

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.06.019

高效液相色谱法同时测定肉苁蓉饮片及管花肉苁蓉提取物中 4种苯乙醇苷类成分含量*

李 洋¹,布比阿加尔·哈依拉提¹,秦亚迪¹,姚 军^{1△},袁 洁²,游 林³

(1. 新疆医科大学药学院,新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆第二医学院,新疆 克拉玛依 834000; 3. 和田帝辰医药生物科技有限公司,新疆 和田 848000)

摘要:目的 建立同时测定肉苁蓉饮片及管花肉苁蓉提取物中4种苯乙醇苷类成分含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为Inertsil ODS-3柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为330 nm,柱温为30℃,进样量为10 μL。结果 松果菊苷、管花苷A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷质量浓度分别在10.08~201.60 μg/mL、2.53~50.55 μg/mL、5.06~101.20 μg/mL、2.53~50.60 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r>0.999\ 3$);检测限分别为0.310 1,0.337 3,0.224 9,0.253 0 μg/mL,定量限分别为1.008 0,1.100 4,0.733 3,0.816 1 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于3.0%;平均加样回收率分别为100.95%,98.07%,97.70%,99.18%,RSD分别为2.63%,4.23%,3.32%,2.14%($n=9$)。结论 该方法简便快捷,准确有效,可用于同时测定肉苁蓉饮片及管花肉苁蓉提取物中4种苯乙醇苷类成分的含量。

关键词:高效液相色谱法;肉苁蓉;饮片;管花肉苁蓉;提取物;苯乙醇苷类;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)06-0077-04

Simultaneous Determination of Four Phenylethanol Glycosides in Cistanches Herba Decoction Pieces and Cistanche Tubulosa Extracts by HPLC

LI Yang¹, HAYILATI Bubiqiaer¹, QIN Yadi¹, YAO Jun¹, YUAN Jie², YOU Lin³

(1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, China 830011; 2. Xinjiang Second Medical College, Karamay, Xinjiang, China 834000; 3. Hotan Dichen Pharmaceuticals & Biotech Co., Ltd., Hotan, Xinjiang, China 848000)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of four phenylethanol glycosides in Cistanches Herba decoction pieces and Cistanche tubulosa extracts. **Methods** The chromatographic column was Inertsil ODS-3 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 330 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of echinacoside, tubuloside A, acteoside and isoacteoside were 10.08-201.60 μg/mL, 2.53-50.55 μg/mL, 5.06-101.20 μg/mL, 2.53-50.60 μg/mL ($r>0.999\ 3$), respectively. The limits of detection (LOD) were 0.310 1, 0.337 3, 0.224 9, 0.253 0 μg/mL, and the limit of quantitation (LOQ) were 1.008 0, 1.100 4, 0.733 3, 0.816 1 μg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 3.0%. The average recoveries of

*基金项目:国家重点研发计划项目[2017YFC1702400];新疆维吾尔自治区重点实验室项目[XJDX1713];新疆维吾尔自治区克拉玛依市创新人才工程项目[2019RC001 A-02]。

第一作者:李洋,女,在读硕士研究生,研究方向为药物分析学,(电子信箱)2807626913@qq.com。

△通信作者:姚军,男,教授,研究方向为药物分析学,(电子信箱)xydyaojun@163.com。

- 2015,34(12):1654-1656.
- [14] 徐 硕,尚明英,刘广学,等. 高效液相色谱法测定土茯苓药材中7种活性成分的含量[J]. 中国中药杂志,2015,40(3):469-479.
- [15] 徐 云. HPLC法测定湿疹洗剂中苦参碱的含量[J]. 云南中医中药杂志,2019,40(3):68-70.
- [16] 刘瑞连,严建业,李顺祥,等. HPLC法同时测定冰荷洗剂中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国药师,2014,17(8):1415-1417.
- [17] 黄良永,杨玲凤,甘春英,等. 如意金黄散高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 医药导报,2019,38(11):1481-1486.
- [18] 胡怀明,杨 洋,黄良永. 麻黄宣肺止咳糖浆指纹图谱研究[J]. 中国药师,2017,20(12):2127-2130.
- [19] 郑江萍,张幼林,黄良永. 痤疮消炎洗剂 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师,2016,19(7):1276-1279.
- [20] 梁 俊,郑江萍,黄良永. 虎杖配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师,2015,18(4):578-582.
- [21] 彭 玮,付琴琴. 基于 HPLC 波长切换法对舒肝益脾液中7种成分的质量控制研究[J]. 中国药师,2018,21(9):1667-1670.
- [22] 孙国祥,闫 波,侯志飞,等. 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展[J]. 中南药学,2015,13(7):673-681.
- [23] 姚令文,刘 燕,郑 笑,等. 指纹图谱、特征图谱技术在中药材和中成药中的应用[J]. 中国药理学杂志,2018,27(8):934-939.

(收稿日期:2021-07-07;修回日期:2021-08-29)

four phenylethanol glycosides were 100.95%, 98.07%, 97.70% and 99.18% with RSDs of 2.63%, 4.23%, 3.32% and 2.14% ($n=9$), respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and effective, which can be used for the simultaneous determination of four phenylethanol glycosides in Cistanches herba decoction pieces and Cistanche tubulosa extracts.

Key words: HPLC; Cistanches Herba; decoction pieces; Cistanche Tubulosa; extracts; phenylethanol glycosides; content determination

肉苁蓉又名苁蓉、地精, 属列当科肉苁蓉属, 以干燥带鳞叶的肉质茎入药^[1], 寄生于藜科植物梭梭和怪柳的根部, 在我国主要分布于内蒙古、青海、新疆、宁夏等西北干旱地区^[2]。其最早见于《神农本草经》, 列为上品^[3], 味甘、咸, 性温, 归肾、大肠经, 因具有补肾壮阳、润肠通便、保肝、抗衰老、抗疲劳、增强免疫力等功效, 临床多用于治疗肾阳虚衰、血枯便秘、女子不孕、腰膝痿软、记忆力减退等症状^[4-7], 素有“沙漠人参”和“药中珍品”之美称^[8]。肉苁蓉属植物主要含有苯乙醇苷类、环烯醚萜类、生物碱类、木质素类等成分^[9-10], 以毛蕊花糖苷和松果菊苷为代表的苯乙醇苷类成分具有壮阳、抗衰老、抗氧化、增强记忆力等功效^[11-15], 是肉苁蓉属植物的主要药效物质基础, 也是2020年版《中国药典(一部)》肉苁蓉项下质量评价和控制的指标性成分。有研究报道了高效液相色谱(HPLC)法测定肉苁蓉属植物苯乙醇苷类成分的含量, 但仅限于肉苁蓉药材及饮片^[16-17]。目前, 关于管花肉苁蓉提取物尚无国家标准, 对其进行含量测定也未见报道。本课题组前期研究发现, 新疆管花肉苁蓉主要含有松果菊苷、异毛蕊花糖苷、毛蕊花糖苷、管花苷A这4种代表性苯乙醇苷类成分。本研究中建立了同时测定肉苁蓉饮片及管花肉苁蓉提取物中4种上述成分含量的HPLC法, 旨在为更好地评价肉苁蓉饮片及制订其提取物的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪, 包括二极管阵列检测器(日本Shimadzu公司); AB135-S型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司); KQ-500DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 艾柯超纯水仪系统(成都唐氏康宁科技发展有限公司)。

1.2 试药

松果菊苷对照品(批号为S-003-01904003)、异毛蕊花糖苷对照品(批号为Y-073-11803024)、毛蕊花糖苷对照品(批号为M-011-02103019)、管花苷A对照品(批号为G-066-11812016), 均购于北京英莱克科技发展有限公司, 含量均大于98%; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 甲酸为分析纯, 水为超纯水。4批肉苁蓉饮片(编号S1, S2, 荒漠肉苁蓉, 产地内蒙古; 编号S3, S4, 管花肉苁蓉, 产地新疆), 均购于乌鲁木齐的4家药店; 管花肉苁蓉提取物(编号S5, 灭酶干片水提; 编号S6, 灭酶

干片醇提; 编号S7, 灭酶干片醇提上树脂), 均购自新疆和田帝辰医药生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-3柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~12 min时17%A→20%A, 12~30 min时20%A→22%A, 30~35 min时22%A→17%A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 330 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 称取4种对照品各适量, 精密称定, 分别置10 mL容量瓶中, 用50%甲醇溶液定容, 制成松果菊苷、管花苷A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷质量浓度分别为1.008, 1.011, 0.012, 1.012 mg/mL的单一对照品贮备液。量取适量, 置同一10 mL容量瓶中, 加50%甲醇溶液定容, 摇匀, 制成松果菊苷、管花苷A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷质量浓度分别为201.60, 50.55, 101.20, 50.60 μg/mL的混合对照品溶液, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 即得。

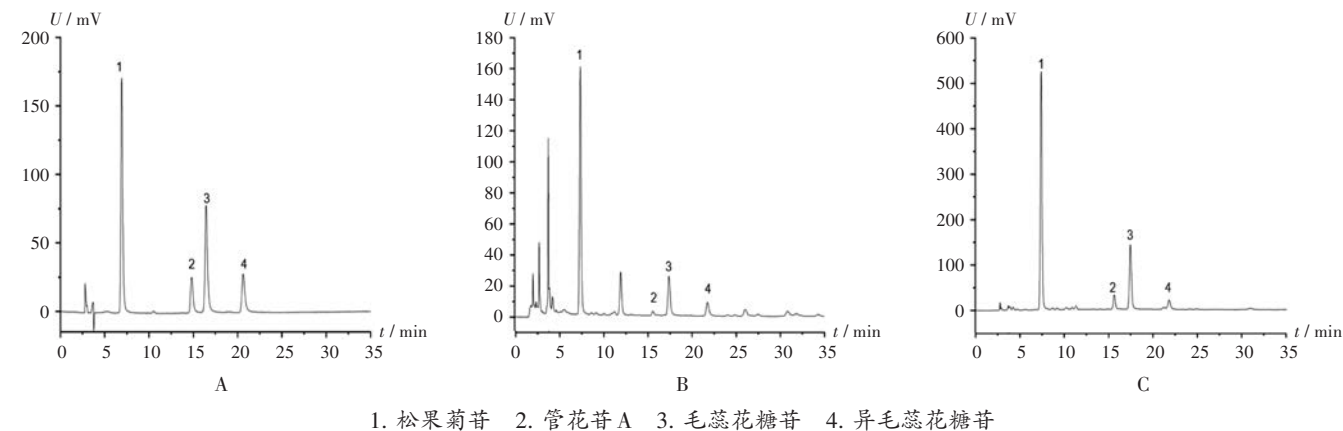
供试品溶液: 取肉苁蓉饮片粉末(过4号筛)约1.0 g, 精密称定, 置100 mL棕色容量瓶中, 精密加入50%甲醇50 mL, 称定质量, 超声(功率250 W, 频率35 kHz)提取40 min, 放冷, 再次称定质量, 用50%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 经0.45 μm微孔滤膜滤过, 即得肉苁蓉饮片供试品溶液。取管花肉苁蓉提取物粉末约0.2 g, 精密称定, 同法制备管花肉苁蓉提取物供试品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验: 取2.2项下3种溶液各适量, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果理论板数按松果菊苷峰计应不低于3 000, 分离度均大于1.5, 基线分离良好。详见图1。

线性关系考察: 分别精密量取2.2项下混合对照品溶液0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 mL, 置10 mL容量瓶中, 加50%甲醇定容, 摇匀, 制成系列混合对照品溶液。精密量取10 μL, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以待测成分质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。回归方程与线性范围见表1。

检测限与定量限考察: 分别精密量取2.2项下混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 并按2.1项下色谱条件进



1. 松果菊苷 2. 管花苷 A 3. 毛蕊花糖苷 4. 异毛蕊花糖苷
A. 混合对照品溶液 B. 肉苁蓉饮片供试品溶液 C. 管花肉苁蓉提取物供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Echinacoside 2. Tubuloside A 3. Acteoside 4. Isoacteoside

A. Mixed reference solution B. Test solution of Cistanches Herba decoction pieces C. Test solution of Cistanche Tubulosa extract

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 线性关系及检测限与定量限考察结果

Tab. 1 Results of the linear relation test, LOD and LOQ

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 ($\mu\text{g/mL}$)	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
松果菊苷	$Y_1 = 9706.2X_1 - 31887$	0.9993	10.08~201.60	0.3101	1.0080
管花苷 A	$Y_2 = 13196X_2 - 9548.7$	0.9996	2.53~50.55	0.3373	1.1004
毛蕊花糖苷	$Y_3 = 15305X_3 - 4386.7$	0.9999	5.06~101.20	0.2249	0.7333
异毛蕊花糖苷	$Y_4 = 15433X_4 - 596.6$	0.9999	2.53~50.60	0.2530	0.8161

样测定,以信噪比为3:1和10:1时的质量浓度分别作为检测限和定量限。结果见表1。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为1.31%,0.91%,1.58%,0.58%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液适量,分别于室温下放置0,2,4,6,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为1.84%,2.18%,1.05%,1.55%($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:称取样品(编号S2)粉末适量,精密称定,平行6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果松果菊苷、管花苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的平均含量分别为0.779%,0.020%,0.155%,0.074%,RSD分别为1.21%,3.12%,2.65%,2.96%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(编号S2)适量,共9份,分别加入低、中、高质量浓度的单一对照品溶液,

按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取各批样品各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果见表3。

3 讨论

本研究中采用二极管阵列检测器,在200~450 nm波长范围内对混合对照品溶液和供试品溶液的待测成分进行扫描,结果松果菊苷、毛蕊花糖苷在330 nm,管花苷 A在331 nm,异毛蕊花糖苷在327 nm波长处有最大吸收。同时,参考2020年版《中国药典(一部)》肉苁蓉项下松果菊苷和毛蕊花糖苷的检测波长330 nm,各成分在330 nm波长处的色谱峰较多,响应值较高,故确定最终测定波长为330 nm。

从肉苁蓉饮片含量测定结果来看,管花肉苁蓉和荒漠肉苁蓉中松果菊苷的含量最高,其次为毛蕊花糖苷,管花苷 A和异毛蕊花糖苷的含量相对较低。4种苯乙醇苷类成分含量差异较大,且不同产地、同一产地不同批间有效成分含量差异也较大,这与药材不同产地的地理环境、温度、气候及采收加工等因素有关,影响了植物中化学成分的积累。不同基源肉苁蓉的化学成分种类相似,但各类成分含量不同,导致其功效各有侧重,故应根据功效选择合适的基源药材,以达到更好的临床效果。

综上所述,本研究中建立的方法简便快捷、准确有效,可用于同时测定肉苁蓉饮片及管花肉苁蓉提取物中4种苯乙醇苷类成分。样品含量测定结果可反映不同产地、同一产地不同批次的肉苁蓉饮片及管花肉苁蓉不同提取物的质量水平,为制订相关质量标准提供了理论依据。

表2 加样回收试验结果($n=9$)
Tab. 2 Results of the recovery test ($n=9$)

成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
松果菊苷	1.642 6	0.821 5	2.487 5	102.85	100.95	2.63
	1.641 7	0.821 5	2.481 5	102.23		
	1.644 9	0.821 5	2.479 3	101.57		
	1.634 5	1.663 2	3.247 6	96.99		
	1.620 7	1.663 2	3.305 1	101.27		
	1.638 2	1.663 2	3.231 8	95.82		
	1.630 8	2.419 2	4.107 3	102.37		
	1.663 9	2.419 2	4.156 9	103.05		
	1.671 8	2.419 2	4.149 0	102.40		
管花苷A	0.032 9	0.016 2	0.049 6	103.09	98.07	4.23
	0.033 1	0.016 2	0.049 9	103.70		
	0.033 4	0.016 2	0.050 1	103.09		
	0.032 6	0.032 4	0.063 5	95.37		
	0.032 0	0.032 4	0.062 7	94.75		
	0.033 1	0.032 4	0.063 2	92.90		
	0.031 5	0.048 5	0.078 9	97.73		
	0.032 5	0.048 5	0.078 6	95.05		
	0.035 6	0.048 5	0.082 6	96.91		
毛蕊花糖苷	0.253 9	0.126 5	0.372 5	93.75	97.70	3.32
	0.277 8	0.126 5	0.401 1	97.47		
	0.275 3	0.126 5	0.395 1	94.70		
	0.258 4	0.258 0	0.513 2	98.76		
	0.277 2	0.258 0	0.536 2	100.39		
	0.257 9	0.258 0	0.527 0	104.30		
	0.280 4	0.394 6	0.661 0	96.45		
	0.298 1	0.394 6	0.685 2	98.10		
	0.292 5	0.394 6	0.668 7	95.34		
异毛蕊花糖苷	0.087 2	0.043 1	0.130 4	100.23	99.18	2.14
	0.084 5	0.043 1	0.129 2	103.71		
	0.093 3	0.043 1	0.135 7	98.38		
	0.087 8	0.088 2	0.174 8	98.64		
	0.087 1	0.088 2	0.173 4	97.85		
	0.086 8	0.088 2	0.174 7	99.66		
	0.087 8	0.131 6	0.219 8	100.30		
	0.089 0	0.131 6	0.216 4	96.81		
	0.091 4	0.131 6	0.219 1	97.04		

参考文献

[1] 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, 2020: 140-141.

[2] 朱乃亮, 徐 荣, 吴海峰, 等. 荒漠肉苁蓉和管花肉苁蓉指纹图谱比较研究[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(13): 1116-1119.

[3] 闫 瞰, 齐海平, 李旻辉, 等. 肉苁蓉和管花肉苁蓉的对比[J]. 包头医学院学报, 2019, 35(1): 120-121.

[4] 吴 波, 顾少菊, 傅玉梅, 等. 肉苁蓉和管花肉苁蓉通便与

表3 样品含量测定结果($\%, n=3$)

Tab. 3 Results of content determination of four phenylethanol glycosides in the samples($\%, n=3$)

编号	松果菊苷	管花苷A	毛蕊花糖苷	异毛蕊花糖苷
S1	0.453	0.013	0.095	0.028
S2	0.869	0.021	0.172	0.073
S3	4.230	0.464	1.681	0.263
S4	16.325	0.910	5.988	1.899
S5	32.126	2.812	10.856	2.174
S6	26.556	2.905	6.595	1.565
S7	38.855	3.783	19.932	4.868

补肾壮阳药理作用的研究[J]. 中医药学刊, 2003, 21(4): 539-548.

[5] 范亚楠, 黄玉秋, 贾天柱, 等. 肉苁蓉炮制前后对衰老模型大鼠抗衰老及免疫功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(11): 2882-2885.

[6] 吴 波, 付玉梅. 肉苁蓉总苷对亚急性衰老小鼠抗脂质过氧化作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(5): 639.

[7] 胡余明, 胡怡秀, 刘秀英, 等. 苁蓉总苷对正常小鼠学习记忆功能的影响研究[J]. 中国预防医学杂志, 2007, 8(4): 370-373.

[8] 屠鹏飞, 姜 勇, 郭玉海, 等. 发展肉苁蓉生态产业推进西部荒漠地区生态文明[J]. 中国现代中药, 2015, 17(4): 297-301.

[9] 覃文婷, 宿美凤, 雒晓梅, 等. 定性分析不同产地荒漠肉苁蓉苯乙醇苷类及多糖类成分[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(7): 77-81.

[10] 王力伟, 曹 瑞, 房永雨, 等. 超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱联用法测定肉苁蓉中有效成分的含量[J]. 中药材, 2017, 40(2): 295-300.

[11] 初 侨, 席兴军, 杨 丽. 肉苁蓉中松果菊苷和毛蕊花糖苷闪提工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(16): 49-52.

[12] 余逸凡. 肉苁蓉属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 化工管理, 2019(13): 111-112.

[13] 王小新, 骆婷婷. 肉苁蓉对小鼠抗疲劳及记忆力的影响[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(22): 102-103.

[14] 随家宁, 李芳媛, 郭勇秀, 等. 肉苁蓉化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物预测分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(1): 191-196.

[15] 刘 涛, 殷松娜, 栾 昕. 肉苁蓉对卵巢早衰大鼠免疫因子和凋亡相关蛋白的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(23): 3084-3087.

[16] 李承花, 刘婧慧, 徐珍霞, 等. RP-HPLC同时测定管花肉苁蓉中4种苯乙醇苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6): 1003-1006.

[17] 丁艳霞, 王晓琴, 张 英. 基于高效液相色谱的肉苁蓉属药材6个主要苯乙醇苷类成分的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(4): 813-816.

(收稿日期: 2021-05-26; 修回日期: 2021-08-22)