

藏药短管兔耳草中松果菊苷和麦角甾苷的 RP-HPLC 分析

肖远灿^{1,2}, 杨仕兵^{1,2}, 刘德铭^{1,2}, 胡凤祖^{1*}¹中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008; ²中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要:建立了藏药短管兔耳草中松果菊苷和麦角甾苷含量的高效液相色谱分析法。采用 Waters XTerra RP₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-1%冰醋酸溶液 (28:72, V:V) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 330 nm, 柱温 30 ℃, 在 20 min 内分离检测了该两种化合物。松果菊苷和麦角甾苷进样量分别在 0.077~4.950 μg ($r=0.9999$) 和 0.085~5.450 μg ($r=0.9999$) 内呈良好线性, 平均加样回收率分别为 98.35% 和 92.50%, RSD 分别为 2.35% 和 2.86%。所建立的方法简便、快捷、结果准确可靠, 重现性好, 可用于藏药短管兔耳草的质量控制, 并为兔耳草属植物中苯丙素苷类化合物的分离分析提供一定的参考。

关键词:短管兔耳草; 松果菊苷; 麦角甾苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

A RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Echinacoside and Acteoside in Tibetan Herb *Lagotis breviflora* Maxim

XIAO Yuan-can^{1,2}, YANG Shi-bing^{1,2}, LIU De-ming^{1,2}, HU Feng-zu^{1*}¹Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China;²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: To establish RP-HPLC method coupled with photodiode array detection (PAD) for the determination of echinacoside and acteoside in Tibetan herb *Lagotis breviflora* Maxim, well separation was achieved with in 20 min on a Waters XTerra RP₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) using methanol-1% acetic acid solution (28:72, V:V) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min and column temperature 30 ℃, 330 nm as the detection wavelength. Echinacoside showed good relationship at the range of 0.077-4.950 μg ($r=0.9999$), and acteoside at the range of 0.085-5.450 μg ($r=0.9999$). The average recovery was 98.35% and 92.50%, relative standard derivation (RSD) of 2.35% and 2.86% for echinacoside and acteoside. The proposed method is simple, rapid, accurate and reliable. It can be used as a quantitative determination method for the quality control of herb *Lagotis breviflora* Maxim.

Key words: *Lagotis breviflora* Maxim; echinacoside; acteoside; HPLC; assay

短管兔耳草 (*Lagotis breviflora* Maxim) 是玄参科兔耳草属植物, 也是传统常用藏药, 以其干燥全草入药, 主要分布在甘肃西南部、青海东部及西藏等地。短管兔耳草味苦, 性寒。有清热凉血, 解毒的功能。用于五脏有热, 血分热毒, 体虚潮热, 高血压, 急、慢性肝炎^[1]。《四部医典》列其为草药类之首。近年来对兔耳草属植物的研究逐渐深入, 郑秀萍等^[2]对短管兔耳草进行了化学成分的研究, 分离得到松果菊苷和麦角甾苷 (毛蕊花糖苷) 等苯丙素苷类化合物。松果菊苷和麦角甾苷具有显著的药理活性, 能

够清除活性氧自由基, 抗氧化, 抗衰老^[3,4]等。松果菊苷还在 SHSY5Y 细胞中对抗 TNF 诱导的凋亡有神经保护作用, 对某些神经退行性疾病有治疗作用^[5]。

目前, 对短管兔耳草的研究较少, 也还未建立有效的药材质量控制标准。为了更好的开发和利用短管兔耳草资源, 发挥藏药的优势, 有必要建立一种行之有效的检测方法对其质量进行控制并为进一步的研究提供依据。

文献^[6,7]报道了肉苁蓉中松果菊苷和麦角甾苷含量分析的高效液相法。对短管兔耳草中苯丙素苷类物质的分析尚未见报道, 本实验建立了短管兔耳草中松果菊苷和麦角甾苷等苯丙素苷类物质的反相高效液相色谱-二极管阵列检测 (RP-HPLC-PAD) 测

收稿日期: 2006-10-16 接受日期: 2006-12-15

*通讯作者 Tel: 86-971-6132750; E-mail: hufz@nwipb.ac.cn

定法,为藏药短管兔耳草的进一步开发利用提供实验依据。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(美国 Waters),包括 515型双高压输液泵,柱温箱,2996型二级管阵列检测器,Empowe色谱工作站。对照品:松果菊苷和麦角甾苷购自中国药品生物制品鉴定所,编号分别为 111670-200401和 1530-200202。甲醇为色谱纯,水为电阻值 18.2 M Ω 超纯水,其余试剂均为分析纯。试验中所用药材 2004年 7月采自青海省门源县达坂山,由中国科学院西北高原生物所卢学峰副研究员鉴定为玄参科兔耳草属植物短管兔耳草 *Lagotis brevituba* Maxim.

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适应性

色谱柱:Waters XTerra RP18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-1%冰醋酸水溶液(28:72);流速:1.0 mL/min;进样量:10 μ L;检测波长:330 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C。理论塔板数按松果菊苷峰计算不低于 3000,麦角甾苷和松果菊苷与其他物质的分离度大于 1.5。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精确称取麦角甾苷 5.45 mg,松果菊苷 4.95 mg于两只 5 mL容量瓶内,加入少量甲醇,超声溶解并定容至刻度,分别取等体积上述两种溶液混合,摇匀,即得松果菊苷 495.00 μ g/mL,麦角甾苷 545.00 μ g/mL的混合对照品储备液。

2.2.2 样品溶液的制备

取室温干燥,粉碎过 20目筛的短管兔耳草粉末 1.000 g,精密称定。滤纸包好,石油醚索氏提取法处理 4 h,除去脂溶性成分。取出,挥干溶剂,置具塞三角瓶中,精密加入甲醇 50 mL,超声 40 min,冷却后滤过,定容于 50 mL容量瓶中,摇匀,仪器分析前 0.45 μ m滤膜过滤,即得。

2.3 标准曲线的制备

精密吸取 2.2.1中配置的松果菊苷、麦角甾苷混合储备液 1 mL,用甲醇依次作等倍稀释,依 2.1中色谱条件测定,以对照品的质量浓度为横坐标(X),相应峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程为:

$$\text{松果菊苷: } Y = 1 \times 10^7 X - 103649, r = 0.9999$$

$$\text{麦角甾苷: } Y = 2 \times 10^7 X - 137510, r = 0.9999$$

结果表明,进样量以 10 μ L计,松果菊苷在 0.077~4.950 μ g,麦角甾苷在 0.085~5.450 μ g范围内,线性关系良好。

2.4 精密度试验

精密吸取 1/4倍浓度对照品储备液(松果菊苷 123.75 μ g/mL,麦角甾苷 136.25 μ g/mL) 10 μ L,于同日内每 2 h测定 1次,共测 5次,以峰面积计算日内精密度,得到 RSD为松果菊苷 1.46%,麦角甾苷 0.71%。

2.5 加样回收率试验

精密称取已测得含量的样品(松果菊苷 15.86 mg/g,麦角甾苷 5.79 mg/g) 0.1 g六份,其中五份分别加入松果菊苷约 1.58 mg,麦角甾苷约 0.58 mg,第六份作对照,按照样品溶液的制备方法处理并测定,计算回收率,试验结果见表 1。

表 1 加样回收率实验结果 ($n=5$)

Table 1 Result of recovery ($n=5$)

| 组分 Component | 药材中的含量 Weight (mg) | 加入量 Add amount (mg) | 检出量 Found amount (mg) | 回收率 Recovery (%) | 平均回收率 Average recovery (%) | RSD (%) |
|----------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------|----------------------------------|------------|
| 松果菊苷 Echinacoside | 1.58 | 1.60 | 3.13 | 96.84 | 98.35 | 2.35 |
| | 1.58 | 1.59 | 3.11 | 96.20 | | |
| | 1.58 | 1.58 | 3.19 | 101.90 | | |
| | 1.58 | 1.59 | 3.13 | 97.47 | | |
| | 1.58 | 1.61 | 3.18 | 99.37 | | |
| 麦角甾苷 Acteoside | 0.56 | 0.58 | 1.09 | 91.07 | 92.50 | 2.86 |
| | 0.56 | 0.57 | 1.11 | 96.43 | | |
| | 0.56 | 0.60 | 1.10 | 89.29 | | |
| | 0.56 | 0.59 | 1.11 | 92.86 | | |
| | 0.56 | 0.61 | 1.13 | 92.86 | | |

表 2 短管兔耳草中松果菊苷及麦角甾苷含量测定结果

Table 2 Result of assay of echinacoside and acteoside in tibetan herb *Lagotis breviflora* Maxim

| 样品编号 No | 松果菊苷 含量 Content (mg/g) | RSD (n=3) (%) | 麦角甾苷 含量 Content (mg/g) | RSD (n=3) (%) |
|------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|
| 04-15-1 | 15.85 | 1.12 | 5.79 | 0.75 |
| 04-15-2 | 15.69 | 1.41 | 5.73 | 0.67 |
| 04-15-3 | 15.72 | 0.96 | 5.68 | 0.54 |

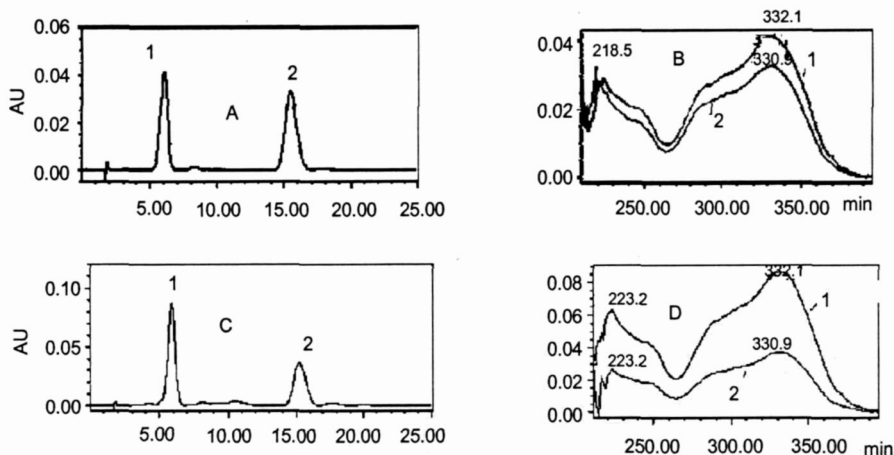


图 1 色谱图及紫外扫描图

Fig. 1 HPLC chromatogram and UV scan spectrum

1. 松果菊苷 Echinacoside; 2. 麦角甾苷 Acteoside

A. 对照品色谱图; B. 对照品紫外扫描图; C. 样品色谱图; D. 样品紫外扫描图;

A. HPLC chromatogram of reference substance; B. UV scan spectrum of reference; C. HPLC chromatogram of sample; D. UV scan spectrum of sample

331、334 nm, 本试验应用二极管阵列检测器对松果菊苷和麦角甾苷对照品进行了 190 ~ 400 nm 全波长扫描, 松果菊苷在 332.1 nm、麦角甾苷在 330.9 nm 处有最大吸收, 结果如图 1(B), 故选择了 330 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择

考察了张思巨等^[7]的乙腈-甲醇-醋酸水溶液三元流动相和张等^[6]的流动相, 经过反复试验, 采用甲醇-1%冰醋酸水溶液(28:72, V:V)二元流动相

2.6 样品测定

按 2.2.2 项下方法制备采自青海省门源县达坂山三个采样点上的短管兔耳草样品溶液, 以 2.1 项下色谱条件进行分析测定, 结果见表 2 和图 1。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

文献报道的松果菊苷和麦角甾苷的检测波长为

能够对短管兔耳草中松果菊苷和麦角甾苷良好的分离。另外, 用甲醇替代乙腈, 降低了分析成本; 二元流动相替代三元流动相, 更加简便易行。最终确定流动相为甲醇-1%冰醋酸水溶液(28:72, V:V)。

3.3 样品提取条件的选择

本试验发现短管兔耳草中酯溶性成分含量较高, 根据松果菊苷和麦角甾苷不溶于石油醚^[8]的性质, 首先以石油醚为溶剂用索氏提取法除去酯溶性成分以减少对分析的干扰。又考察了相同时间内用

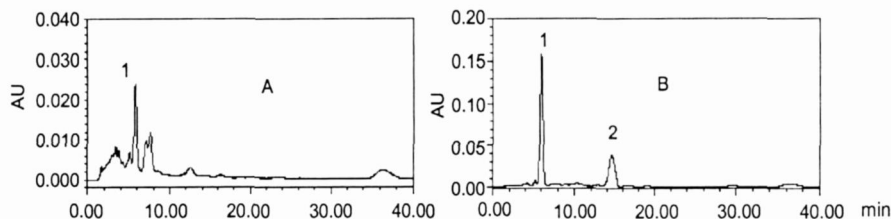


图 2 短管兔耳草水提取物及流动相提取物色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of *Lagotis breviflora* Maxim extract with water and eluent

1. 松果菊苷 Echinacoside; 2. 麦角甾苷 Acteoside

A. 短管兔耳草水提取物色谱图 Extract with water; B. 短管兔耳草流动相提取物色谱图 Extract with eluent

甲醇、水、流动相对短管兔耳草中松果菊苷和麦角甾苷的提取率,结果表明,甲醇和流动相对松果菊苷和麦角甾苷的提取率较水高,水和流动相提取的干扰物较多,不利于目标物质的分析,见图 2A、2B;而甲醇和流动相的提取率差别不大,所以选择了甲醇作为提取溶剂。另外,我们还考察了以甲醇作为提取溶剂,超声和加热回流提取之间的差异,发现提取时间大于 40 min 后两种提取方式的提取率几乎相等,由于回流提取较为繁琐,我们选择了超声提取。综上所述,确定最优提取条件为:先以石油醚索氏提取 4 h,挥干溶剂后再用甲醇超声提取 40 min。

4 结论

藏药短管兔耳草中松果菊苷含量 15.70 mg/g,麦角甾苷含量 5.80 mg/g,总含量超过 2%,是一种值得开发和深入研究的藏药资源植物。本试验所建立的 RP-HPLC-PAD 检测短管兔耳草中松果菊苷和麦角甾苷的方法快速、准确、简便易行,为短管兔耳草的深入研究和开发提供了依据。

参考文献

- 1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences Tibetan Medicine Glossary (藏药志). Xining Qinghai People's Publishing House, 1991. 447-450.
- 2 Zheng XP (郑秀萍), Shi JG (石建功). Chemical constitute research of *Lagotis breviflora* Maxim. *J Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35: 503-504.
- 3 Federica P, Stefania B, Lara M, et al Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. *J Pharm Biomedical Anal*, 2004, (35): 289-301.
- 4 Eun RW, Chul YC, Dong W, et al Protective effect of acteoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity Kyung Jin Leea *Life Sciences*, 2004, (74): 1051-1064.
- 5 Min D, Jin YZ, Peng FT, et al Echinacoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from TNF α -induced apoptosis *European Journal of Pharmacology*, 2004, (505): 11-18.
- 6 Zhang X (张), Li X (李鑫), Rena K (热娜·卡斯木), et al RP-HPLC determination of echinacoside and acteoside in herba cistanches cultivated on different parasitic species and habitats *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2003, 23: 254-257.
- 7 Zhang SJ (张思巨), Liu L (刘丽), Yu JY (余江泳), et al A RP-HPLC method for simultaneous determination of echinacoside and acteoside in Herbe Cistanches *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2004, 39: 740-741.
- 8 Sun WJ (孙文基), Xie SC (谢世昌). Quantitative Analysis of Natural Drug Constituents (中国医药科技出版社). China Medicine Sci-Tech Publishing House, 2003. 7.