

菥蓂 HPLC 指纹图谱的建立和 2 种碳苷成分的含量测定

过立农¹, 郑凰雅², 刘杰¹, 马双成¹, 咎珂^{1*}, 郑健^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 贵州省遵义市食品药品检验所, 遵义 563002)

摘要 目的: 采用高效液相色谱法建立菥蓂的指纹图谱, 并同时测定2种主要黄酮碳苷的含量。方法: 以异荭草苷和异牡荆苷为对照品, 采用 HSS T3 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.5%醋酸水溶液 (15:85) 为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 350 nm, 柱温 30 °C; 采用 CHEMPATTERN 化学计量学软件对结果进行处理分析。**结果**: 建立菥蓂的指纹图谱, 标定 5 个特征峰, 30 min 内菥蓂的主要色谱峰能够达到完全分离, 对 2 个特征峰成分进行含量测定。13 批菥蓂中异荭草苷和异牡荆苷的含量分别为 0.015%~0.094% 和 0.034%~0.323%。**结论**: 建立了菥蓂的指纹图谱, 结合 2 种主要碳苷含量测定, 为菥蓂药材的质量评价提供科学依据。

关键词: 菥蓂; 高效液相色谱; 指纹图谱; 特征峰; 异荭草苷; 异牡荆苷; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)09-1032-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.09.013

Establishment of HPLC Fingerprint Chromatogram of *Thlaspi arvense* L. and Content Determination of Two Flavone C-glycosides

Guo Linong¹, Zheng Huangya², Liu Jie¹, Ma Shuangcheng¹, Zan Ke^{1*}, Zheng Jian^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Zunyi Institute for Food and Drug Control, Zunyi 730070, China)

Abstract Objective: To establish fingerprint chromatogram using the method of HPLC and to determine two main flavone C-glycosides in *Thlaspi arvense* L. **Methods:** Isoorientin and isovitexin were used as reference substance. HPLC analysis was performed on a Waters HSS T3 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.5% acetic acid solution (15:85) with isocratic elution and the flow rate was 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 350 nm and the column temperature was 30 °C. The results were analyzed using the Chemometrics software Chempattern. **Results:** HPLC fingerprint chromatogram of *Thlaspi arvense* L. was established and five characteristic peaks were marked. The main chromatographic peaks of *Thlaspi arvense* L. were completely separated in 30 minutes. Two characteristic peaks of isoorientin and isovitexin were simultaneously determined by HPLC. The contents of the two flavones C-glycosides in 13 samples of *Thlaspi arvense* L. were 0.015%-0.094%, and 0.034%-0.323%, respectively. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint chromatogram together with content determination of two flavones C-glycosides can be used for the quality control of the crude drug.

基金项目: 十二五国家科技重大专项 (编号 2014ZX09304307-002)

作者简介: 过立农, 主管药师; 研究方向: 民族药质量控制; Tel: (010) 67095739; E-mail: 826075517@qq.com

通信作者: 郑健, 研究员; 研究方向: 民族药质量控制; Tel: (010) 67095739; E-mail: bjzj825@163.com

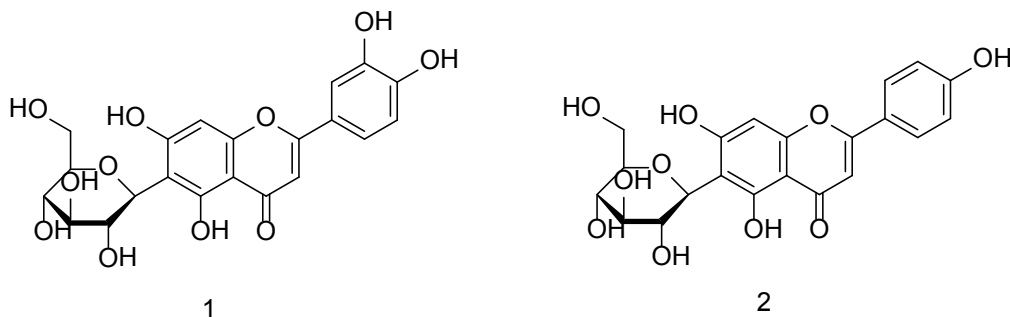
咎珂, 副研究员; 研究方向: 民族药质量控制; Tel: (010) 67095739; E-mail: 6206310@qq.com

Keywords: *Thlaspi arvense* L.; HPLC; fingerprint chromatogram; characteristic peaks; isoorientin; isovitexin; content determination

菥蓂，现收载于《中国药典》2015年版一部中，为十字花科菥蓂属一年生草本植物菥蓂 *Thlaspi arvense* L.的干燥地上部分^[1]，又名遏蓝菜、苏败酱（江苏）、南败酱（湖北）、苦芥子、败酱草、瓜子草、野榆树、芥目（陕西），分布于全国各地，其全草、嫩苗和种子均可入药。全草清热解毒、消肿排脓；嫩苗和中益气、利肝明目。菥蓂始载于《神农本草经》，列为上品，之后历代本草多有记载^[2-3]；《中国药典》1977年版作为正名，别名“苏败酱”，以区别于败酱科败酱草，具有清肝明目、和中、解毒的功效，用于目赤肿痛，消化不良，脘腹胀痛，肝炎，阑尾炎，疮疖痈肿^[4]。河南、广西、湖南等地方标准收载了该药材，《卫生部药品标准》中收载了菥蓂子，为该药材的干燥成熟种子^[5-9]。菥蓂

主要含有黑芥子苷等硫苷类成分，异荭草苷、异牡荆苷等黄酮碳苷类成分^[10-12]。菥蓂的指纹图谱和含量测定研究报道较少。陈玉等^[13]采用HPLC法测定了菥蓂子中的黑芥子苷含量；庞赛等^[14]以异牡荆苷为参照峰建立了菥蓂的HPLC指纹图谱。

异荭草苷具有较好的体内外抗病毒活性，能一定程度上缓解病毒性炎症^[15]；异牡荆苷具有抗氧化、降血糖、抗炎等活性^[16]。针对《中国药典》2015年版一部菥蓂项下缺少含量测定项目，本研究针对市场上抽取的菥蓂药材，采用恒流HPLC法30 min内完成洗脱，建立菥蓂的指纹图谱，并同时测定2种黄酮碳苷异荭草苷和异牡荆苷（结构式见图1）的含量，为菥蓂药材的质量控制提供科学依据。



1. 异荭草苷; 2. 异牡荆苷。

图1 结构式

1 仪器与试剂

1.1 仪器

沃特世2695型高效液相色谱仪，紫外检测器，P120H型超声波清洗器（德国ELMA公司），Milli-Q 纯水系统，电子天平（Sartorius公司，SECURA224-1CN型万分之一天平），电子天平（Sartorius公司，MSE125S型十万分之一天平）。Waters HSS T3色谱柱（填料：十八烷基键合硅胶，250 mm × 4.6 mm，5 μm；沃特斯仪器公司）。

1.2 试剂

异荭草苷对照品（中国食品药品检定研究院，批号：111974-201401，纯度94.0%）、异

牡荆苷（上海源叶生物技术有限公司，批号：P20N6FC331，纯度99.6%）。甲醇和乙腈为色谱纯（Fisher公司）；水为Milli-Q纯化水。

1.3 样品

药材均来自2016年国家药品抽检性评价项目的抽检样品，经中国食品药品检定研究院民族药室郑健研究员鉴定。1~13号样品为十字花科菥蓂 *Thlaspi arvense* L.的干燥地上部分。

2 溶液的制备

2.1 混合对照品溶液

取异荭草苷和异牡荆苷约10 mg，精密称定，分别置10 mL量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，

即得各对照品储备液。分别取各对照品储备液适量,置同一10 mL量瓶中,加乙腈配制成上述2种成分分别为20、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,即得。

2.2 供试品溶液

取样品粉末(过四号筛)约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定重量,超声处理(功率:250 W,频率:33 kHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

3 色谱条件

Waters HSS T3色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);以乙腈-0.5%醋酸水溶液(15:85)为流

动相;流速为1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长为350 nm;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;进样量为10 μL 。

4 指纹图谱

4.1 菝葜指纹图谱的建立

取不同批次的菝葜(1~13号样品)粉末,按“2.2”节方法制备供试品溶液,精密吸取10 μL ,进样测定,记录30 min的HPLC色谱图(见图2)。根据结果,采用Chempattern化学计量学软件进行数据分析处理,设定1号样品的图谱为参照图谱,将其他样品的色谱图与参照图谱进行自动匹配,根据共有峰的平均色谱图生成菝葜的指纹图谱(图3)。

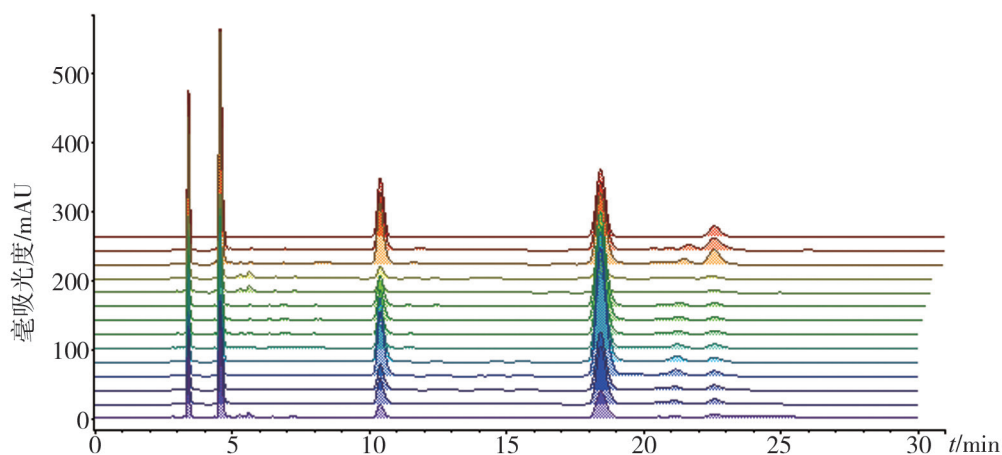
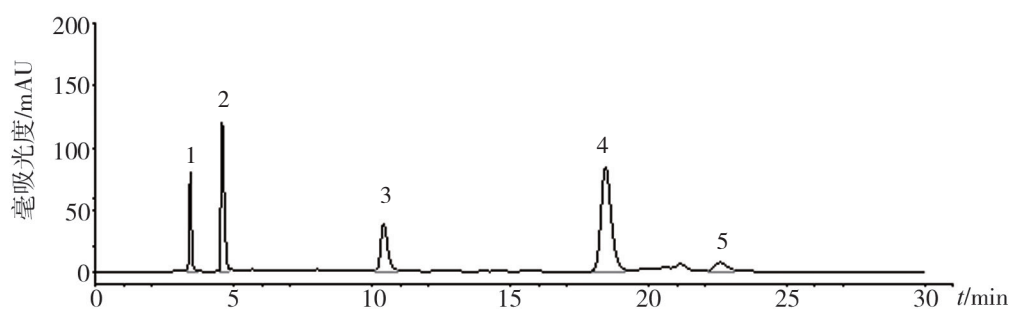


图2 13批菝葜 HPLC 色谱图



1、2、5. 未知成分待进一步研究; 3. 异荛草苷; 4. 异牡荛苷。

图3 菝葜 HPLC 指纹图谱

4.2 特征峰的标定

根据13批菝葜的指纹图谱检测结果,共标定5个特征峰。经过与对照品比对,可知3号峰为异荛草苷,4号峰为异牡荛苷。

4.3 方法学考察

4.3.1 精密度试验

精密吸取同一菝葜供试品溶液(样品1)10 μL ,按上述色谱条件,连续进样测定6次,记

录色谱图。以异牡荆苷为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积，结果各特征峰的相对保留时间的RSD<1%，单峰面积占总峰面积大于2%的特征峰的相对峰面积RSD<2%，采用科迈恩（北京）科技有限公司Chempattern化学计量学软件进行评价，相似度（夹角余弦法，下同）为0.99，结果表明仪器精密度良好。

4.3.2 稳定性试验

精密吸取同一蒜薹供试品溶液（样品1）10 μL，分别于溶液配制后0、2、4、6、8、12、24 h，按上述色谱条件进样测定，记录色谱图。以异牡荆苷为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积，结果各特征峰的相对保留时间的RSD<1%，单峰面积占总峰面积大于2%的特征峰的相对峰面积RSD<2%，采用Chempattern化学计量学软件进行评价，相似度为0.99，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

4.3.3 重复性试验

取同一批蒜薹样品粉末（样品1）6份，精密称定，按“2.2”节方法分别制备供试品溶液，精密吸取供试品溶液10 μL，进样测定，记录色谱图。以异牡荆苷为参照峰，计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积，结果各特征峰的相对保留时间的RSD<1%，单峰面积占总峰面积大于2%的特征峰的相对峰面积RSD<2%，采用Chempattern化学

计量学软件进行评价，相似度为0.99，结果表明，该方法重复性好。

4.4 相似度评价

以样品1为参照图谱，生成蒜薹药材的指纹图谱，13批蒜薹药材与指纹图谱的相似度见图4，相似度分别为1.000、0.999、0.975、0.974、0.862、0.862、0.932、0.932、0.837、0.838、0.938、0.938和0.989，结果表明相似度较好。

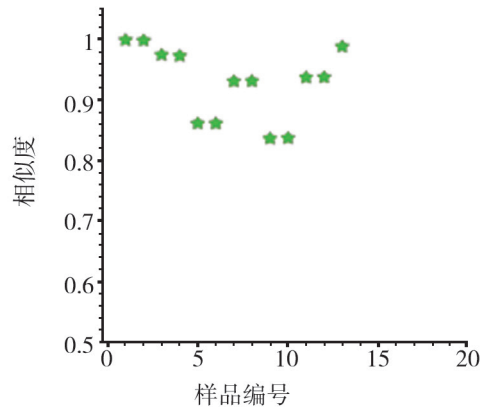
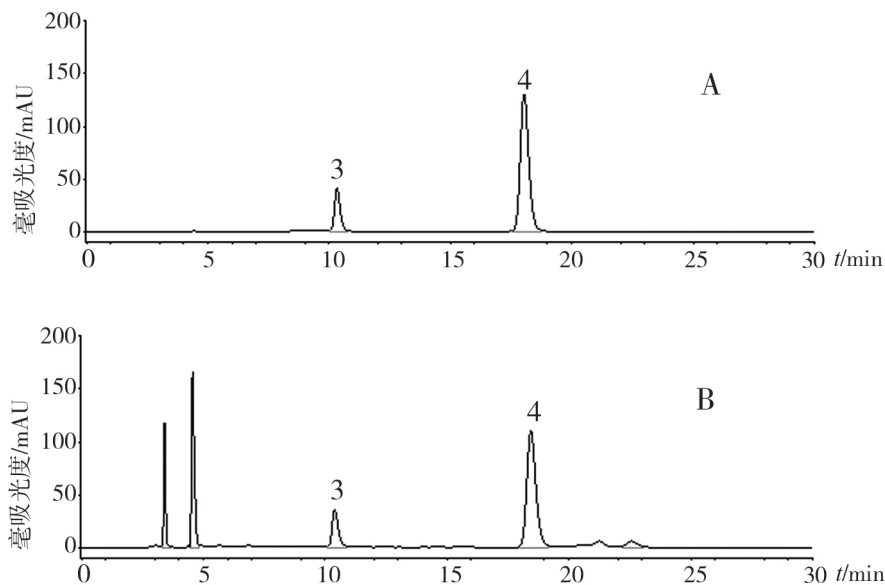


图4 蒜薹药材相似度计算结果

5 蒜薹中异荭草苷和异牡荆苷的含量测定

5.1 系统适用性试验

按“3”项下色谱条件进行检测，以异牡荆苷峰计算理论塔板数大于6000，分离度大于1.5。对照品及样品的色谱图见图5。



A. 对照品混合溶液；B. 供试品溶液；3. 异荭草苷；4. 异牡荆苷。

图5 蒜薹 HPLC 含量测定色谱图

5.2 线性关系考察

精密吸取各对照品储备液0.02、0.1、0.05、0.5、1.0、2.0 mL, 分别置于6个10 mL量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得各系列浓度的混合标准溶液。分别精密吸取各系列浓度的标准溶液及对

照品储备液各10 μL , 注入液相色谱仪, 测定, 以各对照品质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为x轴, 以峰面积为y轴, 进行线性回归, 各对照品回归方程和线性范围见表1。结果表明, 2种成分在一定质量浓度范围以内, 进样量与峰面积线性关系良好。

表1 各被测成分的标准曲线方程、线性范围和相关系数

成分	回归方程	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相关系数 (r)
异荛草苷	$y=1.634 \times 10^5x+6212$	2.030~203.0	0.9999
异牡荆苷	$y=1.567 \times 10^5x-1462$	1.975~197.5	0.9999

5.3 检测限与定量限测定

取“2.1”节混合对照品溶液用甲醇逐级稀释后进样测定, 以色谱图中信噪比3:1为检测限, 信噪比10:1为定量限。结果表明, 异荛草苷和异牡荆苷的检测限分别为0.8和1.1 ng; 定量限分别为2.1和2.8 ng。

5.4 精密度试验

精密吸取“2.1”节对照品混合溶液10 μL , 连续进样6次, 记录峰面积。结果异荛草苷和异牡荆苷峰面积的RSD分别为0.29%和0.25% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

5.5 重复性试验

取样品粉末(样品1)6份, 分别按照“2.2”节方法制备供试品溶液, 按“3”项下色谱条件测定, 记录峰面积, 计算含量。结果供试品溶液的异荛草苷和异牡荆苷平均含量分别为0.023%和

0.090%, RSD分别为1.57%和1.95%, 结果表明重复性良好。

5.6 溶液稳定性试验

取同一份供试品溶液(样品1), 分别于配制后0、2、4、8、12、24 h进样测定。结果异荛草苷和异牡荆苷峰面积的RSD ($n=6$) 分别为0.72%和0.52%, 结果表明供试品溶液在24 h内稳定。

5.7 加样回收率试验

分别取异荛草苷和异牡荆苷适量, 精密称定, 置量瓶中, 加甲醇溶解配制成质量浓度分别为0.1089、0.4448 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。取已知含量的供试品粉末(样品1)6份, 每份各约0.5 g, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 精密加入上述2种对照品溶液各1.0 mL, 按照“2.2”节方法平行制备供试品溶液, 进样分析, 计算回收率, 结果见表2~表3, 表明该方法加样回收试验结果良好。

表2 异荛草苷加样回收率试验结果 ($n=6$)

称样量/g	样品中的量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.5023	0.1155	0.1089	0.2259	101.35		
0.5015	0.1153	0.1089	0.2218	97.75		
0.5034	0.1158	0.1089	0.2205	96.16	98.02	2.23
0.4986	0.1147	0.1089	0.2206	97.27		
0.5006	0.1151	0.1089	0.2239	99.87		
0.5045	0.1160	0.1089	0.2203	95.74		

表3 异牡荆苷加样回收率试验结果 (n=6)

称样量 /g	样品中的量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
0.5023	0.4521	0.4448	0.8916	98.82		
0.5015	0.4514	0.4448	0.8856	97.63		
0.5034	0.4531	0.4448	0.8825	96.55	97.77	1.80
0.4986	0.4487	0.4448	0.8758	96.01		
0.5006	0.4505	0.4448	0.8814	96.87		
0.5045	0.4541	0.4448	0.9023	100.78		

5.8 含量测定

每批样品取2份,分别按“2.2”节方法制备供试品溶液。精密吸取各供试品溶液10 μL,按“3”

项下色谱条件进行测定,13批蒜薹样品中异荭草苷和异牡荆苷的含量结果见表4。

表4 13批蒜薹中异荭草苷和异牡荆苷含量测定结果 (n=2)

批次	异荭草苷含量 /%	异牡荆苷含量 /%	异牡荆苷 + 异荭草苷 /%	异牡荆苷 / 异荭草苷
1	0.023	0.090	0.113	4.0
2	0.075	0.151	0.227	2.0
3	0.029	0.163	0.193	5.6
4	0.040	0.223	0.263	5.6
5	0.036	0.143	0.179	4.0
6	0.015	0.034	0.050	2.3
7	0.034	0.192	0.227	5.6
8	0.094	0.323	0.418	3.4
9	0.020	0.067	0.087	3.4
10	0.029	0.084	0.114	2.9
11	0.090	0.189	0.279	2.1
12	0.036	0.176	0.213	4.8
13	0.029	0.162	0.191	5.6
平均	0.042	0.152	0.195	3.9

6 讨论

6.1 色谱条件的选择

本研究采用等度洗脱色谱法分离菝葜药材中2种主要黄酮碳苷类成分, 30 min内完成分离, 异荭草苷和异牡荆苷分离效果良好, 符合含量测定要求。本研究通过二极管阵列检测器考察所测物质紫外吸收, 2种待测成分具有相同的结构母核, 主要是取代基不同, 紫外最大吸收均在350 nm, 因此, 选择350 nm为检测波长。

6.2 指纹图谱分析

13批菝葜均含有5个特征峰, 通过对照品比对法, 标定了2种黄酮碳苷类成分, 各批次之间HPLC图谱与指纹图谱之间的相似度较好, 可用于菝葜的质量控制。

6.3 含量测定

从表4异荭草苷和异牡荆苷测定结果来看, 异荭草苷含量在0.015%~0.094%, 平均为0.042%; 异牡荆苷含量在0.034%~0.323%, 平均为0.152%; 二者总含量在0.050%~0.418%, 平均为0.195%。异牡荆苷含量均高于异荭草苷含量, 二者比值在2.0~5.6倍, 平均为3.9倍, 该比值具有一定的鉴别意义。

该方法简单方便、准确性高, 建议可作为药典含量测定方法。异荭草苷和异牡荆苷二者含量之和作为测定限度较为合理, 并可确定异荭草苷和异牡荆苷含量之和不低于0.10%作为指标。按此限度, 测定的13批样品, 第6和9批次含量较低, 低于限度, 其余11批符合限度要求。

6.4 小结

本试验在同一色谱条件下, 建立了菝葜药材的指纹图谱, 并同时测定13批药材中异荭草苷和异牡荆苷的含量, 方法简便、快速、准确, 具备了定性和定量双重作用, 为有效控制菝葜的质量提供了科学依据。

参考文献:

[1] 中国药典: 一部[S]. 2015: 308.

- [2] 青海省藏医药研究所, 青海省药品检验所. 中国藏药[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 337-341.
- [3] 中国药品生物制品检定所, 云南省药品检验所, 内蒙古自治区药品检验所, 等. 中国民族药志: 第二卷[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 465-469.
- [4] 中国药典: 一部[S]. 1977: 524-525.
- [5] 河南省卫生厅. 河南省中药材标准[S]. 郑州: 中原农民出版社, 1991: 82-83.
- [6] 河南省食品药品监督管理局. 河南省中药饮片炮制规范[S]. 郑州: 河南人民出版社, 2005: 322-323.
- [7] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准[S]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2009: 307.
- [8] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准: 第二卷[S]. 2011: 257-258.
- [9] 国家药典委员会. 卫生部药品标准藏药第一册[S]. 1995: 90.
- [10] 潘正, 高运玲, 刘毅, 等. 菝葜的化学成分研究[J]. 中成药, 2013, 35(5): 995-997.
- [11] 丁建海, 张俊芳. 菝葜的化学成分及药理作用研究[J]. 宁夏师范学院学报: 自然科学, 2014, 35(3): 78-81.
- [12] 于金英, 王云红, 刘国强, 等. HPLC-ESI-MS/MS分析鉴定菝葜中黄酮类成分[J]. 中成药, 2015, 37(3): 556-561.
- [13] 陈玉, 周旻, 伍丽萍, 等. HPLC测定菝葜子中的黑芥子苷[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(1): 94-95.
- [14] 庞赛, 王立升, 史新, 等. 菝葜药材中异牡荆苷的分离鉴定及指纹图谱研究[J]. 广东农业科学, 2012, (1): 105-107.
- [15] 朱秀珍, 史文伟, 龚翠莹, 等. 异荭草苷体内外抗呼吸道合胞病毒活性研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2015, 36(5): 352-359.
- [16] 闫冲, 林励, 刘红菊, 等. HPLC研究异牡荆苷在大鼠体内的药代动力学及组织分布[J]. 中国药学: 英文版, 2011, 20(4): 376-382.

(收稿日期 2016年12月8日 编辑 王雅雯)