糙叶败酱药材中异白花败酱醇的定性定量分析

姚振宇[1,2*],石晓峰[2#],刘东彦[2],马趣环[2](1.兰州理工大学生命科学与工程学院,兰州 730050;2.甘肃省医学科学研究院,兰州 730050)

中图分类号 R284.1;R927.2 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408(2012)07-0644-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2012.07.25

摘 要 目的:建立糙叶败酱药材中异白花败酱醇的定性和定量分析方法。方法:采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别糙叶败酱药材中的异白花败酱醇;采用反相高效液相色谱法测定其含量,色谱柱为Agilent Eclipse plus C_{18}(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-磷酸水溶液(pH2.5)=7∶93,流速为1.0 mL·min^{-1},检测波长为210 nm,柱温为30 ℃。结果:糙叶败酱药材中异白花败酱醇的TLC鉴别特征明显,专属性好;异白花败酱醇的进样浓度在0.2~1.2 mg·mL^{-1}范围内与峰面积积分值呈良好线性关系(r=0.999 7),平均加样回收率为98.8%,RSD=2.84%(n=9)。结论:所建分析方法准确、可靠,可用于糙叶败酱的质量控制。

关键词 糙叶败酱;异白花败酱醇;薄层色谱法;高效液相色谱法

Qualitative and Quantitative Analysis of Isovillosol in *Patrinia scabra*

YAO Zhen-yu(School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)
YAO Zhen-yu, SHI Xiao-feng, LIU Dong-yan, MA Qu-huan(Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for qualitative and quantitative analysis of isovillosol in *Patrinia scabra*. METHODS: Isovillsol in *Patrinia scabra* was identified by TLC. The content of isovillosol was determined by RP-HPLC. The determination was performed on Agilent Eclipse plus C_{18}(250 mm×4.6 mm, 5 μm)column with mobile phase consisted of acetonitrile-phosphoric acid solution (pH=2.5, 7∶93) at the flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The detection wavelength was set at 210 nm and column temperature was 30 ℃. RESULTS: Isovillosol has an obvious character in the result of TLC. There was a good linear relationship in the range of 0.2~1.2 mg·mL^{-1}(r=0.999 7). The average recoveries were 98.8%(RSD=2.84%, n=9). CONCLUSION: The established method is accurate and reliable. It is suitable for the quality control of *P. scabra*.

KEY WORDS *Patrinia scabra*; Isovillosol; TLC; HPLC

糙叶败酱*Patrinia scabra* Bunge为败酱科败酱属植物,主要分布于河北、山西和甘肃等地,药用其根茎及全草,常与其同属植物异叶败酱*P. heterophylla* Bge.混用,因其治疗崩中带下疗效显著,有“起死回生之功效”,故又得名“墓头回”。糙叶败酱具有清热解毒、祛瘀排脓、活血化瘀、镇静安神等功效,民间用其治疗伤寒、温症、跌打损伤、妇女崩中、赤白带下等证[1]。近年来,国内对糙叶败酱的药理作用进行了较广泛的研究,发现其具有抑菌、抗肿瘤、止血、免疫调节及镇静等多方面的药理作用[2]。其化学成分主要有挥发油、环烯醚萜及其苷类、苯丙素类和黄酮类化合物等[3]。文献报道[4,5],糙叶败酱环烯醚萜苷元和总环烯醚萜苷元具有较好的抗癌作用和免疫调节功能,有进一步开发研究价值。为此,笔者分别采用薄层色谱(TLC)法和反相高效液相色谱(RP-HPLC)法对糙叶败酱中环烯醚萜类成分异白花败酱醇(Isovillosol)进行了定性和定量分析。

1 仪器与试药

1100 HPLC仪,含四元梯度泵、可变波长扫描紫外检测器、1100化学工作站、标准手动进样器(美国Agilent公司);AE-260分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);R-200旋转蒸发器(瑞士Büchi公司)。

糙叶败酱的根及根茎于2006年采自甘肃兰州市兴隆山区,由甘肃省医学科学研究院石长栓研究员鉴定为真品,标本存放于甘肃省医学科学研究院标本室;异白花败酱醇标准品(笔者自制,由HPLC归一化法测得纯度>98%,并应用各种现代波谱技术(X-ray、IR、ESI-MS、^{1}H-NMR、^{13}C-NMR、DEPT)对其化学结构进行了化学表征);GF_{254}薄层硅胶板(石嘴山市同创化工有限公司);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 药材的脱脂处理

称取粉碎过筛(40目)的糙叶败酱药材粉末5.0 g,共3批,分别加入15倍量石油醚回流提取2次(2、1 h),过滤,药渣于50 ℃干燥至恒重,备用。

2.2 定性鉴别

称取脱脂药材粉末1 g,加甲醇10 mL,加热回流提取2 h,放冷,过滤,滤液作为供试品溶液。另取异白花败酱醇标准品,加甲醇制成每1 mL含1 mg的溶液,作为标准品溶液。照TLC法[6]试验,分别吸取上述2种溶液各1 μL,点于同一硅胶GF_{254}薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(4∶3∶1)为展开剂,

* 硕士研究生。研究方向:药物分析与植物化学。E-mail:yzhy20027@yahoo.com.cn
# 通讯作者:主任药师,教授,硕士研究生导师。研究方向:天然药物化学及中药制剂。电话:0931-2614521-6039。E-mail:shixiaofeng2005@sina.com

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

展开，取出，晾干，喷以10%硫酸乙醇试液，105 ℃加热至斑点显色清晰。结果，供试品色谱中，在与标准品色谱相应位置上显紫红色的斑点。糙叶败酱脱脂药材的TLC见图1。

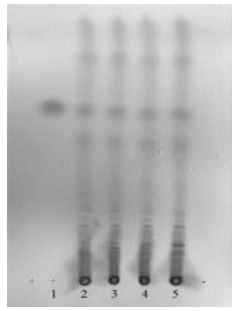

图1　糙叶败酱脱脂药材的TLC

1.异白花败酱醇标准品；2～5.供试品

Fig 1　TLC of defatted *P. scabra*

1.isovillosol standard substancl；2～5. test samples

2.3　含量测定

2.3.1　色谱条件　色谱柱：Agilent Eclipse plus C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈-磷酸水溶液（pH2.5）＝7∶93；柱温：30 ℃；流速：1.0 mL·min^{-1}；检测波长：210 nm。

2.3.2　供试品溶液的制备　精密称取0.5 g脱脂药材，加入25 mL甲醇，称重，回流提取2 h，用甲醇补充失重，过滤，取滤液10 mL，蒸干，用流动相充分溶解并定容于10 mL容量瓶中，经0.45 μm滤膜过滤，取续滤液作为供试品溶液。

2.3.3　标准品贮备液的制备　精密称取异白花败酱醇标准品10 mg，用流动相溶解并定容于5 mL容量瓶中，配制成浓度为2 mg·mL^{-1}的标准品贮备液，即得。

2.3.4　系统适用性试验　分别精密吸取浓度为0.4 mg·mL^{-1}的标准品溶液和“2.3.2”项下供试品溶液各20 μL，按“2.3.1”项下色谱条件测定。结果，标准品与供试品中异白花败酱醇的保留时间均为8.4 min，与其相邻色谱峰的分离度R＞1.5。理论板数以异白花败酱醇峰计算应不低于5 000。色谱见图2。

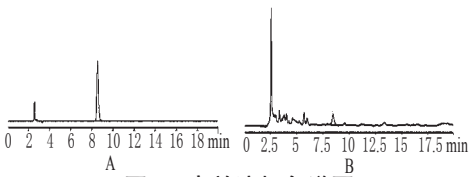

图2　高效液相色谱图

A.异白花败酱醇标准品；B. 供试品

Fig 2　HPLC chromatograms

A. isovillosol standard substance；B. test sample

2.3.5　线性关系考察　分别精密吸取上述标准品贮备液100、200、300、400、500、600 μL，置于1 mL容量瓶中，用流动相定容，配成浓度分别为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg·mL^{-1}的系列标准品溶液，按上述色谱条件分别进样20 μL。以对照品浓度（X，mg·mL^{-1}）为横坐标，峰面积积分值（Y）为纵坐标，进行线性回归，得回归方程为Y＝0.573 8X－0.640 2（r＝0.999 7，n＝6）。结果表明，异白花败酱醇的进样浓度在0.2～1.2 mg·mL^{-1}范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

2.3.6　精密度试验　精密吸取0.6 mg·mL^{-1}的标准品溶液20 μL，连续进样6次，测定异白花败酱醇的峰面积。结果，RSD＝0.67%（n＝6），表明仪器精密度良好。

2.3.7　稳定性试验　取“2.3.2”项下供试品溶液，室温下放置0、2、4、6、8、12、24 h后分别进样20 μL，测定异白花败酱醇的峰面积。结果，RSD＝1.97%（n＝7），表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.3.8　重复性试验　取同一批样品粉末适量，按“2.3.2”项下方法平行制备6份供试品溶液，分别进样20 μL，测定。结果，样品中异白花败酱醇的平均含量为19.2 mg，RSD＝1.55%（n＝6），表明该方法重复性良好。

2.3.9　加样回收率试验　精密称定9份脱脂糙叶败酱药材各0.25 g，分别加入异白花败酱醇标准品适量，按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，分别进样20 μL，按上述色谱条件测定含量，计算加样回收率，结果见表1。

表1　加样回收率试验结果（n＝9）

Tab 1　Result of recovery test（n＝9）

编号	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	$\bar{x}$/%	RSD/%
1	0.249 7	9.59	12.0	21.7	100.9		
2	0.250 2	9.61	12.0	21.2	96.6		
3	0.249 8	9.59	12.0	21.3	97.6		
4	0.249 8	9.59	10.0	19.4	98.1		
5	0.250 5	9.62	10.0	19.5	98.8	98.8	2.84
6	0.249 9	9.60	10.0	19.2	96.0		
7	0.249 6	9.58	8.0	18.0	105.3		
8	0.250 3	9.61	8.0	17.4	97.4		
9	0.250 1	9.60	8.0	17.5	98.8		

2.3.10　样品含量测定　精密称取3批脱脂糙叶败酱药材各0.5 g，分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，照上述色谱条件测定样品中异白花败酱醇的含量，结果见表2。

表2　样品中异白花败酱醇含量测定结果（n＝3）

Tab 2　Results of content determination of isovillosol in samples（n＝3）

编号	含量/mg	$\bar{x}$/mg	RSD/%
1	18.7		
2	19.3	18.8	1.80
3	18.3		

3　讨论

据报道，糙叶败酱环烯醚萜苷元PS-1是抗肿瘤的活性成分之一，可显著抑制人前列腺癌细胞株DU145和PC3的生长[7]。此外，环烯醚萜苷元PS-1、BJ3401可显著抑制小鼠结肠癌细胞株C26的生长，总环烯醚萜苷元可显著减轻荷瘤鼠瘤重，其中高剂量组灌胃总环烯醚萜苷元800 mg·kg^{-1}·d^{-1}，连续给药10 d后抑瘤率可达41.4%；体外细胞试验和荷瘤小鼠实验均表明糙叶败酱中环烯醚萜苷元具有抗结肠癌作用[4]。糙叶败酱中总环烯醚萜苷元能显著提高小鼠胸腺指数和脾指数及伴刀豆球蛋白A（Con A）诱导的脾淋巴细胞增殖，促进小鼠血清溶血素水平，提高小鼠NK细胞活性及腹腔巨噬细胞的吞噬活性，表明糙叶败酱中总环烯醚萜苷元能明显提高小鼠机体的免疫功能[5]。因此，对糙叶败酱中环烯醚萜类化合物进行深入研究具有重要意义。

Kounnu I等[8]曾在糙叶败酱根中分离得到黄花败酱醇（Patriscabrol）和异黄花败酱醇（Isopatriscabrol）；笔者从该植物根中分离得到白花败酱醇（Villosol）和异白花败酱醇（Isovillosol），这些化合物都是同分异构体，且为手性异构体。文献报道[9]白花败酱醇具有一定的抗肿瘤活性，故有必要对其同分异构体进行研究。

在试验中，为了去除杂质峰对目标峰的干扰，笔者曾尝试将药材进行甲醇提取后，依次用石油醚和氯仿萃取，但分离效果不理想。为了提高目标峰的分离效果及柱效，最后确定用石油醚回流脱脂后的药材作为异白花败酱醇的提取材料。

异白花败酱醇在210 nm波长处有最大吸收，因此选择210 nm作为检测波长。试验中分别考察了甲醇-水和乙腈-水流动相系统，以乙腈-水作流动相效果较好。经过反复试验，发现在流动相中加入磷酸能够显著改善分离效果，故考察了乙腈和不同浓度的磷酸水溶液作为流动相对色谱分离的效果，

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

RP-HPLC法测定云香十五味丸中栀子苷的含量

陈晓北*,邹继红(赤峰学院医学院,内蒙古 赤峰 024000)

中图分类号 R283.64;R927.2 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408(2012)07-0646-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2012.07.26

摘 要 目的:建立测定云香十五味丸中栀子苷含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C_{18}(150 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为水-乙腈(85∶15),流速为1 mL·min^{-1},检测波长为238 nm。结果:栀子苷的进样量在0.784~3.920 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系(r=0.999 8);平均加样回收率为99.3%,RSD=1.0%(n=9)。结论:本方法简便、快速、准确,适用于云香十五味丸中栀子苷的质量控制。
关键词 反相高效液相色谱法;云香十五味丸;栀子苷;含量测定

Content Determination of Gardenoside in Yunxiang Shiwu Pills by RP-HPLC

CHEN Xiao-bei,ZOU Ji-hong(Medical College of Chifeng University, Inner Mongolia Chifeng 024000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of gardenoside in Yunxiang shiwu pills. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The separation was performed on Agilent Eclipse XDB-C_{18}(150 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of water-acetonitrile (85∶15) at the flow rate of 1 mL·min^{-1}. The detection wavelength was set at 238 nm. RESULTS: The linear range was 0.784~3.920 μg(r=0.999 8) with an average recovery of 99.3%(RSD=1.0%,n=9). CONCLUSION: The method is simple, quick, accurate, and is suitable for the quality control of gardenoside in Yunxiang shiwu pills.
KEY WORDS RP-HPLC; Yunxiang shiwu pills; Gardenoside; Content determination

云香十五味丸又名嘎日迪-15,是根据蒙医药学配方理论及现代药理研究方法研制而成的传统名方,主治风湿性关节炎、类风湿性关节炎、"巴木"病、游痛症、疮疡、梅毒等,是治疗"协日乌素"病的良药。为了有效控制其质量,笔者参考有关文献[1,2],采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法对云香十五味丸中的栀子苷含量进行测定,操作简单而省时,结果准确、可信,精密度和重复性较好。

1 仪器与试药

1200 HPLC系统(美国安捷伦公司);KQ-250E超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AE240电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);UV-765紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

栀子苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110748-200512);乙腈为色谱纯,甲醇为分析纯,水为娃哈哈纯净水;云香十五味丸(内蒙古库伦蒙药厂,批号:100302、100305、100308);制备阴性样品所需药材由内蒙古赤峰市中蒙医院提供,经赤峰市药品检验所鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C_{18}(150 mm×4.6 mm,5 μm);

最后确定以乙腈-磷酸水溶液(pH2.5)作为流动相,结果较满意。

本试验建立了糙叶败酱药材中异白花败酱醇的定性和定量分析方法,其中TLC鉴别特征明显、专属性好;RP-HPLC法准确、可靠,具有很好的重复性和稳定性。可见,所建方法可作为糙叶败酱药材的质量控制手段之一。

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:567.
[2] 刘 圣,周书明.墓头回研究进展[J].中国中医药信息杂志,1997,4(2):6.
[3] 马趣环,石晓峰,范 彬,等.糙叶败酱化学成分及药理活性研究进展[J].中国药师,2010,13(6):879.
[4] 毛俊琴,李铁军,邱 彦,等.糙叶败酱中环烯醚萜苷元成分抗结肠癌作用的实验研究[J].药学实践杂志,2007,25(1):10.
[5] 储智勇,李铁军,邱 彦,等.糙叶败酱中环烯醚萜苷元对小鼠免疫功能的影响[J].中药材,2008,31(6):882.
[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录34.
[7] 李铁军,邱 彦,芮耀诚,等.糙叶败酱中新的环烯醚萜苷元成分体外抗肿瘤作用研究[J].解放军药学学报,2004,20(2):101.
[8] Kounnu I, Yasuda I, Mizoshiri H, *et al*. Two new iriolactones and their glycoside from the roots of *Patrinia scabra* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(2): 467.
[9] 肖崇厚.中药化学[M].上海:上海科学技术出版社,2001:438.

(收稿日期:2011-09-22 修回日期:2011-12-26)

* 主任药师,副教授,硕士。研究方向:药学的教学与科研。E-mail:cxb04032308@sina.com

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net