

一阶导数 UV 测定独一味及不同提取物中苯乙醇苷含量

邱建国, 张泉龙, 李茂星, 贾正平*, 张汝学, 赵一, 王谨涵, 陶锐

(兰州军区兰州总医院, 全军高原环境损伤防治重点实验室,
国家中医药管理局临床中药学重点学科, 兰州 730050)

[摘要] **目的:**建立独一味水提物、水洗脱物 and 70% 乙醇溶液洗脱物中总苯乙醇苷含量的测定方法。**方法:**加独一味药材质量 18 倍量水,煎煮提取 3 次,每次 1.5 h,滤过,合并滤液,滤液 2~4 °C 冷藏除尘,60 °C 减压干燥得到水提物,水提物经聚酰胺和大孔树脂富集分离,分别用水和 70% 乙醇溶液洗脱,分别得到水洗脱物,70% 乙醇溶液洗脱物 I (通过聚酰胺柱洗脱物)和 70% 乙醇溶液洗脱物 II (通过大孔树脂柱洗脱物);在 224,252,256,354 nm 波长处,采用一阶导数紫外分光光度法测定总苯乙醇苷的含量。**结果:**建立的一阶导数紫外分光光度法测定总苯乙醇苷的含量,在 354 nm 波长处加样回收率 99.71%,RSD 2.5%。**结论:**该方法专属性强、灵敏度高、精确度与重复性好,适用于独一味中总苯乙醇苷的含量测定。

[关键词] 独一味; 提取物; 一阶导数紫外分光光度法; 总苯乙醇苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0043-04

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2015080043

Determination of Phenylethanol Glycosides in Different Extract of Lamiophlomis Herba by First Derivative Ultraviolet Spectrophotometry QIU Jian-guo, ZHANG Quan-long, LI Mao-xing, JIA Zheng-ping*, ZHANG Ru-xue, ZHAO Yi, WANG Jin-han, TAO Rui (Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA; Key Laboratory of the Prevention and Cure for the Plateau Environment Damage, Clinical Pharmacy Key Discipline of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the total phenylethanol glycosides in water extract, water eluate and 70% ethanol eluate of Lamiophlomis Herba by first derivative ultraviolet spectrophotometry. **Method:** Lamiophlomis Herba was extracted with water (18 times) 3 times, 1.5 h per time. The water extract was storage at 2-4 °C, was dried under reduced pressure at 60 °C. Water extract were separated and enriched by polyamide and macroporous resin, to obtain the water eluate and 70% ethanol eluate I (polyamide column), 70% ethanol eluate II (macroporous resin column). The total phenylethanol glycosides were determined by first derivative ultraviolet spectrophotometry at 224, 252, 256, 354 nm. **Result:** Recovery of the total phenylethanol glycosides was 99.71%, RSD was 2.5% at 354 nm. **Conclusion:** This method is special, sensitive, accurate and repeatable, and can be used for the quality analysis of the total phenylethanol glycosides in Lamiophlomis Herba.

[Key words] Lamiophlomis Herba; extract; first derivative ultraviolet spectrophotometry; total phenylethanol glycosides

独一味是藏族、纳西族、蒙古族等民间常用药材,主要含有环烯醚萜苷、苯乙醇苷及黄酮类成分^[1-2],研究表明环烯醚萜苷类成分具有良好的止血镇痛及抗炎活性^[2],苯乙醇苷类成分具有抗氧

化、免疫调节、增强记忆力及抗衰老等作用^[3-6]。有关苯乙醇苷的研究主要集中在毛蕊花糖苷、连翘酯苷、洋丁香苷等单体成分分析^[7-9]。课题组对独一味化学成分、药效、毒理及制剂进行了系统研究,应

[收稿日期] 20140112(002)

[基金项目] 国家科技重大专项(2008ZXJ09004-XXX);甘肃省科技重大专项(1102FKDA012);甘肃省中医药管理局科研课题(GZK-2014-1);全军中医药研发推广项目(2006032001)

[第一作者] 邱建国,主任药师,从事高原植物药和新药的研究,Tel:0931-8994676,E-mail:qjianguo@163.com

[通讯作者] *贾正平,主任药师,教授,博士生导师,从事医院药学研究,Tel:0931-8994652,E-mail:jjazp166@sina.com

用聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱串联、并联的方法,分离、纯化、富集独一味中总苯乙醇苷、总环烯醚萜苷、总黄酮等成分,并达到了工业化生产水平^[10],相关工艺流程获得国家发明专利(ZL200410011679.0),研究中建立了一阶导数紫外分光光度法快速测定独一味药材及其制剂中总环烯醚萜苷含量的方法^[11],在此基础上,本研究建立了以聚酰胺富集苯乙醇苷类成分,一阶导数紫外分光光度法测定总苯乙醇苷的方法,为标准化工业化生产提供快速、易行的检测方法。

1 仪器与试剂

BP210S 型电子天平(Sartorius AG,德国),8453 型紫外-可见分光光度计(美国惠普公司),LM-125 型超滤设备(北京中旭科源过滤技术有限公司);色谱分析用聚酰胺(规格 14~30 目,上海化学试剂站分装厂,批号 20110711),XDA-1 型大孔树脂(西安蓝晓科技有限公司,批号 20110901)。

连翘酯苷 B(批号 111811-201001)、芦丁(批号 100080-200707)对照品由中国食品药品检定研究院提供,8-O-乙酰山柽苷甲酯(由本研究室分离纯化并鉴定结构,纯度 ≥97.5%);无水甲醇、乙醇均为分析纯,水为纯化水,乙腈为色谱纯;独一味药材(购自甘肃省玛曲县黄河首曲药源开发有限公司,批号 20111001),经兰州军区兰州总医院副主任药师李茂星博士鉴定与《中国药典》一部收载独一味 *Lamiophlomis rotata* 药材正品相符。

2 方法与结果

2.1 独一味水提取物的制备

称取独一味药材

200 g,加 18 倍量水煎煮提取 3 次,每次 1.5 h,提取液混合、滤过,60 °C 减压干燥得水提取物。

2.2 独一味不同提取物的制备

称取独一味水提取物 20 g,溶于 200 mL 水中,溶解、混匀。分别将聚酰胺 40 g 和 XDA-1 型大孔吸附树脂 100 g 湿法装柱,并串联。上述配制的独一味水提取物溶液先上样至聚酰胺柱,流出液进入 XDA-1 型大孔吸附树脂柱。上样后,用水冲洗至无色,收集水洗脱液,60 °C 减压浓缩干燥得水洗脱物。再分别用 70% 乙醇溶液洗脱聚酰胺柱和大孔吸附树脂柱,分别收集洗脱液,回收乙醇,60 °C 减压干燥,得 70% 乙醇洗脱物 I(通过聚酰胺柱的洗脱物)和 70% 乙醇洗脱物 II(通过大孔树脂柱的洗脱物)。取 70% 乙醇溶液洗脱物 II 10 g,溶于 100 mL 水中,用 LM-125 型中空纤维超滤设备超滤,收集超滤液,60 °C 减压干燥得超滤物。

2.3 一阶导数紫外分光光度法测定总苯乙醇苷^[11]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取连翘酯苷 B 对照品 0.02 g,置 100 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 60,120,240,300,480,540,600 μL,分别置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度;以相应的溶剂为空白。用一阶导数紫外分光光度法,在 200~400 nm 波长进行扫描,分别在 224,252,256,354 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标、质量浓度 C 为横坐标绘制标准曲线,分别在此 4 个波长处计算回归方程,结果见表 1。

表 1 一阶导数 UV 法在不同波长测定连翘酯苷 B 方法学

Table 1 Methodological parameters of forsythoside B at different wavelength by the first derivative ultraviolet spectrophotometry

λ/nm	回归方程	相关系数	精密度/%		重复性/%	8 h 稳定性/%
			日内	日间		
224	$A = -0.0023C - 0.0003$	0.9998	0.04	2.6	0.1	0.8
252	$A = -0.0008C + 0.0002$	0.9994	0.06	2.7	0.8	0.7
256	$A = -0.0011C + 0.0003$	0.9994	0.01	2.1	1.8	0.8
354	$A = -0.0016C + 0.0003$	0.9993	0.01	2.0	1.5	0.8

注:线性范围均为 1.2~12 mg·L⁻¹。

2.3.3 精密度试验 取 2.3.2 项下制得的 30 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,分别在 224,252,256,354 nm 处连续 3 d 进样,每日连续进样 5 次,测定各峰 A,计算日内精密度和日间精密度,结果见表 1。

2.3.4 重复性试验 取同一批 70% 乙醇洗脱物 I 6 份,制备供试品溶液,分别在 224,252,256,354 nm 处分别测定总苯乙醇苷 A,结果见表 1。

2.3.5 稳定性试验 取同一批 70% 乙醇洗脱物 I,制备供试品溶液,放置室温,在同 1 d 内每隔 2 h 分别在 224,252,256,354 nm 处测定总苯乙醇苷 A,连续考察 8 h,结果见表 1。

2.3.6 加样回收率试验 取同一批 70% 乙醇洗脱物 I 6 份,精密加入一定量的已知浓度的连翘酯苷 B 对照品,依法测定,结果见表 2。

表 2 一阶导数紫外分光光度法回收率试验

Table 2 Results of recovery test

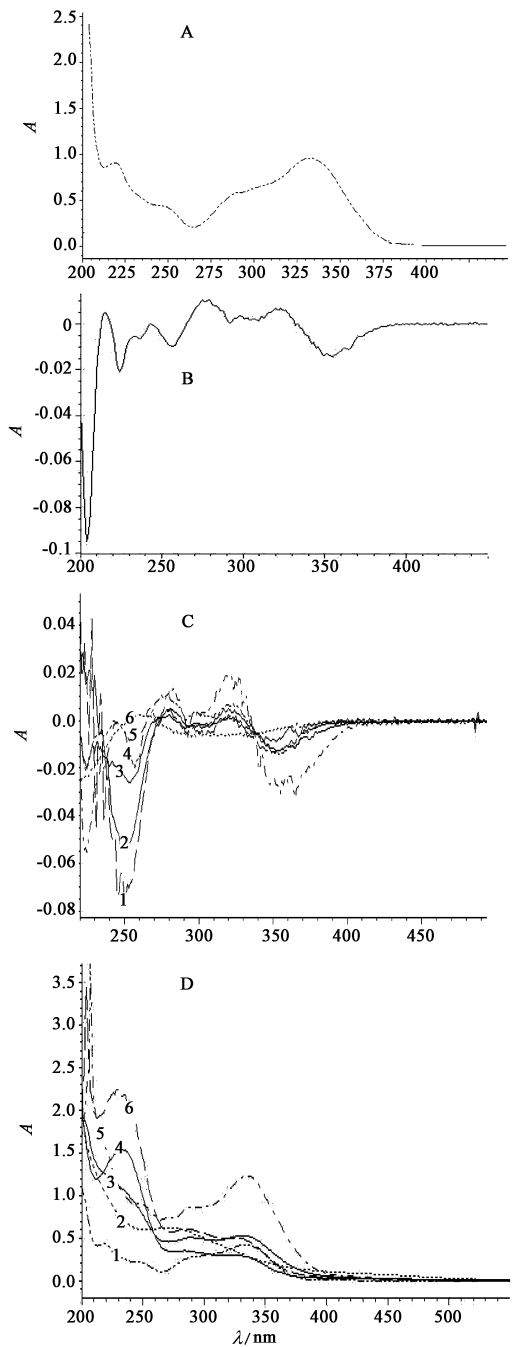
λ /nm	称样量 /g	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
224	0.007	0.801	0.592	18.28	18.26	9.3
	0.007	0.801	0.648	21.01		
	0.005	0.801	0.509	18.07		
	0.006	0.801	0.408	1.97		
	0.006	0.801	0.618	30.77		
252	0.005	0.801	0.520	19.43	70.09	27.9
	0.007	0.793	6.210	76.68		
	0.007	0.793	6.571	68.67		
	0.005	0.793	4.751	20.96		
	0.006	0.793	5.434	64.41		
256	0.006	0.793	5.493	104.20	94.50	17.0
	0.005	0.793	5.262	85.62		
	0.007	0.829	4.406	104.01		
	0.007	0.829	4.609	96.04		
	0.005	0.829	3.418	62.50		
354	0.006	0.829	3.875	91.68	99.71	2.5
	0.006	0.829	3.875	111.15		
	0.005	0.829	3.742	101.60		
	0.007	0.812	1.286	101.61		
	0.007	0.812	1.323	101.78		
	0.005	0.812	1.121	94.66		
	0.006	0.812	1.204	98.39		
	0.006	0.812	1.235	101.76		
	0.005	0.812	1.190	100.08		

2.3.7 供试品溶液的制备 分别精密称定独一味水提取物、水洗脱物和 70% 乙醇洗脱物 II, 超滤物 0.012 5, 0.038 7, 0.010 1, 0.07 g, 70% 乙醇洗脱物 I 0.020 8 g, 分别置 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶液 70 mL, 超声提取 30 min, 放冷, 加 50% 甲醇溶液至刻度, 摇匀; 精密吸取 70% 乙醇洗脱物 I 超声提取溶液 10 mL 置 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶液定容至刻度, 摇匀; 分别取上述配制溶液适量, 滤过, 滤液备用, 依法测定 A, 计算总苯乙醇苷的量, 结果见图 1, 表 3。结果显示, 70% 乙醇洗脱物 I 中苯乙醇苷类成分含量达到 37.58%, 其次是 70% 乙醇洗脱物 II、超滤物、水提取物, 水洗脱物含量最低, 只有 0.1%。可见用聚酰胺可以较好地富集苯乙醇苷类成分。

3 讨论

本课题组分别用 30%, 50%, 70% 的甲醇、乙醇提取独一味药材中总苯乙醇苷, 但 UV 和一阶导数 UV 光谱图均不理想, 分析药材经上述方法提取后总苯乙醇苷含量相对较低造成; 但是通过水提取物中的含量 (6.48%, $g \cdot g^{-1}$) 和水煎煮提取率 (30%) 推算, 独一味药材中含总苯乙醇苷达到 21.6%。所以独一味不同提取物中的总苯乙醇苷含量升高, 可能是水煎煮提取造成的。

由图 1 连翘酯苷 B 一阶导数 UV 色谱图显示, 有



A. 连翘酯苷 B 零阶导数; B. 连翘酯苷 B 一阶导数; C. 独一味不同提取物零阶导数; D. 独一味不同提取物一阶导数; C 图: 1. 连翘酯苷 B; 2. 水洗脱物; 3. 水提取物; 4. 超滤物; 5. 70% 乙醇洗脱物 I; 6. 70% 乙醇洗脱物 II; D 图: 1. 70% 乙醇洗脱物 II; 2. 超滤物; 3. 水提取物; 4. 70% 乙醇洗脱物 I; 5. 连翘酯苷 B; 6. 水洗脱物
图 1 连翘酯苷 B 及独一味不同提取物零阶及一阶导数 UV
Fig. 1 Zeroth order and the first derivative ultraviolet spectrophotometry chromatogram for forsythoside B and different extractive of Lamiophlomis Herba

4 个峰谷, 分别是 224, 252, 256, 354 nm, 但是表 2 结果显示, 在 224, 252, 256 nm 处, 平均回收率分别是 18.26%, 70.09%, 94.50%, RSD 分别为 9.3%,

表 3 独一味不同提取物中总苯乙醇苷在 354 nm 处的含量测定
Table 3 The determination of total phenylethanol glycosides in different extractive of extract of *Lamiophlomis Herba*

样品名称	吸光度	总苯乙醇苷	总苯乙醇苷
		浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	含量/ $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
水提取物	-0.012 7	8.10	6.48
水洗脱物	-0.000 3	0.40	0.10
70% 乙醇洗脱物 I	-0.012 2	7.83	37.58
70% 乙醇洗脱物 II	-0.012 8	8.19	8.15
超滤提取物	-0.007 3	4.73	6.76

27.91%, 17.0%, 而在 354 nm 波长处平均回收率是 99.71%, RSD 2.5%, 可见在 224, 252, 256 nm 处有较大的干扰峰, 在 354 nm 波长处干扰较小。

所以本课题组以独一味中含有的环烯醚萜苷类单体 8-O-乙酰山萮苷甲酯、黄酮类单体芦丁、苯乙醇苷类单体连翘酯苷 B 进行了进一步考察、分析, 即分别配制相应的对照品溶液, 采用 UV 法和一阶导数 UV 法测定, 由图 2 看出, 在 UV 色谱图中芦丁在 254 nm 处对连翘酯苷 B 有较大干扰; 一阶导数 UV 色谱图, 芦丁和 8-O-乙酰山萮苷甲酯在 224,

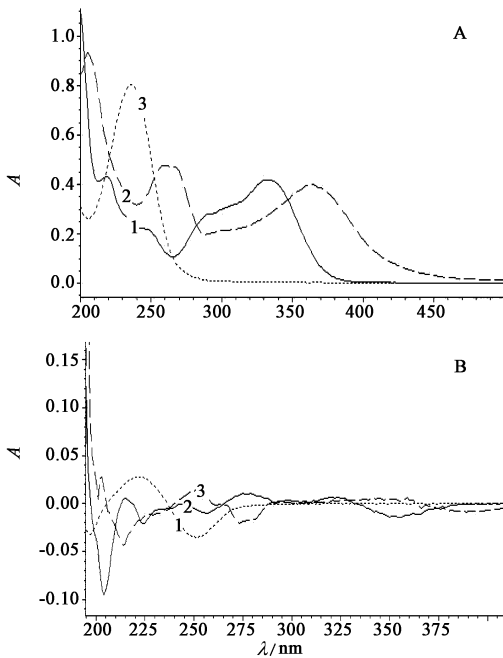
252, 256 nm 处对连翘酯苷 B 均有较大干扰, 而在 354 nm 处二者振幅值在 0 点基本为一直线, 没有干扰, 这与加样回收率试验结果吻合, 所以选择 354 nm 作为苯乙醇苷一阶导数紫外分光光度法测定波长。

与苯乙醇苷类化合物常规使用的质量法、容量法、比色法、高效液相色谱法 (HPLC) 等测定方法比较, 本研究通过导数光谱测定独一味不同提取物中总苯乙醇苷含量, 干扰少, 专属性强, 可提高检测的准确度、精密度, 加快分析速度。

[参考文献]

- [1] 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; 附录 IX H.
- [2] 李茂星, 贾正平, 张汝学, 等. 镇痛止血药独一味的研究概况[J]. 中药材, 2004, 27(3): 222-224.
- [3] 木合布力·阿布力孜, 毛新民, 热娜·卡斯木, 等. 肉苁蓉总苷在 HL-60 细胞中的抗氧化活性研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(3): 362-364.
- [4] Huang D F, Tang Y F, Nie S P, et al. Effect of phenyleth anoid glycosides and polysaccharides from the seed of *Plantago asiatica* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 620(1/3): 105-111.
- [5] 罗兰, 王晓雯, 杨梅, 等. 肉苁蓉总苷对双侧颈总动脉结扎大鼠学习记忆功能影响及其机制探讨[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(6): 401-405
- [6] Xuan G D, Liu C Q. Research on the effect of phenyleth anoid glycosides (PEG) of the *Cistanche deserticola* on antiaging in aged mice induced by *D*-galactose [J]. *J Chin Med Mater*, 2008, 31(9): 1385-1388.
- [7] 潘正, 高运玲, 张涛, 等. HPLC 法测定独一味根中环烯醚萜苷和苯乙醇苷[J]. 中草药, 2011, 42(2): 279-281.
- [8] 刘婕, 许俊, 张铁军, 等. 独一味中洋丁香苷和连翘酯苷 B 对照品的制备[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1905-1907.
- [9] 刘婕, 许俊, 张铁军, 等. HPLC 法测定独一味中类叶升麻苷[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(3): 166-168.
- [10] 邱建国, 张泉龙, 尉丽力, 等. 独一味不同提取物工业化提取分离纯化工工艺研究[J]. 中草药, 2013, 44(15): 2067-2074.
- [11] 李茂星, 贾正平, 胡之德, 等. 藏药独一味中总环烯醚萜苷的含量测定[J]. 华西药理学杂志, 2007, 22(2): 208-210.

[责任编辑 顾雪竹]



A. 3 种对照品零阶; B. 3 种对照品一阶; 1. 连翘酯苷 B; 2. 芦丁; 3. 8-O-乙酰山萮苷甲酯

图 2 连翘酯苷 B, 芦丁, 8-O-乙酰山萮苷甲酯对照品零阶及一阶导数 UV

Fig. 2 Zeroth order and the first derivative ultraviolet spectrophotometry chromatogram for forsythoside B, rutoside and 8-O-acetyl shanzhiside methylester