

HPLC法同时测定马鞭草中马鞭草苷和戟叶马鞭草苷

袁志芳¹,段坤峰¹,张兰桐¹,史清文^{2*}

(1. 河北医科大学药学院 药物分析教研室,河北 石家庄 050017; 2. 河北医科大学药学院 天然药物化学教研室,河北 石家庄 050017)

摘要:目的 建立马鞭草药材中马鞭草苷(verbenalin)及戟叶马鞭草苷(hastatoside)的测定方法。方法 采用Diamonsil C₁₈色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm),乙腈-水(15:85)为流动相,检测波长为238 nm。结果 马鞭草苷、戟叶马鞭草苷在17.2~155.2 μg/mL和25.5~229.9 μg/mL与峰面积均呈良好的线性关系;平均回收率分别为98.89%(RSD=1.1%)、99.00%(RSD=0.4%)。结论 本法操作简便、准确,具有良好的重现性,为马鞭草药材的合理应用及质量控制奠定基础。

关键词:马鞭草;马鞭草苷;戟叶马鞭草苷;高效液相色谱

中图分类号:R286.2 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)05-0818-03

马鞭草为马鞭草科植物马鞭草 *Verbena officinalis* L. 的干燥地上部分,收载于《中国药典》2005年版一部。马鞭草有活血散瘀、截疟、解毒、利水消肿的功效,用于治疗癥瘕积聚、经闭痛经、疟疾、喉痹、痈肿、水肿、热淋^[1]。马鞭草项下的薄层鉴别和定量测定均以熊果酸为指标。熊果酸为脂溶性成分,广泛存在于多种中药中,如山茱萸、夏枯草、枇杷叶、山楂、栀子等^[1]。张涛等^[2]以马鞭草甲醇渗漉粗提物及其经硅藻土柱分离的各部分提取物,进行了抗大鼠早孕作用的实验,结果表明,马鞭草甲醇粗提物及其甲醇部分提取物具有非常显著的抗大鼠早孕作用,而石油醚、氯仿部分提取物未显示出抗大鼠早孕的作用。由此确定马鞭草抗早孕作用的有效部位为其甲醇部分提取物。张涛等^[3]通过实验证明马鞭草苷、3,4-二氢马鞭草苷、5-羟基马鞭草苷均能显著增加子宫肌条的收缩频率和振幅,从而认为3种成分为其兴奋子宫肌条的有效活性成分。由此可见,马鞭草中抗早孕的活性物质为极性成分。卫生部药品标准中药成分制剂含马鞭草的中成药有3种,即肾炎片、清热感冒茶、重感灵片^[4],且马鞭草的提取工艺均为水提。因此,研究马鞭草极性成分的定量测定能够更好地监控药材的质量。

马鞭草的极性成分以环烯醚萜苷类物质为主,也是主要药效物质基础,其中马鞭草苷和戟叶马鞭草苷(即5-羟基马鞭草苷)为量最大的主要成分,其他成分的量很低,所以,通过检测马鞭草苷和戟叶马鞭草苷的量,对于控制马鞭草药材的质量具有重要

的意义。

1 仪器与试剂

Agilent Technologies 1200 series 高效液相色谱仪(配有紫外二极管阵列检测器、四元泵、自动进样器、柱温箱);SCQ-200 超声波清洗器(上海声谱超声波设备厂);SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

马鞭草苷和戟叶马鞭草苷对照品自制,经IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 确定结构^[5-7],质量分数均大于98.5%。乙腈为色谱纯,水为重蒸水(自制),甲醇为分析纯。

药材购自石家庄乐仁堂药店及不同产地的药业公司,经河北医科大学药学院生药学教研室聂凤祿教授鉴定。药材产地见表1。药材经40℃干燥后,粉碎过24目筛,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验: Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm);柱温 35℃;流动相为乙腈-水(15:85),体积流量 1.0 mL/min;检测波长 238 nm;进样量 20 μL。按马鞭草苷和戟叶马鞭草苷计算理论板数均不低于 2 000,与相邻峰之间分离度均大于 1.5,对称因子均在 0.95~1.05。

2.2 对照品溶液制备:精密称取马鞭草苷和戟叶马鞭草苷适量,加 80% 甲醇溶解并稀释制成含马鞭草苷 0.86 mg/mL、戟叶马鞭草苷 1.28 mg/mL 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备:取药材粉末约 0.5 g,精密称

* 收稿日期:2008-08-07

作者简介:袁志芳(1969—),男,河北省故城县人,在读博士,研究方向为中药有效成分的提取分离与药效物质基础研究。

Tel:(0311)86265625 E-mail:zhifangyuan@126.com

*通讯作者 史清文 Tel:(0311)86265534 E-mail:shiqing-w@163.com

定,置具塞 100 mL 锥形瓶中,加入 20 倍量 80% 甲醇,密塞,称定质量,超声处理 45 min,放冷,称质量,用 80% 甲醇补充减失的质量,摇匀,微孔滤膜滤过,取续滤液备用,即得。

2.4 标准曲线绘制:精密吸取 2.2 项下的对照品溶液 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,用 80% 甲醇稀释至刻度,摇匀,在上述色谱条件下测定峰面积。以对照品质量浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,马鞭草苷: $Y = 22.76 X - 52.42, r = 0.9998$,线性范围为 17.2 ~ 155.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 戟叶马鞭草苷: $Y = 32.25 X - 71.41, r = 0.9995$,线性范围为 25.5 ~ 229.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 结果表明线性关系良好。

2.5 精密度试验:精密吸取混合对照品溶液 5 μL ,重复进样 6 次,在上述色谱条件下测定峰面积,马鞭草苷、戟叶马鞭草苷峰面积的 RSD 分别为 0.47% 和 0.61% ($n = 6$)。

2.6 重现性试验:取同一批样品,精密称取 6 份,按 2.3 项下操作,在上述色谱条件测定马鞭草苷、戟叶马鞭草苷的量, RSD 分别为 0.40% 和 0.41% ($n = 6$)。

2.7 稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,在室温下放置,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 测定马鞭草苷、戟叶马鞭草苷的质量浓度, RSD 分别为 1.50% ($n = 6$) 和 1.82% ($n = 4$),样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验:精密称取 6 份已知质量分数的药材粉末 0.25 g,依次加入 2.2 项下混合对照品溶液 2 mL 及 80% 甲醇 18 mL,按 2.3 项下操作。在上述色谱条件下测定,得出马鞭草苷、戟叶马鞭草苷的平均回收率分别为 98.89%、99.00%, RSD 分别为 1.1%、0.4% ($n = 6$)。

2.9 样品测定:分别取供试品溶液和对照品溶液,在上述色谱条件下测定,以外标法计算各样品中马鞭草苷、戟叶马鞭草苷的量,结果见表 1。色谱图见图 1。

3 讨论

3.1 本实验首次建立同时测定马鞭草中马鞭草苷和戟叶马鞭草苷的 HPLC 分析方法,该方法灵敏度高,专属性强,操作简单易行,而且将质量控制与活性成分相结合,为该中药材的质量控制提供了新思路、新尝试。

3.2 《中国药典》2005 年版一部收录的马鞭草是利用其脂溶性成分熊果酸为鉴别和定量测定指标的,而马鞭草基本上采用水提工艺。因此,马鞭草极性

表 1 不同产地马鞭草中马鞭草苷和戟叶马鞭草苷的测定 ($n = 3$)

Table 1 Determination of verbenalin and hastatoside in *V. officinalis* from different habitats ($n = 3$)

产地	马鞭草苷/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	戟叶马鞭草苷/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$
河北 1	3.49	5.49
河北 2	3.15	4.61
河北 3	3.45	5.11
河北 4	3.39	5.08
河南 1	1.49	3.02
河南 2	0.31	0.98
河南 3	0.45	2.86
山东	2.14	5.41
江西	2.72	5.91
广西	2.62	4.59

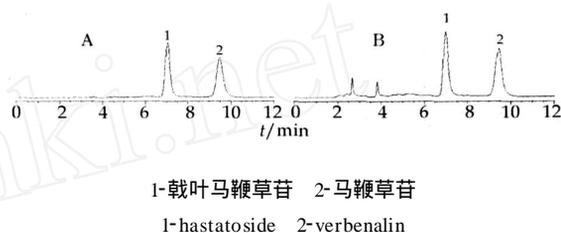


图 1 对照品(A)及样品(B)色谱图
Fig. 1 Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

成分的定量能够更好地监控药材的质量。

3.3 戟叶马鞭草苷与马鞭草苷在 238 nm 附近有强吸收,因此本实验采用 UV 检测器,测定样品中的戟叶马鞭草苷与马鞭草苷的量。结果表明,马鞭草中的戟叶马鞭草苷与马鞭草苷能够获得很好的分离,且分离度及重现性均令人满意,提示可用于马鞭草药材的质量监控。

3.4 关于提取方法和提取溶剂,实验过程中不同质量浓度(20%、40%、60%、80%、100%) 甲醇的提取率进行了比较,结果显示 80% 甲醇提取率最高,因此选用 80% 甲醇作为提取溶剂;并且对不同超声提取时间(15、30、45、60 min)进行了考察,结果表明 45 min 时戟叶马鞭草苷和马鞭草苷的质量浓度不再增加,即能达到最大的提取量,因此确定将样品超声处理 45 min;超声处理和回流提取也进行了比较,比前者为佳,最后选定样品用 20 倍 80% 甲醇超声处理 45 min 进行样品制备。

3.5 从样品的检测结果来看,各产地之间戟叶马鞭草苷和马鞭草苷的量的差异较大,有必要对药材的产地、采集、加工和贮存进行跟踪检测,以保证马鞭草药材的质量和药效稳定。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
[2] 张涛,谢虹,李万. 马鞭草提取物抗大鼠早孕作用的

- 研究 [J]. 中国中医药科技, 2001, 8(1): 30-33.
- [3] 张涛, 李力, 阮金兰. 马鞭草化学成分对大鼠离体子宫平滑肌条作用的研究 [J]. 中国中医药科技, 2001, 8(5): 313-315.
- [4] 卫生部药品标准中药成方制剂 [S]. 第六册, 第九册, 第十九册. 1994.
- [5] 桂承会, 唐人九. 马鞭草镇咳有效成分的研究 [J]. 中药通报, 1985, 10(10): 35.
- [6] Teborg D, Peter J. Iridoid glucosides from *Penstemon nitidus* [J]. *Planta Med*, 1991, 57: 184-187.
- [7] 张涛, 阮金兰, 吕子敏. 马鞭草环烯醚萜苷类成分的研究 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 721-723.

HPLC-UV 法测定通光藤药材中通光藤皂苷 A

马尧, 赵陆华*, 肖望书, 李琼*

(中国药科大学 分析测试中心, 江苏 南京 210009)

通光藤又名乌骨藤、通关藤等, 系萝藦科牛奶菜属植物通光散 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎, 主产于云南、贵州等地, 具有清热解毒、止咳平喘、消炎镇痛等功效。现代药理学研究表明, 通光藤独特的 C₂₁ 甾体衍生物 (主要是 C₂₁ 甾体皂苷) 具有显著的抗肿瘤活性; 通光藤皂苷提取物对人胃癌细胞 MKN28、人结肠腺癌细胞 LoVo 均有显著的抑制作用^[1,2]。由其研制而成的单方制剂“消癌平”, 对小鼠体内移植性实体瘤 S₁₈₀、P388 也有明显抑制作用^[3,4]。

有文献曾报道对通光藤中主要药效成分通光藤皂苷 A、G (tenacisside A、tenacisside G) 等的 HPLC-ELSD 研究^[5], 但关于通光藤皂苷 A 的 HPLC-UV 测定法目前尚未见报道。鉴于 HPLC-ELSD 法的重现性差, 以及 HPLC-UV 分析法的普及率高, 建立了通光藤皂苷 A 的 HPLC-UV 测定法, 并比较了 9 个不同产地药材以及药材不同部位中通光藤皂苷 A 的量, 为通光藤药材的质量控制提供了简单、可行的方法和依据。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AD VP 高效液相色谱仪, 岛津 SPD-10A VP 紫外检测器, 浙江大学 N2000 色谱工作站。

通光藤药材分别由南京圣和制药有限公司 (药材产自云南金平) 和云南医药公司提供, 共 9 个不同产地, 经中国药科大学宋学华教授鉴定为正品。通光藤皂苷 A 对照品自制 (经 MSⁿ、¹H-NMR、¹³C-NMR 确定其化学结构, 经 HPLC-DAD 测定, 归一化法计算质量分数 > 98%)。乙腈购自 TEDIA 公

司, 甲醇为色谱纯, 水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Alltech C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (38:62); 检测波长: 220 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL; 灵敏度: 0.1 AUFS。

在上述色谱条件下, 通光藤皂苷 A 峰形良好, 与其他组分的分离度大于 1.5, 色谱图见图 1。

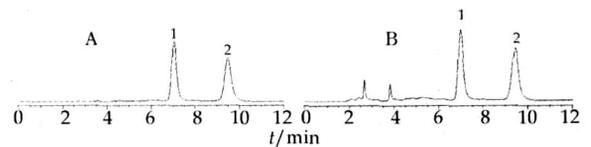


图 1 通光藤皂苷 A 对照品 (A) 和通光藤药材 (南京圣和制药) (B) 的 HPLC-UV 色谱图

Fig. 1 HPLC-UV Chromatograms of tenacisside A to reference substances (A) and sample of *M. tenacissima* (Shenghe) (B)

2.2 对照品溶液的制备: 取干燥至恒重的通光藤皂苷 A 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度为 2.04 mg/mL 的对照品储备液; 临用前精密量取适量, 加甲醇制成 0.51 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 通光藤药材, 粉碎, 取 2 g, 准确称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 加 70% 甲醇 50 mL 浸泡 30 min, 回流 1 h, 放冷, 滤过; 药渣加 70% 甲醇 50 mL 再回流 1 h, 放冷, 滤过, 合并 2 次滤液; 滤液水浴蒸干, 残渣加乙腈溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察: 精密量取通光藤皂苷 A 对照品储备液 0.05、0.1、0.2、0.5、1、1.5 mL 于 2 mL 量

* 收稿日期: 2008-08-02

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2005100)

作者简介: 马尧 (1984—), 男, 江西铜鼓人, 中国药科大学药物分析专业硕士研究生, 研究方向为中药分析。

E-mail: franklinxinzhe@hotmail.com

* 通讯作者 赵陆华 Tel: (025) 83271185 E-mail: luhuaazhaocpu@hotmail.com