

HPLC 法测定不同地区商品贯众中去甲氧基莨菪素的含量

柳芳,戴闻韬,高增平*
(北京中医药大学,北京 100102)

[摘要] 目的:建立去甲氧基莨菪素的含量测定方法,并测定不同地区商品贯众中去甲氧基莨菪素的含量。方法:HPLC法,YWG-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 10 μm),流动相甲醇-水(78:22)等度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 298 nm,柱温 25℃。结果:去甲氧基莨菪素进样量在 0.188 0~1.316 μg 时线性关系良好, $r=0.999 7$,平均回收率为 99.38%,RSD 2.40%。对不同地区商品贯众中去甲氧基莨菪素的含量测定结果表明,河北石家庄的绵马贯众中去甲氧基莨菪素的含量最高,为 0.35%,北京西城的绵马贯众中去甲氧基莨菪素的含量最低,为 0.17%。结论:该方法操作简单,快速,准确,重复性好,可用于商品贯众及其相关药材中去甲氧基莨菪素的含量分析。

[关键词] 贯众;去甲氧基莨菪素;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(2012)10-0130-03

The Quantitative Analysis of Desmethoxymatteucinol in Rhizoma Dryopteridis Crassirhizomatis from Different Areas by HPLC

LIU Fang, DAI Wen-tao, GAO Zeng-ping*
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method to determine the content of desmethoxymatteucinol in Rhizoma Dryopteridis Crassirhizomatis from different areas of China. **Method:** The analysis was performed on a column of YWG-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 10 μm), using methanol and water (78:22) as mobile phase and the flow rate was at 1.0 mL·min⁻¹ and detected at 298 nm under 25℃. **Result:** The linearity of calibration curve was in the range of 0.188 0-1.316 μg ($r=0.999 7$). The average recovery was 99.38%, RSD 2.40%. The highest content of desmethoxymatteucinol in Rhizoma Dryopteridis Crassirhizomatis from Shijiazhuang is 0.35%. The lowest content of desmethoxymatteucinol in Rhizoma Dryopteridis Crassirhizomatis from Xicheng district of Beijing is 0.17%. **Conclusion:** This method is accurate, reputable and can be applied to determine the content of desmethoxymatteucinol in crude drug Rhizoma Dryopteridis Crassirhizomatis.

[Key words] Rhizoma Dryopteridis Crassirhizomatis; desmethoxymatteucinol; HPLC; quantitative analysis

贯众为传统中药,始载于《神农本草经》,列为下品,味苦,性微寒,有小毒,主要具有清热解毒、驱虫之功效,临床用于治疗流感、肺炎、乙型肝炎、肠道

寄生虫病、妇产科出血、带状疱疹等。现代研究表明其具有抗菌、抗病毒、驱虫、止血等药理活性^[1-4],主要含有间苯三酚、黄酮、甾萜等化学成分^[5-7]。Ji Suk Lee等^[2]从绵马贯众 80% 甲醇提取物中首次分离得到黄酮类成分去甲氧基莨菪素,并有研究表明去甲氧基莨菪素具有抗 HIV 和抗疟活性^[2,8-9]。本文选择贯众中的有效成分之一——去甲氧基莨菪素为测定目标成分,首次建立了药材贯众中去甲氧基莨菪素的 HPLC 含量测定方法,并测定了不同地区商品贯众中去甲氧基莨菪素的含量,为临床应用时如何选择不同品种贯众提供了参考。

[收稿日期] 20111031(007)

[基金项目] 北京中医药大学创新团队项目(中药先导化合物发现与开发)

[第一作者] 柳芳,在读博士研究生, E-mail: liufang117117@126.com

[通讯作者] *高增平,博士,教授,硕士生导师,从事中药有效物质基础及质量研究, E-mail: gzp6560@hotmail.com

1 仪器与试药

FW100型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),KQ-400KDE型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),AE240型电子分析天平(METTLER公司),安捷伦1100系列高效液相色谱仪(G1311A四元泵、G1316A柱温箱、D1315B二极管阵列检测器,HPCORE chemstation)。

蛾眉蕈贯众是蹄盖蕈科蛾眉蕈 *Lunathyrium acrostichoides* (sw.) Ching 带叶柄残基的干燥根茎,购于甘肃兰州;绵马贯众是鳞毛蕈科粗茎鳞毛蕈 *Dryopteris Crassirhizomae* Nakai 带叶柄残基的干燥根茎,购于10个不同地区,分别是黑龙江双鸭山、北京西城、北京房山、北京密云、北京顺义、北京石景山、辽宁沈阳、辽宁大连、河北天津、河北石家庄,以上药材均由北京中医药大学中药学院生药系阎玉凝教授协助鉴定,标本保存在北京中医药大学中药学院中药化学系。去甲氧基茛菪蕈素对照品(自制,经HPLC面积归一化法测定纯度为98.6%),甲醇(色谱纯,美国FISHER公司),水(娃哈哈纯净水),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

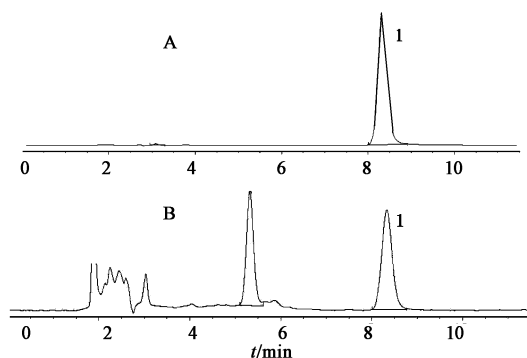
2.1 对照品溶液的制备 精密称取去甲氧基茛菪蕈素对照品适量,加甲醇溶解,制成每1 mL含37.6 μg 的去甲氧基茛菪蕈素的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 通过超声提取与回流提取方法的考察,以及回流提取时间(1,1.5,2 h)的考察,根据测定的去甲氧基茛菪蕈素含量,确定采用回流提取1.5 h作为提取条件。

取蛾眉蕈贯众药材粉末(40目筛)1 g,精密称定,置于100 mL锥形瓶中,精密加入50 mL甲醇,称重,水浴加热回流提取1.5 h,放冷至室温,补重,摇匀,滤过,精密量取15 mL续滤液置25 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,过微孔滤膜,即得。

2.3 色谱条件及系统适应性 YWG-C₁₈HPLC色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,10 μm),流动相甲醇-水(78:22)等度洗脱,流速1.0 mL \cdot min⁻¹,检测波长298 nm,柱温25 $^{\circ}\text{C}$ 。依上述色谱条件,分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液,进样,供试品溶液色谱图中在与对照品相应位置上,具有相同保留时间的色谱峰,且供试品色谱中对照品的色谱峰与其他成分色谱峰分离良好,无干扰。见图1。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液5,10,15,25,30,35 μL ,注入液相色谱仪,按上述色谱



A. 对照品;B. 供试品;1. 去甲氧基茛菪蕈素

图1 对照品及供试品溶液的HPLC

条件测定去甲氧基茛菪蕈素峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线并进行线性回归,回归方程 $Y = 2\,909.8X - 135.4$ ($r = 0.9997$),结果表明,去甲氧基茛菪蕈素进样量在0.188 0 ~ 1.316 μg 时,与其色谱峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度考察 取2.2项下制得的蛾眉蕈贯众供试品溶液1份,连续进样6次,每次进样15 μL ,按照上述确定的色谱条件测定峰面积,去甲氧基茛菪蕈素的峰面积RSD 2.00%,表明精密度良好。

2.6 稳定性考察 取2.2项下制得的蛾眉蕈贯众供试品溶液1份,分别在供试品溶液制备后0,2,4,6,8,10 h进样,进样量均为15 μL ,按照上述确定的色谱条件测定峰面积,去甲氧基茛菪蕈素的峰面积RSD 2.90%,表明供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.7 重复性考察 按照2.2项下供试品溶液的制备方法,平行操作制得蛾眉蕈贯众供试品溶液6份,按照上述确定的色谱条件,进样15 μL ,测定去甲氧基茛菪蕈素峰面积,并随行对照品溶液,外标一点法计算去甲氧基茛菪蕈素的含量,平均含量为0.31%,RSD 2.60%,表明该法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 分别精密称取上述已知含量的蛾眉蕈贯众粉末6份,每份约1 g,分别精密加入1 mL去甲氧基茛菪蕈素对照品溶液(3.76 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),精密加入100 mL甲醇,按照2.2项下供试品溶液的制备方法,回流提取,补重摇匀滤过后,精密量取3 mL续滤液置25 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度摇匀,进样20 μL 测定去甲氧基茛菪蕈素峰面积,并随行对照品溶液,计算加样回收率,结果去甲氧基茛菪蕈素的平均加样回收率为99.38%,RSD 2.40%。见表1。

2.9 不同地区商品贯众中去甲氧基茛菪蕈素的含量测定 取不同地区绵马贯众药材粉末,精密称定,按照2.2项下供试品溶液制备方法制备供试品溶

液,按上述确定的色谱条件,测定去甲氧基莪果蕨素峰面积,并随行对照品溶液,外标一点法计算去甲氧基莪果蕨素含量,结果见表 2。

表 1 贯众中去甲氧基莪果蕨素的加样回收率试验 (n=6)

称样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得总量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.000 1	3.07	3.76	6.81	99.47	99.38	2.40
1.000 3	3.07	3.76	6.77	98.40		
1.000 1	3.07	3.76	6.81	99.47		
1.000 0	3.07	3.76	6.97	103.72		
1.000 1	3.07	3.76	6.70	96.54		
1.000 2	3.07	3.76	6.78	98.67		

表 2 不同地区商品贯众中去甲氧基莪果蕨素的含量 (n=3) %

种类	来源	去甲氧基莪果蕨素
峨眉蕨贯众	甘肃兰州	0.31
	黑龙江双鸭山	0.22
	北京石景山	0.32
	北京顺义	0.34
	河北石家庄	0.35
	北京密云	0.35
	辽宁大连	0.33
绵马贯众	北京房山	0.35
	辽宁沈阳	0.29
	北京西城	0.17
	河北天津	0.20

3 小结与讨论

历代本草所记载的贯众形态、生长环境、产地及附图特征表明,贯众的植物来源甚多,而目前市场上的商品贯众主要有 7 种植物来源^[10],而 2010 年版《中国药典》仅收录了绵马贯众和紫萁贯众^[11],其余品种的贯众多为自产自销的地方用药。本文在方法学考察的基础上,对不同地区商品贯众中去甲氧基莪果蕨素的含量进行了测定,结果表明,甘肃兰州峨眉蕨贯众中去甲氧基莪果蕨素的含量与不同地区绵马贯众中去甲氧基莪果蕨素的平均含量相近;不同地区绵马贯众中去甲氧基莪果蕨素的含量存在一定差异,河北石家庄绵马贯众含量最高(0.35%),北京西城的含量最低(0.17%),推测该成分的含量高低可能与药材的产地、采收时间以及储存时间等因素有关。另外,本试验还对其他商品贯众,如辽东鳞毛蕨贯众、狗脊蕨贯众、单芽狗脊蕨贯众、莪果蕨

贯众和乌毛蕨贯众,进行了去甲氧基莪果蕨素的含量测定,结果显示含量较低,均在 0.001% 左右。根据结果可见,不同品种商品贯众以及不同地区绵马贯众中去甲氧基莪果蕨素的含量存在很大差异,文献报道去甲氧基莪果蕨素具有抗 HIV 和抗疟活性^[8-10],故建议在临床选用时应考虑贯众的品种和产地,并建议将去甲氧基莪果蕨素的含量纳入绵马贯众药材及饮片的质量控制指标。

[参考文献]

- [1] 罗海华,潘实清,刘长秀,等. 贯众提取液对革兰氏阳性球菌的抑菌作用[J]. 热带医学杂志, 2003, 3(2):169.
- [2] Ji Suk Lee, Hirotsugu Miyashiro, Norio Nakamura, et al. Two New Triterpenes from the Rhizome of *Dryopteris crassirhizoma*, and inhibitory Activity of its constituents on Human immunodeficiency Virus-1 Protease [J]. *Chem Pharm Bull*, 2008, 56(5):711.
- [3] 潘实清,王玲,罗海华,等. 甘遂和贯众不同提取液对蚊幼虫的杀伤作用[J]. 热带医学, 2002, 3:252.
- [4] M inoru S, Satoru K, Atsushi I. Flavon-3-ol structure containing glycosides as histidin decarboxylase inhibitors and pharmaceutical compositions containing the inhibitors. JP, 08217674A2[P]. 1996-08-27.
- [5] 高增平. 绵马贯众有效成分的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2003.
- [6] Shiojima K, Arai Y, Ageta H. Seasonal fluctuation of triterpenoid constituents from dried leaflets of *dryopteris crassirhizoma* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(4):1079.
- [7] Wada H, T Kido, et al. Chemical and chemotaxonomical studies of ferns. LXXXI. Characteristic lignans of blechnaceous ferns [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40(8):2099.
- [8] 顾琼,马云保,张雪梅,等. 藤三七中一个新黄烷醇和抗 HIV 活性成分[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(8):1508.
- [9] Surat Boonphong, Pakawan Puangsombat, Apiwat Baramee, et al. Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic activities [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(5):795.
- [10] 高增平,王宝华,江海龙,等. 商品贯众的品种调查[J]. 中医学刊, 2003, 21(5):824.
- [11] 中国药典. 一部[S]. 2010:310, 320.

[责任编辑 蔡仲德]