

55 583.75,  $r = 0.9998$ 。结果表明落新妇苷在 0.041 48 ~ 8.296  $\mu\text{g}$  与峰面积具有良好的线性关系。

精密称取经减压干燥 12 h 的落新妇苷对照品适量,用甲醇分别制成质量浓度为 2.204、4.408、220.4、440.8、881.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液,分别精密吸取上述溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,进样,按上述色谱条件测定峰面积。以进样质量对峰面积进行线性回归,得回归方程  $Y = 2430178.91X + 23623.34$ ,  $r = 0.9999$ 。结果表明黄杞苷在 0.022 04 ~ 8.816  $\mu\text{g}$  与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 重现性试验:采用第一批样品,按供试品制备方法制备样品共 6 份,在上述色谱条件下分别进样测定,计算,结果样品中落新妇苷平均质量分数为 85.7  $\text{mg}/\text{g}$ ,RSD 为 1.9%;黄杞苷平均质量分数为 20.8  $\text{mg}/\text{g}$ ,RSD 为 1.6%。

2.6 精密度试验:取同一份供试品溶液,连续进样 6 次,以落新妇苷及黄杞苷峰面积为考察对象,计算 6 次分析所得落新妇苷与黄杞苷峰面积的 RSD 值均小于 0.3%。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 进样测定,结果落新妇苷峰面积的 RSD 值为 1.4%,黄杞苷 RSD 值为 1.6%。表明供试品溶液中落新妇苷与黄杞苷在 24 h 内均稳定。

2.8 加样回收率试验:采用第一批样品,取其粗粉约 0.125 g,共 6 份,精密称定,分别精密加入含落新妇苷 215.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和黄杞苷 44.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品溶液 50 mL,按供试品制备方法制备样品共 6 份,

在上述色谱条件下测定,计算回收率。结果落新妇苷平均回收率为 101.6% (RSD = 0.8%);黄杞苷为 98.1% (RSD = 1.4%)。

2.9 样品测定:取 4 个不同批次的样品及第一批中黄杞细枝,制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,记录峰面积,按外标法计算质量分数。结果见表 1。黄杞细枝中落新妇苷和黄杞苷的量明显低于黄杞叶中二者的量;且不同批次黄杞叶中落新妇苷与黄杞苷的量比值也不尽相同。

表 1 不同批次黄杞叶样品测定结果 (n = 2)

Table 1 Determination of *E. rcwburghiana* leaves in various batches (n = 2)

批 次	落新妇苷/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )	黄杞苷/( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
第 1 批	85.7	20.8
第 2 批	39.2	4.9
第 3 批	52.9	5.1
第 4 批	86.7	7.1
黄杞细枝	20.0	1.0

### 3 讨论

本实验比较了不同提取方式对样品提取效率的影响,结果显示超声提取与回流提取差别不大,故采用操作相对简单的超声提取方法;此外,还比较了不同超声提取时间 (30、45、60、90 min) 对提取效率的影响,4 种提取时间所测得的量与时间成正比,但 45 min 与 90 min 相差不大,故选择 45 min 提取,节省时间。比较了不同提取溶液 (甲醇,75% 甲醇,50% 甲醇;乙醇,75% 乙醇,50% 乙醇) 对提取效率的影响,在相同条件下提取,甲醇提取所测得的量最高,故选择甲醇作为提取溶剂。

## RP-HPLC 法测定黄荆子中牡荆脂素 A

唐莹翠<sup>1,2</sup>, 曾光尧<sup>1\*</sup>, 谭健兵<sup>1</sup>, 李妍岚<sup>1</sup>, 谭桂山<sup>1</sup>, 周应军<sup>1\*</sup>

(1. 中南大学药学院,湖南 长沙 410013; 2. 湖南省医药学校,湖南 长沙 410014)

**摘要:**目的 建立黄荆子中抗肿瘤活性成分 6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢(3R,4S)-2-醛基萘(牡荆脂素 A, VBE-1) 的定量测定方法。方法 采用反相高效液相色谱法。Kromasil ODS (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱,乙腈-0.1%冰醋酸梯度洗脱(0 min, 15 85; 10 min, 15 85; 40 min, 28 72),检测波长为 255 nm,柱温为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,体积流量为 1 mL/min。结果 黄荆子中牡荆脂素 A 在该条件下有较好的线性关系。结论 测定方法简便、准确,建立了黄荆子药材的牡荆脂素 A 的定量测定方法,为黄荆子质量控制及综合利用提供了可靠的依据。

**关键词:**黄荆子; 6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢(3R,4S)-2-醛基萘; 高效液相色谱

\* 收稿日期: 2008-05-05

作者简介: 唐莹翠,女,高级讲师,中南大学药学院在职研究生,从事天然药物研究与开发。

\* 通讯作者 曾光尧 Tel: (0731) 2650372 E-mail: zenggy2005@126.com

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0307-03

黄荆子为被子植物马鞭草科的牡荆属植物黄荆 *Vitex negundo* L. 的种子<sup>[1]</sup>, 分布于我国 20 余省市, 其中以秦巴山区资源最为丰富, 其味苦, 辛, 温, 具有清热解表、利湿解毒、止咳平喘及缓解支气管痉挛的作用, 主治感冒、咳嗽、哮喘、疟疾、中暑、风湿、跌打肿痛等, 并能防止甲醛性关节炎肿胀的发展。现代药理实验表明, 黄荆子具有抗菌及抗氧化作用<sup>[2,3]</sup>。黄荆子的化学成分研究主要为黄酮类化合物、二萜类化合物和木脂素类化合物。6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢(3*R*, 4*S*)-2-醛基萘(牡荆脂素 A, 以下简称 VBE-1) 为从黄荆子分离得到的木脂素类化合物, 在深入研究的基础上, 发现其具有较强的抗肿瘤活性, 对人乳腺癌(MCF-7)细胞、人卵巢癌(COCI)、人肝癌(SMMC-7721)和人结肠癌(HT-29)细胞增殖有抑制活性, 特别是对卵巢癌(COCI)的抑制作用较强, 其 IC<sub>50</sub> 达 1.77 μmol/L, 目前已申请发明专利<sup>[4]</sup>。为了解黄荆子中 VBE-1 的量, 掌握含 VBE-1 的药用植物资源, 本实验确立了黄荆子药材中 VBE-1 的高效液相定量测定方法。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 HP 公司, 低压四元泵, 自动进样器, 柱温箱, UV 检测器, ChemStation 色谱工作站); VBE-1 对照品(本实验室自制并进行了结构确定<sup>[4]</sup>, 经制备 HPLC 纯化, HPLC 检测面积归一法测得其质量分数 99.75%); 药材购自湖南省药材公司, 经中南大学药学院李劲平副教授鉴定并确定为马鞭草科牡荆属植物黄荆 *V. negundo* L. 的种子; HPLC 流动相中的乙腈为色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 水为超纯水。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件: Kromasil ODS-1 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%冰醋酸水溶液梯度洗脱(0 min, 15 85; 10 min, 15 85; 40 min, 28 72); 检测波长: 255 nm; 体积流量: 1.0 mL/min。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 取 VBE-1 对照品 10.75 mg, 用甲醇溶解并定容到 50 mL, 避光保存。

2.3 供试品溶液的制备: 取粉碎后的黄荆子细粉 5 g, 精密称定, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加 40%乙醇 50 mL, 加热回流 1 h, 脱脂棉滤过, 滤渣加 40%乙醇 40 mL 加热回流 0.5 h 滤过, 合并两次滤液至 100

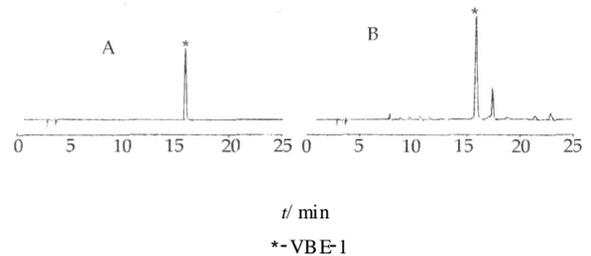


图 1 对照品(A)与样品(B)的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC Chromatogram of reference substance (A) and sample (B)

mL 量瓶中, 40%乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 线性关系及范围的考察: 取上述 VBE-1 对照品溶液, 分别进样 2、4、6、8、10、15、20、25、30 μL, 以 VBE-1 的峰面积对进样的质量进行线性回归, 回归方程为  $Y = 1889.4 X - 2.9919$ ,  $r^2 = 0.9999$ , 其在 0.43 ~ 6.45 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验: 精密吸取上述 VBE-1 对照品溶液, 连续测定 6 次, 每次进样 10 μL, 结果显示其峰面积的 RSD 为 1.04%。

2.6 稳定性试验: 吸取同一供试品溶液, 分别于 0、6、12、18、24、30、48 h 进样测定, 考察 VBE-1 所对应的峰面积, RSD 为 1.75%。结果表明供试品溶液在室温条件下放置 48 h, 溶液中 VBE-1 基本稳定。

2.7 重现性试验: 取黄荆子粉末 5 份, 每份称取药材粉末约 2.0 g, 按制备供试品溶液的操作方法提取, 制备 5 份 50 mL 供试品溶液。分别吸取供试品溶液 10 μL 进样测定, 测得药材中 VBE-1 的平均质量分数为 0.149%, RSD 为 1.98%。

2.8 加样回收试验: 取黄荆子粉末(含 VBE-1 为 0.149%) 6 份, 每份约 2.0 g, 精密称定; 分别加入 1.016 mg/mL VBE-1 对照品液各 3.0 mL, 制备供试品溶液, 测定, 并计算回收率, 结果平均回收率为 100.42%, RSD 为 1.92%。

2.9 样品测定: 取不同产地黄荆子药材, 制备供试品溶液, 测定 VBE-1 的量。结果见表 1。

表 1 样品测定结果(n=3)

Table 1 Determination of samples (n=3)

批号	VBE-1/ %
湖南 061021	0.119 2
湖南 061223	0.113 1
湖南 061107	0.216 6
四川 070523	0.048 2
四川 070723	0.116 8
江西 070710	0.023 4

### 3 讨论

3.1 流动相的选择:为使色谱峰分离效果好,并在较短的时间出峰,先后摸索流动相,最终采用本实验选定的流动相进行梯度洗脱,峰形对称,出峰时间适中,且分离效果好。

3.2 不同产地、不同批次药材中样品的量差别较大。首次对黄荆子药材中 VBE-1 的量进行测定,建立了其定量测定方法学。

参考文献:

- [1] 湖南药物志编委会. 湖南药物志 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2004.
- [2] Kawazoe K, Yutani A, Tamemoto K, et al. Phenylanthracene compound from the subterranean part of *Vitex rotundifolia* and their antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64: 588-591.
- [3] Ono M, Nishida Y, Masuoka C, et al. Lignan derivatives and a norditerpene from the seeds of *Vitex negundo* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67: 2073-2075.
- [4] 周应军. 芳基二氢萘类木脂素衍生物及其用途 [P]. 中国专利. CN200510136656.7, 2007-07-04.

## 蒺藜果中蒺藜呔甾皂苷 B 的 HPLC-ELSD 法测定

解生旭<sup>1</sup>, 徐敏海<sup>2</sup>, 韩冬<sup>1</sup>, 赵宏峰<sup>1</sup>, 司云珊<sup>1</sup>, 徐雅娟<sup>1\*</sup>

(1. 吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130021; 2. 北京中医药大学, 北京 100102)

**摘要:**目的 建立反相高效液相色谱-蒸发光检测法(HPLC-ELSD)测定蒺藜呔甾皂苷 B 的方法。方法 色谱柱 Vp-ODS C<sub>18</sub> 柱, 柱温 40℃, 流动相: 乙腈-水(26/74) (28/72) (31/69) (50/50) 梯度, 体积流量 1 mL/min, 温度: 105℃, 气体流量: 3.0 mL/min。结果 该方法的线性范围为 2.0~10.0 μg, r=0.9973, 平均回收率为 96.68%。结论 方法准确, 灵敏度高, 专属性强, 重现性好, 可用于蒺藜药材中该成分的定量测定。

**关键词:** 蒺藜; 蒺藜呔甾皂苷; HPLC 法

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0309-02

蒺藜为蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥成熟果实, 为我国常用传统中药, 味辛、苦, 微温, 有小毒, 归肝经。具平肝解郁, 活血祛风, 明目, 止痒之功效<sup>[1]</sup>。蒺藜已被广泛应用于临床制剂中, 笔者用蒺藜药材开发出蒺藜果总皂苷制剂, 蒺藜果及其制剂尚无质量控制的对照品。为控制药材及其总皂苷制剂质量, 笔者从蒺藜药材中分离提纯化合物蒺藜呔甾皂苷 B, 并作为对照品进行了纯化及标定, 建立了蒺藜果测定方法。

### 1 试验仪器与药品

1.1 仪器: 岛津 2010 自动高效液相色谱仪, 2000ES 蒸发光散射检测器, N2000 工作站。

1.2 试剂与样品: 蒺藜呔甾皂苷 B 实验室自制, 由 ES-MS、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、HMBC、HMQC 光谱分析确定结构式为 26-O-D-吡喃葡萄糖基-(25R)-5-呔甾烷-20(22)-烯-2,3,26-三醇-3-O-D-吡喃半乳糖基(1,2)-D-吡喃葡萄糖基(1,2)-D-吡喃半乳糖苷, 质量分数 98.80% 以上; 甲醇为色谱

纯, 水为纯净水。蒺藜果采自吉林省洮南市、安徽省亳州市、山东省淄博市、河北省安国市等地, 经长春中医药大学邓明鲁教授鉴定为蒺藜药材为蒺藜科植物蒺藜 *T. terrestris* L. 的干燥成熟果实。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Vp-ODS 色谱柱 (250 mm × 4.5 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱, 0~15 min(A:26%~28%), 体积流量 1 mL/min; 15~25 min(A:28%~31%), 体积流量 1 mL/min; 25~30 min(A:31%~50%), 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL; 检测器: 2000ES 型蒸发光散射检测器; 柱温: 40℃; 检测器温度: 100℃; 气体流量 2.8 mL/min。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液制备: 精密吸取蒺藜呔甾皂苷 B 对照品 5.6 mg, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解至刻度。

2.3 供试品溶液制备: 取蒺藜果 6 g, 精密称定, 加 70% 乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1 h, 合并提取液, 回收乙醇至无醇味, 经过大孔树脂柱(D21), 水洗至

\* 收稿日期: 2008-06-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371739)

作者简介: 解生旭(1975—), 男, 长春市人, 学士学位, 1997年毕业于长春中医药大学中药专业, 现任职于吉林省中医药科学院重点实验室, 主要从事中药化学的基础研究和新药研发。 Tel: (0431) 86816848 E-mail: jshx222@126.com

\* 通讯作者 徐雅娟 Tel: (0431) 86816848 Fax: (0431) 85910067 E-mail: xyj6492@shhu.com