

RP - HPLC 同时测定沙苁蓉中 3 种苯乙醇苷的含量*

马志国^{1 2}, 甘稳城¹

(1. 暨南大学 药学院, 广州 510632; 2. 暨南大学 中药药效物质基础及创新药物研究广东省高校重点实验室, 广州 510632)

摘要 目的: 建立 RP - HPLC 同时测定沙苁蓉中毛蕊花糖苷、金石蚕苷和 2'-乙酰基金石蚕苷含量的方法。方法: 采用 Agilent TC - C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱, 柱温 30 ℃; 流动相为甲醇(A) - 0.1% 甲酸(B), 梯度洗脱(0 min 35% A; 30 min 50% A), 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 330 nm。结果: 在上述色谱条件下, 毛蕊花糖苷、金石蚕苷和 2'-乙酰基金石蚕苷获得良好分离; 进样浓度分别在 0.0214 ~ 0.856 mg · mL⁻¹ (r = 0.9998)、0.1034 ~ 4.136 mg · mL⁻¹ (r = 0.9999)、0.0996 ~ 3.984 mg · mL⁻¹ (r = 0.9999) 范围内呈良好的线性关系; 平均加样回收率 (n = 6) 分别为 98.4%、101.0%、98.2%; 精密度的 RSD (n = 6) 小于 0.33%; 重复性试验的 RSD (n = 6) 小于 2.2%。结论: 该方法简便、准确, 重复性好, 为沙苁蓉的质量控制提供可借鉴的分析方法。

关键词: RP - HPLC; 沙苁蓉; 苯乙醇苷; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2011)06 - 1084 - 04

RP - HPLC simultaneous determination of three phenylethanoid glycosides in *Cistanche sinensis* G. Beck*

MA Zhi - guo^{1 2}, GAN Wen - cheng¹

(1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM & New Drugs Research, Guangzhou 510632, China)

Abstract Objective: To simultaneous determine the contents of acteoside, poliumoside and 2'-acetylpoliumoside in rhizome of *Cistanche sinensis* G. Beck by RP - HPLC. **Methods:** An external standard method by RP - HPLC with an Agilent TC - C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm) column at the temperature 30 ℃. The mobile phase consisted of methanol(A) - 0.1% aqueous methanoic acid(B) with the gradient elution(0 min 35% A; 30 min 50% A) at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The absorbance was monitored 330 nm. **Results:** Acteoside, poliumoside and 2'-acetylpoliumoside were well separated by this method. Linearities of acteoside, poliumoside and 2'-acetylpoliumoside were good in the ranges of 0.0214 - 0.856 mg mL⁻¹ (r = 0.9998), 0.1034 - 4.136 mg mL⁻¹ (r = 0.9999), 0.0996 - 3.984 mg mL⁻¹ (r = 0.9999) respectively. The average recoveries (n = 6) of three phenylethanoid glycosides were 98.4%, 101.0%, 98.2% respectively. All of RSDs of precision (n = 6) and repeatability (n = 6) were less than 0.33% and 2.2%. **Conclusion:** The method is simple, accurate, reproducible and can be used for quality control of *Cistanche sinensis* G. Beck.

Key words: RP - HPLC; *Cistanche sinensis* G. Beck; phenylethanoid glycosides; assay

中药肉苁蓉为常用补肾壮阳药物,我国有肉苁蓉属(*Cistanche*)植物 4 种 1 变种^[1],包括荒漠肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Ma)、管花肉苁蓉 [*Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight]、盐生肉苁蓉 [*Cistanche salsa* (C. A. Mey) G. Beck]、沙苁蓉 [*Cistanche sinensis* G. Beck]和 白花盐苁蓉 [*Cistanche salsa* var. *albi-*

flora P. F. Tu et Z. C. Lou, var. nov.],中国药典 2010 年版一部肉苁蓉项下收载荒漠肉苁蓉和管花肉苁蓉为正品入药^[2],近年来由于肉苁蓉药材紧缺,商品药材市场较为混乱,经笔者调查,在部分地区商品肉苁蓉饮片中,将沙苁蓉充当肉苁蓉流通和使用的现象最为普遍。而对肉苁蓉属植物进行苯乙醇苷类成

* 国家自然科学基金项目(No. 30902001); 暨南大学 211 项目
第一作者 Tel: (020) 85223784; E - mail: mzg79@hotmail.com

分的指纹图谱分析表明^[3],沙苁蓉与本属其他种有明显的区别,沙苁蓉与荒漠肉苁蓉相似度仅为0.053,沙苁蓉中的主要成分金石蚕苷、2'-乙酰基金石蚕苷在正品肉苁蓉中未检测到,而正品肉苁蓉中的主要成分松果菊苷在沙苁蓉中含量极低。因此,有必要对沙苁蓉进行进一步的质量研究,探讨其作为肉苁蓉代用品的科学性。

文献报道^[3,4],沙苁蓉化学成分主要为苯乙醇苷类、环烯醚萜苷类以及多糖类化合物,苯乙醇苷类化合物是其中最重要的一类活性成分,其中毛蕊花糖苷有促血管舒张活性^[5]、雌激素/抗雌激素样作用^[6]及抗炎活性^[7],金石蚕苷具有抗氧化活性^[8,9]及神经保护作用^[10]。本实验采用RP-HPLC对沙苁蓉中毛蕊花糖苷、金石蚕苷、2'-乙酰基金石蚕苷3个苯乙醇苷类成分的含量进行测定,结果表明本方法可使3个成分得到较好分离,并且简便准确,重复性好,可用于沙苁蓉中这3种成分的含量测定。

1 仪器与试剂

Agilent 1200型高效液相色谱仪,DAD检测器,四元低压梯度泵,在线真空脱气机,自动进样器,柱温箱。

甲醇(江苏汉邦科技有限公司)为色谱纯,实验用水为纯净水(华润怡宝食品饮料有限公司),其他试剂均为分析纯。

毛蕊花糖苷、金石蚕苷和2'-乙酰基金石蚕苷为实验室自制(利用¹H NMR、¹³C NMR、MS等波谱技术鉴定了化学结构),HPLC检出纯度均大于98%。沙苁蓉购自广东省、山东省共10家不同的药店,经中国中医科学院中医药发展研究中心图雅教授鉴定为*Cistanche sinensis* G. Beck的干燥肉质茎。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 取对照品毛蕊花糖苷、金石蚕苷和2'-乙酰基金石蚕苷适量,精密称定,加50%甲醇制成每1 mL含毛蕊花糖苷、金石蚕苷、2'-乙酰基金石蚕苷分别为1.07、5.17、4.98 mg的混合溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液 取干燥沙苁蓉药材粉末(65

目)1 g,精密称定,加70%甲醇溶液50 mL,浸泡30 min后,超声(250 W,40 kHz)提取30 min,放冷后加70%甲醇补足减失的重量,滤过,取续滤液以0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2 色谱条件 采用Agilent TC-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱,柱温30 °C;流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸(B),梯度洗脱(0 min,35% A;30 min,50% A),流速1.0 mL·min⁻¹;检测波长330 nm。在该条件下,沙苁蓉中3种成分的色谱图见图1。

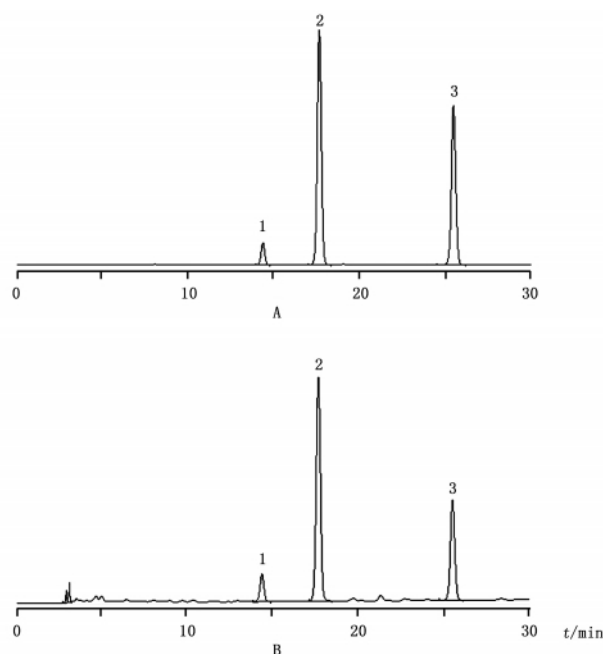


图1 3种苯乙醇苷对照品(A)和9号样品(B)HPLC图
Fig 1 Chromatograms of three phenylethanoid glycosides mixed reference standards(A) and *Cistanche sinensis* sample No. 9(B)

1.毛蕊花糖苷(acteoside) 2.金石蚕苷(poliumoside) 3.2'-乙酰基金石蚕苷(2'-acetylpoliumoside)

2.3 线性关系 精密吸取对照品储备液0.2、1、2、4、6、8 mL,分别置10 mL量瓶中,以50%甲醇稀释至刻度,摇匀,得不同浓度的对照品混合溶液,分别精密吸取10 μL按上述色谱条件进样测定色谱峰面积,以对照品进样浓度(mg·mL⁻¹)为横坐标,峰面积值为纵坐标,进行线性回归。结果表明各成分在各自进样范围内线性关系良好,见表1。

表 1 3 种苯乙醇苷的线性关系
Tab 1 Linear relationship of the 3 phenylethanoid glycosides

化合物 (component)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range) /mg · mL ⁻¹
毛蕊花糖苷(acteoside)	$Y = 1.347 \times 10^4 X - 9.716$	0.9998	0.0214 ~ 0.856
金石蚕苷(poliumoside)	$Y = 1.289 \times 10^4 X + 251.7$	0.9999	0.1034 ~ 4.136
2'-乙酰基金石蚕苷(2'-acetylpoliumoside)	$Y = 1.295 \times 10^4 X + 109.9$	0.9999	0.0996 ~ 3.984

2.4 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL 按上述色谱条件连续进样 6 次,测定毛蕊花糖苷、金石蚕苷和 2'-乙酰基金石蚕苷峰面积积分值,计算 RSD 分别为 0.33%、0.14%、0.32%。结果表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品(4 号样品)溶液 10 μL,于制备后 0、2、4、8、12 h 分别进样测定毛蕊花糖苷、金石蚕苷和 2'-乙酰基金石蚕苷峰面积积分值,计算 RSD 分别为 2.1%、1.1%、0.97%。结果表明供试品溶液在 12 h 内测定稳定。

2.6 重复性试验 精密称取同一样品(4 号样品)6 份,照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进样 10 μL。测定计算毛蕊花糖苷、金石蚕苷和 2'-乙酰基金石蚕苷含量的平均值($n = 6$)分别为 0.308%、3.10%、2.44%; RSD 分别为 2.2%、0.99%、1.5%。结果表明方法重复性较好。

2.7 加样回收率试验 取“2.6”项下已测知含量的沙苳蓉(4 号样品)粉末 6 份,每份约 0.5 g,精密称定。分别精密加入毛蕊花糖苷对照品溶液(0.38 mg · mL⁻¹)、金石蚕苷对照品溶液(3.88 mg · mL⁻¹)、2'-乙酰基金石蚕苷对照品溶液(3.04 mg · mL⁻¹)各 4.0 mL,再以 70% 甲醇补足至 50 mL,然后按“2.2”项下方法制备供试液,进样分析。毛蕊花糖苷、金石蚕苷和 2'-乙酰基金石蚕苷平均回收率($n = 6$)分别为 98.4%、101.0%、98.2%; RSD 分别为 1.5%、1.7%、1.2%。

2.8 样品的含量测定 分别称取不同药店购买的沙苳蓉粉末 1 g,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取混合对照品溶液(毛蕊花糖苷 0.214 mg · mL⁻¹、金石蚕苷 1.034 mg · mL⁻¹、2'-乙酰基金石蚕苷 0.996 mg · mL⁻¹)与供试品溶液各 10 μL 注入高效液相色谱仪测定,以外标法计算含量。结果见表 2。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化 为了在短时间内获得分离度好的色谱图,在以前实验的基础上,采用甲醇(A) - 0.1% 甲酸(B) 作为流动相对梯度洗脱程序进行

表 2 样品含量测定结果(% $n = 2$)

Tab 2 The results of sample determination

样品号 (sample No.)	毛蕊花糖苷 (acteoside)	金石蚕苷 (poliumoside)	2'-乙酰基金石蚕苷 (2'-acetylpoliumoside)
1	0.262	0.980	0.634
2	0.094	0.978	0.472
3	0.174	2.028	0.914
4	0.315	3.158	2.416
5	0.177	1.644	0.618
6	0.192	1.919	0.926
7	0.128	0.520	0.136
8	0.354	3.068	1.762
9	0.361	3.201	1.409
10	0.219	1.257	0.562

优选,曾选择“0 min 40% A; 45 min 55% A”梯度洗脱,结果待测成分保留时间均小于 20 min,基线不稳,分离度差,最终选择“0 min 35% A; 30 min 50% A”结果毛蕊花糖苷、金石蚕苷和 2'-乙酰基金石蚕苷 3 个成分均可获得良好的分离度和峰形。

3.2 测定波长的选择 通过测定毛蕊花糖苷、金石蚕苷和 2'-乙酰基金石蚕苷 3 种苯乙醇苷类成分的紫外吸收光谱图表明,3 种成分紫外吸收光谱图相似,均在 330 ~ 334 nm 有最大吸收,最终确定本试验的测定波长为 330 nm。

3.3 提取条件的选择 为了获得满意的提取效果,对提取溶剂和提取时间分别进行了优选。分别以 30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇和甲醇为提取溶剂,比较不同溶剂对提取效果的影响,结果表明 70% 甲醇提取效果最好。取相同量的样品粉末 3 份,加 70% 甲醇 50 mL,浸泡 30 min 后,分别超声提取 30、40、50 min,结果表明毛蕊花糖苷、金石蚕苷和 2'-乙酰基金石蚕苷 3 种成分在 30 min 内基本提取完全,因此选择提取时间为 30 min。

3.4 通过对不同药店购买的沙苳蓉中 3 个成分的含量测定表明,金石蚕苷为沙苳蓉中含量最高的成分,平均含量接近 1.9%; 其次为 2'-乙酰基金石蚕苷,平均含量接近 1.0%; 而毛蕊花糖苷含量最低,平均含量仅有 0.23%。通过比较不同药店购买的

沙苁蓉之间各成分的含量,表明2'-乙酰基金石蚕苷在不同药店购买的沙苁蓉中含量差异最大,接近18倍;金石蚕苷含量差异也有6倍,毛蕊花糖苷含量差异接近4倍,表明不同药店购买的沙苁蓉质量差别较大,通过对3个成分的含量控制则可以更加有效的评价沙苁蓉质量。

3.5 本课题组曾对荒漠肉苁蓉和管花肉苁蓉中的苯乙醇苷类成分进行含量测定^[11,12],结合本论文的试验结果表明,金石蚕苷和2'-乙酰基金石蚕苷为沙苁蓉中含量最高的2个成分,且为沙苁蓉的特有成分;毛蕊花糖苷为3种肉苁蓉共有的主要苯乙醇苷类成分,在管花肉苁蓉中平均含量最高(为1.72%),在荒漠肉苁蓉和沙苁蓉中的平均含量相当,分别为0.242%和0.228%;荒漠肉苁蓉和管花肉苁蓉中含量最高的成分均为松果菊苷,而沙苁蓉中几乎不含松果菊苷。通过以上比较,表明沙苁蓉与正品肉苁蓉所含的主要苯乙醇苷类成分种类、含量有明显区别,与文献报道结果^[3]基本一致,其能否代替肉苁蓉使用以及临床疗效和安全性方面仍有待于进一步研究。

3.6 本试验建立了RP-HPLC同时测定沙苁蓉中毛蕊花糖苷、金石蚕苷和2'-乙酰基金石蚕苷的分析方法,方法简便、准确、重复性好,可用于沙苁蓉中这3种成分的含量测定。

参考文献

- 1 TU Peng-fei(屠鹏飞), HE Yan-ping(何燕萍), LOU Zhi-cen(楼之岑). Survey and protection of medicinal resources of Desertliving Cistanche(*Cistanche deserticola*) (肉苁蓉类药源调查与资源保护). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1994, 25(4): 205
- 2 ChP(中国药典). 2010. Vol I(一部): 126

- 3 Jiang Y, Li SP, Wang YT, et al. Differentiation of Herba Cistanches by fingerprint with high-performance liquid chromatography - diode array detection - mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2156
- 4 Tu PF, Shi HM, Song ZH, et al. Chemical constituents of *Cistanche sinensis*. *J Asian Nat Prod Res* 2007, 9(1): 79
- 5 Yoshikawa M, Matsuda H, Morikawa T, et al. Phenylethanoid oligoglycosides and acylated oligosugars with vasorelaxant activity from *Cistanche tubulosa*. *Bioorg Med Chem* 2006, 14(22): 7468
- 6 Papoutsis Z, Kassi E, Mitakou S, et al. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006, 98(1): 63
- 7 Sahpaz S, Garbacki N, Tits M, et al. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol*, 2002, 79(3): 389
- 8 Tai BH, Jung BY, Cuong NM, et al. Total Peroxynitrite scavenging capacity of phenylethanoid and flavonoid glycosides from the flowers of *Buddleja officinalis*. *Biol Pharm Bull* 2009, 32(12): 1952
- 9 He ZD, Lau KM, Xu HX, et al. Antioxidant activity of phenylethanoid glycosides from *Brandisia hancei*. *J Ethnopharmacol* 2000, 71(3): 483
- 10 Koo KA, Sung SH, Park OH, et al. In vitro neuroprotective activities of phenylethanoid glycosides from *Callicarpa dichotoma*. *Planta Med* 2005, 71(8): 778
- 11 Ma ZG, Yang ZL, Li P, et al. Simultaneous determination of eight phenylethanoid glycosides in different species of the genus *cistanche* by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr Related Technol* 2008, 31(18): 2838
- 12 LI Cheng-hua(李承花), LIU Jing-hui(刘婧慧), XU Zhen-xia(徐珍霞), et al. RP-HPLC simultaneous determination of four phenylethanoid glycosides in *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight (RP-HPLC同时测定管花肉苁蓉中4种苯乙醇苷的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2010, 30(6): 1003

(本文于2011年5月7日修改回)