

巴戟天中主要环烯醚萜苷的稳定性研究

王玉磊^{1,2}, 黄世敬^{1*}, 迟德军¹, 李强², 雷海民², 崔翰明^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 研究巴戟天中主要环烯醚萜苷-水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的稳定性和转换条件。方法: 利用 HPLC, 测定不同年份生巴戟天中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的含量, 以探寻二者在植物体自身环境内的稳定性; 观察水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸在不同 pH (人工胃液、水、人工肠液) 下的转化情况, 以探寻二者在不同 pH 溶液中的稳定性。结果: 水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸在巴戟天中的含量相对稳定, 前者在人工胃液中可以转化为后者。结论: 水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸在巴戟天中相对稳定; 水晶兰苷在酸性条件下不稳定, 可以转化为结构比较稳定的去乙酰基车叶草苷酸。

[关键词] 巴戟天; 水晶兰苷; 去乙酰基车叶草苷酸; HPLC; 稳定性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0065-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110906.1109.007 **[网络出版时间]** 2011-09-06 11:09

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110906.1109.007.html>

Study on Stability of Main Iridoid Glucosides from *Morindae Officinalis Radix*

WANG Yu-lei^{1,2}, HUANG Shi-jing^{1*}, CHI De-jun¹, LI Qiang², LEI Hai-min², CUI Han-ming^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100053, China;

2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To study stability and transformation of monotropein and deacetylasperulosidic acid, which were the main iridoid glucosides from *Morindae Officinalis Radix*. **Method:** The content of monotropein and deacetylasperulosidic acid from different years of *Morindae Officinalis Radix* were determined by HPLC to find out the stability in plants. The conversion of monotropein and deacetylasperulosidic acid in artificial gastric, water and artificial intestinal juice was studied to seek the stability in different pH solution. **Result:** The content ratio of monotropein and deacetylasperulosidic acid from different years of *Morindae Officinalis Radix* maintain similar. Monotropein converted to deacetylasperulosidic acid in artificial gastric. **Conclusion:** The contents of monotropein and deacetylasperulosidic acid is relatively stable in *Morindae Officinalis Radix*. Monotropein can converted to deacetylasperulosidic acid in acidic condition.

[Key words] *Morindae Officinalis Radix*; monotropein; deacetylasperulosidic acid; HPLC; stability

巴戟天为茜草科巴戟天属植物巴戟天 *Morinda*

officinalis How 的干燥根^[1], 是我国著名的四大南药之一, 其含有的环烯醚萜苷类成分具有较强的抗炎镇痛作用, 与巴戟天祛风湿的传统功效密切相关。本实验室从中分离制备了 2 个主要环烯醚萜苷类成分, 经 MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR 解析及与文献报道的图谱^[2]比较, 确证此 2 种成分分别为水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸, 为巴戟天的主要环烯醚萜苷类成分。水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸是同分异构体, 其稳定性及是否可以发生转化, 未见文献报

[收稿日期] 20110427(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072801); 北京市自然科学基金项目(7093129)

[第一作者] 王玉磊, 硕士研究生, 从事中药新药基础研究, E-mail: yiyang21503@163.com

[通讯作者] * 黄世敬, Tel: 010-88001179, E-mail: gamhsj@126.com; * 崔翰明, Tel: 010-88001470, E-mail: cui-yaoshi@126.com

道。本文从其在巴戟天中的含量,在模拟人工胃液、人工肠液及水中的转化情况研究其稳定性。

1 材料

1.1 药材 生巴戟天(批号 20101121,20100820,20100830,20090401,20090406,20090407,20070312)均采购自广东,经鉴定为茜草科植物巴戟天的干燥根,常温储存;水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸对照品(本实验室自制,经 HPLC-DAD 和 ELSD 测定纯度 >98%)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯),磷酸(优级纯),浓盐酸(AR,北京化工厂),磷酸二氢钾(AR,北京化学试剂公司),高纯水(实验室自制)。

1.3 仪器 Agilent 1200 型高效液相(G1322A Degasser,G1311A Quat pump,G1329A ALS,G1316A TCC,G1315D DAD),ME 215P 型电子分析天平(德国 sartorius 公司),Q-Gard 型纯水机(MILLIPORE 公司),SY7200DH 型超声清洗器(上海声源超声波仪器设备有限公司),HH-S 型水浴锅(郑州长城科工贸有限公司)。

2 方法与结果

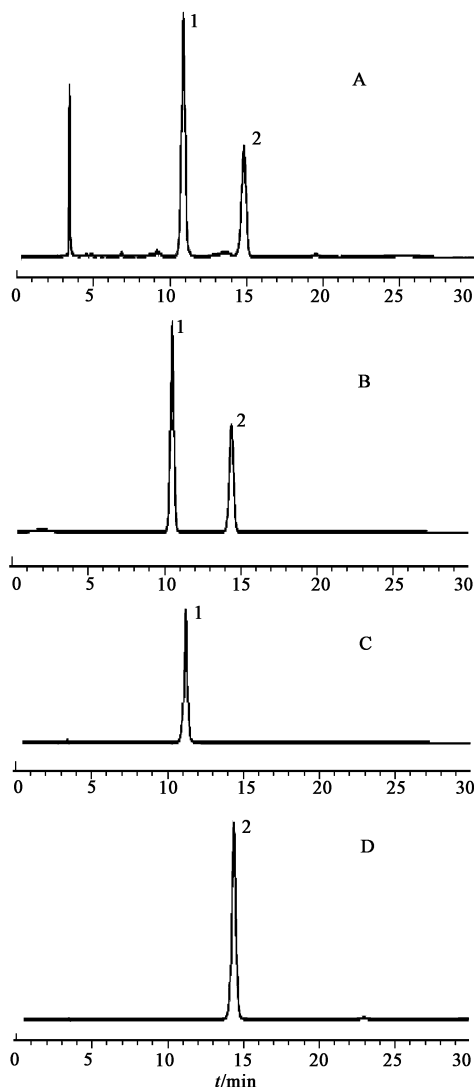
2.1 HPLC 测定巴戟天中水晶兰苷^[3]、去乙酰基车叶草苷酸

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Venusil MP C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液(5:95),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 235 nm,进样量 5 μL。在此条件下,巴戟天药材中水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸色谱峰及与其他峰分离良好,各色谱图见图 1。

2.1.2 对照品储备溶液的制备 精密称定水晶兰苷对照品 17.24 mg,去乙酰基车叶草苷酸 7.42 mg,置 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,即得(质量浓度分别为 1 724,742 mg·L⁻¹)。

2.1.3 巴戟天样品溶液的制备 精密称取巴戟天粉末(过 60 目)0.5 g 置于 100 mL 锥形瓶中,加入 70% 乙醇 100 mL,浸泡 1 h,超声处理 30 min(60 Hz),滤过,滤渣再加入 70% 乙醇 100 mL,超声处理 30 min(60 Hz),过滤,合并 2 次提取液,减压浓缩蒸干,残渣用高纯水定容至 50 mL,溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.1.4 线性关系的考察 精密吸取不同量的 2.1.2 混合对照品溶液,用高纯水稀释至系列浓度,摇匀。按 2.1.1 色谱条件进样测定峰面积,以质量浓度



1. 水晶兰苷;2. 去乙酰基车叶草酸

图 1 巴戟天药材(A)、混合对照品(B)、

水晶兰苷(C)和去乙酰基车叶草苷酸(D)色谱

(C)对峰面积(S)进行线性拟合,水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的线性方程分别为 $S_1 = 6.437C_1 - 2.975$ ($r = 0.9999$),线性范围 54 ~ 1 724 mg·L⁻¹; $S_2 = 6.7457C_2 - 6.8654$ ($r = 0.9999$),线性范围 23 ~ 742 mg·L⁻¹。

2.1.5 精密度试验 精密称取生巴戟天粉末(过 60 目筛)0.5 g,精密称定,按 2.1.3 方法处理,按 2.1.1 色谱条件进样,重复测定 6 次,水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸峰面积的 RSD 分别为 0.32%,0.46%,仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密称取生巴戟天粉末(过 60 目筛)6 份,每份 0.5 g,精密称定,按 2.1.3 方法处理,按 2.1.1 色谱条件进样,水晶兰苷和去乙酰基

车叶草苷酸峰面积的 RSD 分别为 1.30% ,1.31% 。

2.1.7 稳定性试验

2.1.7.1 对照品溶液的稳定性试验 精密吸取同一混合对照品溶液 5 μL (216,93 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),按 2.1.1 色谱条件每隔 24 h 测定 1 次,连续测定 6 d,水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的 RSD 分别为 0.21% ,0.25% ,表明对照品溶液和测定方法稳定性良好。

2.1.7.2 巴戟天样品溶液的稳定性试验 精密吸取同一样品溶液 5 μL (10.05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),按 2.1.1 色谱条件每隔 24 h 测定 1 次,连续测定 6 d,水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的 RSD 分别为 0.59% ,0.72% ,表明样品溶液和测定方法稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的样品粉末(过 60 目筛),每份 0.5 g,分别加入水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸对照品,按 2.1.3 项处理方法进行处理,记录水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的峰面积,并计算平均回收率和 RSD,见表 1。

表 1 水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸峰面积的回收率测定

名称	药材含量/mg		加入量/mg		测定量/mg		回收率/%		平均回收率/%		RSD/%
水晶兰苷	4.33	4.34	8.75	101.8	101.2	0.81					
	4.34	4.31	8.69	100.9							
	4.35	4.31	8.68	100.5							
	4.35	4.31	8.68	100.5							
	4.33	4.32	8.68	100.7							
	4.34	4.32	8.77	102.6							
	4.33	4.27	8.63	100.7							
去乙酰基车叶草苷酸	1.87	1.99	3.84	99.1	101.2	1.43					
	1.88	1.93	3.87	103.1							
	1.88	2.05	3.95	100.9							
	1.87	1.95	3.87	102.7							
	1.88	1.98	3.88	101.0							
	1.87	1.94	3.82	100.5							

2.2 样品测定 取 2010,2009,2007 年生产的各样品 0.5 g,按 2.1.3 方法处理,按 2.1.1 色谱条件测定,测得峰面积并带入回归方程计算各样品中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的含量,见表 2。

2.3 水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的转化研究^[4]

2.3.1 溶液的配制 人工胃液(无酶):取浓盐酸 11.7 mL 用高纯水定容至 50 mL,取此酸液 4.1 mL,加高纯水至 250 mL,摇匀,即得(pH 1.41)。人工肠液:称取磷酸二氢钾 6.8 g 加水 500 mL,用 4% NaOH 调 pH 6.8,加蒸馏水至 1 000 mL,摇匀即得(pH 6.88)。

2.3.2 样品溶液的配制 取水晶兰苷 3 份,精密称定,分别加入 10 mL 的人工胃液、高纯水、人工肠液,

表 2 巴戟天中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的含量

No.	样品产地及批号	样品	水晶兰苷/%	去乙酰基车叶草苷酸/%	水晶兰苷-去乙酰基车叶草苷酸
1	广东(20101121)	生巴戟	0.999	0.479	2.09:1
2	广东(20100820)	生巴戟	0.979	0.471	2.08:1
3	广东(20100830)	生巴戟	0.905	0.450	2.01:1
4	广东(20090401)	生巴戟	1.044	0.460	2.27:1
5	广东(20090406)	生巴戟	0.928	0.422	2.20:1
6	广东(20090407)	生巴戟	0.937	0.420	2.23:1
7	广东(20070312)	生巴戟	0.899	0.403	2.23:1

37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育;取去乙酰基车叶草苷酸 3 份,分别加入 10 mL 的人工胃液、高纯水、人工肠液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育(表 3)。每隔 12 h 取样 1 次,巴戟天中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸在人工胃液中的转化 HPLC 图见图 2,转化测定结果见表 4。

表 3 水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的溶液配制

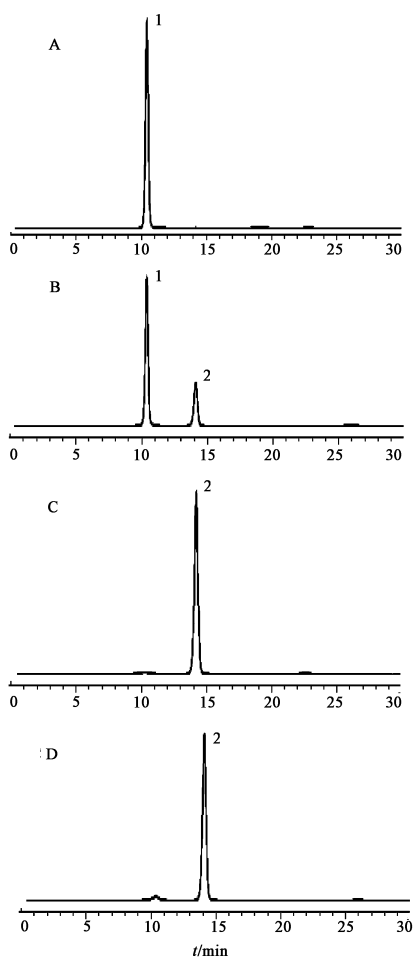
名称	溶剂加入量/mL			样品加入量/mg		
	人工胃液	水	人工肠液	人工胃液	水	人工肠液
水晶兰苷	10	10	10	10	10	10
去乙酰基车叶草苷酸	10.9	11.4	11.4	7.2	7.6	7.1

表 4 不同时间、不同溶液中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸转化比较

t/h	水晶兰苷			去乙酰基车叶草苷酸		
	人工胃液	水	人工肠液	人工胃液	水	人工肠液
0.5	0	0	0	0	0	0
12	3.24	0	0	0.07	0	0
24	4.70	0	0	0.13	0	0
36	9.13	0	0	0.51	0	0
48	12.9	0	0	0.57	0	0
60	16.3	0	0	1.08	0	0
72	20.6	0	0	1.35	0	0
84	24.8	0	0	1.71	0	0

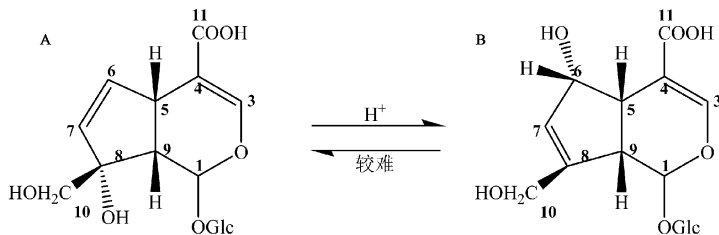
3 讨论

水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸极性较大,且母核上,都有-COOH,具有一定的酸性,使用高水相在普通的 HPLC 柱上保留时间也较短,本实验室选择用 Venusil MP C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱,在甲醇-0.1% 磷酸水溶液(5:95) 流动相系统下,水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸均得到良好的保留和分离。



A. 水晶兰苷转化起点; B. 水晶兰苷转化 36 h; C. 去乙酰基车叶草苷酸转化起点; D. 去乙酰基车叶草苷酸转化 36 h

图 2 水晶兰苷(1)和去乙酰基车叶草苷酸(2)在人工胃液中的转化色谱



A. 水晶兰苷; B. 去乙酰基车叶草苷酸

图 3 水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的转化

巴戟天中的主要环烯醚萜苷-水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸,是同分异构体,在 HPLC 方法学考察中,此 2 种化合物在水溶液中常温放置 6 d 含量保持不变,是稳定的。从表 2 可以看出,在 2010, 2009, 2007 年生产的巴戟天中,水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的含量没有明显差异,二者的含量比波动在一个小的范围内,药材在常温下自身环境下的储存时间(本实验为 3 年)对其含量影响差异不明显,证明水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸在巴戟天药材中是稳定的。

水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸,从结构上看,存在着一定的同源性,在常见溶液 pH 下,二者之间能否发生转化,还未见文献报道。本文选择了 pH 最接近人体的 3 种溶液——无酶的人工胃液、人工肠液以及最广泛使用的水溶液,分别考察了水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸在上述 3 种溶液中的转化关系。水晶兰苷在中性和偏碱性溶液中是稳定的,在酸性条件下水晶兰苷可以转化成为去乙酰基车叶草苷酸(图 3)。去乙酰基车叶草苷酸在上述 3 种溶液中结构稳定,不发生转化。

从结构上看出,水晶兰苷五元环结构中存在着烯丙醇和邻二醇的结构,在 H^+ 作用下,五元环上的 8 位-OH 容易脱水,生成 $CH = CH-C^+$ 离子,再发生水和作用可以生成去乙酰基车叶草苷酸。

水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸是巴戟天中的主要环烯醚萜苷,二者之间存在的微妙的转化关系,对巴戟天的质控有一定的指导意义。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:75.
[2] CHOI Jongwon, LEE Kyung-Tae, CHOI Moo-Young. Antinociceptive anti-inflammatory effect of monotropein isolated from the root of *Morinda officinalis* [J]. Biol

Pharm Bull,2005,28(10)1915.
[3] 徐吉银,丁平. 巴戟天中水晶兰苷的提取方法研究 [J]. 中成药,2007,29(6):893.
[4] 杨秀伟,郝美荣,服部征雄. 中药成分代谢分析[M]. 北京:中国医药科技出版社,2003:143.

[责任编辑 邹晓翠]