 *L. flexuosum* (L.) Sw., 样品来源见表 1。

表 1 样品来源
Table 1 Sources of samples

编号	产地	基原
S1	桂林雁山镇	海金沙
S2	桂林灵川县	海金沙
S3	贺州钟山县	海金沙
S4	桂林永福县	海金沙
S5	南宁横县	海金沙
S6	南宁融安县	海金沙
S7	梧州藤县	海金沙
S8	桂林九屋镇	小叶海金沙
S9	河池都安县	小叶海金沙
S10	桂林永福先	小叶海金沙
S11	梧州藤县	曲轴海金沙
S12	河池都安县	曲轴海金沙

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

采用 Waters symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 0~60 min, 10%~25%A; 60~90 min, 25%~55%A; 检测波长为 354 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL。在上述色谱条件下, 理论塔板数以异槲皮苷计, 不低于 50 000, 分离度大于 1.5。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取咖啡酸、芦丁、异槲皮苷和紫云英苷对照品适量, 分别置 25 mL 量瓶中, 均加甲醇溶解并定容至刻度, 即得咖啡酸(0.758 4 mg/mL)、芦丁(0.688 mg/mL)、异槲皮苷(0.454 4 mg/mL)和紫云英苷(0.41 mg/mL)对照品溶液, 依次取上述各液 0.5、1、1、1 mL 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取金沙藤药材细粉(过 3 号筛)约 1.0 g, 精密称定, 置平底烧瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定质量, 于 85 ℃水浴回流 1 h, 冷却至室温, 再称定质量, 并用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 参照峰的选择

精密量取混合对照品溶液和供试品溶液各 20 μL, 注入 HPLC 仪, 进行测定, 记录色谱图, 见图 1。

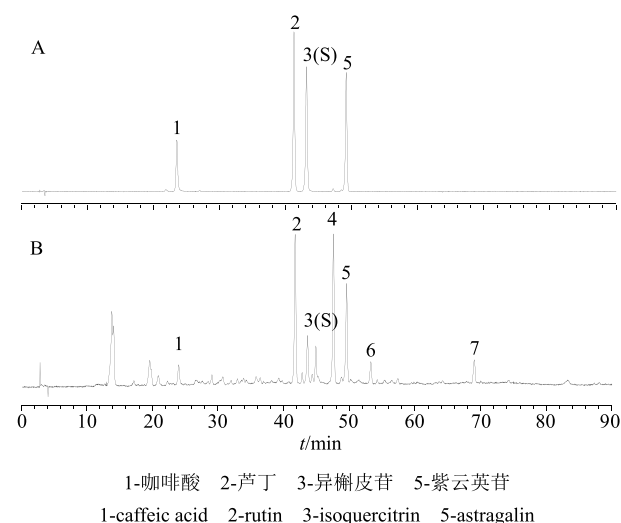


图 1 混合对照品 (A) 和金沙藤药材 (B) HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and *Lygodii Herba* (B)

金沙藤药材经“2.1”项下色谱条件分析后出现多个色谱峰,各批次药材中异槲皮苷色谱峰前后均有多个峰出现,出峰时间间隔小,为准确标定此类色谱峰,故将保留时间居中的异槲皮苷作为参照峰。

2.4 方法学考察

以 S5 样品为分析对象,按照《中国药典》2015 年版相关要求操作,结果表明该方法重复性、精密性符合要求,供试品溶液于 48 h 内稳定。以芦丁、异槲皮苷和紫云英苷为指标成分,混合对照品在 2~20 μL 内的进样量线性良好,样品加样回收率分别为 98.6%、95.2%、96.7%,RSD 分别为 1.8%、2.4%、1.9%。

2.5 广西不同产地金沙藤药材特征图谱的建立及评价

将各批金沙藤药材供试品溶液色谱图信号导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 版)》,利用均值法生成对照特征图谱,如图 2 所示,并计算相似度,结果见表 2。结果表明,仅 S4 相似度在 0.900 以下,说明不同产地的 3 个基原药材所含主要化学成分相似。

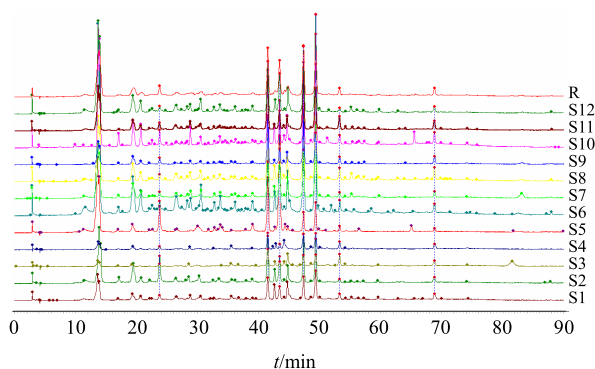


图 2 12 批金沙藤药材的特征图谱

Fig. 2 Fingerprint of 12 batches of *Lygodii Herba*

表 2 12 批药材 HPLC 特征图谱相似度分析结果

Table 2 Analysis on similarities of HPLC characteristic spectrum of 12 batches of samples

样品编号	相似度	样品编号	相似度
S1	0.955	S7	0.970
S2	0.916	S8	0.994
S3	0.981	S9	0.956
S4	0.609	S10	0.987
S5	1.000	S11	0.953
S6	0.971	S12	0.975

2.6 药材中 3 个黄酮成分的含量测定结果

按照“2.2”项制备对照品(除咖啡酸)和供试品溶液,根据“2.1”项色谱条件进行测定。

2.6.1 线性关系考察 吸取精密混合对照品溶液 2、4、6、8、10、15、20 μL 注入液相色谱仪,以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),得芦丁回归方程为 $Y=46\,099 X-1101.4$, $r=0.999\,8$; 异槲皮苷回归方程为 $Y=59\,640 X-8\,278.8$, $r=0.999\,5$; 紫云英苷回归方程为 $Y=46\,519 X-4\,142$, $r=0.999\,8$ 。

2.6.2 精密度试验 精密称取金沙藤粉末(S5, 过 2 号筛)约 1 g, 制备供试品溶液, 进样 10 μL , 重复进样 6 次, 测定芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的峰面积, 分别计算质量分数, 测得质量分数的 RSD 分别为 0.20%、0.62%、0.43%。

2.6.3 稳定性试验 精密称取金沙藤粉末(S5, 过 2 号筛)约 1 g, 制备供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0、4、8、16、24、48 h 精密吸取供试品溶液 10 μL , 测定芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的峰面积, 分别计算质量分数, 测得质量分数的 RSD 分别为 0.84%、1.25%、1.40%。

2.6.4 重复性试验 精密称取金沙藤粉末(S5, 过 2 号筛)约 1 g, 共 6 份, 制备供试品溶液, 测定芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的峰面积, 分别计算质量分数, 测得质量分数的 RSD 分别为 1.75%、1.33%、2.20%。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取金沙藤粉末(S5, 过 2 号筛)约 0.5 g, 共 6 份, 分别加入芦丁、异槲皮苷、紫云英苷各对照品溶液 0.3、0.1、0.2 mL, 制备供试品溶液, 测定并计算加样回收率, 分别为 98.6%、95.2%、96.7%, RSD 分别为 1.8%、2.4%、1.9%。

2.6.6 样品测定 取各批次金沙藤粉末(过 2 号筛)1 g, 各 2 份, 精密称定, 测定芦丁、异槲皮苷、紫云英苷的峰面积, 分别计算质量分数, 结果见表 3。结果表明, 广西不同地区采集的金沙藤药材中化学成分组成相似, 但相关黄酮苷成分的含量波动较大。

2.7 同批次药材不同部位的化学成分比较

按照上述方法分别测定各批药材的茎和叶部位相关成分含量, 结果见表 4。

结果表明, 同批次药材的茎和叶所含成分相似, 且芦丁、异槲皮苷及紫云英苷等黄酮苷成分主要集中在茎部位。

表 3 各批药材中 3 个黄酮苷成分含量测定结果

Table 3 Determination of three flavonoid glycosides in each batch of medicinal materials

样品编号	质量分数/%		
	芦丁	异槲皮苷	紫云英苷
S1	0.023	0.019	0.041
S2	0.038	0.019	0.046
S3	0.030	0.008	0.017
S4	0.151	0.012	0.041
S5	0.039	0.010	0.023
S6	0.033	0.022	0.052
S7	0.064	0.043	0.107
S8	0.014	0.007	0.015
S9	0.090	0.055	0.043
S10	0.011	0.002	0.007
S11	0.010	0.003	0.008
S12	0.036	0.074	0.015

表 4 各批药材的茎和叶部位 3 个黄酮苷成分的测定结果

Table 4 Determination of flavonoid glycosides in stems and leaves of each batch of medicinal materials

样品编号	部位	质量分数/%		
		芦丁	异槲皮苷	紫云英苷
S1	叶	0.011	0.005	0.007
	茎	0.029	0.025	0.056
S2	叶	0.021	0.004	0.017
	茎	0.045	0.026	0.058
S3	叶	0.013	0.002	0.006
	茎	0.037	0.010	0.021
S4	叶	0.048	0.003	0.007
	茎	0.171	0.016	0.055
S5	叶	0.011	0.005	0.006
	茎	0.051	0.012	0.030
S6	叶	0.012	0.006	0.011
	茎	0.044	0.030	0.070
S7	叶	0.026	0.015	0.057
	茎	0.080	0.055	0.128
S8	叶	0.011	0.003	0.006
	茎	0.019	0.012	0.020
S9	叶	0.034	0.025	0.033
	茎	0.140	0.119	0.102
S10	叶	0.007	0.003	0.006
	茎	0.014	0.003	0.009
S11	叶	0.008	0.003	0.006
	茎	0.017	0.004	0.011
S12	叶	0.011	0.016	0.007
	茎	0.047	0.099	0.018

3 讨论

3.1 检测波长的选择

金沙藤主含咖啡酸类和黄酮苷类成分,经全波长色谱图对比,于 354 nm 全谱图峰信号多,指标成分色谱峰分离度好,故确定检测波长为 354 nm。

3.2 色谱柱的选择

实验过程中比较了多个品牌色谱柱(250mm×4.6 mm, 5 μm),以各色谱峰与参照峰的保留时间比值为指标,均能较好地重现所建方法,说明方法于色谱柱要求方面耐用较好。

3.3 流动相系统的选择

实验中对比了甲醇-水、乙腈-水及酸水溶液的流动相系统,结果以乙腈-0.2%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱的色谱图指标成分的色谱峰分离度和基线较好,特别是 2~5 号峰出峰时间段较好,因此以乙腈-0.2%磷酸水溶液为本方法流动相系统。

综上所述,本实验利用 HPLC 对广西区不同产地的多批次药材进行分析,建立了金沙藤特征图谱方法,共得到 7 个共有峰,并指出 4 个主要成分,且对其中 3 个黄酮苷含量进行了测定。结果表明,广西不同产地不同基原的金沙藤药材所含主要化学成分相似,证明其作为金沙藤的药用基原具有合理性;分析方法简便、准确、重复性好,可为有效控制该药材的内在质量提供科学依据。

参考文献

- [1] 彭海燕,钟小清,吕高荣,等.金沙藤药材的名实考证[J].中草药,2013,44(21):3063-3066.
- [2] 何胜旭,孟杰,吕高荣,等.金沙藤与海金沙药理作用的比较研究[J].中国中药杂志,2011,36(15):2149-2152.
- [3] 周艳林,赵旭,华娟,等.金沙藤化学成分及其抗氧化活性评价研究[J].中华中医药志,2013,28(5):1391-1396.
- [4] 王采奕,胡筱希,闵建国,等.HPLC 法测定金沙藤中绿原酸、咖啡酸和 P-香豆酰葡萄糖[J].中草药,2015,46(2):273-275.
- [5] 张道英,王妙飞,程庚金生,等.赣南产金沙藤中异槲皮苷和紫云英苷的含量测定[J].基因组学与应用生物学,2017(8):3133-3137.