

HPLC 测定续断中马钱苷酸、马钱苷和当药苷的量

张 芬^{1,2}, 黄文华², 孙欣光², 郭宝林^{2*}, 陈安家^{1*}

1. 山西医科大学, 山西 太原 030001

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定续断中马钱苷酸、马钱苷和当药苷的分析方法, 通过对多个产地续断的分析, 完善续断药材的质量评价方法。方法 Venusil MP C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 0.1% H₃PO₄ (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱: 0~10 min, 8%~9% B; 10~30 min, 9%~11% B; 30~36 min, 11%~100% B; 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 ℃。结果 马钱苷酸、马钱苷和当药苷得到很好分离, 并分别在 18.4~368.2、2.02~40.4、17.5~349.6 μg/mL 内线性关系良好; 提取方法的回收率分别为 99.34%、99.19%、101.61%。结论 马钱苷酸、当药苷和马钱苷为续断中的主要环烯醚萜苷类成分, 同时测定续断中 3 种环烯醚萜苷类成分的方法简便、快捷。各主产地续断中马钱苷酸、当药苷和马钱苷的范围分别为 20.4~186.8、26.4~177.7 和 1.9~13.2 mg/g, 3 个成分之和在不同样品之间变化不大, 建议作为续断药材质量控制标准。

关键词: 续断; HPLC; 环烯醚萜苷; 马钱苷酸; 当药苷; 马钱苷

中图分类号: R286.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)17-2632-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.17.021

Determination of loganic acid, chiratin, and loganin in *Dipsaci Radix*

ZHANG Fen^{1,2}, HUANG Wen-hua², SUN Xin-guang², GUO Bao-lin², CHEN An-jia¹

1. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of loganic acid, chiratin, and loganin in *Dipsaci Radix* and improve the quality evaluation by analyzing *Dipsaci Radix* from different habitats. **Methods** The analysis was performed on Venusil MP C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of 0.1% H₃PO₄-acetonitrile for gradient elution: 0—10 min, 8%—9% B; 10—30 min, 9%—11% B; 30—35 min, 11%—100% B. The flow rate was 1 mL/min and the column temperature was 25 ℃. **Results** The results showed that loganic acid, chiratin, and loganin were well separated with the good linearity in 18.4—368.2, 2.02—40.4, and 17.5—349.6 μg/mL, respectively. The average recoveries of the three iridoid glycosides were 99.34%, 99.19%, and 101.61%. **Conclusion** Loganic acid, chiratin, and loganin are the main iridoid glycosides in *Dipsaci Radix*. The method can easily be applied to the content determination of loganic acid, chiratin, and loganin in *Dipsaci Radix* quickly. The content ranges of loganic acid, chiratin, and loganin are 20.4—186.8, 26.4—177.7, and 1.9—13.2 mg/g, respectively, and the sum of the three iridoid glycosides shows no significant differences in various *Dipsaci Radix* from different habitats, and proposes to evaluate the quality of *Dipsaci Radix*.

Key words: *Dipsaci Radix*; HPLC; iridoid glycosides; loganic acid; loganin; chiratin

续断为川续断科植物川续断 *Dipsacus asper* 血脉、利关节、破癰、止痛解毒的功效^[1]。续断主产于四川、湖北、云南、贵州等省。续断中的化学

收稿日期: 2014-12-16

基金项目: 国家科技重大专项资助项目 (2011ZX09201-201-05); 中国医学科学院药用植物研究所创新团队发展计划资助项目

作者简介: 张 芬, 女, 硕士在读, 研究方向为药物分析。Tel: 15311326861 E-mail: zhangfenny@163.com

*通信作者 郭宝林, 女, 研究员, 博士, 研究方向为中药资源、鉴定、栽培和药材质量。E-mail: guobaolin010@163.com

陈安家, 男, 教授, 硕士导师, 从事药物分析学研究。E-mail: chenanjia888@163.com

成分主要有三萜皂苷类、环烯醚萜苷类、木脂素类等^[2-3]。目前,《中国药典》2010年版用续断皂苷VI的量控制川续断药材的质量,刘京晶等^[4]测定了续断中3种皂苷的量,发现续断皂苷X和续断皂苷XII在药材中的量也比较高,曹桂侠等^[5]采用HPLC法测定了续断饮片中马钱苷的量。本课题组发现,马钱苷酸(loganic acid)、当药苷(chiratin)和马钱苷(loganin)为续断中高质量分数环烯醚萜苷类成分,本实验建立了HPLC测定续断药材中这3个成分的方法,并通过测定四川、贵州、云南、湖北等主产地药材的3成分的量,考察环烯醚萜苷类成分在不同产地续断药材中的质量分数状况。

1 仪器与材料

Perkin Elmer 高效液相色谱仪;KQ-250DB 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AL204-IC 电子分析天平、XS105 型电子天平(METTLER TOLEDO 公司)。

马钱苷酸对照品(批号 MUST-13042501)购自成都曼思特生物科技有限公司,质量分数为98%;当药苷对照品(批号 111742-200501)购自中国食品药品检定研究院;马钱苷(为实验室自制,HPLC 质量分数>98%)。乙腈(色谱纯,Honeywell),甲醇(分析纯,北京化工厂),磷酸(分析纯,北京红星化工厂),水(纯净水,娃哈哈)。

所有药材样品采自产地或购自药材市场,由中国医学科学院药用植物研究所郭宝林研究员鉴定为川续断 *Dipsacus asper* Wall. ex Henry 的根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Venusil MP C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温 25 ℃,检测波长为 235 nm,体积流量 1.0 mL/min,进样量 20 μL,流动相与洗脱条件:流动相 A 为 0.1% H₃PO₄,流动相 B 为乙腈;梯度洗脱:0~10 min, 8%~9% B;10~30 min, 9%~11% B;30~36 min, 11%~100% B。色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的配制 分别精密称取马钱苷酸、马钱苷、当药苷对照品 3.652、2.020、2.185 mg,分别配制成 1.841、0.202、0.874 mg/mL 的对照品溶液母液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取药材细粉约 0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%乙醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 100 W,频率 40

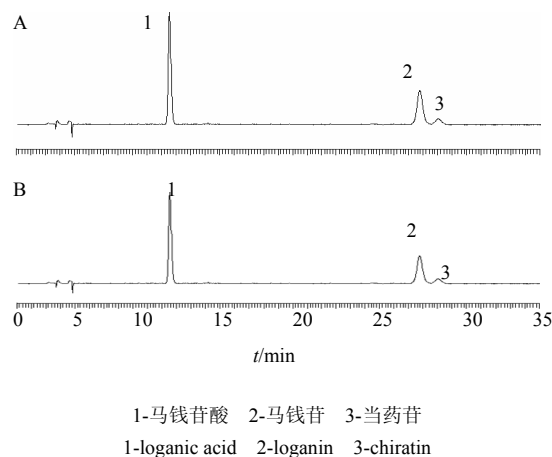


图1 混合对照品(A)和续断样品(B)的HPLC图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and *Dipsaci Radix* sample (B)

kHz) 30 min, 放冷,再称定质量,用 50%乙醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取滤液即得。

2.3 线性关系考察

精密吸取上述对照品溶液母液配制马钱苷酸质量浓度分别为 18.4、36.8、92.0、138.0、184.0、368.2 μg/mL;当药苷质量浓度分别为 17.5、34.9、87.4、131.1、174.8、349.6 μg/mL;马钱苷质量浓度分别为 2.0、4.0、10.1、15.2、20.2、40.4 μg/mL。过 0.45 μm 微孔滤膜,按“2.1”项下色谱条件进样。以对照品溶液的质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。回归方程分别为马钱苷酸: $Y = 2.4 \times 10^7 X - 7.9 \times 10^5$, 线性范围 18.4~368.2 μg/mL, $R^2 = 0.9991$;当药苷: $Y = 1.4 \times 10^7 X - 1.6 \times 10^5$, 线性范围 17.5~349.6 μg/mL, $R^2 = 0.9991$;马钱苷 $Y = 1.4 \times 10^8 X - 6.7 \times 10^5$, 线性范围 2.02~40.4 μg/mL, $R^2 = 0.9993$ 。

2.4 精密度试验

取一定质量浓度的混合对照品溶液(马钱苷酸 1.841 mg/mL、当药苷 0.874 mg/mL、马钱苷 0.202 mg/mL),在“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱峰面积,计算马钱苷酸、当药苷和马钱苷峰面积的 RSD 分别为 0.48%、0.38%、0.99%;连续进样 3 d,每天 6 次,记录峰面积,以上 3 种指标成分日间 RSD 分别为 0.78%、0.73%、1.40%,表明精密密度良好。

2.5 稳定性试验

取供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h

按“2.1”项下色谱条件测定,测定峰面积。结果马钱苷酸、当药苷和马钱苷的 RSD 分别为 0.93%、3.55%、2.08%,结果表明,供试品溶液中马钱苷酸、当药苷和马钱苷在室温条件下 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验

制备供试品溶液 6 份,按“2.2.2”项下方法操作,平行制备供试品溶液,在“2.1”项下色谱条件下测定,记录色谱峰面积,结果马钱苷酸、当药苷和马钱苷的质量分数的 RSD 分别为 1.36%、4.95%、3.67%,表明重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取样品 6 份,每份 0.25 g,分别加入与供试品中质量分数相等的马钱苷酸、当药苷、马钱苷对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样,记录色谱峰峰面积,计算回收率。结果马钱苷酸、当药苷、马钱苷的平均回收率分别为 99.34%、99.19%、101.61%,RSD 分别为 1.12%、1.35%、2.66%。

2.8 样品测定

对不同产地的续断样品按上述供试品溶液制备方法和色谱条件进行测定和计算,结果见表 1。

表 1 不同产地续断药材中环烯醚萜苷类成分的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of iridoid glycosides in *Dipsaci Radix* from different habitats ($n=3$)

编号	产地	采购时间/年	马钱苷酸/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	当药苷/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	马钱苷/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	总量/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	湖北恩施	2009	121.8	137.3	15.4	274.5
2	湖北恩施	2009	34.1	26.4	4.6	65.1
3	云南大理	2009	35.1	177.7	1.9	214.7
4	云南大理	2009	109.6	151.0	3.9	264.5
5	云南大理	2009	85.0	120.6	3.9	209.5
6	四川越西	2009	83.1	122.9	4.8	210.8
7	四川	2009	166.0	59.8	12.2	238.0
8	四川	2009	178.2	51.9	13.2	243.3
9	四川	2009	174.5	64.3	12.2	251.0
10	贵州龙里	2011	186.8	79.3	9.8	275.9
11	贵州龙里	2011	178.7	57.9	10.5	247.1
12	贵州龙里	2011	20.4	32.6	3.5	56.5
13	贵州龙里	2011	89.5	127.8	4.8	222.1

3 讨论

3 种环烯醚萜苷类化合物马钱苷酸最大紫外吸收波长为 233 nm,当药苷最大紫外吸收波长为 245 nm,马钱苷最大紫外吸收波长为 238 nm,综合采用 235 nm 为检测波长。流动相添加磷酸后的色谱峰分离度较好,故选择 0.1%磷酸水、乙腈作为流动相。

从本实验所测的 13 份药材的量可以看到,续断药材中马钱苷酸和当药苷的范围分别为 20.4~186.8 $\mu\text{g/g}$ 和 26.4~177.7 $\mu\text{g/g}$,而马钱苷的量稍低,范围为 1.9~13.2 $\mu\text{g/g}$ 。在药材中,或者马钱苷酸是量最高成分,或者当药苷的量最高,如在 3 个产于云南的样品中,当药苷明显高于马钱苷酸,但是在其他产地规律不甚明显。除去 2 份量很低的样品,其他样品中 3 个成分的总和差异不大,总量范围为 0.209 5~0.275 9 mg/g。建议马钱苷酸、马钱苷和当

药苷 3 个成分的总量作为控制续断中环烯醚萜苷类成分的质量标准。本实验的样品来源有限,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 杜伟锋,贾永强,姜东京,等. 基于 HPLC-ESI-MS 法续断发汗前后的成分分析 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3251-3255.
- [3] 孙欣光,黄文华,郭宝林. 续断的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 459-464.
- [4] 刘京晶,郭宝林,黄文华,等. HILIC-HPLC 测续断药材中多种皂苷含量 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2367-2371.
- [5] 曹桂侠,汪秀月,焦 坤. 高效液相色谱法测定续断饮片 中马钱苷的含量 [J]. 安徽医药, 2013, 17(5): 768-769.