

战骨药材及其复方制剂的指纹图谱分析及牡荆素含量测定

江志霞, 李海玲, 邓亚利*

华南农业大学材料与能源学院制药工程系, 广州 510000

摘要: 建立战骨药材及其复方制剂的 HPLC 指纹图谱分析及牡荆素的 HPLC 含量测定方法, 并考察牡荆素在跌打生骨胶囊制备过程中的含量变化。采用 Waters Xbridge C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.5% 冰醋酸水溶液, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 350 nm; 柱温: 25 °C。结果表明牡荆素在 0.16 ~ 0.80 μg 范围内线性关系良好 ($R^2 = 0.9996$); 10 批战骨药材的指纹图谱有 19 个共有特征峰, 其峰面积占总峰面积的 90% 以上。每克药材含牡荆素在 15.8 ~ 30.2 μg 之间。制备胶囊的稠膏及内容物颗粒未检出牡荆素。表明本实验建立的 HPLC 方法可用于测定战骨药材中牡荆素的含量, 而不适用于其复方制剂中牡荆素的含量测定。

关键词: 战骨; 跌打生骨胶囊; HPLC; 指纹图谱; 牡荆素

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.013

Fingerprinting Analysis and Content Determination of Vitexin of *Premna fulva* Craib and Its Compound Preparation

JIANG Zhi-xia, LI Hai-ling, DENG Ya-li*

South China Agricultural University College of material and Energy of Pharmaceutical Engineering, Guangzhou 510000, China

Abstract: The objective of this study was to develop a HPLC method for the fingerprinting analysis of *Premna fulva* Craib and to determine the content of vitexin in *P. fulva* and its compound preparation. The chromatographic separation was carried out using Waters Xbridge C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with gradient elution. The mobile phase was comprised of acetonitrile-0.5% glacial acetic acid in water, the UV detection wavelength was set at 350 nm, with a flow rate of 1.0 mL/min, and column temperature was maintained at 25 °C. Results showed that good linear relationship of vitexin was achieved in the range of 0.16-0.80 μg ($R^2 = 0.9996$). There were 19 common peaks (peak areas account for more than 90% of total peaks) in the fingerprints of 10 batches of *P. fulva*. The contents of vitexin in 10 batches of *P. fulva* samples were between 15.8 ~ 30.2 μg/g. In addition, vitexin was not detected in Dieda Shenggu capsules or extract. Hence, it was concluded that the developed HPLC method can be used as a quality control method for vitexin in *P. fulva*. While, it was unsuitable for its compound preparation.

Key words: *Premna fulva* Craib; Dieda Shenggu capsules; HPLC; fingerprint; vitexin

壮药战骨, 也叫土霸王、穿云箭, 学名黄毛豆腐柴 (*Premna fulva* Craib), 属于马鞭草科。具有活血化瘀, 强筋健骨, 祛风止痛的疗效, 常常被用来治疗腰腿痛、跌打扭伤, 风湿性关节炎和类风湿关节炎及肝区疼痛等相关疾病^[1,2]。战骨含有的主要有效成分为黄酮类化合物, 如柚皮素、芹菜素、牡荆素等^[3]。李小燕^[4]等以柚皮素为对照, 对战骨 30% 乙醇提取液进行了指纹图谱研究。

跌打生骨胶囊处方中包含七味药材, 战骨、肿节风、自然铜、丹参、延胡索、牛膝、杜仲, 其中自然铜为矿物药, 主含二硫化铁 (FeS₂), 有散瘀止痛, 续筋接骨的功效。原生自然铜常含少量或微量 Fe、Ag、Au、Hg、Bi、Sb、Ge 等元素。金属离子与黄酮类成分的酚羟基络合, 使药材原有黄酮类成分发生改变^[5]。复方中自然铜及其他中药对君药战骨黄酮类成分, 在提取工艺、胶囊制备工艺中, 是否产生影响, 是本研究的目的。

本研究首先建立了以牡荆素为对照, 以乙酸乙酯提取液为研究部位, 进行 HPLC 指纹图谱含量测

定研究;并对跌打生骨胶囊制备工艺提取所制备的稠膏,以及上市销售的跌打生骨胶囊内容物进行了测定,考察复方中其他药味及制备工艺对战骨黄酮类成分的影响,为战骨药材及其在复方制剂中的应用,提供借鉴。

1 仪器与材料

美国 Waters 600-2998 型高效液相色谱仪(四元高压梯度泵、手动进样、柱温箱、2998PAD 检测器、Empower Pro 工作站);电子天平(FA1004N,上海精

密科学仪器有限公司);旋转蒸发器;超声仪;回流管;恒温电热套;牡荆素对照品(批号:111687-200602),购自中国药品生物制品研究院。

战骨药材购于不同的医药公司(表1),经陕西省中医药研究院孙平川主任药师鉴定为黄毛豆腐柴的干燥茎。跌打生骨胶囊中间体稠膏、跌打生骨胶囊由陕西省中医药研究院汉唐制药有限公司提供(批号分别为:120301、120701;胶囊规格:每粒重0.45 g)。乙腈(色谱纯),屈臣氏蒸馏水。

表1 战骨药材来源

Table 1 Origin of *P. fulva* samples

批次号 Batch	采收时间 Harvest time	供货单位 Manufacturer	产地 Origin
S1	110604	广东省药材公司中药饮片厂	南宁
S2	090826	广东致信药业中药饮片厂	玉林
S3	120103	广东康美药业中药饮片厂	百色
S4	120218	广东杏林药业有限公司	北海
S5	111206	广州市药材公司中药饮片厂	天峨县
S6	120105	广州中医药大学大药房公司	田阳县
S7	130108	广东致信药业中药饮片厂	北海
S8	130603	南海药材公司中药饮片厂	百色
S9	120116	广州市药材公司中药饮片厂	玉林
S10	111208	玉林中药材批发市场	玉林

2 实验方法

2.1 供试品溶液与对照品溶液的制备

2.1.1 战骨药材供试品的制备

称取药材粗粉约10.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入乙酸乙酯60 mL,称定重量,超声处理30 min,再称定重量,用乙酸乙酯补足减失重量,摇匀,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇使溶解,定容到10 mL容量瓶中,摇匀,过0.22 μm微孔滤膜,即得。

2.1.2 稠膏供试品的制备

称取跌打生骨胶囊中间体稠膏(批号120301)约1.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,按2.1.1方法操作即得。

2.1.3 胶囊供试品的制备

取跌打生骨胶囊(批号120701)30粒,倒出内容物颗粒,研细,称取约5.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,按2.1.1方法操作即得。

2.1.4 对照品溶液的制备

精密称取牡荆素对照品适量,用甲醇配制成每1 mL中含0.08 mg的对照品溶液(含牡荆素80 μg/mL)。

2.2 色谱条件

色谱柱:Waters Xbridge C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)柱;流速:1 mL/min,柱温:25 °C,检测波长:350 nm,进样量:10 μL;流动相:乙腈(A)-0.5%冰醋酸水溶液(B),梯度洗脱程序:0~20 min,10%~13% A;20~40 min,13%~15% A;40~50 min,15%~20% A;50~60 min,20%~23% A。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度实验

分别吸取对照品牡荆素溶液各10 μL,在“2.2”项下色谱条件下,连续进样5次,计算色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的RSD值。

2.3.2 重复性实验

取同一批战骨药材按2.1.1制成5份供试品溶

液,依法进样分析。

2.3.3 稳定性试验

取同一批战骨药材供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12 h 进样 5 次,计算相对保留时间及峰面积的 RSD 值。

2.3.4 线性范围考察

分别精密移取牡荆素(80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对照品溶液,2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL 置 10 mL 量瓶中,配制浓度依次为 16、32、48、64、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液,按“2.2”项下的色谱条件进行色谱分析,以面积为横坐标,以进样量为纵坐标,进行线性方程拟合。

2.3.5 回收率试验

精密称量已知含量的同一批战骨药材 5 g 五份(牡荆素含量为 24.63 $\mu\text{g}/\text{g}$),分别加入牡荆素(24 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对照品溶液各 5 mL,按 2.1.1 制成 5 份供

试品溶液,在“2.2”项下色谱条件下进样分析。

3 结果与分析

3.1 方法学考察结果

精密度试验结果显示相对保留时间与相对峰面积 RSD 值分别是 0.84% 和 2.76%。重复性试验结果 19 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2%,相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明重复性良好。稳定性试验结果显示共有峰的相对保留时间的 RSD 值小于 2%,相对峰面积的保留时间的 RSD 值小于 3%,提示样品溶液稳定性较好。线性方程为 $Y = 2.6e^{-7}X + 0.0323$ ($R^2 = 0.9996$),表明牡荆素的进样量在 0.16~0.80 μg 范围内线性关系良好。加样回收实验结果见表 2。

表 2 牡荆素的加样回收率实验结果($n=5$)

Table 2 Recoveries of vitexin ($n=5$)

原有量 Original amount(μg)	加入量 Added amount(μg)	实测量 Detected amount(μg)	回收率 Recovery(%)	平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
123.56	120.00	243.45	99.95		
122.96	120.00	236.44	97.32		
122.66	120.00	228.14	94.02	99.15	3.58
124.08	120.00	251.34	102.97		
123.81	120.00	247.44	101.49		

3.2 药材的指纹图谱分析及牡荆素含量测定结果

对照品牡荆素的出峰时间是 36.34 min,与药材指纹图谱中的第 6 号峰 36.26 min 相对应,见图 1(A)。10 批药材的指纹图谱见图 2,通过中药色谱图分析和数据管理系统软件对各批药材谱图进行处理,结果发现,10 批战骨药材样品的色谱图中有 19 个主要共有特征峰,从而构建了战骨药材的指纹图谱,其中 6 号峰为牡荆素(通过与参照物色谱图对照确认),以牡荆素为对照,计算出其他各特征峰的相对保留时间和相对峰面积,结果表明,10 批药材中 19 个共有峰的峰面积之和均大于总峰面积的 90%,相对保留时间的 RSD 值均小于 0.5%;共有峰的相对保留时间 RSD 值均小于 3%,符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》^[6]。但各成分的相对峰面积却不尽相同。在药材谱图[图 1(B)]保留时间为 9.50 min 处批次 7、8、9 检测到该峰;保留时间为 23.89 min 处的峰批次 1、2、7 检出,但含量较

低;保留时间为 37.63 min 处批次 7 未出峰;在保留时间分别为 63.11、63.65、64.83 min 处批次 7、8 中未检出峰,因此谱图中这些峰未作为特征峰标出。这一结果也表明因产地不同,药材的质量也会有所差异。根据线性方程,对 10 批药材中的牡荆素含量进行计算,每批重复测量三次,结果取三次的平均值依次为 17.0、16.5、24.6、21.6、21.2、20.1、15.8、30.2、20.8、18.3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版进行相似度评价,结果见表 3。

3.3 跌打生骨胶囊中间体稠膏及胶囊内容物的 HPLC 结果

跌打生骨胶囊中间体稠膏及胶囊内容物的 HPLC 分别见图 1(C)和图 1(D),结果表明,在对照品牡荆素出峰时间 36.26 min 处,两者均未出现相应的色谱峰。

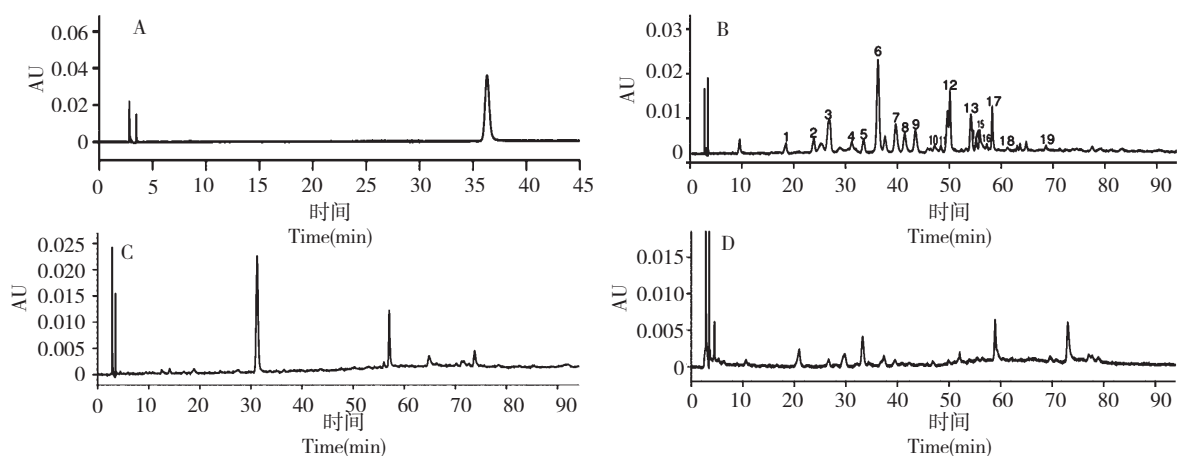


图 1 牡荆素对照品 (A)、战骨药材 (B)、中间体稠膏 (C) 和胶囊内容物 (D) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of vitexin standard (A), *P. fulva* sample (B), intermediate products of *P. fulva* (C) and Dieda Shenggu capsules (D)

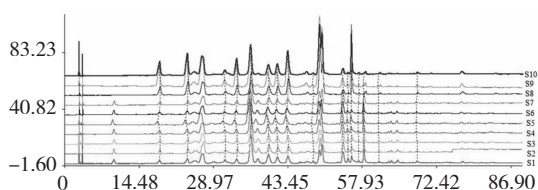


图 2 10 批战骨药材 HPLC 重叠图

Fig. 2 Overlaid HPLC chromatograms of 10 batches of *P. fulva* samples

表 3 10 批样品的相似度计算

Table 3 Similarity of 10 batches of *P. fulva* samples

批号 Batches	参照 Reference	对照 Contrast
S1	1.000	0.915
S2	0.989	0.905
S3	0.998	0.913
S4	0.914	0.930
S5	0.895	0.875
S6	0.925	0.912
S7	0.922	0.939
S8	0.957	0.942
S9	0.941	0.924
S10	0.894	0.875

4 讨论

4.1 检测波长、流动相及洗脱方法的优化

将供试品溶液进行波谱扫描,发现其最大吸收

波长为 350 nm 处,因此选此波长为检测波长。对甲醇-0.5% 磷酸溶液、甲醇-0.01 mol/L 磷酸溶液、乙腈-0.5% 冰醋酸溶液、乙腈-0.5% 磷酸水溶液等流动相进行筛选,优化梯度洗脱比例,乙腈-0.5% 冰醋酸水溶液在文中 2.1 项色谱条件下,样品中的共有峰能得到很好的分离。

4.2 制备工艺和复方成分对药材有效成分的影响

将制备胶囊的提取物稠膏、胶囊内容物样品的 HPLC 色谱图,与对照品谱图对比,在同一保留时间下,两者均未出现牡荆素的相应峰;更换不同批次提取物稠膏、胶囊内容物,依法制备样品并测定,结果一致,均未出现牡荆素峰。将两者与药材的指纹谱图对比,峰数、出峰时间及峰面积差异较大,究其原因,可能是跌打生骨胶囊为复方制剂,处方中含有自然铜,自然铜中的矿物质元素,如铁离子等可能会与战骨中黄酮类成分络合^[5]所致。

但制备胶囊的提取物稠膏、胶囊内容物样品的 HPLC 图,呈现出相似的趋势,中间体稠膏分别在 31.21、57.07、73.79 min 有较大的吸收峰,胶囊内容物在 33.24、58.94、73.03 min 处有较大的吸收峰;而 30 min 处的峰,稠膏的峰面积是胶囊内容物的 5 倍;73 min 处的峰,在制备成胶囊后峰面积反而增加了 2 倍。说明在稠膏制备内容物颗粒的过程中,药物的成分也发生了变化。

有文献报道称,不同干燥方法对黄芩花中黄酮类成分含量影响不同,且不同的干燥方法对黄芩花中不同的黄酮类成分的影响也是有所不同的^[7]。而乙醇溶度、提取温度、提取时间、和浓缩温度等这

些制备工艺工程都可能会对黄酮类成分的提取造成影响^[8,9]。故本研究采用乙酸乙酯为提取溶剂,与参考文献^[4]采用30%乙醇为提取溶剂,所得到的黄酮类成分及杂质含量亦有所差异,复方的提取工艺对原药材的黄酮类成分会造成影响。

由此可知,战骨的黄酮类成分,在组成复方后,在复方提取及制剂制备的工艺过程中,加热会影响黄酮类成分的组成及含量。我们的后续研究会重点对这部分内容进行探讨。有针对性的优化战骨复方制剂的制备工艺,完善含有战骨药材的中成药的质量标准,确保用药的安全和有效。

参考文献

- Wei JQ (韦记青), Shi TS (石天松), Jiang YS (蒋运生), *et al.* Review on studies of Zhuang medicinal plants *Premna fulva* Craib. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2009, 04: 965-966.
- Xiong ZC (熊忠臣), Shi YC (史艳财), Qi XX (漆小雪), *et al.* ISSR analysis on genetic diversity for germplasm resources of *Premna fulva* in Zhuang medicine. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 10: 2040-2044.
- Dai CY (戴春燕), Chen GY (陈光英), Zhu GY (朱国元), *et al.* The chemical composition of Zhangu stem research. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2007, 01: 34-35.
- Li XY (李小燕), Yang LF (杨立芳), Deng GH (邓光辉), *et al.* Study on fingerprint chromatograms of Zhuang by high performance liquid chromatography. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 02: 287-290.
- Wu LJ (吴立军). Medicinal Chemistry of Natural Products (天然药物化学). Beijing: People's Medical Publishing House, 1988. 178-179.
- State Drug Administration (国家药品监督管理局). Traditional Chinese medicine injection fingerprint study technical requirements. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 10: 3-7.
- He CN (何春年), Xiao SP (肖苏萍), Tian Z (田壮), *et al.* The influence of different drying methods to flavonoids ingredients of *Radix scutellariae* leaf. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2012, 12: 31-35.
- Zhang J (张静), Ji WL (季万兰). Extraction and rising film concentration of flavonoids from Ginkgo leaves. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1704-1708.
- Hu R (胡荣), Li ZH (李召辉), Yang RP (杨荣平), *et al.* Study on the preparation technology of total flavonoids from *Hedyotis diffusa* and *Scutellaria barbata*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25: 1442-1444.
- Guo C, Han GY, Su ZW. Chemical constituents from the seeds of *Cuscuta australis*. *Chin Pharm J*, 1997, 32: 8-11.
- Hiroji I, Hideo I. Isolation and structure of thalictoside. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34: 726-729.
- Isao K, Takuya M, Yumiko H, *et al.* Two new sesquioneolignans from the bark of *Illium dunnianum*. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39: 2606-2608.
- Chung IM, Hahn SJ, Ahmad A. Confirmation of potential herbicidal agents in hulls of rice, *Oryza sativa*. *J Chem Ecol*, 2005, 31: 1339-1352.
- Wang MY, Li W, Li XB. Study on water soluble constituents of *Urtica fissa*. *Chin Pharm J*, 2005, 4: 1853-1855.
- Morikawa T, Tao J, Ueda K, Matsuda H, *et al.* Medicinal foodstuffs. XXXI. structure of new aromatic constituents and inhibitors of degranulation in RBL-2H3 cells from a Japanese folk medicine, the stem bark of *Acernikoenese*. *Chem Pharm Bull*, 2003, 51: 62-67.
- Lin RJ, Lo WL, Wang YD *et al.* A novel cytotoxic monoterpene from the leaves of *Cinnamomum subavenium*. *Nat Prod Res*, 2008, 22: 1055-1059.
- Peter J, Hylands, Kristin I. The isolation of methyl- β -orsellinate from *Stereocaulon alpinum* and comments on the isolation of 4,6-dihydroxy-2-methoxy-3-methylacetophenone from *Stereocaulon* species. *Phytochemistry*, 1985, 24: 127-129.
- Ernest W, Hugo E, Otto R, *et al.* ¹³C NMR spectroscopy of neolignans. *Phytochemistry*, 1976, 15: 1547-1551.
- Bang KH, Kim YK, Min BS, *et al.* Antifungal activity of magnolol and honokiol. *Arch Pharm Res*, 2000, 23: 46-49.
- Chen XM, Qian SH, Feng F. Chemical constituents of the stems of *Impatiens balsamina* L. *Pharm Clin Res*, 2009, 17: 31-33.
- Gu Q, Zhang XM, Zhou J, *et al.* One new dihydrobenzofuran lignan from *Vitex trifolia*. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10: 499-502.
- Veronique S, Francois B, and Peter GW. Novel oligorhamnosides from the stem bark of *Cleistoholis glauca*. *J Nat Prod*, 2000, 63: 6-11.
- Shen ZB, Olof T. (-)-Massoniresinol, A lignan from *Pinus Massoniana*. *Phytochemistry*, 1985, 24: 364-365.

(上接第 608 页)