

筋骨草中总环烯醚萜苷的含量测定

王锦玉, 孙晓丽, 全燕*, 陈两绵, 张锴镔, 王智民, 李建荣
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立筋骨草药材中总环烯醚萜苷的含量测定方法。方法: 采用分光光度法, 以乙酰哈巴苷(8-acetylharpagide) 为对照品, 经酸水解、二硝基苯肼乙醇试液-氢氧化钠甲醇水溶液显色后, 在 586 nm 处测定其含量。结果: 乙酰哈巴苷及筋骨草药材显色稳定, 乙酰哈巴苷在 0.016 2~0.324 8 mg 范围内线性关系良好($r=0.999\ 8$), 筋骨草药材样品平均回收率为 101.2%, RSD=2.0%。结论: 建立了比色法测定筋骨草药材中总环烯醚萜苷类含量的方法, 该方法简便、准确、重复性好, 可作为该药材的质量控制方法。

[关键词] 筋骨草; 总环烯醚萜苷; 分光光度法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)08-0003-03

Determination of Total Iridoid Glycoside in *Ajuga decumbens* by Spectrophotometry

WANG Jin-yu, SUN Xiao-li, TONG Yan*, CHEN Liang-mian, ZHANG Kai-bing, WANG Zhi-min, LI Jiang-rong
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To set up a method for the determination of the total iridoid glycoside in herb medicine of *Ajuga decumbens* Thunb. **Methods:** Spectrophotometric method was developed to determine the total iridoid glycoside. 8-acetylharpagide was used as the reference substance, the samples were hydrolyzed by acid, 2, 4-dinitrophenylhydrazine ethanol test solution was used as color-developing agent, methanol-water solution of sodium hydroxide as solvent. The maximal absorption wavelength was 586 nm. **Results:** The absorbance color of 8-acetylharpagide and herb sample solutions was stable after the development, there was a good linear relationship in the scope of 0.016 2~0.324 8 mg ($r=0.999\ 8$). The average recovery of the added reference substance was 101.2% and RSD was 2.0%. **Conclusions:** The developed method is simple, accurate, reproducible and effective for the quality control of *Ajuga decumbens* Thunb.

[Key words] *Ajuga decumbens* Thunb.; total iridoid glycoside; spectrophotometry; assay

[收稿日期] 2009-03-09

[基金项目] 科技部创新药物和中药现代化专项(2002A2Z3225)

[通讯作者] * 全燕, Tel: (010) 84027721

筋骨草分布于华东、中南、华南及西南等地区^[1]。具有清热解毒, 治咳祛痰, 活络止痛, 舒筋活血之功效。八十年代以来, 对筋骨草的研究重点转移到抗肿瘤等方面, 对不同时期的胃肠、肝、肺恶性肿瘤具有不同程度的改善症状、缓解疼痛、延长生命的疗效^[2]。Midori Takasaki 等^[3,4]通过对筋骨草中化学成分的研究发现, 筋骨草中环烯醚萜苷类成分具有较强的抗肿瘤活性。根据文献^[5,6]报道, 筋骨草中含有 7 种环烯醚萜苷类成分。本文拟用 2,4-二硝基苯肼法对筋骨草药材中总环烯醚萜苷成分进行含量测定, 考察基本条件和参数, 建立一种既简便、易行, 又能同时测定该类成分总含量的质量控制方法。

1 仪器与试剂

T6 紫外可见分光光度仪(普析通用)。乙酰哈巴昔(8-acetylharpagide)对照品(由中药研究所化学室分离纯化并鉴定结构, 纯度 98%); 2,4-二硝基苯肼(上海化学试剂公司生产, 批号 T200206), 筋骨草药材购于福建、江苏、江西、河南、贵州、广西等地, 经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定为唇形科植物金疮小草 *Ajuga decumbens* Thunb. 的干燥全草, 符合中国药典(1977 年版)筋骨草项下的有关规定。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取乙酰哈巴昔对照品适量, 甲醇溶解, 配制成每 1 mL 约含 0.4 mg 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 KHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 紫外测定显色条件 精密量取对照品溶液、供试品溶液及甲醇各 0.4 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 3 mL, 置 90 °C 水浴中保温 15 min, 放冷, 加二硝基苯肼乙醇试液 0.5 mL, 置 90 °C 水浴保温 30 min, 放冷, 加 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠甲醇水溶液(4 g 氢氧化钠, 20 mL 水, 80 mL 甲醇) 4 mL, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 常温放置 2 h 后, 以上述甲醇反应液为空白, 在 586 nm 处用分光光度计测定吸光度。

2.4 检测波长的选择 取筋骨草样品溶液及乙酰哈巴昔对照品甲醇溶液适量, 按“2.3”项下方法经酸

水解、二硝基苯肼试液-氢氧化钠甲醇水溶液显色后, 经过 400~700 nm 可见全波长扫描, 乙酰哈巴昔与样品最大吸收均在 586 nm(见图 1), 而未经显色的筋骨草样品溶液及乙酰哈巴昔对照品在 586 nm 附近无吸收峰, 因此选择 586 nm 为检测波长, 以消除可能的干扰。

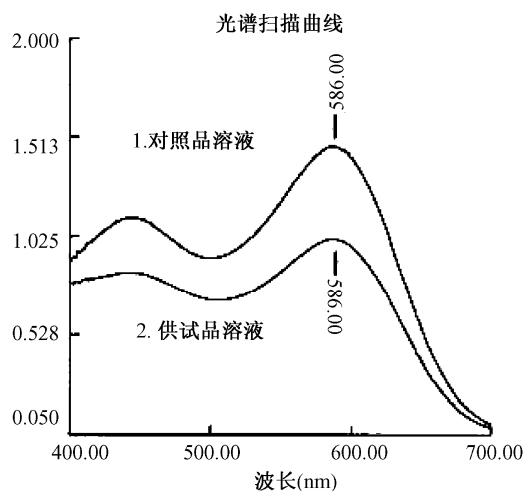


图 1 对照品及供试品溶液水解、显色的可见全波长扫描图

2.5 线性关系考察 取干燥至恒重的乙酰哈巴昔对照品, 加甲醇配制成 0.406 mg·mL⁻¹ 乙酰哈巴昔对照品溶液, 分别精密吸取 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL, 甲醇溶液 0.4 mL, 置 10 mL 量瓶中, 依“2.3”项显色, 以甲醇反应液为空白, 在 586 nm 处测定吸光度, 分别为 0.081, 0.191, 0.352, 0.631, 0.942, 1.237, 以取样量(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果表明, 乙酰哈巴昔在 0.016 2~0.324 8 mg 范围内线性关系良好, $A = 3.709C + 0.035$, $r = 0.9998$ 。

2.6 稳定性试验 取筋骨草药材, 按“2.2”项方法制成供试品溶液, 按“2.3”项所述分光光度法显色, 取样品溶液分别在 0~4 h 内每间隔 0.5~1 h 测量 1 次, 其吸光度分别为 0.547, 0.547, 0.546, 0.547, 0.546, 0.541, $RSD = 0.43%$ ($n = 6$), 表明供试品溶液在 4 h 内稳定性良好。

2.7 精密度试验 取乙酰哈巴昔对照品溶液, 精密吸取 0.5 mL, 按“2.3”项所述分光光度法显色, 进行含量测定, 重复测定 6 次, $RSD = 0.14%$ ($n = 6$), 说明方法精密度良好。

2.8 重复性试验 取筋骨草药材 6 份, 按 2.2 项方法制成供试品溶液, 按“2.3”项所述分光光度法显色, 进行测定, 平均含量 3.05%, $RSD = 0.98%$ ($n = 6$), 说明方法重复性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,精密称取已知含量筋骨草药材(含总环烯醚萜苷 3.05%) 0.25 g,共 9 份,1~3 分别精密加乙酰哈巴苷对照品约 6.00 mg,4~6 分别精密加乙酰哈巴苷对照品约 7.50 mg,7~9 分别精密加乙酰哈巴苷对照品约 9.50 mg,按“2.2”项方法制成供试品溶液,按“2.3”项所述分光光度法显色,测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

编号	样品称量(g)	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.252 9	7.71	6.06	13.87	101.7		
2	0.253 3	7.73	6.03	13.74	99.7		
3	0.255 6	7.80	6.08	13.93	100.8		
4	0.250 9	7.65	7.54	15.02	97.7		
5	0.250 8	7.65	7.51	15.09	99.1	101.2	2.0
6	0.253 6	7.73	7.61	15.49	102.0		
7	0.255 6	7.80	9.48	17.56	103.0		
8	0.255 8	7.80	9.58	17.78	104.2		
9	0.255 9	7.80	9.42	17.43	102.2		

2.10 测定法 精密量取对照品溶液、供试品溶液及甲醇溶液各 0.4 mL,置 10 mL 量瓶中,依“2.3”项显色,以甲醇反应液为空白,在 586 nm 处测定吸光度,计算样品中总环烯醚萜苷的含量,结果见表 2。

表 2 不同产地药材中总环烯醚萜苷含量

产地	总环烯醚萜苷含量(%)
福建福清	0.22
福建平潭春季采收	3.54
福建平潭夏季采收	3.06
福建平潭秋季采收	1.10
福建南平	2.58
江西南昌	3.17
江苏仪征	0.82
浙江杭州	1.81
安徽	1.13
贵州(亳州购买)	0.50
贵州(广西购买)	0.26
广西桂林	0.23

3 讨论

环烯醚萜苷类化合物是许多中药的活性成分,但相关中药的总环烯醚萜苷的含量测定方法报道较

少。筋骨草中含有哈巴苷($C_{15}H_{24}O_{10}$, 分子量 364.35)、乙酰哈巴苷($C_{17}H_{26}O_{11}$, 406.39)、雷扑妥苷($C_{17}H_{26}O_{10}$, 390.39)及白毛夏枯草苷 A($C_{29}H_{46}O_7$, 506.69), B($C_{29}H_{46}O_6$, 490.69), C($C_{23}H_{35}O_{13}$, 519.52), D($C_{23}H_{35}O_{12}$, 503.52) 7 种环烯醚萜类化合物^[5,6],此类化合物基本结构十分相似,其 A 环上的氧较活泼,加酸可使环烯醚萜分子中的葡萄糖水解,并暴露出其半缩醛,两个醛基在一定条件下同 2,4-二硝基苯肼反应可以生成 2,4-二硝基苯腙,在碱性环境下形成棕色溶液,可利用可见分光光度仪进行含量测定。乙酰哈巴苷在筋骨草药材中含量较大,且分子量居中(平均分子量为 454.5),故选择乙酰哈巴苷作为对照品测定其中总环烯醚萜苷的含量。

本文以筋骨草为研究对象,探讨利用可见分光光度法定量测定总环烯醚萜苷方法。通过对水解温度、水解时间、加酸量、显色剂用量、显色保温条件、显色时间、碱用量及显色后溶液稳定性等条件的考察,最终确定总环烯醚萜苷测定的显色条件;通过对药材粒度、提取溶剂、提取方法、提取溶剂用量及提取时间等条件的考查,最终确定供试品溶液的制备方法。从而建立了一种既简便、易行,又能测定总环烯醚萜苷类成分总含量的质量控制方法,为其它药材测定总环烯醚萜苷类成分提供参考。

[参考文献]

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 上册, 北京: 人民卫生出版社, 1996: 882.
- [2] 吴德峰. 浅析筋骨草的药用价值[J]. 福建畜牧兽医, 1997, 1: 32.
- [3] Midori Takasaki, Harukuni Tokuda, Hoyoku Nishino, et al. Cancer Chemopreventive Agents (Antitumor-promoters) from *Ajuga decumbens*[J]. J Nat Prod, 1999, 62(7): 972.
- [4] Midori Takasaki, Isao Yamauchi, Mitsumasa Haruna, et al. New Glycosides from *Ajuga decumbens*[J]. J Nat Prod, 1998, 61(9): 1105.
- [5] Yoshio Takeda, Satomi Tsuchida. Four New Iridoid Glucoside P-Coumaroyl Esters From *Ajuga Decumbens* [J]. Phytochemistry, 1987, 26(8): 2303-2306.
- [6] 刘 斌, 石任兵, 葛小侠, 等. 筋骨草属植物化学成分与药理活性[J]. 国外医药植物药分册, 2001, 16(3): 96-101.