

藏药短管兔耳草中松果菊苷和麦角甾苷的含量测定*

星玉秀^{1,2,3} 胡凤祖¹ 董琦¹ 彭敏^{1**}(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039;
3. 青海省公安厅刑警总队刑事科学技术研究管理中心, 西宁 810008)

摘要 目的: 建立 RP-HPLC 法同时测定松果菊苷和麦角甾苷的含量。方法: 采用 ZORXDB C₁₈ (150 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.1% 醋酸水溶液(3:7), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 330 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL。结果: 本方法可在 25 min 内完成松果菊苷和麦角甾苷 2 个成分的色谱分析, 且两成分色谱峰之间具有良好的分离度, 线性范围分别为 25 ~ 400 μg · mL⁻¹ ($r=0.9996$) 和 19.4 ~ 310 μg · mL⁻¹ ($r=0.9985$), 平均加样回收率 ($n=9$) 分别为 99.8% 和 97.8%。结论: 以松果菊苷和麦角甾苷为目标成分时, 青海省海北州热水地区为短管兔耳草的最佳采收地。该方法灵敏度高、准确、简便、快速, 可用于短管兔耳草的质量控制。

关键词: 民族用药; 藏药; 短管兔耳草; 藏黄连; 松果菊苷; 麦角甾苷; 高效液相色谱; 质量控制

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2012)07-1183-04

Determination of echinacoside and acteoside in
Tibetan herb *Lagotis breviflora* Maxim*XING Yu-xiu^{1,2,3}, HU Feng-zu¹, DONG Qi¹, PENG Min^{1**}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Criminal Police Contingent of Qinghai, Xining 810008, China)

Abstract Objective: To develop an RP-HPLC method for the simultaneous determination of echinacoside and acteoside in Tibetan herb *Lagotis breviflora* Maxim. **Methods:** The sample was separated on an ZORXDB C₁₈ (150 mm × 4.6 mm 5 μm) with the mobile phase consisting of methanol-0.1% acetic acid water solution(3:7) at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, UV detection wavelength was set at 330 nm and the column temperature was 25 °C. **Results:** Experimental results showed that a good separation of echinacoside and acteoside was achieved in 25 min by HPLC method; The method displayed good linearity of echinacoside and acteoside with the correlation coefficients and linear ranges of 25-400 μg · mL⁻¹ ($r=0.9996$) and 19.4-310 μg · mL⁻¹ ($r=0.9985$); The average recoveries ($n=9$) were 99.8% and 97.8%. **Conclusion:** The best harvest region is Reshui of Haibei, when echinacoside and acteoside are taken as target components. The method is sensitive, accurate, simple and fast, and can be used for quality control of *Lagotis breviflora* Maxim.

Key words: ethnic drug; Tibetan medicine; *Lagotis breviflora* Maxim; Zanghuanglian; echinacoside; acteoside; HPLC; quality control

短管兔耳草 (*Lagotis breviflora* Maxim) 又名短筒兔耳草, 藏黄连, 为一种传统常用藏药。《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药》(第 1 册) 载入的兔耳草 (藏名洪连) 为玄参科植物短管兔耳草 (*Lagotis breviflora* Maxim) (藏名红林)^[1] 或全缘兔耳草 *L. in-*

tegra W. Smith (藏名洪连)^[1] 的干燥全草。主要分布在甘肃西南部、青海东部及西藏等地。全草入药, 用于五脏有热, 血分热毒, 体虚潮热, 高血压, 急、慢性肝炎, 全身发热, 肾炎, 肺病, 动脉粥样硬化, 月经不调, 毒物中毒及“心热”症^[1]。史高峰等^[2] 从甘肃

* 科技部青海西宁国家农业科技园区农产品质量控制及服务体系建设项目(2006EA106-37)资助

** 通讯作者 Tel: (0971) 8292738; E-mail: pengmin@nwipb.ac.cn

短管兔耳草中分离鉴定了5个已知化合物,刘德铭等^[3]对青海产短管兔耳草脂溶性化学成分进行了研究,金兰等^[4]发现短管兔耳草具有一定的抗肿瘤作用。目前,对于麦角甾苷和松果菊苷的测定已有较多报道^[5-9]。本文鉴于短管兔耳草的多种功能作用,采用与文献报道中相似的分离、测定方法,对分布在不同地区的短管兔耳草中主要成分松果菊苷和麦角甾苷进行了多样点测定,测定结果与海拔间关系表明:短管兔耳草在海拔3.500~4.100 km间的活性物质的含量较高且较稳定,这为短管兔耳草的采收提供了一定的科学依据。

1 实验仪器、试剂和材料

1.1 仪器 Agilent 1200型高效液相色谱仪,四元梯度泵,DAD检测器。

1.2 试药 松果菊苷、麦角甾苷的对照品(纯度达99%)均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯,水为超纯水。

1.3 药材 野生短管兔耳草全草(采集于祁连县达坂山,热水,大冬树山和野牛沟及玉树州杂多县长拉山垭口,见表1)粉碎后,过80目筛,冷藏保存备用。

表1 短管兔耳草采集地点

Tab 1 Origin of whole herb of *Lagotis breviflora* Maxim

编号 (No.)	位点 (sites)	海拔 (altitude) /m	纬度 (longitude)	经度 (latitude)
1	杂多县长拉垭口 (ChanglaYakou, Zaduoxian)	4525	95°53'24"	32°58'36"
2	祁连山大冬树山 (Dadongshushan, Qilianxian)	4122	100°14'31"	38°00'51"
3	祁连山野牛沟 (Yeniugou, Qilianxian)	4110	100°14'31"	38°00'52"
4	海北州达坂山 (Dabanshan, Haibeizhou)	3924	100°26'60"	37°29'25"
5	海北州热水 (Reshui, Haibeizhou)	3499	100°51'41"	37°40'15"

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品储备液 精密称取对照品松果菊苷4.0 mg、麦角甾苷3.1 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配得质量浓度分别为400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、310 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液 分别称取不同采集地的短管

兔耳草粉末各1.0 g,精密称定,置50 mL锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声(功率200 W,频率53 kHz)提取30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.2 色谱条件 采用ZORXDB C₁₈(150 mm × 4.6 mm 5 μm),流动相为甲醇-0.1%醋酸水溶液(3:7),流速1.0 mL · min⁻¹,检测波长330 nm,柱温25 °C,进样量20 μL 。在该色谱条件下,松果菊苷、麦角甾苷均被洗脱并达到基线分离(图1-A、B)。

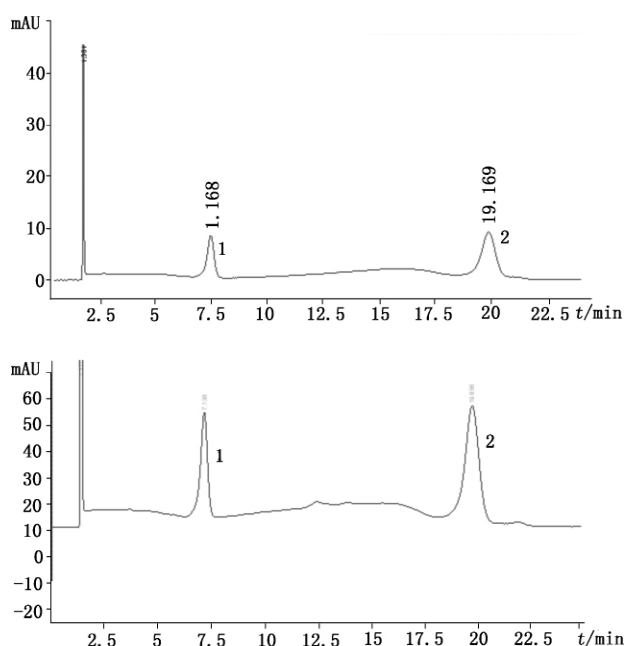


图1 对照品(A)及采集自祁连山大冬树山的短管兔耳草全草(B)色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and whole herb of *Lagotis breviflora* Maxim from Dadongshushan of Qilianxian(B)

1. 松果菊苷(echinacoside) 2. 麦角甾苷(acteoside)

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 用甲醇按1/2, 1/4, 1/8, 1/16倍稀释“2.1.1”项下的对照品储备液,即得系列浓度对照品溶液。取系列对照品溶液及对照品储备液,按“2.2”项下色谱条件进样测定,以浓度对峰面积作图,进行线性回归,得松果菊苷、麦角甾苷回归方程分别为:

$$Y = 2 \times 10^6 X - 2.153 \times 10^4 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 2 \times 10^6 X - 2.113 \times 10^4 \quad r = 0.9985$$

线性范围分别为25~400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和19.4~310 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.3.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液20 μL ,连续进样5次,测定峰面积,计算RSD为2.0%。

2.3.3 稳定性试验 取同一短管兔耳草全草样品的供试品溶液,分别于 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h 进样测定,其质量分数的 RSD 为 1.3% ($n=9$)。结果表明,供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一短管兔耳草全草样品 5 份,按照“2.1.2”项下方法制成供试品溶液,依法分别测定含量。结果松果菊苷和麦角甾苷平均含量分别为 0.12 和 0.40 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 分别为 1.6% 和 2.3%。

2.3.5 加样回收率试验 取“2.4.4”项下已测定松果菊苷和麦角甾苷含量的短管兔耳草药材粉末 9 份,每 3 份为 1 组,每份约 0.5 g,精密称定后,加入“2.1.1”项下对照品储备液适量,使得加入对照品的量分别约为样品中松果菊苷和麦角甾苷含有量的 80%,100%,120%,按“2.1.2”项下方法制备供试溶液,按“2.2”项下的色谱条件进样,计算回收率。结果松果菊苷和麦角甾苷低浓度回收率($n=3$)分别为 100.5% 和 99.7%,RSD 分别为 0.7% 和 0.6%;中浓度回收率($n=3$)分别为 99.4% 和 97.9%,RSD 分别为 1.1% 和 1.9%;高浓度回收率($n=3$)分别为 99.5% 和 95.9%,RSD 分别为 1.9% 和 0.2%。低、中、高浓度平均回收率($n=9$)分别为 99.8% 和 97.8%。

2.4 样品测定 精密吸取供试品溶液 20 μL ,按上述“2.2”项下色谱条件进样测定,以外标法计算样品中松果菊苷和麦角甾苷的含量,结果见表 2 及图 2。

表 2 短管兔耳草全草中松果菊苷和麦角甾苷的含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab 2 The contents of echinacoside and acteoside in *Lagotis breviflora*

编号(No.)	松果菊苷 (echinacoside)	麦角甾苷 (acteoside)	总和 (total)
1	0.12	0.40	0.53
2	1.74	1.12	2.86
3	1.56	0.64	2.20
4	1.52	0.74	2.26
5	1.18	3.28	4.46

3 讨论

3.1 检测波长的选择 取混合对照品溶液在 210~400 nm 波长范围扫描,其中松果菊苷在 334 nm 处有最大吸收,麦角甾苷在 331 nm 处有最大吸收。由于二者的最大吸收波长相差不大,为了便于检测,最终确定 330 nm 为测定波长。

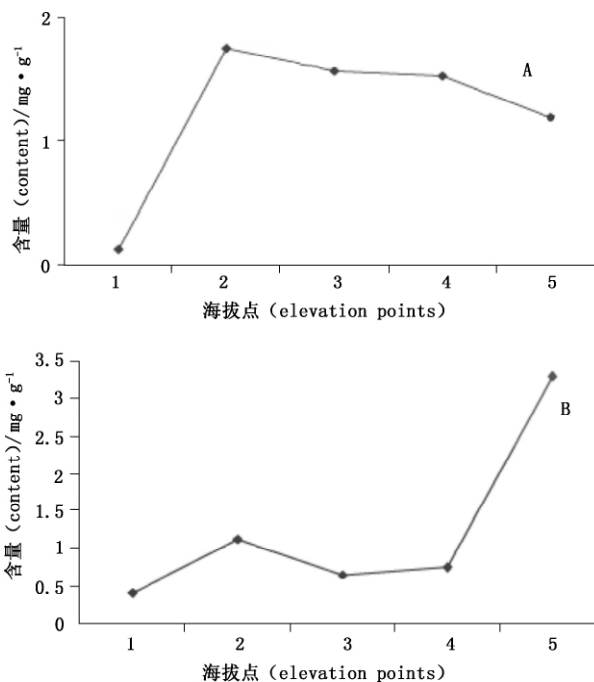


图 2 短管兔耳草中松果菊苷(A)及麦角甾苷(B)的含量随海拔高度的变化趋势图

Fig 2 The trendline of the content of echinacoside (A) and acteoside (B) with the altitude

3.2 流动相的选择 本实验考察了甲醇-水、甲醇-0.1% 醋酸水溶液和乙腈-水体系,发现甲醇-0.1% 醋酸水溶液体系的分离效果较好,且无重叠峰,因此选取甲醇-0.1% 醋酸水溶液(3:7)作为流动相进行洗脱。

3.3 提取条件的选择 松果菊苷和麦角甾苷均易溶于甲醇,因此本实验采用甲醇超声提取,并对提取温度(25, 35, 45, 55 $^{\circ}\text{C}$)、提取时间(10, 20, 30, 40, 50 min)、提取次数(1, 2, 3, 4 次)以及甲醇用量(10, 20, 30, 40, 50 mL)进行考察。结果表明,以小于 45 $^{\circ}\text{C}$ 的温度,超声提取 1 次,每次 30 min,甲醇用量为 50 mL 的条件对样品进行提取时,即可快速有效地将短管兔耳草中的松果菊苷和麦角甾苷提取完全。

3.4 小结 从 5 个不同采收地短管兔耳草中松果菊苷和麦角甾苷的含量测定结果可以看出,采自祁连山大冬树山的短管兔耳草药材中的松果菊苷含量最高,达到 1.74 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,采自海北州热水地区的短管兔耳草药材中的麦角甾苷含量最高,达到 3.28 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,综合考虑后,初步推测海北州热水地区为短管兔耳草的最佳采收地区。样品采集于青海省不同州县的环境条件差异较大的 5 个采样区,海拔高度从 3.499 km 至 4.526 km,图 2-A 中松果菊苷的含量随着海拔的

(下转第 1195 页)

- 利用的研究现状与进展). *Bull Biol*(生物学通报), 2001, 36(5): 45
- 8 LIU Li - pin(刘立品). Record Ziwuling Woody Plants(子午岭木本植物志). Lanzhou(兰州): Lanzhou University Press(兰州大学出版社), 1998. 215
 - 9 GUO Xiao - qiang(郭小强). The developmental recommendations on the wild medicinal plant resources of the eastern areas of Gansu(甘肃陇东地区野生药用植物资源及开发建议). *Gansu Agric Sci Technol*(甘肃农业科技), 2004, 44(2): 49
 - 10 MA Xiao - qing(马晓青), CAI Hao(蔡皓), LIU Xiao(刘晓), *et al.* ICP - AES determination of metallic and trace elements in *Chrysanthemum* before and after sulfur - fumigated process(硫磺熏蒸前后中药菊花中金属元素及微量元素的 ICP - AES 检测). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2011, 31(6): 1031
 - 11 ZHANG Li - juan(张丽娟), GU Xue - xin(谷学新), ZHOU Yong - yi(周勇义). Heavy metals in Chinese traditional medicines(中药产品中的重金属元素). *J Cap Norm Univ(Nat Sci Ed)*(首都师范大学学报·自然科学版), 2004, 25(1): 34
 - 12 KOU Xing - ming(寇兴明), XU Min(徐敏), GU Yong - zuo(顾永祚). Determination of trace heavy metal elements in Cortex Phellodendri Chinensis by ICP - MS after microwave - assisted digestion(微波消解/ICP - MS 法测定川黄柏中微量重金属元素). *Spectrosc Spectral Anal*(光谱学与光谱分析), 2007, 27(6): 1197
 - 13 TIAN Zhu - ping(田柱萍), HE Bang - ping(何邦平), WANG Xiao - yan(王小燕), *et al.* The efficacy of medicine of the Chinese herbal medicine with its a research for containing trace element relating to progress(中药材的药效与其所含微量元素关系的研究进展). *Stud Trace Elem Health*(微量元素与健康研究), 2005, 22(4): 32
 - 14 WANG Pei - yu(王丕玉), LIU Hai - chao(刘海潮). The relation between zincic unbalance and human body health(锌失衡与人体健康). *Food Nutr China*(中国食物与营养), 2007, 13(7): 50
 - 15 WEI An - yang(韦安阳), ZHOU Chun - lan(周春兰). Trace element Cu, Fe, Mn, Ge and free radical(微量元素铜、铁、锰、锗与自由基). *Guangdong Trace Elem Sci*(广东微量元素科学), 2001, 8(6): 15

(本文于2011年10月16日收到)

(上接第1185页)

增高含量逐渐提高,在海拔4122 km,其含量逐渐下降,这与青藏高原地区的特殊气候条件有关,如:气压低、日辐射强、温度低,生长季节内植物经常遭受冰冻的侵袭^[10]。图2 - B中麦角甾苷的含量由海拔4525 km处的0.40 mg · g⁻¹逐渐增加到海拔3499 km处的3.28 mg · g⁻¹,与图2 - A中松果菊苷在海拔4.122 km处含量达到最高后逐渐下降为一个极小值的趋势大致相同,说明短管兔耳草在海拔3.500 ~ 4.100 km间的活性物质的含量较高且较稳定,这为短管兔耳草的采收提供了一定的科学依据。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 1995. Vol I(一部): 63
- 2 SHI Gao - feng(史高峰), HUANG Xin - yi(黄新异), LU Run - hua(黄润华). The chemical composition research of *Lagotis breviflora* Maxim(藏药短管兔耳草的化学成分研究). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2006 31(2): 164
- 3 LIU De - ming(刘德铭), YANG Shi - bing(杨仕兵), PENG Min(彭敏), *et al.* Analysis of liposoluble composition in *Lagotis breviflora* Maxim by GC - MS(不同产地短管兔耳草脂溶性化学成分的GC - MS分析). *J Yunnan Univ*(云南大学学报) 2006 28(S1): 241
- 4 JIN Lan(金兰), CHEN Zhi(陈志). Anticancer research of *Lagotis breviflora* Maxim(短管兔耳草抗癌作用的研究). *J Qinghai Norm Univ*(青海师范大学学报) 2006(2): 86
- 5 ZHANG Xuan(张烜), LI Xin(李鑫), RENA Kasimu(热娜·卡斯木) *et al.* RP - HPLC determination of echinacoside and acteoside in *Herba Cistanches* cultivated on different parasitic species and habitats(RP - HPLC法测定不同寄主和不同产地肉苁蓉中松果菊苷和麦角甾苷的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2003 23(4): 254
- 6 CHEN Juan(陈娟), LIU Xia(刘霞), SHI Yan - ping(师彦平). HPLC determination of acteoside(verbascoside) in flowers of *Pau- lownia tomentosa* (Thunb.) Steud[高效液相色谱法测定毛泡桐花中麦角甾苷(毛蕊花糖苷)的含量]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2004 24(2): 123
- 7 TANG Xiao - lei(汤小蕾). The content determination of echinacoside and acteoside in *Cistanche tubulosa* by HPLC(HPLC法测定管花肉苁蓉中松果菊苷和麦角甾苷的含量). *China Pharm*(中国药师) 2009 12(8): 1061
- 8 JU Ai - hua(鞠爱华), AO GE RI Le - tu(敖格日乐图), ZHOU Kai(周凯). Determination of echinacoside and acteoside in herbs of *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) G. Beck of Inner Mongolia(内蒙古盐生肉苁蓉中松果菊苷和麦角甾苷的含量测定). *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志) 2011 26(1): 178
- 9 XIAO Yuan - can(肖远灿), YANG Shi - bing(杨仕兵), LIU De - ming(刘德铭) *et al.* A RP - HPLC method for simultaneous determination of echinacoside and acteoside in Tibetan Herb *Lagotis breviflora* Maxim(藏药短管兔耳草中松果菊苷和麦角甾苷的RP - HPLC分析). *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发) 2008 20(2): 288
- 10 LU Cun - fu(卢存福), JIAN Ling - cheng(简令成). Photosynthesis in alpine plant *Lagotis breviflora* and its response to freezing stress(高山植物短管兔耳草光合作用特性及其对冰冻胁迫的反应). *Chin Bull Bot*(植物学通报) 2000 17(6): 559

(本文于2012年5月13日修改回)