

成分疗效不明确。因此本实验采用不同的提取方法获得水提多糖和碱提多糖,为海螵蛸资源的深入研究及中成药的开发提供一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 郭一峰,冯伟华,焦炳华. 海螵蛸基础研究和临床应用[J]. 中药材 2007 30(8): 1042-1045.
- [2] 陈忻,袁毅桦,陈健飞. 从乌贼内壳提取 13-壳聚糖及其结构表征[J]. 食品科学 2004 25(1): 105-107.
- [3] 徐山,肖激文,邓朝晖. 复方海螵蛸片的研制及临床应用[J]. 中南药学 2004 2(1): 43-45.
- [4] 周蔚,吴海涛,李采. 海螵蛸作为组织工程支架材料的实验研究[J]. 复旦学报:医学版 2007 34(3): 438-441.
- [5] 王劲松,王艳,周培根. 海螵蛸凝血活性的研究[J]. 天然产物研究与开发 2007 19(4): 408-410 438.
- [6] 王劲松. 海螵蛸的研究概况[J]. 北京水产 2006 3(3): 56-57.
- [7] 龙瑛. 灭幽愈疡汤治疗 Hp 阳性消化性溃疡 50 例临床观察[J]. 中华临床医学研究杂志 2007 13(16): 2319-2320.
- [8] 夏锦军,黄桂勇,徐正新. 胃溃宁胶囊药理实验研究[J]. 时珍国医国药 2000 11(1): 11.
- [9] Zheng X D, Xiao S, Wang Z P, et al. Histological and histochemical analyses of the cuttlebone sac of the golden cuttlefish *Sepia esculenta* [J]. *J Ocean Univ China*, 2007 6(4): 393-397.
- [10] 魏江洲,张建鹏,刘军华,等. 海螵蛸多糖的提取分离及活性组分 CPS-1 的纯化[J]. 第二军医大学学报 2006 27(1): 17-21.
- [11] 宋航,马丽芳,郝红,等. 制药工程专业实验[M]. 北京:化学工业出版社,2005: 141-142.
- [12] 郑丹. 灵芝多糖和灵芝几丁质的分离提取及理化性质的研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2008.
- [13] 夏秀华,王海鸥. 银杏叶多糖提取工艺研究[J]. 食品研究与开发 2006 27(1): 69-72.
- [14] 霍光华,李来生,高荫榆. 波谱在多糖结构分析上的应用[J]. 生命的化学 2002 22(2): 194-196.

维药新塔花中胡薄荷酮的鉴别及定量测定

张海英, 李伟, 薛洁*

(新疆医科大学附属中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 对新塔花中胡薄荷酮的定性鉴别及定量测定方法进行研究。方法 采用薄层色谱法鉴别新塔花; 采用紫外-可见分光光度法测定新塔花挥发油中总萜类成分; 采用高效液相色谱法测定新塔花中胡薄荷酮, 用 SHIMADZU VP-ODS RpC₁₈ (150 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱, 柱温: 30 ℃; 流动相为甲醇-水 (80 : 20); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 252 nm; 进样量 10 μL。结果 薄层色谱法可检出胡薄荷酮; 在挥发油总萜类成分测定中, 胡薄荷酮进样量在 0.050 25 mg ~ 0.251 3 mg 之间线性关系良好 $r = 0.999\ 3$ ($n = 5$), 平均回收率为 101.2%, RSD 为 1.86% ($n = 6$); 用 HPLC 法测定胡薄荷酮, 胡薄荷酮质量浓度在 0.056 7 mg/mL ~ 0.283 4 mg/mL 之间线性关系良好 $r = 0.999\ 1$ ($n = 5$), 平均回收率为 99.5%, RSD 为 1.11% ($n = 6$)。结论 用该法对新塔花中胡薄荷酮进行质量控制, 操作简单、重复性好、精密度高。

关键词: 新塔花; 胡薄荷酮; 薄层色谱鉴别; 分光光度法; 总萜类成分; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-4528(2011)09-1628-04

维药新塔花别名苏则, 为唇形科新塔花属多年生草本植物新塔花 *Ziziphora clinopodioides* Lam. 的干燥地上部分。具有强心利湿、理气化痰、消炎散结的功效, 用于治疗心脏病、气短多汗、水肿、咳嗽、气管炎、肺脓肿等疾病。喜生于向阳的低山坡草地及砾石干旱坡地上, 分布于新疆南北疆大部分地区, 全草含 0.8% ~ 1.5% 的挥发油^[1-2]。目前研究较多的是采用 GC-MS 技术分析其挥发油成分, 尚未见有系统的挥发油成分定性、定量质量控制方法的报道^[3]。本研究对新疆乌鲁木齐市南山、新疆昌吉州吉木萨尔县、新疆阿勒泰地区布尔津县 3 个不同产地新塔花药材中胡薄荷酮进行定性鉴

别和定量测定, 为新塔花药材的质量控制及合理开发利用提供试验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters2695 高效液相色谱仪(美国); 紫外-可见分光光度计 Cintra-20(澳大利亚); AG-435 电子天平(瑞士); SK3300LH 超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 新塔花于 2008 年 6 月 4 日—2008 年 7 月 20 日分别采自新疆乌鲁木齐市南山、新疆昌吉州吉木萨尔县、新疆阿勒泰地区布尔津县, 经新疆医科大学附属中医医院李永和主任中药师鉴定为 *Ziziphora clinopodioides* Lam。

收稿日期: 2011-03-29

作者简介: 张海英(1973—), 女, 副主任中药师, 讲师, 研究方向: 中药复方新制剂研发。Tel: (0991) 5814127, E-mail: zzhhy2583@126.com

* 通信作者: 薛洁(1962—), 女, 主任中药师, 教授, 研究方向: 中药复方新制剂研发。Tel: (0991) 4365256

胡薄荷酮对照品(批号:111706-200602)购自中国药品生物制品检定所;甲醇为色谱纯;香草醛、硫酸、冰醋酸、高氯酸、石油醚(60~90℃)、乙酸乙酯等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别 取新疆乌鲁木齐市南山、新疆昌吉州吉木萨尔县、新疆阿勒泰地区布尔津县3个不同产地的新塔花粗粉各0.8g,加石油醚(60~90℃)20mL,密塞,放置过夜,时时振摇,滤过,滤液水浴挥干,残渣加1mL石油醚(60~90℃)使溶解,作为供试品溶液。另取胡薄荷酮对照品,加石油醚(60~90℃)制成质量浓度4mg/mL的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取供试品溶液、对照品溶液各10μL,点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(37:3)为展开剂,展开约10cm,取出,晾干,喷以1%香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同紫红色斑点。结果见图1。

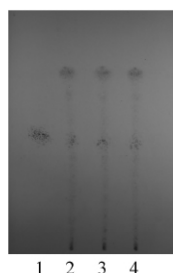


图1 新塔花药材薄层色谱鉴别

1. 胡薄荷酮对照品 2. 新塔花(乌鲁木齐市南山)
3. 新塔花(吉木萨尔县) 4. 新塔花(布尔津县)

2.2 新塔花挥发油的提取工艺研究

2.2.1 新塔花药材粉碎度的确定 取乌鲁木齐市南山的新塔花药材,每100g供试品加水500mL,置蒸馏烧瓶中,连接挥发油提取器与回流冷凝管。照挥发油测定法(《中国药典》2010年版一部附录XD)保持微沸5h,将提取得到的挥发油用无水硫酸钠脱水,石油醚洗涤多次,低温挥干石油醚后,得干燥的挥发油,计算新塔花药材中挥发油得率(%)。试验表明,将新塔花药材粉碎成细粉,挥发油得率为0.69%;切制成约5mm的短段进行提取,挥发油得率为1.23%。故决定将新塔花药材切制成5mm的短段。

2.2.2 加水倍数的确定 取新塔花100g,分别加水10、12、14、16、18倍,提取挥发油。试验结果显示,加水12倍时挥发油得率最高,为1.15%,所以决定加水倍数为12倍进行提取。

2.2.3 浸泡时间的确定 取新塔花药材100g,分别加水浸泡0.5、1.0、1.5、2.0、6.0、12.0、24.0h,提取挥发油。试验结果显示,药材浸泡1h左右挥发油得率达到高值,浸泡时间延长对挥发油得率无明显提高,故确定浸泡时间为1h。

2.2.4 不同产地挥发油的测定 取3个不同产地的新塔花药材,剪成约5mm短段,每份100g,加12倍量水浸泡1.0h,提取挥发油,测定。挥发油得率测定结果见表1。

表1 不同产地新塔花挥发油得率、总萜量、胡薄荷酮测定结果

产地	挥发油得率/%	总萜质量分数/%	胡薄荷酮质量分数/%
新疆乌鲁木齐市南山	1.09	69.24	0.523
新疆吉木萨尔县	0.92	64.37	0.469
新疆布尔津县	1.24	70.59	0.570

2.3 新塔花挥发油中总萜成分测定

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称定胡薄荷酮对照品10.05mg,置100mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,制成质量浓度0.1005mg/mL的溶液,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取新塔花挥发油0.2g,置100mL量瓶中,加无水乙醇至刻度,即得。

2.3.3 检测波长的确定 精密量取对照品溶液和供试品溶液各1mL于具塞试管中,按标准曲线制备项下操作,在紫外-可见分光光度计上进行全波长扫描,对照品溶液最大吸收波长为536.45nm,供试品溶液最大吸收波长为535.46nm。综合上述试验拟定(536±2)nm为检测波长。

2.3.4 标准曲线的绘制 精密量取质量浓度0.1005mg/mL的胡薄荷酮对照品溶液0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mL于具塞试管中,加无水乙醇使至3mL,加入5%香草醛-冰醋酸溶液(新配制)1mL,高氯酸2.5mL,置60℃水浴中加热15min,取出,冰浴冷却,加冰醋酸5mL,摇匀,放置10min,以相应试剂为空白,按紫外-可见分光光度法(《中国药典》2010年版一部附录VA)测定吸光度。

以进样量 X 为横坐标,以吸光度 Y 为纵坐标制作标准曲线,得回归方程为: $Y = 3.3556X + 0.0130$ ($r = 0.9993$),表明胡薄荷酮对照品在0.05025~0.2513mg范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.3.5 稳定性考察 精密量取供试品溶液1.0mL,置具塞试管中,按标准曲线制备项下操作,加入冰醋酸后,每隔10min测定吸光度,测定至1h,结果表明10min为最佳显色时间,RSD为0.80%。本试验选择加冰醋酸后放置10min进行测定。

2.3.6 精密度考察 取胡薄荷酮对照品溶液1.0mL,按标准曲线制备项下操作,在同一天内重复测定5次,连续测定5日,计算日内日间标准差。结果日内精密密度RSD为0.47%,日间精密密度RSD为1.99%。结果表明,日内及日间相对标准偏差均小于2%,表明本法精密度良好。

2.3.7 重复性试验 取乌鲁木齐市南山新塔花挥发油供试品溶液6份,按标准曲线制备项下操作,测定吸光度,结果RSD为1.71%,说明本法比较稳定,重复性好。

2.3.8 回收率试验 取乌鲁木齐市南山新塔花挥发油供试品溶液0.5mL,共6份,精密称定,置具塞试管中,每份均加入胡薄荷酮对照品溶液(0.1005mg/mL)1mL,按标准曲线制备项下操作,测定吸光度,计算加样回收率。总萜类成分平均回收率为101.2%,RSD为1.86%。

2.3.9 样品测定 本试验对新疆乌鲁木齐市南山、新疆昌

吉州吉木萨尔县、新疆阿勒泰地区布尔津县3个不同产地的新塔花挥发油进行了总萜类成分的测定,试验结果见表1。

2.4 胡薄荷酮测定

2.4.1 色谱条件与系统适用性试验 SHIMADZU VP-ODS RpC_{18} 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm 5 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;以甲醇-水(80:20)为流动相;体积流量1.0 mL/min;检测波长为252 nm;进样量10 μL ;理论板数按胡薄荷酮峰计算应不低于3 000。

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称定胡薄荷酮对照品14.17 mg,置50 mL量瓶中,加甲醇定容,制成质量浓度为0.283 4 mg/mL的溶液,即得。

2.4.3 供试品溶液的制备 精密称定新塔花药材粉末(二号筛)0.5 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇10 mL,超声提取20 min,滤过,滤渣和滤纸再加10 mL甲醇,超声提取20 min,滤过,加适量甲醇洗涤2次,合并滤液和洗液,转移至25 mL量瓶中,加甲醇定容,即得^[4-5]。

2.4.4 线性关系的考察 精密吸取质量浓度0.283 4 mg/mL的胡薄荷酮对照品溶液1、2、3、4、5 mL分别置于5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,得质量浓度分别为0.056 7、0.113 4、0.170 0、0.226 7、0.283 4 mg/mL的胡薄荷酮对照品溶液,注入高效液相色谱仪,测定峰面积。

以进样质量浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标制作标准曲线,得回归方程为: $Y = 2.69 \times 10^7 X + 987.25$ $r = 0.998\ 9$ ($n = 5$)。结果表明胡薄荷酮在0.056 7 mg/mL~0.283 4 mg/mL范围内,与峰面积成良好的线性关系。色谱图见图2~3。

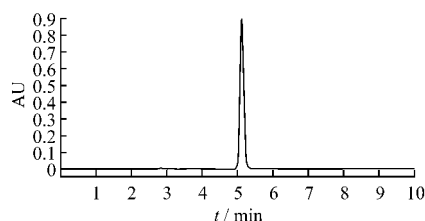


图2 胡薄荷酮对照品溶液 HPLC 图谱

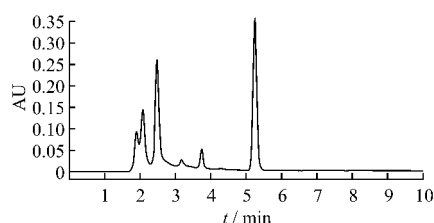


图3 供试品溶液 HPLC 图谱

2.4.5 精密度试验 用质量浓度0.170 0 mg/mL的胡薄荷酮对照品溶液同一天内连续测定5次,测定峰面积,计算得胡薄荷酮峰面积RSD为1.28%,表明本法精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 取乌鲁木齐市南山新塔花供试品溶液,每隔2 h进样,测定峰面积,计算得胡薄荷酮峰面积的RSD为1.34% ($n = 6$),表明在10 h内稳定性良好。

2.4.7 重复性试验 取乌鲁木齐市南山新塔花样品5份,1630

按供试品溶液制备项下操作并测定,计算得胡薄荷酮的平均质量为(0.474 $\pm$ 0.006 0)%,RSD为1.26%,表明本方法重复性良好。

2.4.8 回收率试验 精密称定0.4 g乌鲁木齐市南山新塔花样品,共6份,均精密加入胡薄荷酮对照品溶液(0.170 0 mg/mL)10 mL,按供试品溶液制备项下操作并测定,计算加样回收率,见表2。胡薄荷酮平均回收率为99.5%,RSD为1.11%,结果表明本方法准确可靠。

表2 胡薄荷酮加样回收率试验结果

称样量 /g	样品中原 有量/mg	加入对照 品量/mg	实际测得 量/mg	回收率 /%	平均回收 率/%	RSD /%
0.400 1	1.896 5	1.700 0	3.586 1	99.4		
0.399 8	1.895 1	1.700 0	3.601 2	100.4		
0.400 5	1.898 4	1.700 0	3.568 7	98.3	99.5	1.11
0.400 9	1.900 3	1.700 0	3.586 7	99.2		
0.399 6	1.894 1	1.700 0	3.614 2	101.2		
0.400 6	1.898 8	1.700 0	3.579 8	98.9		

2.4.9 样品测定 本试验对新疆乌鲁木齐市南山、新疆昌吉州吉木萨尔县、新疆阿勒泰地区布尔津县3个不同产地的新塔花药材进行了胡薄荷酮的高效液相测定,试验结果见表1。

3 讨论

3.1 检测指标的选择 文献报道,用气相-质谱联用(GC-MS)方法分析新塔花挥发油化学成份,其中质量分数最高的为胡薄荷酮(69.60%),其次是薄荷酮(19.94%)、乙酸-2-二甲基环己酯(3.10%)、辣薄荷烯酮(1.84%)、顺-5-甲基-2-(1-甲基乙基)环己酮(1.35%)。这5种成分占挥发油总量的95.83%^[6]。胡薄荷酮可作为合成薄荷脑的原料及肥皂香料,有很强的抗炎作用^[7]。由此可见,对芳香新塔花的挥发性成分胡薄荷酮的研究具有重要的应用前景。在《维吾尔药志》中记载的新塔花药材项下只有显微鉴别和理化鉴别,方法专属性不好,无法对药材进行质量控制,或科研报道多用GC-MS方法对其挥发性成分进行分析,操作复杂,对仪器要求较高。本研究以胡薄荷酮为对照品对新塔花药材进行薄层色谱定性鉴别,采用紫外-可见光光度计和高效液相色谱仪对其进行测定,操作简便,便于基层普及推广,能更好地控制新塔花药材的质量。

3.2 薄层色谱研究 在新塔花药材的薄层色谱鉴别中,参照《中国药典》2010年版一部荆芥药材项下的方法,由于胡薄荷酮有很好的脂溶性,故采用石油醚为浸提溶剂,以石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-乙酸乙酯(37:3)为展开剂,以1%香草醛硫酸溶液为显色剂,加热后显紫红色斑点,表明该方法专属性好、可操作性强。

3.3 总萜类成分的测定 芳香新塔花挥发油成分复杂,为多种类型化合物的混合物,其中相对含量较多为萜类化合物,萜类化合物是存在于植物界的一大类化合物,具有多种生物活性,并且是某些中药的主要有效成分。故用紫外分光光度法对新塔花挥发油中的总萜类成分进行测定,操作简单,比较适合基层单位对新塔花药材进行质量控制。

3.4 胡薄荷酮的测定 在 HPLC 法测定新塔花药材中胡薄荷酮含量时, 比较了加热回流与超声的方法进行提取, 结果表明加热回流提取时, 挥发油受热易挥发而使测得的结果偏低, 故选用超声提取。采用超声提取法对胡薄荷酮进行了提取 2 次和提取 3 次的考察, 结果表明甲醇 2 次提取就已完全, 故确定提取次数为 2 次。流动相选择时比较了甲醇-水(50:50)、甲醇-水(60:40)、甲醇-水(80:20)。结果甲醇-水(80:20)这一条件下胡薄荷酮出峰时间适中, 主峰的分离度、理论板数、对称性等色谱参数均符合要求, 故确定为本研究的色谱条件。

经研究 3 个产地的新塔花药材中挥发油得率在 0.92%~1.24% 范围内变化, 总萜类成分质量分数在 64.37%~70.59% 范围内变化, 胡薄荷酮量在 0.469%~0.570% 范围内变化, 考虑到药材质量受产地、采收季节、存放和加工等因素的影响, 其中挥发油、总萜类成分、胡薄荷酮量有较大的差异, 因此有必要做进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘勇民. 维吾尔药志: 上册[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1985: 353-357.
- [2] 胡晓灵, 谢志云, 火树华, 等. 新塔花胶囊治疗稳定型心绞痛临床疗效观察[J]. 中西医结合实用临床急救, 1997, 11(4): 490-492.
- [3] 李 雪, 张正方, 唐 军. 唇香草挥发油的气相色谱-质谱分析[J]. 质谱学报, 2008, 29(2): 105-109.
- [4] 张 丽, 单鸣秋, 孔 铭, 等. RP-HPLC 法测定荆芥穗中胡薄荷酮的含量[J]. 中草药, 2004, 35(12): 1444-1445.
- [5] 杨建平, 包贝华, 张 丽, 等. 荆芥饮片中胡薄荷酮的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 669-670.
- [6] 石 峰, 杨伟俊, 顾政一, 等. 芳香新塔花挥发油的化学成份分析[J]. 新疆中医药, 2009, 27(1): 23-24.
- [7] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 713-714, 872.

高效液相色谱法测定白及中肉桂酸

麻秀萍¹, 杨清秋², 蒋朝晖¹, 陆崇玉¹

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 安顺市西秀区人民医院, 贵州 安顺 561000)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定白及中肉桂酸的方法。方法 采用 Shim-Pack VP-ODS(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 柱温 40℃; 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液(29:71) 为流动相, 检测波长为 285 nm。结果 肉桂酸进样量在 0.023 2~0.208 8 μg 范围内呈良好线性关系($r=0.999\ 9$); 平均回收率为 99.10%, RSD 为 1.83%。结论 建立的方法操作简便、灵敏、准确, 为白及药材质量控制标准的完善提供科学依据。

关键词: 白及; 肉桂酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-4528(2011)09-1631-03

白及系兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎, 多年生草本, 分布于贵州、四川、湖南、江苏等地, 具收敛止血、消生肌之功效^[1], 并收载于中国药典。临床上广泛用于治疗咳血吐血、外伤出血疮疡肿毒、皮肤皲裂、结核咳血、溃疡病出血等, 疗效显著。白及含黏液质、对羟基苯甲酸、原儿茶酸、肉桂酸(Cinnamic acid)、联苄类等化合物^[2-3]。目前, 药典只收载其显微鉴定及薄层鉴别, 未见有定量测定的报道。李及等人曾对白及中的大黄素甲醚进行定量测定, 因其量甚微, 没有检测的实际意义^[4]。肉桂酸具有抗菌、真菌作用和升高白细胞作用, 是本品的有效成分之一^[5]。故本实验采用 HPLC 法测定白及中肉桂酸, 并进行方法学考察, 结果表明建立的方法前处理简便, 专属性强, 测定结果准确、稳定, 为白及药材质量控制标准的完善提供科学

依据。

1 仪器和材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(四元泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、化学工作站); 肉桂酸对照品($C_9H_8O_2$, 编号 0786-9802, 中国药品生物制品检定所提供, 供含量测定用), 乙腈为色谱纯, 水为纯净水, 其他试剂为分析纯。

白及药材采于贵州省关岭县, 采集时间为 2007 年 11 月, 经贵阳中医学院董立莎教授鉴定为药典品种兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的新鲜块茎。鲜品洗净, 部分去皮, 皮与去皮块茎分别低温烘干, 皮为 1 号样品, 去皮块茎为 2 号样品; 鲜品洗净, 切片, 烘干, 为 3 号样品; 鲜品按药典的炮制方法, 蒸至无白心, 去皮, 切片, 烘干, 为 4 号

收稿日期: 2010-08-09

作者简介: 麻秀萍(1971—), 女(苗族), 副教授, 从事分析化学和中药制剂分析的教学、科研工作。Tel: (0851) 5601577, E-mail: mxp001130@sina.com.cn