

HPLC 测定藏药螃蟹甲中 5 个环烯醚萜苷的含量

李茂星^{1*}, 张超^{1,2}, 尉丽力¹, 樊鹏程¹, 张泉龙¹, 贾正平^{1,2}

(1. 兰州军区兰州总医院, 甘肃 兰州 730005;
2. 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的: 建立 RP-HPLC 同时测定藏药螃蟹甲中 5 种环烯醚萜苷的含量。方法: 色谱柱为 Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-水(B) 梯度洗脱, 0~5 min, 7% A, 5~10 min, 7%~12% A, 10~40 min, 12% A; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 20 °C, 检测波长 235 nm。结果: sesamoside, 山梔苷甲酯, 7, 8-dehydropenstemoside, penstemoside 和 8-O-乙酰山梔苷甲酯分别在 0.050~0.650 (r=0.999 3), 0.050~0.350 (r=0.999 5), 0.040~0.280 (r=0.999 4), 0.010~0.070 (r=0.999 6), 0.040~0.280 (r=0.999 7) g · L⁻¹ 与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率均 96%~104%, RSD 均小于 5.0% (n=6)。结论: 此方法简便、准确, 重复性好, 结果稳定, 可作为螃蟹甲药材的质量控制方法。

[关键词] 螃蟹甲; 环烯醚萜苷; HPLC; 质量标准

螃蟹甲为唇形科糙苏属多年生草本植物螃蟹 *Phlomis younghusbandii* Mukerjee 的干燥块根, 广泛分布于西藏、青海海拔 2 700~4 800 m 的地区, 藏语称“露木尔”, 为藏医习用药材, 至今已有千余年沿用历史。具有祛风活络、强筋壮骨、清热消肿、止咳祛痰之功效, 广泛用于治疗感冒、咳嗽、疮疡肿毒、风湿性关节炎、肺炎、支气管炎等疾病^[1]。历届藏药质量标准及 1995 年部颁《药品标准》藏药分册均有收载, 但除性状外都未建立定性、定量质控指标, 因而难以对螃蟹甲药材及其制剂进行客观评价和有效质量控制^[2]。化学成分研究表明螃蟹甲根及地上部分大量含有环烯醚萜苷类成分^[3-5]。高咏莉等^[6]对螃蟹甲药材的指纹图谱进行了初步的研究, 结果在其指纹图谱中也指认出了大量的环烯醚萜苷了成分。有关螃蟹甲中环烯醚萜苷的含量测定, 目前已有文献报道通过 HPLC 测定其中山梔苷甲酯和 8-O-乙酰山梔苷甲酯单个环烯醚萜苷的含量^[7-8]。为了更有效地控制螃蟹甲药材及其制剂的质量, 本实验首次采用高效液相色谱梯度洗脱法, 对不同产地的螃蟹甲药材及其制剂进行了 5 个环烯醚萜苷类成分(图 1)含量的同时测定, 为进一步完善螃蟹甲品质评价及质量控制提供参考依据。

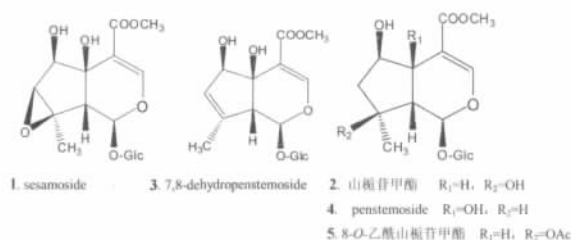


图 1 螃蟹甲中的 5 个环烯醚萜苷化合物结构式

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪, 包括 600 型二元梯度泵、996 型二极管阵列紫外检测器 (美国 Waters 公司), BP210S 电子分析天平 (Sartorius 公司), SK7200H 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); 乙腈为色谱纯, 水为灭菌注射用水, 其余试剂均为分析纯; 对照品 sesamoside, 山梔苷甲酯, 7, 8-dehydropenstemoside, penstemoside, 8-O-乙酰山梔苷甲酯均为本实验室自制 (从螃蟹甲药材中分离鉴定, 经 HPLC 面积归一化法计算, 纯度均在 98% 以上)。螃蟹甲药材 3 份, 分别采购于西藏林芝、拉萨、四川成都, 经兰州大学药学院马志刚教授鉴定为螃蟹甲 *P. younghusbandii*。螃蟹甲制剂 (七味螃蟹甲丸, 青海琦鹰生物制药股份有限公司, 0.25g/粒, 国药准字 Z20054325, 批号 20091203)。

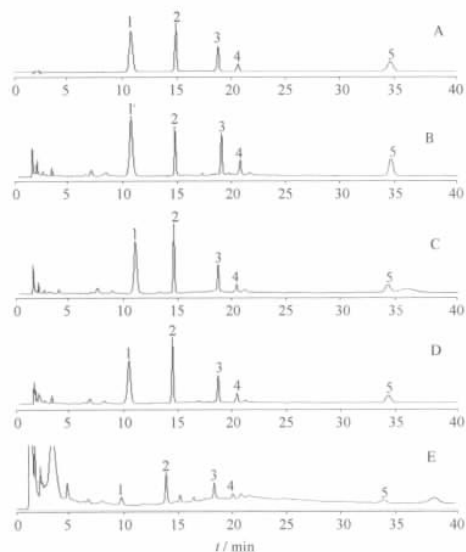
2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Symmetry C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-水

[稿件编号] 20100703005

[通信作者] * 李茂星, 副主任药师, 主要从事天然药物化学研究, 中药新药研究与开发, Tel: (0931) 8994676, E-mail: limaox2005@ yahoo. com. cn

(B) 梯度洗脱, 0~5 min, 7% A; 5~10 min, 7%~12% A; 10~40 min, 12% A。流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 235 nm; 柱温 20 °C; 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 5种环烯醚萜苷成分能达到较好分离, 与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5, 理论塔板数均大于 2 000, 对照品溶液和样品溶液的色谱图见图 2。



1. sesamoside; 2. shanzhiside methyl ester; 3. 7,8-dehydropenstemoside; 4. penstemoside; 5. 8-O-acetylshanzhiside methyl ester。

图2 对照品(A)、螃蟹甲(成都,B)、螃蟹甲(拉萨,C)、螃蟹甲(林芝,D)和七味螃蟹甲丸(E)的HPLC图

2.2 对照品储备液的制备 分别精密称取干燥至恒重的 sesamoside, 山栀苷甲酯, 7, 8-dehydropenstemoside, penstemoside 和 8-O-乙酰山栀苷甲酯各 40 mg 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度。即得质量浓度为 4 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备 螃蟹甲药材粉碎过 4 号筛, 七味螃蟹甲丸研细。精密称取 1 g 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称重, 超声处理 30 min, 冷却, 再称重, 加 50% 甲醇补足失重, 摇匀, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系的考察 分别吸取 sesamoside 储备液 125, 375, 625, 875, 1 125, 1 375, 1 625 μL; 山栀苷甲酯储备液 125, 250, 375, 500, 625, 750, 875 μL; 7,8-dehydropenstemoside 储备液 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 μL; penstemoside 储备液 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 μL; 8-O-乙酰山栀苷甲酯储备液

100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 μL。然后分别依次加入到 7 个 10 mL 量瓶中混匀, 加 50% 甲醇至刻度, 即得不同质量浓度的 5 种环烯醚萜苷混合对照品溶液。然后按 2.1 项下的色谱条件进行测定, 进样 10 μL, 以峰面积为纵坐标, 以浓度为横坐标进行线性回归, 得各成分回归方程见表 1。

表1 5个环烯醚萜苷的线性关系

| 化合物 | 回归方程 | r | 线性范围/g·L ⁻¹ |
|-----|---|---------|------------------------|
| 1 | $Y = 9.380 \times 10^3 X - 3.411 \times 10^3$ | 0.999 3 | 0.050 ~ 0.650 |
| 2 | $Y = 9.934 \times 10^3 X + 5.500 \times 10^4$ | 0.999 5 | 0.050 ~ 0.350 |
| 3 | $Y = 8.272 \times 10^3 X + 2.511 \times 10^3$ | 0.999 4 | 0.040 ~ 0.280 |
| 4 | $Y = 1.252 \times 10^4 X - 1.201 \times 10^3$ | 0.999 6 | 0.010 ~ 0.070 |
| 5 | $Y = 1.131 \times 10^4 X - 4.756 \times 10^3$ | 0.999 7 | 0.040 ~ 0.280 |

2.5 精密度的试验 取 2.4 项下制备的任意质量浓度的混合对照品溶液, 在 2.1 项下的色谱条件下, 重复进样 6 次, 进样量为 10 μL, 记录峰面积, 计算仪器精密度的 RSD, 结果 sesamoside, 山栀苷甲酯, 7, 8-dehydropenstemoside, penstemoside 和 8-O-乙酰山栀苷甲酯的 RSD 分别为 0.78%, 0.78%, 1.9%, 0.90%, 1.2%, 表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一产地的螃蟹甲药材 6 份, 按照 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备样品溶液, 然后按 2.1 项下的色谱条件进行测定, 每次进样 10 μL, 分别测定峰面积, 结果 sesamoside, 山栀苷甲酯, 7, 8-dehydropenstemoside, penstemoside, 8-O-乙酰山栀苷甲酯的 RSD 分别为 1.6%, 2.1%, 1.8%, 1.5%, 1.6%。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 按 2.1 项下的色谱条件, 每次进样 10 μL, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 h 测定峰面积, 结果 sesamoside, 山栀苷甲酯, 7, 8-dehydropenstemoside, penstemoside, 8-O-乙酰山栀苷甲酯的 RSD 分别为 1.9%, 2.6%, 3.7%, 3.2%, 2.7%, 表明样品溶液在 72 h 内基本稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量样品 6 份, 精密称定。然后分别精密加入一定量的对照品, 按照 2.3 项下方法制备样品溶液, 按 2.1 项下的色谱条件进行测定, 计算加样回收率, 见表 2。

2.9 样品含量测定 分别取不同来源的螃蟹甲药材, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按照 2.1 项下的色谱条件进行测定, 进样 10 μL, 采用外标法以峰面积计算 5 种环烯醚萜苷的含量, 见表 3。

表2 5个环烯醚萜苷加样回收率($n=6$)

| 化合物 | 样品量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|-----|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 3.365 | 3.328 | 6.726 | 101.0 | 101.8 | 2.7 |
| | 3.366 | 3.328 | 6.821 | 103.8 | | |
| | 3.376 | 3.328 | 6.772 | 102.0 | | |
| | 3.370 | 3.328 | 6.890 | 105.8 | | |
| | 3.372 | 3.328 | 6.645 | 98.35 | | |
| | 3.379 | 3.328 | 6.698 | 99.73 | | |
| 2 | 1.970 | 1.926 | 3.834 | 96.78 | 99.22 | 5.1 |
| | 1.970 | 1.926 | 3.866 | 99.48 | | |
| | 1.976 | 1.926 | 4.005 | 105.4 | | |
| | 1.972 | 1.926 | 3.998 | 105.2 | | |
| | 1.973 | 1.926 | 3.808 | 95.28 | | |
| | 1.977 | 1.926 | 3.774 | 93.30 | | |
| 3 | 1.202 | 1.104 | 2.212 | 97.12 | 99.07 | 3.5 |
| | 1.202 | 1.104 | 2.250 | 100.8 | | |
| | 1.205 | 1.104 | 2.277 | 103.4 | | |
| | 1.203 | 1.104 | 2.258 | 101.5 | | |
| | 1.204 | 1.104 | 2.180 | 94.04 | | |
| | 1.206 | 1.104 | 2.217 | 97.60 | | |
| 4 | 0.302 | 0.324 | 0.619 | 97.84 | 98.46 | 2.8 |
| | 0.302 | 0.324 | 0.622 | 98.77 | | |
| | 0.303 | 0.324 | 0.625 | 99.38 | | |
| | 0.302 | 0.324 | 0.613 | 95.99 | | |
| | 0.303 | 0.324 | 0.627 | 103.1 | | |
| | 0.303 | 0.324 | 0.613 | 95.68 | | |
| 5 | 0.811 | 0.816 | 1.640 | 101.6 | 98.92 | 3.7 |
| | 0.811 | 0.816 | 1.659 | 103.9 | | |
| | 0.813 | 0.816 | 1.600 | 96.45 | | |
| | 0.812 | 0.816 | 1.633 | 100.8 | | |
| | 0.812 | 0.816 | 1.594 | 95.83 | | |
| | 0.814 | 0.816 | 1.590 | 95.10 | | |

表3 螃蟹甲中5个环烯醚萜苷类成分的质量分数($n=3$)

| 样品来源 | sesamo- side | 山梔苷 甲酯 | 7, 8-dehydro- penstemo- side | penstemo- side | 8-O-乙酰山 梔苷甲酯 |
|--------|-----------------|-----------|------------------------------------|-------------------|-----------------|
| 四川(成都) | 7.82 | 2.67 | 3.43 | 0.954 | 2.79 |
| 西藏(拉萨) | 8.40 | 4.94 | 2.99 | 0.756 | 2.02 |
| 西藏(林芝) | 7.22 | 4.62 | 2.75 | 0.760 | 1.62 |
| 七味螃蟹甲丸 | 0.249 | 0.634 | 0.423 | 0.097 | 0.160 |

3 讨论

5个环烯醚萜苷结构相似,极性较大,实验考察了乙腈-水,甲醇-水系统及不同比例流动相的分离

策略,结果表明采用乙腈-水梯度洗脱系统(7:93-12:88)效果较佳,化合物间分离效果好,分析时间适中。

将5个环烯醚萜苷对照品溶液于200~400 nm进行紫外扫描,其在235 nm处都有最大吸收,故选择235 nm作为最大测定波长。

本实验采用HPLC测定了不同产地的螃蟹甲药材和1个制剂中5个环烯醚萜苷的含量。结果显示,在不同产地的螃蟹甲药材和制剂中均检测到5个环烯醚萜苷成分的存在,且这5个成分的含量差别较大。总体看来,sesamside > 山梔苷甲酯 > 7, 8-dehydropenstemoside > 8-O-乙酰山梔苷甲酯 > penstemoside。考虑到螃蟹甲药材采集困难,这种差异的普遍性还有待进一步研究。

本实验在明确螃蟹甲化学成分的基础上,建立了螃蟹甲中5个环烯醚萜苷类成分的HPLC定量测定方法,并对采自不同地区的螃蟹甲样品和1个制剂中的5种环烯醚萜苷类成分的量进行了同时测定与分析。该研究结果为进一步了解不同产地、不同自然环境条件下螃蟹甲中环烯醚萜苷量的分布规律以其进一步开发利用提供了一定的依据。

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第65卷. 第2分册[M]. 北京: 化学工业出版社, 1995: 126, 231.
- [2] 中华人民共和国卫生部药品标准. 藏药. 第1册[S]. 北京: 化学工业出版社, 1995: 126, 231.
- [3] Kasai R, Katagiri M, Ohtani K, et al. Iridoid glycosides from *Phlomis younghusbandii* roots [J]. *Phytochemistry*, 1994, 36(4): 967.
- [4] 赵斌, 董小萍, 余娅芳, 等. 藏药螃蟹甲化学成分研究[J]. *中药材*, 2008, 31(8): 1170.
- [5] 高咏莉, 林瑞超, 王钢力, 等. 藏药螃蟹甲的化学成分研究[J]. *中药材*, 2007, 30(10): 1239.
- [6] 高咏莉, 林瑞超, 王钢力, 等. 藏药螃蟹甲 HPLC 指纹图谱研究[J]. *中药材*, 2007, 30(8): 919.
- [7] 赵斌, 董小萍, 吴健明. HPLC法测定螃蟹甲中山梔苷甲酯的含量[J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(2): 323.
- [8] 张军莉, 徐娟, 李茂星. HPLC法测定了藏药螃蟹甲中8-乙酰氧基山梔子苷甲酯的含量[J]. *解放军药学报*, 2009, 25(3): 261.

Determination of five iridoid glycosides in *Phlomis younghusbandii* by HPLC

LI Maoxing¹, ZHANG Chao^{1,2}, Wei Lili¹, FAN Pengcheng¹, ZHANG Quanlong¹, JIA Zhengping^{1,2*}

(1. Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China;

2. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an RP-HPLC method for the determination of five iridoid glycosides in *Phlomis younghusbandii*. **Method:** HPLC analysis was performed on a Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm, Waters) column eluted with acetonitrile (A) and water (B) in gradient elution. The gradient program was as follows: 0-5 min kept 7% A; 5-10 min changed to 12% A; 10-40 min kept 12% A. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was 20 °C and the detection wavelength was 235 nm. **Result:** The linear ranges of sesamoside, shanzhiside methyl ester, 7, 8-dehydropentemioside, pentemioside and 8-O-acetyls-hanzhiside methyl ester were 0.050-0.650 ($r=0.999\ 3$), 0.050-0.350 ($r=0.999\ 5$), 0.040-0.280 ($r=0.999\ 4$), 0.010-0.070 ($r=0.999\ 6$), 0.040-0.280 ($r=0.999\ 7$) g · L⁻¹, respectively. The average recoveries ($n=6$) of them were all between 96% and 104%, RSD < 5.0%. **Conclusion:** The method is simple, accurate, repeatable and stable, which can be used for quality control of *P. younghusbandii*.

[Key words] *Phlomis younghusbandii*; iridoid glycosides; HPLC; quality standard

doi: 10.4268/cjcm20110517

[责任编辑 王亚君]

本刊重要启事

本刊已开通在线支付功能,作者请登录本刊网站 www.cjcm.com.cn “作者中心”,点击在线充值,可以选择网上银行(没开通网银功能的帐户可以选择信用卡充值)和手机充值卡2种充值方式,充值成功后系统会显示您的账号余额。然后您可以根据稿件状态和编辑部邮件通知来缴纳相应的费用,如审稿费,发表费等。如有疑问请咨询周驰编辑:13810178861,21310385@qq.com。