

HPLC 法测定独一味根中环烯醚萜苷和苯乙醇苷

潘正¹, 高运玲¹, 张涛², 邓杰²

1. 重庆邮电大学生物信息学院, 重庆 400065

2. 重庆医药工业研究院有限责任公司, 重庆 400061

摘要: 目的 建立 HPLC 法, 同时测定独一味根中 4 种环烯醚萜苷胡麻属苷、山梗苷甲酯、7, 8-dehydropenstemoside、8-O-乙酰山梗苷甲酯和 2 种苯乙醇苷连翘酯苷、毛蕊花糖苷。方法 采用高效液相色谱法, Waters Symmetry 柱 (100 mm×3.5 mm, 3.5 μm), 柱温 25 ℃, 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 235、332 nm。结果 胡麻属苷在 0.236~1.410 μg、山梗苷甲酯在 0.440~2.640 μg、7, 8-dehydropenstemoside 在 0.094~0.564 μg、8-O-乙酰山梗苷甲酯在 0.750~4.500 μg、连翘酯苷在 0.698~4.180 μg、毛蕊花糖苷在 0.455~2.730 μg 线性关系良好, 回收率均在 96.75%~103.97%, RSD 均小于 2%。结论 此方法同时测定了独一味根中 6 种化学成分, 方法分离度好, 快速, 简便, 结果稳定。

关键词: 独一味根; 环烯醚萜苷; 胡麻属苷; 苯乙醇苷; 连翘酯苷; 毛蕊花糖苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)02-0279-03

HPLC determination of iridoid glycosides and phenylethanoid glycosides in roots of *Lamiophlomis rotata*

PAN Zheng¹, GAO Yun-ling¹, ZHANG Tao², DENG Jie²

1. College of Bio-Information, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China

2. Chongqing Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Chongqing 400061, China

Key words: the roots of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo; iridoid glycosides; sesamoid; phenylpropanoid glycosides; forsythoside B; verbascoside

独一味为唇形科植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的干燥地上部分^[1-2]。《中国药典》2010 年版一部收载以山梗苷甲酯和 8-O-乙酰山梗苷甲酯为对照, HPLC 法测定了独一味及其胶囊。独一味中主要含有环烯醚萜苷类和苯乙醇苷类成分^[3-4], 其中环烯醚萜苷类具有很好的止血、促凝血作用, 是止血活性成分^[5]; 苯乙醇苷类成分具有抗炎、抗氧化活性^[6-7]。本实验采用 HPLC-梯度洗脱法, 测定独一味根中 4 种环烯醚萜苷胡麻属苷、山梗苷甲酯、7, 8-去氢钩钟柳苷 (7, 8-dehydropenstemoside)^[8]、8-O-乙酰山梗苷甲酯和 2 种苯乙醇苷连翘酯苷、毛蕊花糖苷, 为更好地保证药材质量提供了有益的参考。

1 仪器与材料

Waters1525 高效液相色谱仪, 2996PDA 检测器, 717 Sampler 自动进样器, MILLIQ 纯水机, Buchi

旋转蒸发仪, Sartorius CP224S 电子天平。

独一味的根由市场购买, 经重庆邮电大学生物信息学院刘毅副教授鉴定为唇形科植物独一味 *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo 的干燥根; 胡麻属苷、山梗苷甲酯、7, 8-dehydropenstemoside、8-O-乙酰山梗苷甲酯、连翘酯苷、毛蕊花糖苷对照品均为本实验室自制, 经 HPLC 面积归一化法计算质量分数分别为 99.87%、99.01%、98.25%、98.63%、98.06%、98.12%, UV、NMR 光谱测试确认其结构; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Symmetry 柱 (100 mm×3.5 mm, 3.5 μm), 柱温 25 ℃, 流动相为甲醇 (A)-水 (B), 梯度洗脱 (0~8 min, 12%~15% A; 8~11 min, 15%~27% A; 11~15 min, 27% A; 15~

收稿日期: 2010-06-10

基金项目: 重庆市教委科学技术研究基金资助项目 (KJ080504)

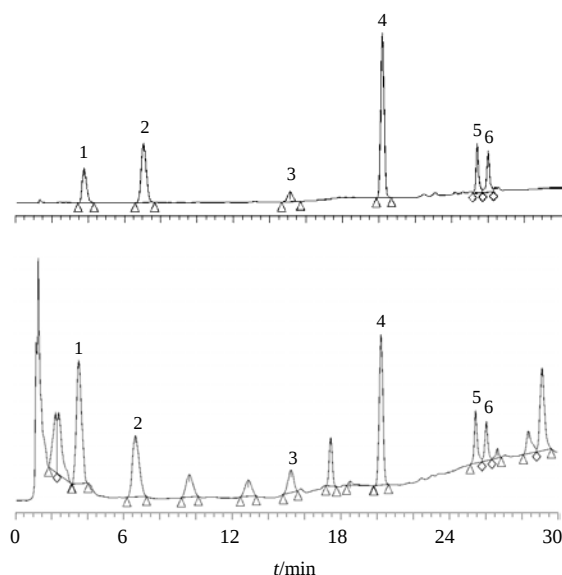
作者简介: 潘正 (1976—), 男, 河南临颍人, 讲师, 研究方向为中药成分的分离纯化及质量控制。

Tel: (023)62461884 E-mail: panzhengbusiness@yahoo.com.cn

18 min, 27%~40% A; 18~25 min, 40%~48% A; 25~27 min, 60%甲醇); 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 235、332 nm。

2.2 系统适应性及专属性试验

分别取对照品溶液、供试品溶液各 5 μ L 进样, 记录色谱图见图 1。以胡麻属苷计, 理论塔板数大于 1 500, 两峰的分离度 ≥ 1.5 。



1-胡麻属苷 2-山柰苷甲酯 3-7, 8-dehydropenstemoside
4-8-O-乙酰山柰苷甲酯 5-连翘酯苷 6-毛蕊花糖苷
1- sesamside 2- shanzhiside methyl methyl ester
3-7, 8-dehydropenstemoside 4- 8-O-acetylshanzhiside methyl ester
5- forsythoside B 6- verbascoside

图1 对照品(A)和独一味根(B)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and roots of *L. rotata* sample (B)

2.3 标准曲线的制备

精密称取经五氧化二磷减压干燥 24 h 的胡麻属苷、山柰苷甲酯、7, 8-dehydropenstemoside、8-O-乙酰山柰苷甲酯、连翘酯苷、毛蕊花糖苷对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 0.472、0.880、0.188、1.50、1.395、0.910 mg/mL 的混合对照品溶液。

精密量取上述对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL, 分别置 5.0 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。分别进样 5 μ L, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标进行线性回归, 得各成分回归方程, 见表 1。由于系统误差, 标准曲线未过原点, 所以采用外标两点法进行测定。

2.4 供试品溶液的制备

独一味根研细, 过 60 目筛, 精密称取细粉 0.5 g, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 加 70% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 20 min, 冷却, 用甲醇补充损失的质量, 滤过, 精密吸取续滤液 1.0 mL, 置 5.0 mL 量瓶中, 70% 甲醇定容, 摇匀, 用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5 精密度试验

取供试品溶液(批号 20090226), 连续进样 6 次, 每次 10 μ L, 记录峰面积, 计算质量分数, 结果胡麻属苷、山柰苷甲酯、7, 8-dehydropenstemoside、8-O-乙酰山柰苷甲酯、连翘酯苷、毛蕊花糖苷质量分数的 RSD 分别为 1.07%、1.87%、1.94%、1.42%、1.84%、1.73%。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液(批号 20090226)于 0、2、4、6、8、10 h 进样分析, 每次 10 μ L, 记录峰面积, 计算质量分数, 结果胡麻属苷、山柰苷甲酯、7, 8-dehydropenstemoside、8-O-乙酰山柰苷甲酯、连翘酯苷、毛蕊花糖苷质量分数的 RSD 分别为 1.08%、1.75%、1.82%、1.63%、1.14%、1.48%。结果表明供试品溶液中活性成分在 10 h 内稳定。

2.7 重现性试验

取同一批样品(批号 20090226)6 份, 制备供试品溶液, 进样, 测定峰面积, 计算质量分数, 结果胡麻属苷、山柰苷甲酯、7, 8-dehydropenstemoside、8-O-乙酰山柰苷甲酯、连翘酯苷、毛蕊花糖苷质量分数的 RSD 分别为 1.47%、1.78%、1.92%、1.84%、1.43%、1.15%。

表1 各成分的回归方程

Table 1 Regression equations of components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μ g
胡麻属苷	$Y = -1.53 \times 10^4 + 1.19 \times 10^6 X$	0.999 8	0.236~1.410
山柰苷甲酯	$Y = 6.20 \times 10^3 + 1.27 \times 10^6 X$	0.999 5	0.440~2.640
7, 8-dehydropenstemoside	$Y = -8.56 \times 10^3 + 1.06 \times 10^6 X$	0.999 5	0.094~0.564
8-O-乙酰山柰苷甲酯	$Y = -7.37 \times 10^4 + 1.41 \times 10^6 X$	0.999 6	0.750~4.500
连翘酯苷	$Y = -9.46 \times 10^4 + 6.12 \times 10^5 X$	0.999 5	0.698~4.180
毛蕊花糖苷	$Y = -7.31 \times 10^4 + 7.67 \times 10^5 X$	0.999 7	0.455~2.730

2.8 加样回收率试验

精密吸取独一味样品 (批号 20090226), 6 份, 分别精密加入混合对照品溶液 1.0 mL, 制备供试品溶液, 进样 5.0 μL , 测定峰面积, 计算回收率, 结果胡麻属苷、山梔苷甲酯、7, 8-dehydropenstemoside、8-O-乙酰山梔苷甲酯、连翘酯苷、毛蕊花糖苷的平均回收率分别为 96.75%、103.21%、103.77%、

99.85%、103.97%、97.61%, RSD 分别为 1.86%、1.77%、1.98%、1.59%、1.73%、1.55%。

2.9 样品测定

取独一味样品, 制备供试品溶液, 分别精密吸取 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积积分值, 用外标法测定样品中环烯醚萜苷和苯乙醇苷, 结果见表 2。

表 2 独一味根中胡麻属苷、山梔苷甲酯、7, 8-dehydropenstemoside、8-O-乙酰山梔苷甲酯、连翘酯苷、毛蕊花糖苷的测定 ($n=3$)

Table 2 Determination of sesamoid, shanzhiside methyl ester, 7, 8-dehydropenstemoside, 8-O-acetylshanzhiside methyl ester, forsythoside B, and verbascoside in roots of *L. rotate* ($n=3$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	胡麻属苷	山梔苷甲酯	7, 8-dehydropenstemoside	8-O-乙酰山梔苷甲酯	连翘酯苷	毛蕊花糖苷
20090201	7.908	3.512	—	3.610	13.87	7.258
20090226	4.302	2.330	0.151	1.325	14.21	6.740
20090305	6.389	2.818	0.368	1.157	19.17	8.023

3 讨论

研究表明独一味总环烯醚萜苷类成分具有很好的止血、促凝血作用, 是其中的止血活性成分, 李茂星等^[9]采用 UV 法对独一味药材中总环烯醚萜苷类进行了测定, 结果显示药材中总环烯醚萜苷类量最高, 可达 12.5%。刘婕等^[10]采用 HPLC 法测定了独一味中苯乙醇苷类成分叶升麻苷。张凤^[11]通过 HPLC 法测定了不同产地的独一味中连翘酯苷和毛蕊花糖苷。在参考上述研究的基础上, 本实验采用 HPLC 法对独一味根中的 4 个环烯醚萜苷和 2 个苯乙醇苷类进行测定, 对独一味药材的整体质量评价具有更切实际的指导意义。

考察了乙腈-水、乙腈-0.4%磷酸水、甲醇-水、甲醇-0.4%磷酸水 4 种流动相, 并尝试了这 4 种流动相的多种线性梯度洗脱, 结果表明甲醇-水系统最佳, 并进行了梯度洗脱条件的优化。采用该系统得到的各个色谱峰的峰形和分离度都较好, 基线稳定。因此选用该系统为独一味根测定的流动相。

参考文献

[1] 刘 婕, 许 浚, 张铁军. 独一味中洋丁香苷和连翘酯苷 B 对照品的制备 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1905-1907.

[2] 张 凤, 孙连娜, 陈万生. 独一味的化学成分及药理作用 [J]. 药学实践杂志, 2008, 26(3): 169-171.
 [3] 樊鹏程, 李茂星, 贾正平, 等. RP-HPLC 同时测定不同产地独一味药材中 4 种环烯醚萜苷 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 483-485.
 [4] 王 煜, 张智艳, 程明和, 等. 独一味化学成分研究进展与临床应用 [J]. 药学实践杂志, 2006, 24(2): 73-76.
 [5] 贾正平, 李茂星, 张汝学, 等. 独一味止血有效部位的实验研究 [J]. 解放军药学学报, 2005, 21(4): 272-274.
 [6] Emanuela M, Emanuela E, Rosanna D P, et al. Effects of verbascoside biotechnologically produced by *Syringa vulgaris* plant cell cultures in a rodent model of colitis [J]. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, 2009, 380(1): 79-94.
 [7] Haddad J J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox (y)-sensitive transcription factors [J]. *Cell Signal*, 2002, 14(11): 879-897.
 [8] 易进海, 黄小平, 陈 燕, 等. 藏药独一味根环烯醚萜苷的研究 [J]. 药学学报, 1997, 32(5): 357-360.
 [9] 李茂星, 贾正平, 胡之德. 藏药独一味中总环烯醚萜苷的含量测定 [J]. 华西药学杂志, 2007, 22(2): 208-210.
 [10] 刘 婕, 许 浚, 张铁军. HPLC 法测定独一味中类叶升麻苷 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 166-168.
 [11] 张 凤, 孙连娜, 陈万生. 不同产地独一味中苯乙醇苷类的含量测定与品质评价 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1346-1347.