

不同产地管花肉苁蓉中有效成分的定量分析

蔡 鸿¹, 鲍 忠¹, 姜 勇¹, 王新意², 樊兴土², 艾尔肯·买提肉孜², 屠鹏飞^{1*}

(1. 北京大学药学院 中药现代研究中心, 北京 100083; 2. 和田天力沙生药物研究所, 新疆 和田 848400)

摘要:目的 建立管花肉苁蓉药材中松果菊苷、毛蕊花糖苷和半乳糖醇的 HPLC 测定方法。方法 采用 Agilent ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱, 甲醇-0.1% 甲酸梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 在检测波长 330 nm、柱温为 35 ℃ 的条件下对松果菊苷和毛蕊花糖苷的量进行测定; 采用 Prevail Carbohydrate ES 聚合凝胶柱色谱柱, 以乙腈-水(77:23)为流动相, 体积流量为 0.7 mL/min, 以 ELSD 为检测器, 在柱温为 25 ℃ 的条件下对半乳糖醇进行测定。结果 松果菊苷的平均回收率为 100.29%, RSD 为 1.32%; 毛蕊花糖苷的平均回收率为 102.10%, RSD 为 1.14%; 半乳糖醇的平均回收率为 99.42%, RSD 为 2.83%。结论 本方法对管花肉苁蓉质量标准的制定和栽培基地的选择具有很好的参考价值。

关键词:管花肉苁蓉; 松果菊苷; 毛蕊花糖苷; 半乳糖醇; 高效液相色谱法

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)03-0452-04

Qualification of active constituents in *Cistanche tubulosa* from various habitats

CAI Hong¹, BAO Zhong¹, JIANG Yong¹, WANG Xin-yi², FAN Xing-tu²,
AIERKEN Maitirouzi², TU Peng-fei¹

(1. Center of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Institute of Hetian Tianli Desert Medicine, Hetian 848400, China)

Key words: *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight; echinacoside; verbascoside; galactitol; HPLC

肉苁蓉为著名的补益中药, 具有补肾阳、益精血、润肠通便等功效, 用于阳痿、不孕、腰膝酸软、筋骨无力、肠燥便秘等症。活性成分研究表明, 其补肾阳作用的有效成分为松果菊苷(echinacoside)和毛蕊花糖苷(verbascoside)等苯乙醇苷类成分^[1], 润肠通便的主要有效成分为半乳糖醇(galactitol)^[2,3]。《中国药典》2005 年版一部收载的肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 和管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质茎^[4]。肉苁蓉主产于内蒙古西北部和新疆北疆的古尔班通古特沙漠边缘地区, 由于长期的不合理采挖, 该种资源已濒于枯竭。管花肉苁蓉分布于新疆南疆的塔克拉玛干沙漠周围, 资源比较丰富, 沙漠公路的开通, 为其采集提供了便利, 同时该种易于人工种植, 目前已在于田、民丰等县大面积栽培, 因此, 年产量有不断增加的趋势, 目前已成为市场上肉苁蓉的主流品种。为了有效地评价管花肉苁蓉的质量, 同时为其栽培基地的选择提供科学依据, 笔者对塔克拉玛干沙漠周围各县收集的 60 批野生管花肉苁蓉药材所含的松果菊苷、毛蕊花糖苷和半乳糖醇的量进行了测定。本研究收集样品范围广、批次多, 所

取得的结果对管花肉苁蓉质量标准的制定和栽培基地的选择具有很好的参考价值。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 系列(G1322A 在线真空脱气机, G1311A 四元梯度泵, G1313A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1314A VWD 紫外检测器); 法国 SEDEX 75 型蒸发光散射检测器(ELSD)。

松果菊苷对照品自制, 质量分数 >98%; 毛蕊花糖苷对照品购自中国药品生物制品检定所; 半乳糖醇对照品自制, 质量分数 >98%; 色谱纯乙腈(美国, J. T. Baker); 色谱纯甲醇(天津市西华特种试剂厂); 分析纯甲酸(北京化工精细化学品公司); 水(乐百事纯净水一次蒸馏)。

管花肉苁蓉药材由新疆和田天力沙生药物研究所王新意、艾尔肯·买提肉孜收集, 北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定为列当科植物管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight 的干燥带鳞叶的肉质茎, 见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 松果菊苷和毛蕊花糖苷测定的色谱条件: 色

谱柱 Agilent Zorbax SB C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.1%甲酸梯度洗脱, 按甲醇-0.1%甲酸 (26.5 : 73.5), 保持 17 min, 3 min 内换成 29.5 : 70.5, 保持 7 min; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 330 nm; 柱温为 35 °C; 理论塔板数按松果菊苷峰计应不低于 3 000。见图 1。

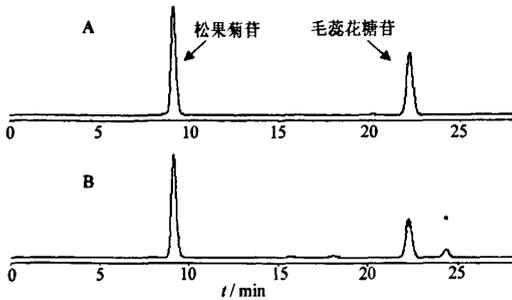


图 1 松果菊苷对照品、毛蕊花糖苷对照品(A)和管花肉苁蓉样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of echinacoside, verbascoside reference substances (A) and sample of *C. tubulosa* (B)

2.1.2 半乳糖醇测定的色谱条件: 色谱柱 Prevail Carbohydrate ES 聚合凝胶柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (77 : 23); 体积流量为 0.7 mL/min; 柱温为 25 °C; 检测器为 ELSD; 漂移管温度 40 °C, 气体压力 2.4 bar, 检测灵敏度设置为 8; 理论塔板数按半乳糖醇峰计算不低于 3 000。见图 2。

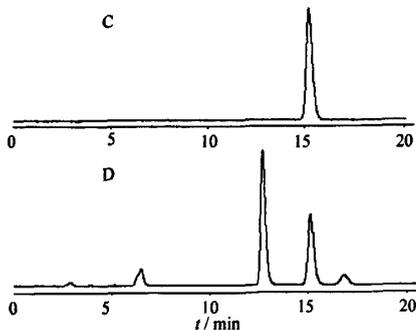


图 2 半乳糖醇对照品(C)和肉苁蓉样品(D)的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC Chromatograms of galactitol (C) and sample of *C. tubulosa* (D)

2.2 溶液制备

2.2.1 松果菊苷和毛蕊花糖苷对照品溶液的制备: 精密称取松果菊苷和毛蕊花糖苷对照品适量, 加 60% 甲醇制成质量浓度分别为 0.5 mg/mL 的混合溶液, 摇匀, 即得。

2.2.2 半乳糖醇对照品溶液的制备: 取半乳糖醇对

照品适量, 加水制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试液的制备: 取管花肉苁蓉药材粉末 (过 80 目筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置 100 mL 棕色量瓶中, 精密加入 60% 甲醇 50 mL, 密塞, 摇匀, 称定质量, 浸泡 0.5 h, 超声处理 40 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用 60% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 静置, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液置棕色样品瓶保存, 作为测定松果菊苷和毛蕊花糖苷的供试品溶液。取该供试品溶液 5 mL 置 25 mL 量瓶中, 用 60% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.2 μm 微孔滤膜滤过, 作为测定半乳糖醇的供试品溶液。

2.3 松果菊苷和毛蕊花糖苷的测定: 按“2.1.1”的色谱条件, 分别精密吸取松果菊苷和毛蕊花糖苷混合对照品溶液与供试品溶液各 5 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 按外标一点法计算质量分数, 即得。

2.4 半乳糖醇的测定: 按“2.1.2”的色谱条件, 分别精密吸取对照品溶液 5、25 μL, 供试品溶液 5 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 按外标二点法对数方程计算, 即得。

2.5 标准曲线制作: 取质量分数分别为 0.50、0.40 mg/mL 的松果菊苷和毛蕊花糖苷对照品溶液, 分别进样 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 μL, 按“2.1.1”的色谱条件测定峰面积。以峰面积积分为纵坐标 (Y)、进样量 (μg) 为横坐标 (X), 得回归方程。松果菊苷: $Y = 1\,201.527 X - 11.437$ ($r = 1.000\,0, n = 6$), 线性范围 0.05 ~ 10.00 μg; 毛蕊花糖苷: $Y = 1\,457.737 X - 16.672$ ($r = 1.000\,0, n = 6$), 线性范围 0.04 ~ 10.00 μg。取质量分数为 0.50 mg/mL 半乳糖醇对照品溶液, 分别进样 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 μL, 按“2.1.2”的色谱条件测定峰面积, 以峰面积积分值对数 (Y) 为纵坐标、半乳糖醇进样量 (μg) 对数 (X) 为横坐标, 得回归方程为 $Y = 1.548\,8 X + 2.918\,4$ ($r = 0.999\,2, n = 6$), 线性范围 0.25 ~ 10.00 μg。

2.6 精密度试验: 取管花肉苁蓉药材样品 1 份, 按供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 松果菊苷的 RSD 为 0.19%, 毛蕊花糖苷的 RSD 为 0.19%, 半乳糖醇的 RSD 为 1.15%。

2.7 稳定性试验: 取管花肉苁蓉药材样品 1 份, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 测定峰面积, 松果菊苷的 RSD 为 0.20%, 毛蕊花糖苷的 RSD 为 0.50%, 半乳糖醇的 RSD 为 1.50%。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重现性试验:取管花肉苁蓉样品 6 份,按 2.2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按上述色谱条件分别测定峰面积,计算质量分数,松果菊苷的 RSD 为 0.77%,毛蕊花糖苷的 RSD 为 0.68%,半乳糖醇的 RSD 为 1.25%。结果表明方法重现性良好。

2.9 回收率试验:分别取已测定量的肉苁蓉样品 0.5 g 共 9 份,3 份为一组,分别精密加入松果菊苷对照品溶液(0.624 8 mg/mL)和毛蕊花糖苷对照品溶液(0.440 8 mg/mL)2、4、6 mL,半乳糖醇对照品溶液(3.925 mg/mL)1、2、3 mL,按上述色谱条件测定,计算回收率。松果菊苷的平均回收率为 100.29%,RSD 为 1.32%;毛蕊花糖苷的平均回收率为 102.10%,RSD 为 1.14%;半乳糖醇的平均回收率为 99.42%,RSD 为 2.83%。结果表明,方法准确度较高。

2.10 样品测定:按照上述供试品溶液的制备方法制备供试品溶液,按松果菊苷和毛蕊花糖苷测定色谱条件和半乳糖醇测定色谱条件,对 60 批样品进行测定,结果见表 1。

3 讨论

3.1 《中国药典》2005 年版中管花肉苁蓉项下只规定了松果菊苷的量不得低于 1.0%,但这不能全面保证肉苁蓉的质量,因为以松果菊苷为代表的苯乙醇苷类成分只代表了肉苁蓉药材的补肾壮阳功效,而其润肠通便的寡糖类成分按照原来的方法不能得到控制。本实验采用多指标的定量测定方法对管花肉苁蓉中的松果菊苷、毛蕊花糖苷和半乳糖醇的量进行了测定,从而全面保证了其补肾壮阳和润肠通便的药效物质基础。

3.2 从前面的测定结果可以看出,不同栽培地点或同一栽培地点的不同批次的样品所含有有效成分的量差异较大,分析原因如下:

3.2.1 产地原因:研究表明,同一种药物由于产地不同,质量存在一定的差异。许多药材由于天时、地利的生长条件和多年来的精心培植,优质而高产,另外一些药材则因为不良的气候或土壤等环境因素,有效成分的量明显减少,质量较差。

3.2.2 采收因素:中药质量的好与差取决于有效成分量的多少,有效成分的量与采收的季节、时间、方法有着密切关系。药用植物采收应根据供药用部分中有效成分积累状态和生长发育阶段这两个指标,即考虑成分的量,又考虑产量。

3.2.3 炮制因素:在前期研究中发现,肉苁蓉植物体内含有苯乙醇苷类的水解酶,传统的干燥方法时间长,苯乙醇苷类成分在干燥过程中被水解,量大大

表 1 新疆不同产地管花肉苁蓉药材有效成分测定结果 (n=2)

Table 1 Determination of active constituents in *C. tubulosa* from various habitats of Xinjiang (n=2)

编号	产地	松果菊苷/ (mg · g ⁻¹)	毛蕊花糖苷/ (mg · g ⁻¹)	半乳糖醇/ (mg · g ⁻¹)
1	阿克苏地区 阿瓦提县	5.64	1.10	27.27
2		30.99	4.85	32.95
3		19.60	4.17	29.78
4		40.49	12.23	22.27
5		44.82	7.51	26.76
6		31.59	8.10	35.84
7	巴州轮台县	11.86	2.17	59.26
8		13.14	3.30	77.46
9		21.44	5.99	50.31
10		7.55	1.72	91.48
11		39.14	6.55	62.85
12		28.07	5.08	40.54
13	巴州且末县	49.96	8.14	36.32
14		25.77	4.67	65.70
15		86.64	12.46	60.03
16		11.91	2.52	76.81
17		18.25	3.70	104.27
18		26.48	6.99	74.52
19	喀什地区巴楚县	27.05	4.53	45.22
20		13.10	2.13	40.25
21		74.81	4.33	30.86
22		16.15	4.20	51.79
23		38.15	8.21	32.29
24		24.34	3.59	39.64
25	喀什地区莎车县	8.80	1.81	36.53
26		4.01	0.89	49.49
27		3.39	0.78	36.74
28		3.87	0.70	23.19
29		7.31	1.40	33.53
30		16.44	2.91	36.38
31	和田地区墨玉县	41.81	1.24	50.83
32		6.58	1.87	57.61
33		37.77	6.87	33.82
34		37.49	7.79	64.65
35		42.95	8.90	86.10
36		19.27	8.16	48.79
37	和田地区策勒县	19.35	4.90	32.32
38		29.97	5.98	35.94
39		37.25	6.46	40.19
40		17.13	5.09	37.96
41		14.35	3.44	23.84
42		24.25	5.82	44.11
43	和田地区民丰县	41.44	6.77	61.04
44		73.04	10.65	40.62
45		54.41	12.89	35.36
46		58.19	8.64	38.74
47		60.09	12.16	43.68
48		40.66	7.63	48.34
49	和田地区于田县 (达里雅布依乡)	21.33	4.69	56.72
50		21.72	3.64	40.61
51		61.44	9.41	45.78
52		26.57	5.06	54.37
53		35.06	7.71	28.89
54		21.70	4.82	49.17
55	和田地区于田县 (奥依托拉克乡)	29.32	4.56	49.29
56		52.76	9.14	43.45
57		27.36	3.91	63.40
58		11.06	2.12	91.93
59		17.15	4.75	50.19
60		22.12	4.14	48.09

降低,因此,鲜肉苡蓉的加工方式对肉苡蓉样品中苯乙醇苷类量的影响较大,而由于我国地域广阔,各地用药习惯各不相同,长期以来形成了各地特色的中药炮制方法,从而形成了各省市发布的《中药炮制规范》,且其炮制方法的描述非常简单,缺少详细的工艺参数,对同一产地的实际生产仍难以起到指导作用,这也是导致中药饮片的质量参差不齐的一个重要原因。

在以上的10个地区中,以和田地区民丰县栽培的管花肉苡蓉质量为佳,建议以后可以在该地区进行大面积的栽培种植以加强种质资源优化的管理,同时建立统一、规范的中药炮制工艺,制定合理的中

药饮片质量标准。

References:

[1] Song Z H, Lei L, Tu P F. Advances in research of pharmacological activity in plants of *Cistanche Hoffing.* et Link [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (9): 16.
 [2] Zhang B S, Zhao X W, Chen S H, et al. Laxative action of separated parts from *Herba Cistanches* [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2003, 10 (11): 31.
 [3] Zhang B S, Chen S H, Zhao X W, et al. Study on the dosage-effect relationship of laxative action of galactitol from *Cistanche* [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2003, 10 (12): 28.
 [4] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

RP-HPLC 法测定积雪草中积雪草苷和羟基积雪草苷

张蕾磊¹, 王海生², 姚庆强^{1*}, 栾 阳¹, 王秀丽¹

(1. 山东省医学科学院药物研究所, 山东 济南 250062; 2. 山东大学第二医院, 山东 济南 250062)

积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urb. 为伞形科积雪草属植物,全草入药。性寒,味苦、辛,具有清热利湿、解毒消肿之功效。临床上用于跌打损伤、传染性肝炎、流行性脑脊髓膜炎等^[1]。曾建国等^[2]采用梯度洗脱,肖隽等^[3]采用衍生化法测定了积雪草中有效成分。本实验采用RP-HPLC法,建立了积雪草中积雪草苷和羟基积雪草苷的测定方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(备有四元梯度泵、自动进样器和DAD二级管阵列检测器),Agilent Chemstation;乙腈为色谱纯;水为双蒸水;积雪草苷(自制,质量分数98%,经HPLC检验为单一色谱峰)和羟基积雪草苷(自制,质量分数98%,经HPLC检验为单一色谱峰);3批积雪草药材购自重庆市药物种植研究所,并经易思容教授鉴定为 *Centella asiatica* (L.) Urb.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Merck Lichrospher 60RP-Select B(250 mm×4 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(27:73);体积流量:1 mL/min;柱温为室温;检测波长:205 nm;进样量10 μL;理论塔板数按积雪草苷和羟基积雪草苷峰计算分别为5 581和4 436。积

雪草苷、羟基积雪草苷对照品和积雪草药材的HPLC色谱图见图1。

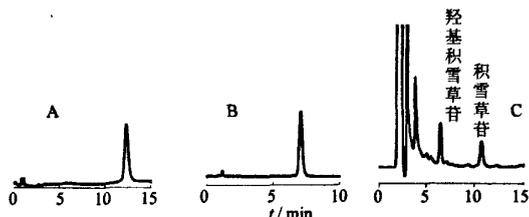


图1 积雪草苷(A)、羟基积雪草苷(B)和积雪草全草(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of asiaticoside (A), madecassoside (B), and whole herb of *C. asiatica* (C)

2.2 对照品溶液的制备:取积雪草苷和羟基积雪草苷对照品各5 mg,精密称定,分别置10 mL量瓶中,加乙腈-水(1:1)至刻度,配成0.5 mg/mL积雪草苷和0.5 mg/mL羟基积雪草苷对照溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备:取积雪草药材粉末1 g,精密称定,置100 mL圆底烧瓶中,加入甲醇适量,水浴回流提取1 h,放冷,滤过,滤液挥干,残渣用甲醇定容至10 mL,滤过,取续滤液即得。

2.4 线性关系考察:取积雪草苷和羟基积雪草苷对

收稿日期:2006-06-10

作者简介:张蕾磊(1979—),女,硕士,主要从事中药新药研究。

* 通讯作者 姚庆强 E-mail,yqingqiang@yahoo.com