

# 车前子及车前草中毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷的含量比较

许兵兵<sup>1</sup>, 黄碧涛<sup>2</sup>, 曾金祥<sup>1\*</sup>, 李敏<sup>1</sup>, 王娟<sup>1</sup>,  
朱玉野<sup>1</sup>, 任刚<sup>1</sup>, 朱继孝<sup>1</sup>, 罗光明<sup>1</sup>, 王晓云<sup>1</sup>

(1. 江西中医药大学 中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004; 2. 南昌市洪都中医院, 南昌 330006)

**[摘要]** **目的:**分析比较车前子及车前草中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷含量差异,为车前质量控制与临床用药提供实验依据。**方法:**采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC),Diamondsil C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.1%甲酸水溶液(40:60),同时测定车前子及车前草中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的含量,流速0.6 mL·min<sup>-1</sup>,柱温25℃,检测波长330 nm。**结果:**车前子与车前草中毛蕊花糖苷质量分数分别为9.70,0.32 mg·g<sup>-1</sup>,异毛蕊花糖苷质量分数分别为1.28,1.51 mg·g<sup>-1</sup>。**结论:**车前子中毛蕊花糖苷含量高于车前草,异毛蕊花糖苷含量低于车前草,临床应合理用药,并建议车前增加异毛蕊花糖苷为质控指标。

**[关键词]** 车前子;车前草;毛蕊花糖苷;异毛蕊花糖苷;反相高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0064-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016180064

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160523.1035.036.html>

**[网络出版时间]** 2016-05-23 10:35

## Comparison of Contents of Verbascoside and Isoverbascoside in Plantaginis Semen and Plantaginis Herba

XU Bing-bing<sup>1</sup>, HUANG Bi-tao<sup>2</sup>, ZENG Jin-xiang<sup>1\*</sup>, LI Min<sup>1</sup>, WANG Juan<sup>1</sup>,  
ZHU Yu-ye<sup>1</sup>, REN Gang<sup>1</sup>, ZHU Ji-xiao<sup>1</sup>, LUO Guang-ming<sup>1</sup>, WANG Xiao-yun<sup>1</sup>

(1. *The Research Center of Natural Resources of Chinese Medicinal Materials and Ethnic Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;*  
2. *Nanchang Hongdu Hospital of TCM, Nanchang 330006, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze and compare the content differences of verbascoside and isoverbascoside in Plantaginis Semen and Plantaginis Herba, and provide experimental basis for quality control and clinical application of plantain. **Method:** A RP-HPLC method was applied for the content determination with a Diamondsil C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 25℃. Methanol-0.1% formic acid aqueous solution (40:60) was used as mobile phase; the flow rate was 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wavelength was set at 330 nm. **Result:** Content of verbascoside in Plantaginis Semen was 9.70 mg·g<sup>-1</sup> and 1.28 mg·g<sup>-1</sup>, respectively; and isoverbascoside was 0.32 mg·g<sup>-1</sup> and 1.51 mg·g<sup>-1</sup>, respectively in Plantaginis Herba. **Conclusion:** Content of verbascoside in Plantaginis Semen was higher than that of Plantaginis Herba, while the content of isoverbascoside was below than that of Plantaginis Herba. The content differences shall be seriously considered in clinical application. It is recommended to add isoverbascoside as a mark component for the quality control of Plantaginis Semen and Plantaginis Herba.

**[Key words]** Plantaginis Semen; Plantaginis Herba; verbascoside; isoverbascoside; RP-HPLC

**[收稿日期]** 20150501(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81260630);江西省卫生厅基金项目(2013A029)

**[第一作者]** 许兵兵,在读硕士,从事中药资源与中药药理研究,Tel:0791-87119065,E-mail:xbfey2010@163.com

**[通讯作者]** \*曾金祥,博士,副教授,从事中药资源与中药生物传感研究,Tel:0791-87119065,E-mail:zjinxiang@163.com

车前是一种广为使用的药材,分别以车前子与车前草入药。车前具有多种功效,2015 年版《中国药典》指明车前子与车前草性味均甘,寒。归肝、肾、肺、小肠经。但功能主治略有差异<sup>[1]</sup>。

苯乙醇苷类化合物在中药材中广泛存在并具有多种功效,测定中药材中苯乙醇苷类化合物的含量可为有关中药材的后续开发及质量控制提供必要依据,因而一直是研究热点<sup>[2-7]</sup>。李茂星等<sup>[2]</sup>对独一味、萝卜秦艽及螃蟹甲<sup>[3]</sup>,马志国等<sup>[4]</sup>对沙苁蓉,李承花等<sup>[5]</sup>对管花肉苁蓉,蔡灏等<sup>[6]</sup>对不同产地广东紫珠,王争等<sup>[7]</sup>对糙苏中的苯乙醇苷类化合物均进行了含量测定研究,为这些药材的有效开发利用提供了大量实验与理论依据。

最新研究表明,车前中苯乙醇苷类化合物是降低急性高尿酸血症小鼠血清尿酸水平<sup>[8-9]</sup>的重要药效成分<sup>[10]</sup>,主要为毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷<sup>[11]</sup>。毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷还具有抗氧化活性、抗溶血活性、血管紧张素酶抑制活性和抗高血压活性<sup>[12]</sup>,抗蛋白糖基化活性<sup>[13]</sup>及增强免疫功能活性<sup>[14]</sup>。这些研究表明毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷对车前的品质评价与质量控制具有重要意义。虽然已有车前子中的毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷研究报告<sup>[15]</sup>,但尚未见有车前草中毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷含量测定以及车前子与车前草中毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷含量比较研究报告。2015 年版《中国药典》以京尼平苷酸、毛蕊花糖苷为车前子质控指标,而以大车前苷作为车前草质控指标。鉴于苯乙醇苷类化合物对中药材品质评价、质量控制及后续开发利用的重要性<sup>[2-7]</sup>,本实验采用高效液相色谱建立车前中毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷含量测定方法,并比较分析车前子与车前草中毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷的含量差异,以期为进一步合理制定与提升车前质控标准提供参考,并为车前临床科学合理用药及后续开发提供依据。

## 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司),BUCHIR-210 型旋转蒸发仪(江西鼎技科学仪器有限公司),BUCHI V-700 型真空泵(江西鼎技科学仪器有限公司),DFT-200 型 200 g 手提式高速万能粉碎机(温州市林大机械有限公司),205DU 型 1/10 万电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),标准筛(上海海唐筛网滤布织造有限公司),ZNHW 型智能恒温电热套(巩义市予华仪器有限责任公司)。

药材采自江西九江,经江西中医药大学中药资

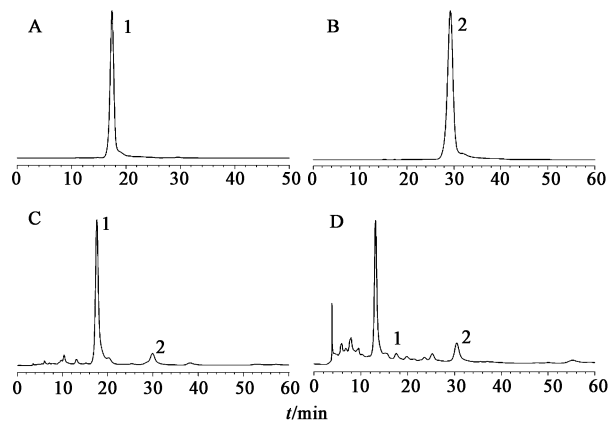
源与民族药研究中心张寿文教授鉴定车前子及车前草为车前科植物车前 *Plantago asiatica* 的干燥成熟种子和全草,标本现保存于江西中医药大学中药资源与民族药中心。毛蕊花糖苷及异毛蕊花苷对照品(自制),经 UV,IR,NMR 鉴定并确认结构,纯度 > 98%。甲醇色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 对照品溶液制备** 分别称取毛蕊花糖苷 10.04 mg 及异毛蕊花糖苷 10.02 mg,于 10 mL 量瓶中用 40% 甲醇溶解至刻度,配成质量浓度分别为 1.004,1.002 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2 供试品溶液制备** 取车前子、车前草药材粉碎,过 20 目筛,分别精密称定 0.20 g,用 70% 乙醇 20 mL 回流提取 3 次,每次 1.5 h,合并滤液后旋转蒸发至干,用 40% 甲醇分别转移至 50,10 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,进样前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

**2.3 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.1% 甲酸水(40:60),流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>,柱温箱温度 25 °C,检测波长 330 nm,进样量 20 μL。对照品溶液及样品溶液 HPLC 色谱见图 1。



1. 毛蕊花糖苷;2. 异毛蕊花糖苷

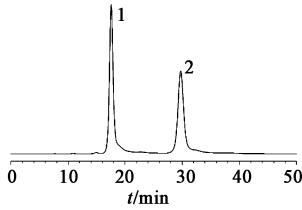
图 1 毛蕊花糖苷(A)与异毛蕊花糖苷(B)对照品及车前子样品(C)与车前草样品(D)HPLC

Fig.1 HPLC chromatogram of standards (A and B) and samples (C and D)

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 标准曲线及线性方程** 分别精密吸取上述 2 种对照品溶液 1 mL,用 40% 甲醇转移至 10 mL 量瓶,并定容至刻度,混匀,过 0.45 μm 微孔滤膜;将此混合对照品溶液依次进样 1,2,4,8,12,16,20 μL。以各成分峰面积(Y)为纵坐标,对照品浓度

(X)为横坐标分别绘制 2 种对照品的标准曲线,混合对照品色谱见图 2。分别得到毛蕊花糖苷的线性回归方程为  $Y = 53\ 584X - 18\ 419$  ( $r = 0.999\ 9$ ),线性范围  $0.1 \sim 2.0\ \mu\text{g}$ ;异毛蕊花糖苷的线性回归方程为  $Y = 42\ 934X - 17\ 080$  ( $r = 0.999\ 6$ ),线性范围  $0.1 \sim 2.0\ \mu\text{g}$ 。



1. 毛蕊花糖苷;2. 异毛蕊花糖苷

图 2 毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷混合对照品溶液 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatogram of verbascoside and isoverbascoside standards

**2.4.2 精密度试验** 取同 1 份毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷混合对照品溶液进样,重复进样 6 次,按照 2.3 项下色谱条件测定峰面积,毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷峰面积 RSD 分别为 1.5%,0.5%,表明仪器精密度良好。

**2.4.3 重复性试验** 分别精密称取 6 份车前子、车前草样品,按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,按照 2.3 项下色谱条件测定。车前子中毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷质量分数分别为  $9.69, 1.32\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 1.1%,1.9%,车前草中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷质量分数分别为  $0.31, 1.53\ \text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 4.6%,2.8%。表明样品重复性良好。

**2.4.4 稳定性试验** 取同一车前子及车前草供试品溶液,按照 2.3 项下色谱条件,分别在 0,4,8,12,16,20,24 h 测定毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷峰面积,结果车前子中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷 RSD 分别为 2.3%,1.6%,车前草中毛蕊花糖苷及异毛蕊花糖苷 RSD 分别为 2.0%,1.5%。表明样品在 24 h 内基本稳定。

**2.4.5 加样回收率试验** 精密称取已知含量的车前子、车前草样品,分别准确加入一定量的毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷对照品,按照 2.2 项下方法制备供试品溶液。按照 2.3 项下色谱条件测定,计算得车前子中毛蕊花糖苷加样平均回收率为 100.37%,RSD 1.1%;异毛蕊花糖苷加样平均回收率为 99.81%,RSD 2.5%。车前草中毛蕊花糖苷平均回收率为 96.40%,RSD 4.3%;异毛蕊花糖苷加样回收率为 98.98%,RSD 2.2%。见表 1。

**2.5 样品测定** 取车前子及车前草样品,按照 2.2

表 1 车前子与车前草中 2 种成分的加样回收试验

Table 2 Recovery test of 2 composition in Plantaginis Semen and Plantaginis Herba

药材	成分	样品中量/mg	加样量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值(RSD)			
车前子	毛蕊花糖苷	9.70	4.84	14.51	99.38	100.49 (1.1)			
		9.70	4.81	14.63	102.49				
		9.70	4.82	14.61	101.87				
		9.70	9.68	19.41	100.31				
		9.70	9.71	19.47	100.62				
		9.70	9.72	19.37	99.49				
		9.70	14.51	24.10	99.24				
		9.70	14.56	24.31	100.34				
		9.70	14.53	24.17	99.59				
		车前草	毛蕊花糖苷	1.28	0.65		1.94	101.54	99.81 (2.5)
				1.28	0.62		1.89	98.39	
				1.28	0.63		1.88	95.23	
1.28	1.30			2.57	99.23				
1.28	1.28			2.59	102.34				
1.28	1.29			2.55	98.45				
1.28	1.93			3.19	98.96				
1.28	1.96			3.25	100.51				
1.28	1.94			3.29	103.61				
车前子	异毛蕊花糖苷			1.51	0.76	2.29	102.63	98.98 (2.2)	
				1.51	0.74	2.23	97.30		
				1.51	0.77	2.27	98.70		
		1.51	1.52	3.05	101.32				
		1.51	1.50	2.97	97.33				
		1.51	1.49	2.95	96.64				
		1.51	2.27	3.74	98.24				
		1.51	2.24	3.69	97.32				
		1.51	2.25	3.79	101.33				

项下方法制备供试品溶液。按照 2.3 项下色谱条件测定,进样 20  $\mu\text{L}$ ,重复 3 次,以毛蕊花糖苷和异毛

蕊花糖苷对照品为参照,计算车前子中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷质量分数分别为 9.7, 1.28 mg·g<sup>-1</sup>;车前草中毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷质量分数分别为 0.32, 1.51 mg·g<sup>-1</sup>。

### 3 讨论

苯乙醇苷类化合物在 220, 247, 290, 330 nm 波长下均有较大吸收,一般选择样品杂峰数目更少的 330 nm 作为检测波长。另外,苯乙醇苷类化合物分子结构中存在酚羟基,在色谱柱上易产生拖尾现象,因此在水相中加入体积分数 0.1% 的甲酸改善峰形。所获得的色谱图中毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷色谱峰形良好,与前后的色谱峰均达到基线分离,达到含量测定要求。

用 70% 乙醇考察了回流提取、超声提取、索氏提取方法对毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷的影响,发现回流提取较其他方法提取率高。优化提取时间,超过 1.5 h 后,毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷含量未见有明显增加。因此确定 70% 乙醇回流提取 1.5 h 为样品的提取条件。

由测定结果可知,车前子中毛蕊花糖苷含量约为异毛蕊花糖苷的 8.5 倍,与文献测定结果基本相符<sup>[15]</sup>。《中国药典》规定车前子中京尼平苷酸与毛蕊花糖苷含量分别不得低于 0.4%, 0.3%。考虑到车前子中异毛蕊花糖苷的含量高达 0.128%,与毛蕊花糖苷及京尼平苷酸处于同一数量级水平,建议药典在车前子质控成分指标中增加异毛蕊花糖苷。另外,车前草中毛蕊花糖苷的含量低至 0.03%,说明《中国药典》不采用毛蕊花糖苷作为车前草质控指标具有合理性。但《中国药典》规定车前草中大车前苷的含量不得低于 0.1%,而车前草中异毛蕊花糖苷的含量已高达 0.151%,二者也处于同一数量级水平,因此建议车前草质控成分增加异毛蕊花糖苷。

另一方面,与车前子毛蕊花糖苷含量高于异毛蕊花糖苷不同的是,车前草中异毛蕊糖苷的含量高于毛蕊花糖苷,约为 5 倍。总体看车前子中毛蕊花糖苷的含量远远高于车前草,约为车前草中含量的 30 倍,而二者异毛蕊花糖苷的含量比较接近。车前子与车前草毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷化学成分分布的不同必然影响车前的药效,笔者前期研究也证明相同剂量下车前子与车前草的抗痛风效果有不同<sup>[8-9]</sup>。这提示有必要充分研究车前子与车前草化学成分的差异,以便在临床使用时根据不同中医症状科学用药。

### [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,2010:63-64.
- [2] 李茂星,尉丽力,陶锐,等. RP-HPLC 法同时测定 4 种唇形科植物中 3 个苯乙醇苷的含量[J]. 中国药房,2014,25(11):1027-1029.
- [3] 李茂星,张超,乌兰,等. HPLC 法测定藏药螃蟹甲中苯乙醇苷类化合物的含量[J]. 药学实践杂志,2011,29(5):379-381,400.
- [4] 马志国,甘稳城. RP-HPLC 同时测定沙苻蓉中 3 种苯乙醇苷的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(6):1084-1087.
- [5] 李承花,刘婧慧,徐珍霞,等. RP-HPLC 同时测定管花肉苻蓉中 4 种苯乙醇苷的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(6):1003-1006.
- [6] 蔡灏,孙秀漫,欧阳彩君,等. HPLC 测定不同产地广东紫珠中 3 种苯乙醇苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):63-65.
- [7] 王争,邓瑞雪,杨友亮,等. HPLC 法同时测定糙苏中 3 个苯乙醇苷类化合物的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(4):668-670.
- [8] 曾金祥,魏娟,毕莹,等. 车前子醇提取物降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):146-150.
- [9] 曾金祥,毕莹,魏娟,等. 车前草提取物降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及机理研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(9):2064-2066.
- [10] 曾金祥,毕莹,许兵兵,等. 车前子提取物部位群抗痛风的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(8):131-135.
- [11] 万茵. 车前子多糖、黄酮和苯乙醇苷类的纯化、结构解析及其活性功能研究[D]. 南昌:南昌大学,2007.
- [12] Chen C H, Lin Y S, Chien M Y, et al. Antioxidant and antihypertensive activities of acteoside and its analogs[J]. Bot Stud,2012,53(4):421-429.
- [13] Liu Y H, Lu Y L, Han C H, et al. Inhibitory activities of acteoside, isoacteoside, and its structural constituents against protein glycation *in vitro*[J]. Bot Stud,2013,54(1):1-9.
- [14] Huang D F, Tang Y F, Nie S P, et al. Effect of phenylethanoid glycosides and polysaccharides from the seed of *Plantago asiatica* L. on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells[J]. Eur J Pharmacol,2009,620(1/3):105-111.
- [15] 万茵,谢明勇,何彦林. 反相高效液相色谱法同时测定车前子中的毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷[J]. 天然产物研究与开发,2008,20(3):474-476.

[责任编辑 顾雪竹]