

# RP-HPLC 同时测定向日葵列当中 苯乙醇苷类化合物 crenatoside 和类叶升麻苷

曲正义, 金银萍, 孙成贺, 李亚丽, 姚春林, 王英平\*

(中国农业科学院特产研究所, 长春 130112)

**[摘要]** **目的:** 建立同时测定向日葵列当中 crenatoside 和类叶升麻苷含量的 HPLC 法。**方法:** 采用反相高效液相色谱法, 用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 以乙腈-0.01% 冰醋酸溶液 (18:82) 为流动相, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 330 nm, 柱温 30 °C, 在 30 min 内分离检测了这两种化合物。**结果:** RP-HPLC 测定的 crenatoside 和类叶升麻苷线性范围分别在 1.08 ~ 16.2 μg ( $r=0.9999$ ) 和 1.00 ~ 15.0 μg ( $r=0.9998$ ), 平均加样回收率分别为 97.23%, 96.27%, RSD 分别为 1.21%, 1.66%。**结论:** 该方法简便, 精密度、重复性良好, 结果准确可靠, 可以作为向日葵列当及其相关制剂的质量控制。

**[关键词]** 向日葵列当; 苯乙醇苷类化合物; crenatoside; 类叶升麻苷

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0087-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100087

## Simultaneous Determination of Crenatoside and Acteoside in *Orobanche cumana* by RP-HPLC

QU Zheng-yi, JIN Yin-ping, SUN Cheng-he, LI Ya-li, YAO Chun-lin, WANG Ying-ping\*

(Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Changchun 130112, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a RP-HPLC method for simultaneous determination of phenylethanoid glycosides crenatoside and acteoside in *Orobanche cumana*. **Method:** The analysis was performed on a Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with CH<sub>3</sub>CN-0.01% HOAc (18:82) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and at a column temperature of 30 °C, 330 nm as the detection wavelength, the well separation was achieved in 30 min. **Result:** Crenatoside showed good relationship at the range of 1.08-16.2 μg ( $r=0.9999$ ), and acteoside at the range of 1.00-15.0 μg ( $r=0.9998$ ). The average recovery were 97.23% and 96.27%, relative standard derivation (RSD) of 1.21% and 1.66% for crenatoside and acteoside. **Conclusion:** The proposed method is simple, rapid, accurate and reliable. It can be used for the quality evaluation of *O. cumana* and its preparation.

**[Key words]** *Orobanche cumana*; phenylethanoid; glycoside; crenatoside; acteoside

向日葵列当主要分布于黑龙江、吉林、北京、甘肃、辽宁、内蒙古、河北、山西、陕西、青海、新疆等省区<sup>[1-2]</sup>。列当属多种植物在我国民间以作为药用,

具有强筋壮骨、补肾助阳、抗疲劳、改善脑组织循环、增强免疫及雄性激素样等作用,其主要活性成分为苯乙醇苷类物质<sup>[3-5]</sup>。如含有向日葵列当的国家中药保护品种脑塞通,在治疗中风方面具有很好疗效。作者及赵梦霞对列当属植物向日葵列当进行了化学成分研究,从中分离鉴定了 4 个苯乙醇苷类化合物,分别为 crenatoside、isocrenatoside、类叶升麻苷和 3-O-methyl-crenatoside。其中 crenatoside 和类叶升麻苷含量较高,通过药理实验证明 crenatoside 和类叶升麻苷均具有显著的抗氧化、抗菌活性<sup>[6-8]</sup>,类叶升

**[收稿日期]** 20131115(016)

**[基金项目]** 吉林市科技计划项目(201162512)

**[第一作者]** 曲正义, 硕士, 助理研究员, 从事药效质量评价研究, Tel: 0431-81919571, E-mail: qzy209@163.com

**[通讯作者]** \* 王英平, 博士, 教授, 从事药用植物资源及质量评价研究, Tel: 0431-81919571, E-mail: yingpingw@126.com

麻苷还具有雌激素/抗雌激素样作用、调节免疫、壮阳、增强记忆力等多种生物活性<sup>[9-11]</sup>。

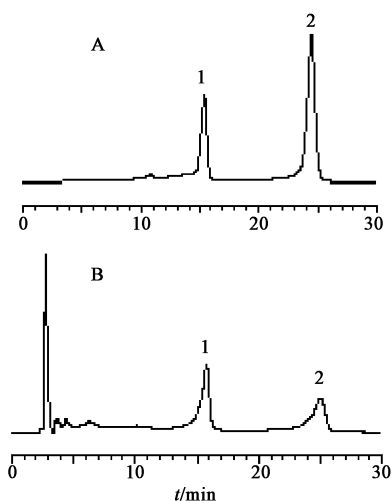
国内外对向日葵列当化学成分及药理活性研究较少,未建立有效的药材质量控制方法,本实验参考同科植物建立了向日葵列当中 crenatoside 和类叶升麻苷 2 种苯乙醇苷类物质的反相高效液相测定法,为向日葵列当的进一步开发利用提供依据。

## 1 材料

10AvP 高效液相色谱仪(日本岛津),包括 LC-10AtvP 型液相色谱泵、SIL-10AdvP 型自动进样器、CTO-AvP 型色谱柱恒温箱、CLASS-vP 色谱工作站)。Crenatoside 对照品为本课题组从向日葵列当中分离纯化得到,按本实验色谱条件,峰面积归一化法计算纯度 >98%,类叶升麻苷购自四川维克奇生物科技有限公司(批号 120921)。乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。试验中所用药材 2013 年 9 月采自吉林省长岭县,由中国农业科学院特产研究所姚春林研究员鉴定为列当科列当属植物向日葵列当 *Orobancha cumana* Wallr. 的全草。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.01% 冰醋酸溶液(18:82),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,检测波长 330 nm,进样量 20 μL。在上述条件下,crenatoside 和类叶升麻苷的保留时间分别为 23.9, 15.1 min,无杂质干扰,二者分离度良好。见图 1。



A. 对照品; B. 供试品;  
1. 类叶升麻苷; 2. crenatoside

图 1 向日葵列当 HPLC

**2.2 Crenatoside 和类叶升麻苷对照品储备液的制备** 精密称取 crenatoside 对照品 5.4 mg 置 10 mL 量

瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成每 1 mL 含 0.540 0 mg 的溶液。精密称取类叶升麻苷对照品 5.0 mg 置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成每 1 mL 含 0.500 0 mg 的溶液。

**2.3 样品溶液的制备** 精密称取干燥,粉碎并过 40 目筛的向日葵列当药材 0.50 g,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 80% 乙醇溶液 50 mL,称定质量,热回流提取 60 min,放至室温,用 80% 乙醇补足失重,混匀,过滤,回收浓缩滤液,定容于 10 mL 的量瓶中,摇匀,即得。

**2.4 线性关系考察** 精密吸取 2.2 项下配置的 crenatoside、类叶升麻苷混合储备液 2, 5, 10, 20, 30 μL 依 2.1 项下色谱条件测定,以对照品质量(X)对色谱峰面积(Y)做标准曲线,得回归方程分别为 crenatoside  $Y = 1.996 \times 10^6 X + 4.730 \times 10^6$ ,  $r = 0.9999$ ; 类叶升麻苷  $Y = 9.235 \times 10^5 X + 1.973 \times 10^5$ ,  $r = 0.9998$ 。

**2.5 精密度试验** 取供试品溶液连续进样 6 次,按 2.1 项下色谱条件测定,结果 crenatoside 及类叶升麻苷峰面积的 RSD 分别为 1.32%, 1.65%, 表明仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 取同一批药材粉末 6 份,按 2.3 项下制备方法制备,按 2.1 项下色谱条件平行测定,结果 crenatoside 及类叶升麻苷含量的 RSD 分别为 1.16%, 1.53%, 表明方法重复性良好。

**2.7 回收率试验** 精密称取 0.50 g 已测得含量的样品(crenatoside 2.86 mg·g<sup>-1</sup>, 类叶升麻苷 7.02 mg·g<sup>-1</sup>) 6 份,其中 5 份分别加入 crenatoside 约 1.41 mg, 类叶升麻苷约 3.53 mg, 第 6 份作对照,按照 2.3 项下制备方法制备样品溶液,并按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率,得到 crenatoside 的平均回收率为 97.23%, RSD 1.21%; 类叶升麻苷的平均回收率为 96.27%, RSD 1.66%, 表明该方法准确率高。试验结果见表 1。

**2.8 样品溶液的稳定性试验** 取新制备的样品溶液分别在放置 0, 2, 4, 8, 12 h 后进样分析,记录峰面积,结果 crenatoside 及类叶升麻苷峰面积的 RSD 分别为 0.85%, 0.93%, 表明供试品溶液在室温下放置 12 h 内稳定性良好。

**2.9 样品含量测定** 精密称取向向日葵列当药材粉末 0.50 g,按 2.3 项下方法制备。分别精密吸取混合对照品溶液(crenatoside 0.54 g·L<sup>-1</sup>, 类叶升麻苷 0.50 g·L<sup>-1</sup>) 与供试品溶液各 20 μL,注入高效液相色谱仪,测定,以外标法计算含量,见表 2。

表 1 向日葵列当中 2 种成分的加样回收率试验

成分	称样量 /g	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
crenatoside	0.500 6	1.417	1.415	2.790	97.03	97.23	1.21
	0.501 3	1.419	1.417	2.771	95.41		
	0.500 9	1.418	1.419	2.797	97.18		
	0.501 2	1.418	1.417	2.813	98.45		
	0.501 5	1.419	1.416	2.808	98.09		
类叶升麻苷	0.500 6	3.534	3.531	7.027	98.90	96.27	1.66
	0.501 3	3.539	3.532	7.067	98.67		
	0.500 9	3.536	3.535	7.037	99.03		
	0.501 2	3.538	3.532	7.017	98.50		
	0.501 5	3.541	3.536	7.054	99.35		

表 2 向日葵列当中 crenatoside 及类叶升麻苷含量测定

样品编号	crenatoside 含量 /mg·g <sup>-1</sup>	RSD /%	类叶升麻苷含量 /mg·g <sup>-1</sup>	RSD /%
130925-1	2.81		7.04	
130925-2	2.84	2.18	6.93	1.16
130925-3	2.93		7.09	

### 3 讨论

**3.1 色谱柱的选择** 作者比较了 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 Hypersil ODS2(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 结果表明 Hypersil ODS2(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 分离效果较差, Crenatoside 和类叶升麻苷没有达到适宜的分度度, Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 分离效果好, 能够达到适宜的分度度。

**3.2 检测波长的选择** Crenatoside 和类叶升麻苷均为苯乙醇苷类化合物, 紫外吸收光谱类似, 均在 330 ~ 334 nm 有最大吸收, 同时参考《中国药典》2010 年版一部肉苁蓉项下的测定波长为 330 nm<sup>[12]</sup>, 故选择最大吸收波长 330 nm 作为检测波长。

**3.3 流动相的选择** 比较了甲醇-酸水和乙腈-酸水两种流动相系统, 结果显示甲醇-酸水系统下的峰形较差, 改用乙腈-酸水后峰形较好, 在乙腈-酸水的基础上, 又对酸水的浓度进行了优选, 发现若采用 1% 和 0.1% 的冰醋酸, 流动相 pH 接近 2, 可能会使色谱柱键合相在强酸性条件下水解, 从而缩短色谱柱寿命, 影响方法的灵敏度和耐用性。本试验最终采用乙腈-0.01% 冰醋酸(18:82) 作为流动相。

**3.4 提取方法的选择** 比较了不同提取方法(冷浸、渗滤、超声、热回流) 以及提取时间(30, 60, 90

min) 对药材提取的影响, 结果热回流方法 crenatoside 和类叶升麻苷提取率最高, 发现提取时间 60 min 以后虽然时间延长, 目标提取率几乎不变。考察了 30%, 50%, 80%, 95% 乙醇 4 种溶剂对 crenatoside 和类叶升麻苷的提取效果, 最终确定体积分数 80% 的乙醇热回流 60 min 作为向日葵列当药材的提取方法。

### 4 结论

向日葵列当中 crenatoside 含量为 2.86 mg·g<sup>-1</sup>, 类叶升麻苷含量为 7.02 mg·g<sup>-1</sup>, 二者合计已达药材质量的 1% 左右, 是一种值得开发和深入研究的列当科列当属植物。本试验所建立的 RP-HPLC 检测向日葵列当中 crenatoside 和类叶升麻苷的方法简便易行、精密度和重现性良好、结果准确, 可为向日葵列当病害防治提供资源利用的新途径, 达到“变废为宝”的目标。

### [参考文献]

- [1] 汪劲武. 列当王国探奇[J]. 植物杂志, 1995(1): 29.
- [2] 刘颖, 齐艳春, 任丽梅. 向日葵列当发生特点及防除对策[J]. 上海农业科技, 2007(1): 1021.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977: 8541.
- [4] 高昂, 姚默, 崔超, 等. 列当属药理学研究概况[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(33): 20394.
- [5] 刘晓林, 赵秀香, 魏颖颖, 等. 向日葵列当粗提物对植物病原真菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2008(3): 104.
- [6] 曲正义, 侯微, 金银萍, 等. 向日葵列当抗氧化活性研究[J]. 中药材, 2010, 33(11): 1780.
- [7] 曲正义. 向日葵列当化学成分及其抗氧化活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010: 13.
- [8] 赵梦霞. 向日葵列当化学成分及其活性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012: 20.
- [9] 李媛, 宋媛媛, 张洪泉. 肉苁蓉的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(1): 7.
- [10] Papoutsi Z, Kassi E, Mitakou S, et al. Acteoside and martynoside exhibit estrogenic/antiestrogenic properties [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006, 98(1): 63.
- [11] 林娟, 高莉, 霍仕霞, 等. 类叶升麻苷对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2956.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 126.

[责任编辑 顾雪竹]