

中药半枝莲中二萜类生物碱 scutebarbatine A 的 分离及含量测定

赵一帆, 曹英夕, 梁彩霞, 张轲, 杨岚*, 张东*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:半枝莲中生物碱 scutebarbatine A 的分离鉴定及其含量测定方法的建立。方法:采用色谱分离方法从半枝莲中分离得到 scutebarbatine A,并通过光谱技术确定其结构;色谱条件为 Agilent-Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 mm),流动相甲醇-水(60:40),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 260 nm,柱温 40 °C,考察了不同产地半枝莲中 scutebarbatine A 的含量差异。结果:Scutebarbatine A 线性范围为 0.030 34~1.213 6 μg($r=0.999\ 9$),重复性 RSD 1.8%,精密度 RSD 0.5%,供试品溶液在 16 h 内稳定,平均加样回收率为 100.2%,RSD 3.6%。结论:从半枝莲中分离鉴定 scutebarbatine A,所建立的定量方法可控、科学,可用于该药材的质量控制。

[关键词] 半枝莲; scutebarbatine A; 结构鉴定; 高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0050-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030050

Isolation and Determination of Scutebarbatine A in Scutellariae Barbatae Herba

ZHAO Yi-fan, CAO Ying-xi, LIANG Cai-xia, ZHANG Ke, YANG Lan*, ZHANG Dong*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and identify the contents of scutebarbatine A from Scutellariae Barbatae Herba. **Method:** Scutebarbatine A was isolated from Scutellariae Barbatae Herba by chromatographic separation method and its structure was determined by spectroscopic method. Agilent-Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 mm) was used with methanol-water (60:40) as the mobile phase at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 260 nm and the column temperature was 40 °C. This method was used to investigate the differences of scute barbatine A contents in Scutellariae Barbatae Herba of different origins. **Result:** The calibration curves of scutebarbatine A showed good linearity over the ranges of 0.030 34-1.213 6 μg ($r=0.999\ 9$). The repeatability RSD was 1.8%; precision RSD was 0.5%; and the test sample solution was stable within 16 h, with an average recovery rate of 100.2% (RSD 3.6%). **Conclusion:** The quantitative determination method to isolate and identify scutebarbatine A from scutellariae Barbatae Herba is controllable, scientific, and suitable for the quality control of Scutellariae Barbatae Herba.

[Key words] Scutellariae Barbatae Herba; scutebarbatine A; structure identification; HPLC; content determination

半枝莲别名牙刷草、狭叶韩信草等^[1],主产于江苏、浙江、福建等地。其味辛、苦,性寒,归肺、肝、肾经,具有清热解毒、散瘀止血、利尿消肿等功效,用于治疗热毒痈肿、毒蛇咬伤、衄血、水肿、腹水及癌症

[收稿日期] 20160419(009)

[基金项目] 国家国际科技合作项目(2011DFA30870);中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ06080-02)

[第一作者] 赵一帆,在读硕士,从事中药化学及质量标准研究,Tel:13552868089,E-mail:zyfan_666@163.com

[通讯作者] *张东,助理研究员,从事中药有效成分和质量标准研究,Tel:13810123884,E-mail:13810123884@163.com;

*杨岚,硕士,研究员,硕士生导师,从事中药有效成分和质量标准研究,Tel:13641137349,E-mail:ylan_66@163.com

等^[2]。收载于 2015 年版《中国药典》一部^[3]。半枝莲含有多种化学成分,主要有黄酮类、萜类、生物碱、多糖、甾体等成分^[4]。现代药理学研究表明,半枝莲具有很好的抗癌作用、神经保护作用、抗流感病毒作用、抗氧化作用、免疫调节作用、解热作用、护肝作用以及对晶体醛糖还原酶的抑制作用等^[5-6]。半枝莲某些单体化合物^[7]或提取物(如乙醇提取物、多糖、生物碱等^[8-10])具有较好的抗肿瘤活性,对人妇科肿瘤细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞、皮肤癌细胞、肺癌 A549 细胞、白血病 8562 细胞等多种肿瘤细胞有广泛的抑制作用,尤其是其中的新克罗烷二萜类及生物碱类成分有显著的抗肿瘤效果,具有很大潜力成为抗肿瘤药物^[11-16]。目前半枝莲生物碱类化合物含量测定的文章极少,已报道的一个是 scutebarbatine B 的含量测定^[17]。基于以上研究背景,为了完善半枝莲药材质量分析,本实验分离、鉴定了化合物 scutebarbatine A,并建立了半枝莲中 scutebarbatine A 的 HPLC 的测定方法,考察了不同产地半枝莲中 scutebarbatine A 的含量差异,为半枝莲的临床合理应用和资源开发利用以及为寻找潜在的抗肿瘤药物提供参考依据。

1 材料

N-1100 型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司),MPC 301Z 型真空泵(伊尔姆真空设备贸易有限公司),LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津),BP 211D 型分析天平(德国赛多利斯公司),KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AV600 MHz 型液体核磁共振质谱仪(瑞士 Bruker 公司)。

半枝莲干燥全草分别产自江苏招远、江苏 1(购自北京同仁堂药店)、江苏 2(购自东直门中医院)、安徽、四川、江西赣州、江西宜春、江西南昌、广东南岭和河南。样品经北京中医药大学刘春生教授鉴定为唇形科黄芩属植物半枝莲 *Scutellaria barbata* 的干燥全草,标本存放于中国中医科学院中药研究所。样品粉碎过 3 号筛,备用。scutebarbatine A 为实验室自制,经¹H-NMR,¹³C-NMR 确证结构,经 HPLC 归一化法测定其纯度 > 98%,符合定量要求。用于 HPLC 测定的甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分离方法 将干燥半枝莲全草 40 kg 粉碎,用 95% 乙醇 10 倍量回流提取 2 次,合并滤液,减压回收溶剂浓缩为 10 kg 浸膏。加水弥散,分别用

等体积的石油醚、乙酸乙酯各萃取 3 次,回收溶剂得到石油醚部位、乙酸乙酯部位(793.6 g)及水部位。

取半枝莲浸膏乙酸乙酯萃取物约 793.6 g,与等量硅胶拌样,上样于硅胶柱,以石油醚-乙酸乙酯系统(1:0,9:1,8:2,7:3,5:5,3:7,0:1)进行常压梯度洗脱,薄层色谱跟踪,合并相似馏分。合并石油醚-乙酸乙酯(9:1)洗脱的馏分,上样于硅胶柱,以石油醚-丙酮系统(1:0,19:1,9:1,8:2,7:3,6:4,1:1,3:7,2:8,1:9,0:1)进行常压梯度洗脱,薄层色谱跟踪,合并相似馏分。合并石油醚-丙酮(6:4~1:1)洗脱部分的馏分,上样于 MCI 柱,以 70% 甲醇进行洗脱,薄层色谱跟踪,合并相似馏分,得到馏分 D。将馏分 D 上样于 LH-20 柱,用甲醇洗脱,得到馏分 E,经反复重结晶后得到淡黄色针状结晶,即为化合物 1(约 30 mg)。

2.2 结构鉴定

化合物 1 淡黄色针状结晶(甲醇),在荧光下显黄色, EI-MS m/z 558。¹H-NMR(600 MHz, 甲醇- d_4) δ :1.73(1H, m, H-1),1.43(1H, m, H-1),2.08(2H, br s, H-2),5.28(1H, br s, H-3),5.95(1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-6),5.76(1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-7),2.43(1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-10),6.61(1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-11),6.50(1H, d, $J = 16.8$ Hz, H-12),6.01(1H, s, H-14),5.15(2H, q, H-16),1.07(3H, s, H-17),1.60(3H, s, H-18),1.49(3H, s, H-19),1.32(3H, s, H-20),8.85(1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3'),8.62(1H, dd, $J = 1.4, 4.9$ Hz, H-5'),7.40(1H, dd, $J = 4.5, 8.2$ Hz, H-6'),8.13(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7'),8.97(1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3"),8.64(1H, dd, $J = 1.4, 4.9$ Hz, H-5"),7.43(1H, dd, $J = 4.5, 8.2$ Hz, H-6"),8.23(1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7")。¹³C-NMR(600 MHz, 甲醇- d_4) δ :20.39(C-1),27.26(C-2),125.23(C-3),142.18(C-4),44.74(C-5),77.41(C-6),78.06(C-7),78.34(C-8),48.62(C-9),44.28(C-10),149.15(C-11),123.37(C-12),165.59(C-13),115.05(C-14),176.95(C-15),72.57(C-16),21.69(C-17),20.41(C-18),17.86(C-19),15.96(C-20),166.18(C-1'),127.83(C-2'),150.97(C-3'),154.33(C-5'),125.07(C-6'),138.68(C-7'),165.82(C-1"),127.01(C-2"),151.56(C-3"),154.33(C-5"),124.61(C-6"),139.21(C-7")。数据与文献[18]报道基本一致,故鉴定化合物为 scutebarbatine A,结构见图 1。经 HPLC 归一化法测定纯度 > 98%。

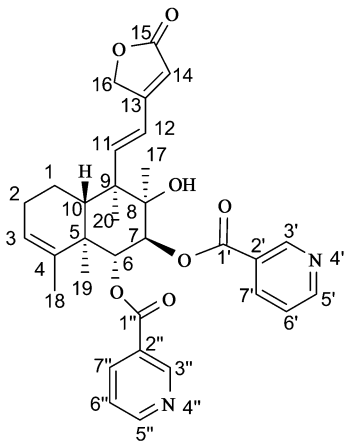
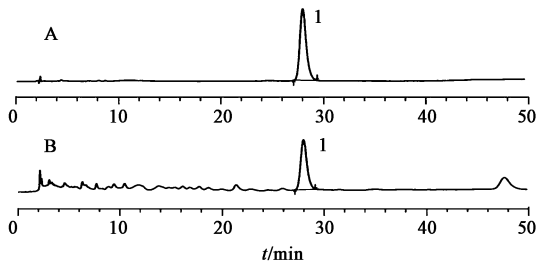


图 1 化合物 Scutebarbatine A 的结构

Fig. 1 Structure of compound scutebarbatine A

2.3 Scutebarbatine A 的含量测定

2.3.1 色谱条件 Agilent-Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 甲醇-水 (60:40), 流速 1 mL·min⁻¹, 经长波长扫描, 确定最大吸收检测波长为 260 nm, 柱温 40 °C。对照品及样品高效液相色谱见图 2。



A. 对照品; B. 半枝莲样品; 1. scutebarbatine A

图 2 半枝莲样品的 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatograms of Scutellariae Barbatae Herba

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取 scutebarbatine A 对照品 15.17 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加少量甲醇超声溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 606.8 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液制备 精密称取半枝莲粉末 (过 3 号筛) 约 0.5 g, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入二氯甲烷 10 mL, 称定质量, 超声 30 min, 放冷 15 min, 继续超声 30 min, 冷却后二氯甲烷补足质量, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 5 mL, 减压回收溶剂, 残渣精密加入甲醇 3 mL 溶解, 用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取 2.3.2 项下 606.8 mg·L⁻¹ 的 scutebarbatine A 对照品溶液, 依次配成质量浓度为 3.034, 30.340, 60.680, 12.136, 24.272, 121.360 mg·L⁻¹ 的系列溶液, 按 2.3.1 项下色谱

条件进样 10 μL 分析并记录色谱图。以峰面积 (Y) 为纵坐标, 溶液质量浓度 (X) 为横坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程为 $Y = 3.34 \times 10^6 X - 17\,645.06$ ($r = 0.999\,9$)。表明 scutebarbatine A 进样量在 0.030 34 ~ 1.213 6 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.5 最低检测限 将 2.3.2 项下 606.8 mg·L⁻¹ 的 scutebarbatine A 对照品溶液按照倍比稀释法进行稀释, 按 2.3.1 项下色谱条件进样分析并记录色谱图, 其最低检测限为 1.640 2 ng。

2.3.6 重复性试验 取半枝莲粉末 6 份各约 0.5 g, 精密称定, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件进样 10 μL, 连续进样 6 次, 记录色谱图并分析, 经测定 scutebarbatine A 样品平均质量分数为 67.8 μg·g⁻¹, 其 RSD 1.8%, 结果表明, 该方法重复性较好。

2.3.7 稳定性试验 取制备好的供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件分别于制备后 0, 2, 4, 6, 10, 16 h 进样 10 μL, 记录色谱图, 其 RSD 1.8%, 表明供试品溶液在 16 h 内基本稳定。

2.3.8 精密度试验 精密吸取 606.8 mg·L⁻¹ scutebarbatine A 对照品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件重复进样 6 次, 进样体积 2 μL, 以 scutebarbatine A 峰面积积分值计算, RSD 0.5%, 表明仪器精密度良好。

2.3.9 加样回收率试验 取已知含量的样品 (含 scutebarbatine A 67.8 μg·g⁻¹) 9 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 分别精密加入一定量的 scutebarbatine A 对照品溶液 (12.9 mg·L⁻¹), 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件进样 10 μL, 计算得平均回收率为 100.2%, RSD 3.6%, 结果见表 1。

2.4 样品含量测定 分别称取不同产地的半枝莲粉末约 0.5 g, 精密称定, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件, 进样分析, 并计算含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长的确定 本实验中对 scutebarbatine A 进行了全波长扫描, 在 400 ~ 800 nm 无吸收, 所以仅扫描 190 ~ 400 nm 下的吸收图谱, 通过峰参数确定样品于检测波长为 260 nm 时吸收最大, 确定 260 nm 为检测波长。

3.2 供试品溶液制备方法筛选 考虑到化合物的极性 & 最大程度的溶出情况, 以二氯甲烷、乙酸

表 1 半枝莲 scutebarbatine A 加样回收试验

Table 1 Recovery results of scutebarbatine A in Scutellariae Barbatae Herba

称样量 /g	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	加样回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.251 5	17.102	15.480	31.983	96.13		
0.253 4	17.231	15.480	32.632	99.49		
0.252 2	17.150	15.480	32.541	99.43		
0.249 8	16.986	19.350	36.586	101.29		
0.252 7	17.184	19.350	35.929	96.88	100.2	3.6
0.252 7	17.184	19.350	35.673	95.55		
0.241 1	16.395	23.220	40.611	104.29		
0.252 8	17.190	23.220	41.445	104.45		
0.244 0	16.592	23.220	40.776	104.15		

表 2 不同产地半枝莲中 scutebarbatine A 的质量分数测定

Table 2 Determination the content of scutebarbatine A in Scutellariae Barbatae Herba from different place

产地	scutebarbatine A / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
江苏招远	111.900
江苏 1	172.872
江苏 2	164.009
安徽	33.600
江西赣州	215.617
江西宜春	19.209
江西南昌	201.208
广东南岭	105.957
四川	193.327
河南	71.595

乙酯、丙酮、甲醇做为考察提取溶剂及以回流、超声 2 种提取方法作为考察提取方法,测定其对 scutebarbatine A 含量的影响。结果表明,以二氯甲烷经超声提取效果最好。

针对超声时间是否对 scutebarbatine A 含量有影响,又考察了 30,45,60,75 min 超声影响,结果在考察时间因素时发现,在 0~60 min scutebarbatine A 的含量在趋势上是逐渐增高,而 60 min 之后趋于平缓不在上升,说明在 60 min 时提取率已经达到最高峰。

最后考察料液比 1:10,1:20,1:50,经对比 1:20 所测得 scutebarbatine A 的量最高;由上述考察因素最终确定了供试品溶液制备方法。

3.3 不同产地半枝莲中 scutebarbatine A 的含量差异
不同产地半枝莲中二萜类生物碱成分 scutebarbatine A 的含量存在较大差异。江西赣州、

江西南昌、四川的药材中该成分含量均表现较其他地区含量高,而江苏省内不同地区的含量表现有差异,这说明在不同纬度、不同气候以及地理差异造就了半枝莲中 scutebarbatine A 的含量出现明显差异,这为针对半枝莲中这类有效成分的采集地区提供了一定的科学参考,且该方法对于半枝莲的质量控制提供了科学、稳定、可靠的依据。

[参考文献]

[1] 杨蓓芬,李钧敏. 半枝莲次生代谢产物含量的分析[J]. 浙江中医药大学学报,2006,30(3): 297-299.

[2] 曹英夕,张东,杨岚,等. 不同萃取纤维在半枝莲挥发性成分分析中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(8): 51-55.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015: 118-119.

[4] 王哲. 半枝莲的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(21): 84-86.

[5] 李洁. 中药半枝莲的研究与应用[J]. 齐鲁药事,2006,25(12): 745-747.

[6] 邹箴蕾,吴启南. 半枝莲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2005,16(2): 149-150.

[7] 张跃,张科,赵琦,等. 半枝莲抑制胃癌 SGC-7901 细胞浸润转移作用及机理[J]. 时珍国医国药,2012,23(11): 2692-2694.

[8] ZHAO Z H, SONG W, WEI Y, et al. Antitumor and antiangiogenic activities of *Scutellaria barbata* extracts *in vitro* are partially mediated by inhibition of Akt/protein kinase B [J]. Molecular Med Rep, 2012, 5 (3): 788-792.

[9] YANG J, YANG G, HOU G, et al. *Scutellaria barbata* D. Don polysaccharides inhibit the growth of Calu3 xenograft tumors via suppression of the HER2 pathway

- and angiogenesis [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9 (6): 2721-2725.
- [10] GONG T, WANG C F, YUAN J R, et al. Inhibition of tumor growth and immunomodulatory effects of flavonoids and scutebarbatines of *Scutellaria barbata* D. Don in lewis-bearing C57BL/6 mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015; 1-11.
- [11] WANG T S, WANG S Q, XIAO D L. A review of phytochemistry and antitumor activity of a valuable medicinal species; *Scutellaria barbata* [J]. *J Med Plants Res*, 2012, 6 (26): 4259-4275.
- [12] 张晶, 赵伟杰. 半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠红细胞功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19 (22): 265-268.
- [13] 李园园. 半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 化学成分及生物活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [14] 石锐. 半枝莲提取物对白血病 8562 细胞增殖与凋亡的影响灰湘相关机制的探讨 [D]. 湖南: 南华大学, 2011.
- [15] 曹英夕, 张东, 杨岚, 等. HS-SPME-GC-MS 测定中药半枝莲中的挥发性成分 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (12): 40-43.
- [16] 梁宪梅, 夏春波. 半枝莲提取物对肺癌 A549 细胞生存素蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (10): 155-158.
- [17] 涂琪顺, 蔡光明, 何群, 等. HPLC 法测定半枝莲中二萜类生物碱 Scutebarbatine B [J]. *中草药*, 2008, 39 (2): 280-282.
- [18] Nguyen V H, Pham V C, Nguyen T T H, et al. Novel Antioxidant neo-Clerodane Diterpenoids from *Scutellaria barbata* [J]. *Europ J Organic Chem*, 2009, 2009 (33): 5810-5815.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》2014—2016 年度优秀审稿专家名单

田元祥教授(中国中医科学院中医临床基础医学研究所)
刘春生教授(北京中医药大学)
沈祥春教授(贵阳医学院药学院)
王长虹教授(上海中医药大学)
倪艳教授(山西省中医药研究院)
倪健教授(北京中医药大学)
赵艳玲研究员(解放军 302 医院)
李孝栋教授(福建中医药大学)
康文艺教授(河南大学)
张艳教授(辽宁中医药大学)
任钧国研究员(中国中医科学院西苑医院)
蔡宇教授(暨南大学药学院)
王冰副教授(上海中医药大学)
袁子民副教授(辽宁中医药大学)
张华副教授(山东中医药大学)

获奖的优秀审稿专家是在 2014—2016 年度一贯积极支持编辑部工作,能认真负责、按时完成审稿任务,且审稿数量较多的专家,由责任编辑推荐,编委会年会通过并颁发了获奖证书及奖金。