

HPLC 法测定不同产地忍冬藤中 4 种环烯醚萜苷

纪瑞锋¹, 刘素香², 刘 毅², 张铁军^{2*}, 陈常青^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定忍冬藤中 4 种环烯醚萜苷的方法。方法 使用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈 (A)-0.05%磷酸水 (B) 梯度洗脱, 0~10 min, 10%~14% A; 10~35 min, 14% A; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 236 nm。柱温 30 ℃。结果 裂环马钱子苷酸、马钱苷、当药苷、secologanoside-7-methyl ester 分别在 0.806 4~32.256 μg、2.136~85.44 μg、0.793 6~31.744 μg、0.782 4~31.296 μg 呈良好线性关系; 回收率分别为 101.27%、98.50%、101.34%、101.36%, RSD 分别为 2.30%、1.54%、2.10%、1.87%; 结论 所建立的方法简便、准确、重复性好, 可用于同时测定忍冬藤中 4 种环烯醚萜苷的量。

关键词: 忍冬藤; 裂环马钱子苷酸; 马钱苷; 当药苷; secologanoside-7-methyl ester

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2013)04-0289-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.04.013

Determination of four iridoid glycosides in *Lonicera Japonicae Caulis* from different habitats

Ji Rui-feng¹, Liu Su-xiang², Liu Yi², Zhang Tie-jun², Chen Chang-qing²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the determination of four iridoid glycosides in *Lonicera Japonicae Caulis*. **Methods** The Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile (A)-0.05% phosphoric acid (B) gradient elution: 0—10 min, 10%—14% A; 10—35 min, 14% A; flow rate of 1.0 mL/min, detection wavelength at 236 nm, column temperature of 30 ℃. **Results** The secologanic acid, loganin, sweroside, and secologanoside-7-methyl ester presented the good linear relationship in 0.806 4—32.256, 2.136—85.44, 0.793 6—31.744, and 0.782 4—31.296 μg, respectively. Recoveries were 101.27%, 98.50%, 101.34%, and 101.36% with RSD values of 2.30%, 1.54%, 2.10%, and 1.87%. **Conclusion** The established method is simple, accurate, and reproducible and could be used for the simultaneous determination of four iridoid glycosides in *Lonicera Japonicae Caulis*.

Key words: *Lonicera Japonicae Caulis*; secologanic acid; loganin; sweroside; secologanoside-7-methyl ester

忍冬藤 (*Lonicera japonicae caulis*) 为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥茎枝, 产于我国大部分地区。忍冬藤为临床常用中药, 具有清热解毒、疏风通络之功效, 用于温病发热、热毒血痢、痈肿疮疡、风湿热痹、关节红肿热痛, 2010 年版《中国药典》将该药材中的绿原酸和马钱苷的含量作为质量控制指标^[1], 但是化学研究表明忍冬藤中除了绿原酸外, 还有黄酮类、皂苷类成分以及包

括马钱苷在内的环烯醚萜类成分^[2-5]。现代药理研究表明, 忍冬藤中的环烯醚萜苷类成分具有较好的抗炎、抗水肿、抗病毒活性^[6], 且有研究表明忍冬藤中的环烯醚萜苷抗水肿活性优于金银花^[7]。

本实验建立了同时测定忍冬藤中 4 种环烯醚萜苷即裂环马钱子苷酸、马钱苷、当药苷、secologanoside-7-methyl ester 的 HPLC 法, 并用建立的分析方法, 分析测定了不同产地不同批次的忍冬

收稿日期: 2013-05-23

基金项目: 天津市自然科学基金 (11zdzcz21000)

*通信作者 张铁军, 研究员。E-mail: zhangtj@tjipr.com
陈常青, 研究员。E-mail: chencq@tjipr.com

藤中4个环烯醚萜苷的量,为忍冬藤类药材的鉴别、质量评价和质量标准制定提供更多参考和依据。

1 仪器与材料

UV6000LP HPLC 高效液相色谱仪-二元梯度泵,自动进样器,DAD检测器和柱温箱(天津兰博实验室仪器设备有限公司);Mettler Toledo AB204—N 电子分析天平(十万分之一);超声清洗仪(奥特宝恩斯仪器有限公司);乙腈(色谱纯,天津市康科德科技有限公司),纯净水(娃哈哈有限公司),其余试剂均为分析纯。

忍冬藤来源于河北、河南、山东、湖北、天津等产地,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为忍冬科忍冬 *L. japonica* Thunb. 的干燥藤茎。

裂环马钱子苷酸、马钱苷、当药苷、secologanosi-7-methyl ester 对照品均为本实验室自制,经色谱及光谱分析确认,质量分数均在98%以上。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),乙腈(A)-0.05%磷酸水(B)梯度洗脱,0~10 min, 10%~14% A; 10~35 min, 14% A; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 236 nm, 柱温 30 ℃。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取裂环马钱子苷酸、马钱苷、当药苷和 secologanosi-7-methyl ester 对照品适量,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得到裂环马钱子苷酸质量浓度为 201.6 μg/mL,马钱苷质量浓度为 534 μg/mL,当药苷质量浓度为 198.4 μg/mL,secologanosi-7-methyl ester 的质量浓度为

195.6 μg/mL 的混合对照品储备液。取上述储备液 2 mL 定容至 25 mL,摇匀,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取忍冬藤药材粉末(过 40 目筛)约 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 1 h,放冷至室温,再称定质量,并用 50%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液即得。

2.4 标准曲线的绘制

分别精密吸取“2.2”项中4个环烯醚萜苷的混合对照品储备溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 mL, 50%乙醇定容至 25 mL,摇匀,各进样 10 μL,测定峰面积,记录数据。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得各成分回归方程,见表 1,色谱图见图 1。

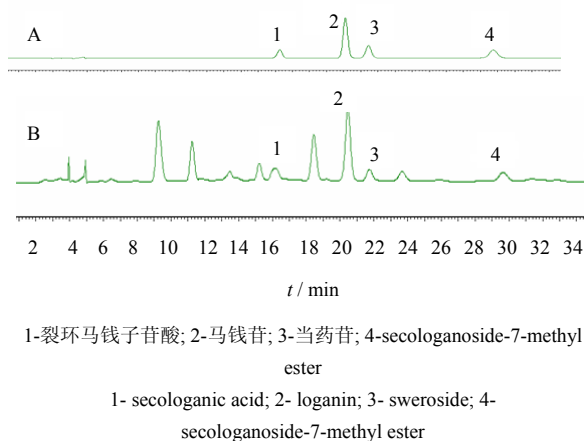


图 1 混合对照品(A)和样品(B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

表 1 各对照品的回归方程

Table 1 Regression equations of each reference substance

对照品	线性方程	R^2	线性范围/μg
裂环马钱子苷酸	$Y=368\ 102X-11\ 169$	0.999 9	0.806 4~32.256
马钱苷	$Y=1\ 616\ 488.36X+5\ 060.80$	1.00	2.136 0~85.440
当药苷	$Y=595\ 817X+15\ 452$	0.999 9	0.793 6~31.744
Secologanosi-7-methyl ester	$Y=368\ 102X-11\ 169$	0.999 9	0.782 4~31.296

2.5 精密度试验

取忍冬藤(过 40 目筛)约 0.5 g,精密称定,按“2.3”项下供试品溶液制备方法处理,吸取所得供试品溶液 10 μL,连续进样 6 次,测定色谱峰面积,裂环马钱子苷酸、马钱苷、当药苷、

secologanosi-7-methyl ester 的 RSD 分别为 1.01%、0.19%、1.25%、1.33%。

2.6 稳定性试验

取忍冬藤(过 40 目筛)约 0.5 g,精密称定,按“2.3”项下供试品溶液制备方法处理,分别在 0、

2、4、8、12、24 h 进样 10 μ L, 测定裂环马钱子苷酸、马钱苷、当药苷、secologanoside-7-methyl ester 的色谱峰面积, 计算得 RSD 值分别为 1.00%、0.29%、1.21%、1.42%。

2.7 重复性试验

取忍冬藤药材粉末(过 40 目筛)约 0.5 g, 平行精密称定 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 测定色谱峰面积, 计算 4 种环烯醚萜苷的量, 裂环马钱子苷酸、马钱苷、当药苷、secologanoside-7-methyl ester 的质量分数的 RSD 值分别为 1.02%、0.70%、1.33%、1.39%。

2.8 加样回收率试验

取忍冬藤药材粉末(过 40 目筛)约 0.25 g, 平行精密称定 6 份, 分别加入适量的混合对照品溶液, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分析, 计算回收率, 裂环马钱子苷酸的回收率为 101.27%, RSD 为 2.30%; 马钱苷的回收率为 98.50, RSD 为 1.54%; 当药苷的回收率为 101.34%, RSD 为 2.10%; secologanoside-7-methyl ester 的回收率为 101.36%, RSD 值为 1.87%。

2.9 样品测定

取 18 批忍冬藤药材, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下方法测定, 计算各成分含量, 结果见表 2。

表 2 样品测定结果

Table 2 Determination of samples

批号	产地	裂环马钱子苷酸/%	马钱苷/%	当药苷/%	secologanoside-7-methyl ester/%
1	河北	0.15	0.40	0.07	0.08
2	河南封丘	0.14	0.15	0.01	0.10
3	河南封丘	0.00	0.01	0.00	0.01
4	山东	0.04	0.30	0.02	0.02
5	河北安国	0.09	0.04	0.01	0.00
6	河南	0.01	0.11	0.07	0.00
7	河南	0.02	0.12	0.03	0.01
8	山东	0.03	0.31	0.03	0.02
9	湖北	0.02	0.28	0.03	0.02
10	不详	0.02	0.26	0.03	0.02
11	不详	0.04	0.52	0.08	0.01
12	不详	0.01	0.06	0.01	0.00
13	不详	0.02	0.17	0.03	0.01
14	不详	0.03	0.39	0.04	0.02
15	天津, 自采	0.02	0.01	0.02	0.00
16	河北, 自采	0.12	0.79	0.08	0.03
17	天津, 自采	0.08	0.26	0.01	0.09
18	天津, 自采	0.04	0.36	0.13	0.01

3 讨论

本实验建立 HPLC 法测定了忍冬藤药材中 4 种环烯醚萜苷的量。试验所采用的优化色谱条件稳定、可靠、重复性好, 为进一步研究忍冬藤中环烯醚萜类成分奠定基础。

本实验所建立的 4 种环烯醚萜苷在同一色谱条件下分析测定, 可以节约分析时间, 提高效率, 可以为忍冬藤的多指标质量控制提供依据和参考。

本实验考察了 50%甲醇、70%甲醇、50%乙醇、

70%乙醇四种提取溶剂, 加热回流、超声两种提取方法, 以及提取时间, 最终选定 50%乙醇超声 1 h, 使得药材中的待测成分能够提取完全, 保证了含量测定结果的准确性。

通过 18 批药材的含量测定结果, 可以发现不同产地中 4 种环烯醚萜苷的含量差异较大, 裂环马钱子苷酸的质量分数在 0.01%~0.15%, 马钱苷的质量分数在 0.11%~0.79%, 当药苷的质量分数在 0.01%~0.13%, secologanoside-7-methyl ester 的质

量分数在 0.01%~0.10%。不同产地之间的含量差异可能是由地理环境和气候的差异导致的。同一产地不同批次的药材之间含量也不尽一致,可能是由个体差异以及生长年限等原因导致的。忍冬藤中的环烯醚萜类成分具有较好的生理活性^[5-6],不同产地的忍冬藤中环烯醚萜类含量的较大差异将会导致药材质量的较大差异,不利于对其进行质量控制以及临床应用,因此有必要对忍冬藤中该类成分做进一步的研究,阐明忍冬藤中环烯醚萜类成分的种类和含量差异。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 赵娜夏,韩英梅,付晓丽. 忍冬藤的化学成分研究 [J].

中草药, 2007, 38(12): 1774-1776.

[3] 张 聪,殷志琦,叶文才,等. 忍冬藤的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3051-3053.

[4] 马 荣,殷志琦,张 聪,等. 忍冬藤正丁醇萃取部位的化学成分 [J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(4): 333-336.

[5] 纪瑞锋,刘素香,王文倩,等. 忍冬属植物环烯醚萜类成分研究概况[J]. 中草药, 2012, 43(6): 1226-1232.

[6] 石建功,李 帅,王素娟,等. 金银花提取物,其制备方法和应用 [P]. 中国专利: CN 101085795A, 2007-12-12.

[7] Kwan W J, Cho Y B, Han C K, *et al.* Extraction and purification method of active constituents from stem of *Lonicera japonica* Thunb, its usage for anti-inflammatory and analgesic drug [P]. US Patent: US2007/0111955A1, 2007-05-17.