

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)05-0083-04

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.05.020



## 高效液相色谱法测定藏药亚吉玛(肉质金腰)中金腰乙素含量\*

郭丽萍<sup>1</sup>, 次旦多吉<sup>1</sup>, 任刚<sup>2</sup>, 邱毅<sup>1</sup>, 尼珍<sup>1△</sup>

(1. 西藏自治区食品药品检验研究院·国家药品监督管理局中药<藏药>质量控制重点实验室·西藏自治区藏药标准化研究重点实验室, 西藏拉萨 850000; 2. 江西中医药大学·中药资源与民族药研究中心, 江西南昌 330004)

**摘要:**目的 建立测定藏药亚吉玛(肉质金腰)中金腰乙素含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Inertsustain C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸溶液(40:60, V/V), 流速为 1.2 mL/min, 检测波长为 350 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。结果 金腰乙素的进样量在 0.04~5 μg 范围内与峰面积线性关系良好( $R^2=0.999\ 0$ ,  $n=8$ ); 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0% ( $n=6$ ); 平均加样回收率为 95.39%, RSD 为 1.64% ( $n=6$ )。样品中金腰乙素含量为 0.132 3%~0.612 7% ( $n=3$ )。结论 所建立的方法结果准确, 精密性、重复性及耐用性均良好, 可用于肉质金腰中金腰乙素的含量测定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 肉质金腰; 金腰乙素; 含量测定

### Content Determination of Chrysosplenetin in Tibetan Medicine Yajima (*Chrysosplenium Carnosum*) by HPLC

GUO Liping<sup>1</sup>, CIDANDUOJI<sup>1</sup>, REN Gang<sup>2</sup>, QIU Yi<sup>1</sup>, NIZHEN<sup>1</sup>

(1. Xizang Institutes for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine <Tibetan Medicine> · Xizang Key Laboratory of Standardization Research in Tibetan Medicine, Lhasa, Xizang, China 850000; 2. Jiangxi University of Chinese Medicine · Research Center of Natural Resources of Chinese Medicinal Materials and Ethnic Medicine, Nanchang, Jiangxi, China 330004)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of chrysosplenetin in Tibetan medicine Yajima (*Chrysosplenium carnosum*). **Methods** The chromatographic column was Inertsustain C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (40:60, V/V), the flow rate was 1.2 mL/min, the detection wavelength was 350 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of chrysosplenetin was 0.04-5 μg ( $R^2=0.999\ 0$ ,  $n=8$ ). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0% ( $n=6$ ). The average recovery of chrysosplenetin was 95.39% with an RSD of 1.64% ( $n=6$ ). The content of chrysosplenetin in samples was in the range of 0.132 3%-0.612 7% ( $n=3$ ). **Conclusion** The established method is accurate, with good precision, repeatability, and durability, which can be used for the content determination of chrysosplenetin in *Chrysosplenium carnosum*.

**Key words:** HPLC; *Chrysosplenium carnosum*; chrysosplenetin; content determination

藏药亚吉玛汉译名为金腰草, 为金腰属 *Chrysosplenium* Tourn. ex L. 植物。我国记载金腰属植物有 35 种, 分布于陕西、甘肃、云南、青海、四川、西藏等地区<sup>[1]</sup>。肉质金腰 *Chrysosplenium carnosum* Hook. f. et Thoms. 分布于四川西部和西藏东部, 生长于海拔 4 400~4 700 m 的高山灌丛草甸和石隙<sup>[2]</sup>。《晶珠本草》记载, 亚吉玛味苦, 性凉, 清胆热, 祛胆病, 用于治疗胆病引起的发烧头痛、胆囊疾患、急性黄疸型肝炎、急性肝坏死等症, 为藏药中常用上品<sup>[3]</sup>, 是泻胆热病之主药。课题组曾多次对藏区的金腰属植物资源进行调查, 走访藏药材流通规模较大的药材市场, 对亚吉玛药材进行市场调查, 发现亚吉玛的主流品种为肉质金腰和长梗金腰。黄酮醇类衍生物为金腰属植物的主要成分, 黄酮醇属酚类化合物,

结构复杂, 在自然界广泛存在, 能提高人体免疫力, 具有抗氧化、抗肿瘤等多种药理学作用<sup>[4-9]</sup>, 且对肝损伤有较好的改善作用<sup>[10-11]</sup>。前期研究对肉质金腰中的主要化学成分进行了分离, 获得了含量较高的高度氧化的黄酮醇化合物, 经核磁共振波谱技术鉴定为金腰乙素<sup>[12]</sup>, 可用作含量测定指标。目前, 未见肉质金腰相关研究报道, 且现行亚吉玛的质量标准仅有性状和鉴别项, 不能有效控制其质量。故本研究建立了测定肉质金腰中金腰乙素含量的高效液相色谱法。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

伍丰 EX-1600 型高效液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司), 配有自动进样器; BT124S 型电子天平

\*基金项目: 国家药典委员会国家药品标准提高研究项目[411]。

第一作者: 郭丽萍, 女, 大学本科, 药师, 研究方向为中药藏药质量控制, (电子信箱)530424857@qq.com。

△通信作者: 尼珍, 女, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为食品、药品质量控制与评价, (电子信箱)nizhen1221@163.com。

(赛多利斯<上海>贸易有限公司,精度为十万分之一);SB-5200DTD型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率为250 W,频率为40 kHz);DE-100g型万能粉碎机(浙江红景天工贸有限公司)。

1.2 试药

金腰乙素对照品(上海鸿永生物科技有限公司,批号为100173-202210,纯度为98.08%);乙腈(色谱纯,美国Tedia公司);磷酸、丙酮、乙醇(分析纯,西陇化工股份有限公司);水为超纯水;肉质金腰药材(编号为S1-S28,样品信息见表1),经江西中医药大学慕泽涇副教授鉴定为正品。

表1 肉质金腰药材样品信息  
Tab.1 Information of *Chrysosplenium carnosum* samples

| 编号  | 批号              | 来源            |
|-----|-----------------|---------------|
| S1  | XZ2021513YC     | 西藏亚朗藏药材销售有限公司 |
| S2  | XZ2020051YC     | 西藏亚朗藏药材销售有限公司 |
| S3  | QH2019011YC     | 青海藏翰阁商贸有限公司   |
| S4  | QH20201114YC    | 青海藏翰阁商贸有限公司   |
| S5  | QH2020712YC     | 青海藏翰阁商贸有限公司   |
| S6  | QH2021118YC     | 青海藏翰阁商贸有限公司   |
| S7  | QH20201120YC    | 青海西宁卓玛药材公司    |
| S8  | XZ2020613YC     | 西藏日喀则市江孜县     |
| S9  | QH2021323YC     | 青海西宁卓玛药材公司    |
| S10 | QH20210520YC    | 青海西宁卓玛药材公司    |
| S11 | QH2021519YC     | 青海西宁卓玛药材公司    |
| S12 | HHC1            | 成都荷花池药材市场     |
| S13 | HHC2            | 成都荷花池药材市场     |
| S14 | HHC3            | 成都荷花池药材市场     |
| S15 | SNB200900100931 | 西藏山南市         |
| S16 | B200900100930   | 雄巴拉曲神水藏药厂     |
| S17 | B200900100936   | 西藏林芝市朗县       |
| S18 | SN20203397      | 西藏山南市错那县      |
| S19 | 20203398        | 西藏日喀则市南林木县    |
| S20 | 20203401        | 西藏日喀则市江孜县     |
| S21 | SN20203395      | 西藏山南市错那县      |
| S22 | B201115374      | 西藏日喀则市江孜县     |
| S23 | SN20203393      | 西藏山南市措美县      |
| S24 | SN20203394      | 西藏山南市错那县医院    |
| S25 | 20203399        | 西藏日喀则市        |
| S26 | 20203400        | 西藏日喀则市南林木县    |
| S27 | 20203396        | 西藏山南市陈区索诛乡    |
| S28 | B200900100932   | 西藏日喀则市江孜县     |

2 方法与结果

2.1 色谱条件

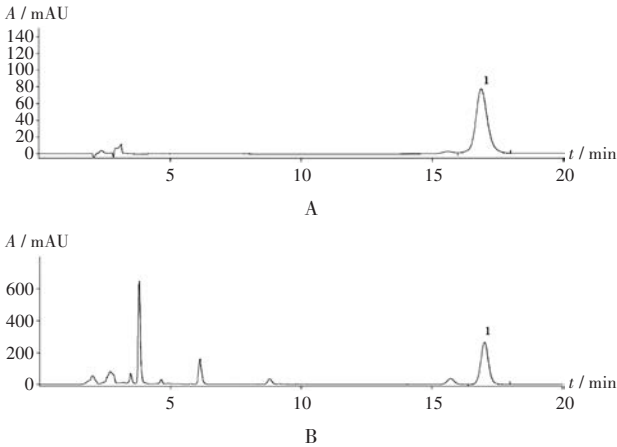
色谱柱:Inertsustain C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸溶液(40:60,V/V);流速:1.2 mL/min;检测波长:350 nm;柱温:35℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取金腰乙素对照品适量,精密称定,加丙酮溶解,摇匀,制得每1 mL含1.0 mg的对照品贮备液;取适量,依次稀释2,4,8,16,32,64,128,256倍,即得对照品溶液。取样品粉末(过3号筛)0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇25 mL,称定质量,超声处理(功率为250 W,频率为40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用50%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下对照品溶液和供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有色谱峰出现。色谱图见图1。



1. 金腰乙素  
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液  
图1 高效液相色谱图  
1. Chrysosplenetin  
A. Reference solution B. Test solution

Fig.1 HPLC chromatograms

线性关系考察:取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件进样测定,以进样量(X,μg)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1\,899.4\,X + 5.323\,4$ ( $R^2 = 0.999\,0$ , $n = 8$ )。结果表明,金腰乙素的进样量在0.04~5 μg范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取2.2项下对照品溶液10 μL,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果金腰乙素峰面积的RSD为0.40%( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取2.2项下供试品溶液10 μL,分别于配制后0,2,4,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果金腰乙素峰面积的RSD为1.48%( $n = 6$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取同一批肉质金腰药材(编号为S1)粉末(过3号筛)6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,

按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以标准曲线法计算含量。结果金腰乙素含量的 $RSD$ 为1.53%( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

耐用性试验:取同一批肉质金腰药材(编号为S1)粉末(过3号筛),按2.2项下方法制备供试品溶液,以2.1项下色谱条件为基础,分别改变进样量(10,15,20  $\mu\text{L}$ ),流速(0.8,1.0,1.2  $\text{mL}/\text{min}$ ),柱温(25,30,35  $^{\circ}\text{C}$ ),色谱柱品牌(MYC, Shimadzu, Sepax),进样测定。结果金腰乙素含量的 $RSD$ 分别为0.28%, 3.07%, 2.15%, 0.83% ( $n=3$ ),表明方法耐用性良好。

加样回收试验:取已知金腰乙素含量的同一批肉质金腰药材(编号为S7)粉末(过3号筛)6份,各0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别加入金腰乙素对照品贮备液(质量浓度为1.0  $\text{mg}/\text{mL}$ )1.4  $\text{mL}$ ,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表2。

表2 金腰乙素加样回收试验结果( $n=6$ )

| Tab. 2 Results of the recovery test of chrysosplenetin ( $n=6$ ) |          |         |         |        |               |           |
|------------------------------------------------------------------|----------|---------|---------|--------|---------------|-----------|
| 取样量(g)                                                           | 样品含量(mg) | 加入量(mg) | 测得量(mg) | 回收率(%) | $\bar{X}$ (%) | $RSD$ (%) |
| 0.250 1                                                          | 1.400 1  | 1.400 0 | 2.716 4 | 94.02  | 95.39         | 1.64      |
| 0.250 2                                                          | 1.400 6  | 1.400 0 | 2.705 5 | 93.21  |               |           |
| 0.250 0                                                          | 1.399 5  | 1.400 0 | 2.739 7 | 95.73  |               |           |
| 0.250 2                                                          | 1.400 6  | 1.400 0 | 2.760 2 | 97.11  |               |           |
| 0.250 3                                                          | 1.401 2  | 1.400 0 | 2.758 9 | 96.98  |               |           |
| 0.250 2                                                          | 1.400 6  | 1.400 0 | 2.735 0 | 95.31  |               |           |

2.4 样品含量测定

分别取28批(编号为S1-S28)肉质金腰药材粉末(过3号筛)适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,以标准曲线法计算金腰乙素含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 基原考证

传统藏医药中对植物的分类与现代植物学分类不同,造成藏医药用植物基原确定困难或多基原问题。《宇妥本草》中记载:“金腰子生长在石山雪线附近,叶面上有金色网纹,花为五宝装饰很美丽。味苦,性凉,为泻胆热之药。”<sup>[13]</sup>金腰子分为5种花色,花绿色者称为后金腰子,花黄色者称为金金腰子,花白色者称为银金腰子,花红色者称为铜金腰子,花蓝色者称为铁金腰子<sup>[14]</sup>,这与《中国植物志(第八卷)》中对金腰属植物的分类表述<sup>[2]</sup>不一致。《藏药标准》规定,亚吉玛的基原为虎耳草科植物裸茎金腰子 *Chrysosplenium nudicaule* Bunge.、山溪金腰子 *Chrysosplenium nudicaule* D. Don.、肾叶金腰子 *Chrysosplenium nudicaule griffithii* Hook. et Thoms. 的干燥全草<sup>[15]</sup>。现行藏药标准《中华人民共和国

表3 样品中金腰乙素含量测定结果(%, $n=3$ )

Tab. 3 Results of the content determination of chrysosplenetin in samples (%, $n=3$ )

| 编号  | 含量       | $RSD$ | 编号  | 含量       | $RSD$ | 编号  | 含量      | $RSD$ |
|-----|----------|-------|-----|----------|-------|-----|---------|-------|
| S1  | 0.803 4* | 1.17  | S11 | 0.304 4  | 1.30  | S21 | 0.446 2 | 1.71  |
| S2  | 0.612 7  | 1.50  | S12 | 0.503 3  | 1.21  | S22 | 0.449 5 | 0.23  |
| S3  | 0.402 8  | 1.27  | S13 | 0.555 7  | 0.80  | S23 | 0.507 9 | 0.71  |
| S4  | 0.189 3  | 1.47  | S14 | 0.433 3  | 0.99  | S24 | 0.440 2 | 1.38  |
| S5  | 0.538 6  | 0.72  | S15 | 0.501 8  | 0.33  | S25 | 0.330 6 | 0.84  |
| S6  | 0.520 3  | 1.87  | S16 | 0.411 9  | 1.64  | S26 | 0.486 1 | 0.69  |
| S7  | 0.559 8  | 0.07  | S17 | 0.193 9  | 0.63  | S27 | 0.554 1 | 0.80  |
| S8  | 0.183 1  | 1.79  | S18 | 0.482 0  | 0.67  | S28 | 0.132 3 | 1.13  |
| S9  | 0.535 7  | 0.12  | S19 | 0.800 9* | 0.34  |     |         |       |
| S10 | 0.495 5  | 1.12  | S20 | 0.235 2  | 1.92  |     |         |       |

注:\*指该批次样品含量较其他批次高,制订含量限度标准时作为离群值舍去。

Note:\* indicates that the content of chrysosplenetin in this batch of samples is higher than that of other batches of samples, so it is rounded off as an outlier when formulating the content limit standard.

国卫生部药品标准·藏药(第一册)》规定,亚吉玛的基原为虎耳草科植物裸茎金腰 *Chrysosplenium nudicaule* Bunge. 及同属数种植物的干燥全草<sup>[16]</sup>。前期调查发现,裸茎金腰的野生资源较少,且生物量较小,藏医医疗机构多使用肉质金腰和长梗金腰。故本研究中选择肉质金腰为研究对象。

3.2 供试品提取方法选择

分别考察不同提取溶剂(95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇及30%乙醇),结果50%乙醇的提取效率最高,且稳定性好,故选择50%乙醇为提取溶剂。分别考察不同提取方式(85  $^{\circ}\text{C}$ 水浴回流提取30 min,超声提取30,45,60 min),结果超声提取30 min的提取效率较高,影响因素较少,故选择超声提取30 min。

3.3 色谱条件选择

分别考察不同流动相系统(乙腈-0.2%甲酸、甲醇-0.2%磷酸、乙腈-0.2%磷酸)和不同流速(0.8,1.0,1.2  $\text{mL}/\text{min}$ )对提取效果的影响,结果流动相为乙腈-0.2%磷酸(40:60,  $V/V$ ),流速为1.2  $\text{mL}/\text{min}$ 时金腰乙素的色谱峰峰形最好,拖尾因子最小,故选择2.1项下色谱条件。

3.4 方法评价

本研究中的方法结果准确,精密度、重复性及耐用性均良好,可用于肉质金腰中金腰乙素的含量测定。

参考文献

[1] 万青,涂楚月,熊惠,等.一测多评法测定藏药金腰草中4种黄酮类化学成分的含量[J].药物分析杂志,2016,36(6):1053-1058.