

# RP-HPLC法同时测定4种唇形科植物中3个苯乙醇苷的含量<sup>Δ</sup>

李茂星<sup>1,2\*</sup>, 尉丽力<sup>1</sup>, 陶锐<sup>1,2</sup>, 张超<sup>1</sup>, 邱建国<sup>1</sup>, 张泉龙<sup>1</sup>(1.兰州军区兰州总医院全军高原特殊环境损伤防治重点实验室, 兰州 730050; 2.兰州大学药学院, 兰州 730000)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)11-1027-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.11.24

**摘要** 目的:建立同时测定唇形科植物独一味、糙苏、螃蟹甲和萝卜秦艽中3个苯乙醇苷成分(actsoside、alyssonoside、isoactsoside)含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Symmetry C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(用醋酸调pH为4.5,梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为20℃,检测波长为330 nm。结果:actsoside、alyssonoside、isoactsoside的质量浓度分别在20~620、5~125、5~125 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系( $r$ 分别为0.999 4、0.999 8、0.999 7);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<5%;平均加样回收率分别为101.15%、96.98%、102.01%,RSD分别为3.41%、3.64%、1.80%( $n$ 均为6)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于测定独一味、糙苏、螃蟹甲和萝卜秦艽中3个苯乙醇苷的含量。

**关键词** 独一味;糙苏;螃蟹甲;萝卜秦艽;苯乙醇苷;反相高效液相色谱法;含量测定

## Simultaneous Determination of 3 Kinds of Phenylethanoid Glycosides in 4 Lamiaceae Plants by RP-HPLC

LI Mao-xing<sup>1,2</sup>, WEI Li-li<sup>1</sup>, TAO Rui<sup>1,2</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, QIU Jian-guo<sup>1</sup>, ZHANG Quan-long<sup>1</sup>(1. Key Laboratory of the Prevention and Treatment for the Plateau Environment Damage, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China; 2. Pharmacy College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of 3 kinds of phenylethanoid glycosides (actsoside, alyssonoside, isoactsoside) in *Lamiophlomis rotata*, *Phlomis umbrosa*, *Phlomis younghusbandii* and *Phlomis medicinalis*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Symmetry C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (pH adjusted to 4.5 using acetic acid, gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 20℃ and the detection wavelength was set 330 nm. RESULTS: The linear ranges of actsoside, alyssonoside, isoactsoside were 20-620 μg/ml( $r=0.999 4$ ), 5-125 μg/ml( $r=0.999 8$ ) and 5-125 μg/ml( $r=0.999 7$ ), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 5%. The average recoveries of them were 101.15% (RSD=3.41%,  $n=6$ ), 96.98% (RSD=3.64%,  $n=6$ ) and 102.01% (RSD=1.80%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reproducible and suitable for the content determination of 3 kinds of phenylethanoid glycosides in *L. rotata*, *P. umbrosa*, *P. younghusbandii* and *P. medicinalis*.

**KEYWORDS** *Lamiophlomis rotata*; *Phlomis umbrosa*; *Phlomis younghusbandii*; *Phlomis medicinalis*; Phenylethanoid glycosides; RP-HPLC; Content determination

独一味[*Lamiophlomis rotata*(Benth.)Kudo]为唇形科独一味属植物,以全草或根及根茎入药,具有活血止痛、化瘀止血之功效,用于治疗各种外科手术后的刀口疼痛、出血、外伤骨折等<sup>[1-2]</sup>。糙苏(*Phlomis umbrosa*)、螃蟹甲(*P. younghusbandii* Mukerjee)和萝卜秦艽(*P. medicinalis* Diels)为唇形科糙苏属植物,该属植物具有抗炎、免疫抑制、抗自由基突变及抗菌等生

理活性,民间用于滋补强壮、跌打损伤、消肿祛痛等。化学成分研究表明,独一味、糙苏、螃蟹甲和萝卜秦艽这4种植物中都含有苯乙醇苷类成分<sup>[3-6]</sup>,该类成分具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、增强记忆、保肝和强心等作用<sup>[7-9]</sup>,可能为这几种药用植物的有效成分。本试验以3个苯乙醇苷成分——actsoside、alyssonoside、isoactsoside作为含量测定指标,

[J].中国药房,2011,22(27):2560.

[6] 杨迺嘉,刘文伟,霍昕,等.绣线菊挥发性成分研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(5):852.

[7] 张华.反式-2-烯醛类化合物和反,反-2,4-二烯醛类化合物在香精中的应用[J].香料香精化妆品,2006(2):30.

Δ基金项目:甘肃省科技重大专项计划项目(No.1102FKDA012)

\*副主任药师,硕士研究生导师,博士。研究方向:天然药物化学、中药新药研发。电话:0931-8994676。E-mail:limaox2005@aliyun.com

[8] 李玉红,郭刚,毛旭虎,等.反式茵香烯具有体内外抗幽门螺杆菌作用[C]//中华医学会第七次全国消化病学术会议论文集汇编.济南.2007:271.

[9] 孙贵娟,唐振柱,苏伟东,等.复方松油醇皮肤消毒液消毒性能的试验观察[J].中国消毒学杂志,2006,23(2):116.

[10] 林翔云.天然芳樟醇与合成芳樟醇[J].化学工程与装备,2008(7):21.

(收稿日期:2013-03-25 修回日期:2013-05-20)

使用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时测定了独一味、糙苏、螃蟹甲和萝卜秦艽中3个苯乙醇苷的含量,希望可以为这几种药用植物的进一步开发和利用提供一些理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HPLC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型电子分析天平(德国Sartorius公司);SK7200H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

acteoside、alyssonoside、isoacteoside对照品均为本实验室从螃蟹甲药材中分离得到,均经光谱学和波谱学鉴定其结构(见图1),经HPLC面积归一化法计算其纯度均在98%以上;乙腈为色谱纯,水为灭菌注射用水,其余试剂均为分析纯。

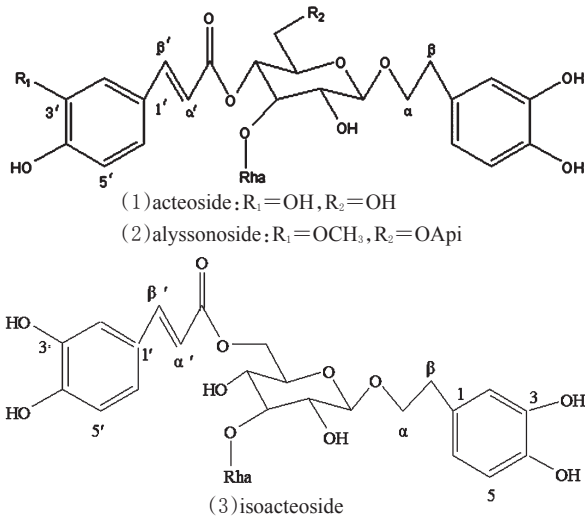


图1 3个苯乙醇苷类化合物的结构

Fig 1 The structure of 3 kinds of phenylethanoid glycosides

### 1.3 药材

独一味和糙苏药材于2010年7月分别采集于甘肃玛曲县和天水市,螃蟹甲和萝卜秦艽药材分别购于西藏林芝地区和青海果洛州,经兰州大学药学院马志刚教授鉴定均为真品。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Symmetry C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(用醋酸调pH为4.5), 梯度洗脱(0~5 min, 14% A; >5~10 min, 14%→20% A; >10~25 min, 20% A); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 330 nm; 柱温: 20 °C; 进样量: 10 μl。在此色谱条件下, 3个苯乙醇苷的峰形较好, 与其他组分色谱峰可达基线分离。色谱见图2。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 准确称取干燥至恒质量的 acteoside、alyssonoside、isoacteoside对照品各25 mg, 分别置25 ml量瓶中, 加70%甲醇溶解并稀释至刻度, 即得对照品贮备液, 用铝箔作避光保护, 4 °C冰箱里贮藏。检测前将各对照品贮备液配制成不同质量浓度的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取4种药材各适量, 粉碎(过四号筛), 分别准确称取1 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入70%甲醇25 ml, 称定质量, 超声处理(功率: 350 W, 频率: 59 kHz) 30

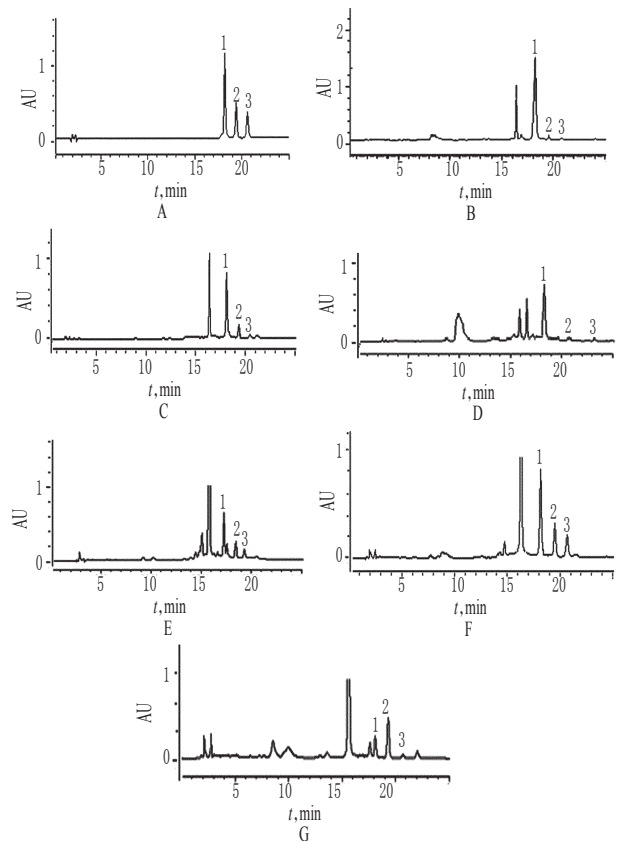


图2 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 独一味地上部分; C. 独一味地下部分; D. 糙苏地上部分; E. 糙苏地下部分; F. 螃蟹甲地下部分; G. 萝卜秦艽地下部分; 1. acteoside; 2. alyssonoside; 3. isoacteoside

Fig 2 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. aerial parts of *L. rotata*; C. inferior parts of *L. rotata*; D. aerial parts of *P. umbrosa*; E. inferior parts of *P. umbrosa*; F. inferior parts of *P. younghusbandii*; G. inferior parts of *P. medicinalis*; 1. acteoside; 2. alyssonoside; 3. isoacteoside

min, 冷却, 再称定质量, 加70%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 以0.45 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

### 2.3 标准曲线的制备

取“2.2.1”项下各质量浓度的混合对照品溶液适量, 按上述色谱条件进样分析。以质量浓度(x)为横坐标, 峰面积积分值(y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到3个苯乙醇苷成分的线性回归方程、线性范围和相关系数(r), 详见表1。当信噪比为3时, 得到各成分的检出限, 详见表1。

表1 线性回归方程及检出限

Tab 1 Linear regression equation and detection limits

苯乙醇苷成分	回归方程	线性范围, μg/ml	r	检出限, μg/ml
acteoside	$y=6.559 \times 10^3 x - 2.182 \times 10^4$	20~620	0.999 4	0.012
alyssonoside	$y=6.885 \times 10^3 x - 2.286 \times 10^4$	5~125	0.999 8	0.022
isoacteoside	$y=6.107 \times 10^3 x - 3.316 \times 10^4$	5~125	0.999 7	0.030

### 2.4 精密度试验

取混合对照品溶液适量, 按上述色谱条件重复进样测定6次, 记录峰面积。结果显示, acteoside、alyssonoside、isoacteoside的RSD分别为1.75%、3.44%、2.45%(n均为6), 表明仪器精密度良好。

### 2.5 重复性试验

取螃蟹甲药材粉末适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算样品含量。结果显示,acteoside、alyssonoside、isoacteoside的平均含量分别为3.20、1.12、1.42 mg/g, RSD分别为1.49%、3.16%、4.52% ( $n$ 均为6),表明本方法重复性良好。

### 2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液适量,分别于0、1、2、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,acteoside、alyssonoside、isoacteoside的RSD分别为1.83%、2.86%、2.90% ( $n$ 均为7),表明供试品溶液在24 h内稳定。

### 2.7 加样回收率试验

精密称取适量已知含量的螃蟹甲药材粉末,共6份,分别精密加入一定量的acteoside、alyssonoside、isoacteoside对照品,使药材中的acteoside、alyssonoside、isoacteoside分别与各自对照品的质量比约为1:1,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果 ( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery tests ( $n=6$ )

组分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
acteoside	1.575	1.560	3.196	103.88	101.15	3.41
	1.568	1.560	3.088	97.45		
	1.565	1.560	3.091	97.83		
	1.574	1.560	3.125	99.41		
	1.576	1.560	3.177	102.60		
	1.578	1.560	3.227	105.72		
alyssonoside	0.799	0.800	1.626	103.37	96.98	3.64
	0.800	0.800	1.545	93.13		
	0.801	0.800	1.589	98.55		
	0.802	0.800	1.566	95.54		
	0.785	0.800	1.541	94.53		
	0.803	0.800	1.577	96.76		
isoacteoside	1.534	1.540	3.099	101.65	102.01	1.80
	1.538	1.540	3.083	100.31		
	1.540	1.540	3.080	100.00		
	1.539	1.540	3.107	101.80		
	1.536	1.540	3.141	104.21		
	1.538	1.540	3.141	104.09		

### 2.8 样品含量测定

取独一味、糙苏、螃蟹甲、萝卜秦艽药材(地上/地下部分)粉末各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算药材中acteoside、alyssonoside、isoacteoside的含量,结果见表3。

## 3 讨论

### 3.1 流动相的选择

上述3个苯乙醇苷结构相似、极性较大,因此流动相的极性对其分离的影响很大。本试验考察了不同比例的乙腈-水、甲醇-水系统作为流动相的效果,发现采用乙腈-水梯度洗脱、用醋酸调pH为4.5时,分离度较好。

### 3.2 检测波长的选择

将上述3个苯乙醇苷分别作紫外光谱扫描,发现它们在330 nm波长处均有最大吸收,故选择330 nm作为检测波长。

表3 样品中3个苯乙醇苷的含量测定结果 ( $n=3$ )

Tab 3 Content determination of 3 phenylethanoid glycosides in samples ( $n=3$ )

样品	acteoside		alyssonoside		isoacteoside	
	含量,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	RSD,%	含量,mg/g	RSD,%
独一味地上部分	60.70	0.57	2.30	1.56	1.84	2.80
独一味地下部分	6.01	1.02	1.48	2.54	0.69	1.40
糙苏地上部分	4.95	0.64	0.20	1.67	0.44	0.84
糙苏地下部分	2.66	0.42	1.36	3.47	1.03	2.80
螃蟹甲地下部分	3.20	1.72	1.12	0.26	1.42	2.85
萝卜秦艽地下部分	0.90	0.98	1.70	1.61	0.31	4.20

### 3.3 小结

本试验结果表明,独一味、糙苏、螃蟹甲、萝卜秦艽4种药材中3个苯乙醇苷的含量各不相同,即使同一药材不同部位中3个成分的含量也各异。独一味地上部分中acteoside、alyssonoside、isoacteoside的含量比其他药材均高;萝卜秦艽地下部分中acteoside、isoacteoside的含量相较于其他药材均低;糙苏地上部分中alyssonoside的含量较其他药材均低。这是因为不同药材的习性各异、生长环境不同,造成acteoside、alyssonoside、isoacteoside的含量差异较大。3个苯乙醇苷成分总含量最高的为独一味地上部分,达到了64.84 mg/g,接下来依次为独一味地下部分(8.18 mg/g)、螃蟹甲地下部分(5.74 mg/g)、糙苏地上部分(5.59 mg/g)、糙苏地下部分(5.05 mg/g),而萝卜秦艽地下部分的总含量最低,为2.91 mg/g。同一种药材地上部分和地下部分3个苯乙醇苷成分总含量的高低差异还有待收集更多样品进行比较。

综上,本方法简便、准确、重复性好,可以同时测定4种唇形科植物独一味、糙苏、螃蟹甲和萝卜秦艽中3个苯乙醇苷成分——acteoside、alyssonoside、isoacteoside的含量。

### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 第19卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 6 074.
- [2] 李茂星. 藏药独一味止血活性部位的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2008.
- [3] 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.
- [4] 易进海, 颜贤忠, 罗泽渊, 等. 藏药独一味根化学成分的研究[J]. 药学学报, 1995, 30(3): 206.
- [5] Li MX, Shang XF, Jia ZP, et al. Phytochemical and biological studies of plants from the genus *Phlomis*[J]. *Chem Biodivers*, 2010, 7(2): 283.
- [6] 于振喜. 萝卜秦艽化学成分及质量控制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2006.
- [7] 靖会, 佐建锋, 李教社. 苯乙醇苷类化合物的药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 440.
- [8] 许敬英, 苏奎, 周静. 苯丙素苷类化合物的研究进展: II [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(7): 1 770.
- [9] 宋光西, 马玲云, 魏锋, 等. 苯乙醇苷的分布及药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(4): 169.

(收稿日期: 2013-03-21 修回日期: 2013-07-22)