

## HPLC 法测定藏药螃蟹甲中苯乙醇苷类化合物的含量

李茂星<sup>1,2</sup>, 张超<sup>1,2</sup>, 乌兰<sup>3</sup>, 尉丽力<sup>1</sup>, 邱建国<sup>1</sup>, 张泉龙<sup>1</sup>, 贾正平<sup>1,2</sup> (1. 兰州军区兰州总医院药剂科, 全军高原环境损伤防治重点实验室, 甘肃兰州 730050; 2. 兰州大学生命科学学院, 甘肃兰州 730000; 3. 西北民族大学化工学院, 甘肃兰州 730030)

**[摘要]** 目的 建立 RP-HPLC 法同时测定藏药螃蟹甲中 3 个苯乙醇苷的含量。方法 色谱柱为 Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (36 : 64), 冰醋酸调 pH 至 4.5; 流速 1.0 ml/min; 柱温 20 °C, 检测波长 330 nm。结果 毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷分别在 20 ~ 500 ( $r=0.9996$ ), 10 ~ 130 ( $r=0.9995$ ), 10 ~ 130 ( $r=0.9997$ ) μg/ml 范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率均在 96% ~ 104% 之间, RSD 均小于 5% ( $n=6$ )。结论 该方法专属性强、灵敏度高、精确度与重现性好, 可作为螃蟹甲药材的质量控制方法。

**[关键词]** 螃蟹甲; 苯乙醇苷; 高压液相色谱法

**[中图分类号]** R927.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)05-0379-04

## Determination of phenylethanoid glycosides in *Phlomis younghusbandii* by HPLC

LI Mao-xing<sup>1,2</sup>, ZHANG Chao<sup>1,2</sup>, WU Lan<sup>3</sup>, WEI Li-li<sup>1</sup>, QIN Jian-guo<sup>1</sup>, ZHANG Quan-long<sup>1</sup>, JIA Zheng-ping<sup>1,2</sup> (1. Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Key laboratory of the prevention and cure for the plateau environment damage, PLA, Lanzhou 730050, China; 2. College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3. College of Chemical Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a HPLC method for the determination of three phenylethanoid glycosides in *Phlomis younghusbandii*. **Methods** HPLC analysis was performed on Symmetry C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column and the mixture of methanol-water (36 : 64, pH=4.5, HAc) was used as the mobile phase with a flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 20 °C and the detection wavelength was 330 nm. **Results** The linear ranges of acteoside, alyssonoside, isoacteoside were 20 ~ 500 ( $r=0.9996$ ), 10 ~ 130 ( $r=0.9995$ ), 10 ~ 130 ( $r=0.9997$ ) μg/ml, respectively. The average recoveries ( $n=6$ ) of them were all between 96% and 104%, RSD < 5%. **Conclusions** This method was special, sensitive, accurate and with good repeatability, which could be used for quality control of *Phlomis younghusbandii*.

**[Key words]** *Phlomis younghusbandii*; phenylethanoid glycosides; HPLC

螃蟹甲为唇形科糙苏属多年生草本植物螃蟹 (*Phlomis younghusbandii* Mukerjee) 的干燥块根, 藏语称“露木尔”, 为藏医习用药材, 广泛分布于青海、西藏海拔 2 700 ~ 4 800 m 的地区<sup>[1]</sup>。传统中医药、民族医药理论认为螃蟹甲具有强筋壮骨、祛风活络、清热消肿、止咳祛痰的功效, 广泛用于治疗咳嗽、感冒、肺炎、支气管炎、风湿性关节炎、疮疥肿毒等疾病。现代药理研究其镇咳、祛痰和平喘效果显著, 临床应用也非常广泛。作者前期对螃蟹甲的化学成分研究表明螃蟹甲中大量含有环烯醚萜苷和苯乙醇苷类成分, 有关螃蟹甲中环烯醚萜苷类化合物的含量测定目前已有文献报道<sup>[2,3]</sup>, 而苯乙醇苷类化合物的含量测定未见报道。药理学研究表明, 苯乙醇苷类化合物具有抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、增强记忆、保肝和强心等作用<sup>[4,5]</sup>, 可能为螃蟹甲中的活性成

分。为了更有效地控制螃蟹甲药材及其制剂的质量, 本测定首次采用 HPLC 法对不同产地的螃蟹甲药材和 1 个螃蟹甲制剂中 3 个苯乙醇苷类成分的含量进行测定和比较, 希望可以为进一步完善该药材的品质评价及质量控制提供参考依据。

### 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪, 包括 600 型二元梯度泵、996 型二极管阵列紫外检测器 (美国 Waters 公司), BP210S 电子分析天平 (Sartorius 公司), SK7200H 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司); 甲醇为色谱纯, 水为灭菌注射用水, 其余试剂均为分析纯; 对照品毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷均为本实验室自制 [从螃蟹甲药材中分离得到, 经光谱学和波谱学分析鉴定其结构 (图 1), 经 HPLC 面积归一化法计算, 纯度均在 98% 以上]。螃蟹甲对照药材由中国药品生物制品检定所提供 (批号为 121407-200401)。螃蟹甲药材 (3 份, 分别收购于西

**[作者简介]** 李茂星 (1973-), 男, 副主任药师。Tel: (0931) 8994676, E-mail: limaox2005@yahoo.com.cn

藏林芝、拉萨、四川成都,经兰州大学药学院马志刚教授鉴定为螃蟹甲 *Phlomis younghusbandii* Mukerjee)。螃蟹甲制剂七味螃蟹甲丸(0.25 g/粒,青海琦鹰生物制药股份有限公司,国药准字 Z20054325,批号 20091203)。

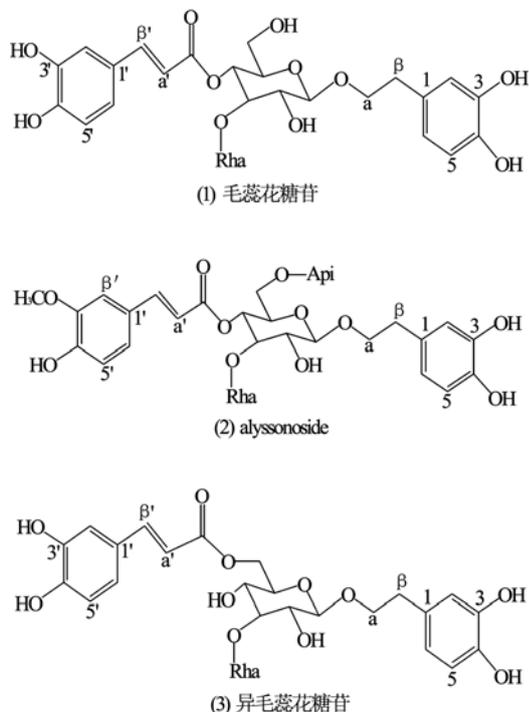


图1 螃蟹甲中的3个苯乙醇苷类化合物的结构

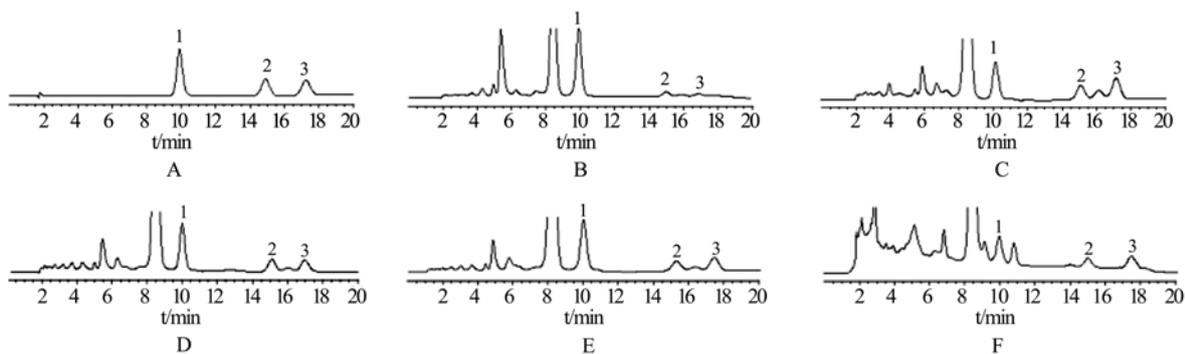


图2 螃蟹甲药材 HPLC 色谱图

A-对照品;B-螃蟹甲对照药材;C-螃蟹甲(成都);D-螃蟹甲(林芝);E-螃蟹甲(拉萨);F-七味螃蟹甲丸  
1-毛蕊花糖苷;2-alyssonoside;3-异毛蕊花糖苷

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱为 Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);洗脱流动相为甲醇-水(36:64),冰醋酸调 pH 至 4.5;流速 1.0 ml/min;检测波长 330 nm;柱温 20 °C;进样量 10 μl。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取干燥至恒重的毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷各 25 mg 置 25 ml 量瓶中,加 70% 的甲醇至刻度。即得浓度为 1 mg/ml 的对照品储备溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取螃蟹甲药材粉末(过四号筛) 1 g,精密称定;取七味螃蟹甲丸 8 粒,研细,分别置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 ml,称定重量,超声处理 45 min,冷却,再称定重量,加 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取滤液,即得。

### 2.4 系统适用性试验

**2.4.1 理论塔板数和分离度** 在“2.1”项下的色谱条件下,取混合对照品溶液(毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷按浓度 2:1:1 混合),供试品溶液各 10 μl,分别进样,记录色谱图,见图 2。在图 2 中,毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷的保留时间分别为 10.0、14.9、17.4 min,与相邻峰的分离度均大于 1.5,理论塔板数均大于 2 000。

**2.4.2 精密度试验** 取毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷的混合对照品溶液,在“2.1”项下的色谱条件下,重复进样 6 次,进样量为 10 μl,记录峰面积,计算仪器精密度的 RSD,结果毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷的 RSD 分别为 1.94%、1.20%、0.75%,表明精密度良好。

**2.5 线性关系的考察** 分别吸取毛蕊花糖苷储备液 100、500、900、1 300、1 700、2 100、2 500 μl;aly-

ssonoside 储备液 50、150、250、350、450、550、650 μl;异毛蕊花糖苷储备液 50、150、250、350、450、550、650 μl;然后分别依次加入到 7 个 5 ml 的容量瓶中混匀,加 70% 的甲醇定容至刻度。即得不同浓度的 3 种苯乙醇苷混合对照品溶液。然后按“2.1”项下的色谱条件进行测定,分别进样 10 μl,以峰面积为纵坐标,以浓度为横坐标进行线性回归,得各成分回归方程和线性范围见表 1。

表1 3个苯乙醇苷的回归方程和线性范围

对照品	回归方程	r	线性范围 ( $\mu\text{g/ml}$ )
毛蕊花糖苷	$Y=6.921 \times 10^3 X - 5.173 \times 10^4$	0.999 6	20 ~ 500
alyssonoside	$Y=6.867 \times 10^3 X - 2.145 \times 10^4$	0.999 5	10 ~ 130
异毛蕊花糖苷	$Y=6.106 \times 10^3 X - 3.602 \times 10^4$	0.999 7	10 ~ 130

2.6 重复性试验 取同一产地螃蟹甲样品6份,按照“2.3”项下供试品溶液的制备方法制备样品溶液,然后按“2.1”项下色谱条件进行测定,每次进样10

$\mu\text{l}$ ,分别测定峰面积,计算含量,结果测得毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷含量分别为3.15、1.10、1.35 mg/g;RSD分别为1.74%、1.99%、1.48%。  
2.7 加样回收率试验 精密称取适量已知含量的购自四川成都的螃蟹甲药材粉末6份,分别精密加入一定量的毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷对照品,按照“2.3”项下方法制备样品溶液,按“2.1”项下的色谱条件进行测定,计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验(n=6)

组分	样品量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
毛蕊花糖苷	1.575	1.560	3.196	103.88	101.15	3.41
	1.568	1.560	3.088	97.45		
	1.565	1.560	3.091	97.83		
	1.574	1.560	3.125	99.41		
	1.576	1.560	3.177	102.60		
alyssonoside	1.578	1.560	3.227	105.72	96.98	3.64
	0.799	0.800	1.626	103.37		
	0.800	0.800	1.545	93.13		
	0.801	0.800	1.589	98.55		
	0.802	0.800	1.566	95.54		
异毛蕊花糖苷	0.785	0.800	1.541	94.53	102.01	1.80
	0.803	0.800	1.577	96.76		
	1.534	1.540	3.099	101.65		
	1.538	1.540	3.083	100.31		
	1.540	1.540	3.080	100.00		
	1.539	1.540	3.107	101.80		
	1.536	1.540	3.141	104.21		
	1.538	1.540	3.141	104.09		

### 2.8 耐用性

2.8.1 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件,每次进样10  $\mu\text{l}$ ,分别在0、2、4、8、12、24、48、72 h测定峰面积,结果毛蕊花糖苷、alyssonoside、异毛蕊花糖苷的RSD分别1.87%、1.34%、2.71%。表明样品溶液在72 h内基本稳定。

2.8.2 流动相的组成比例和pH值 在研究分析

方法的过程中可以看出,流动相中甲醇和水相的比例有小的变动(1%左右),pH值在4.0~5.0之间变化,对测定结果无明显的影响。

2.9 样品含量测定 分别取不同来源的螃蟹甲样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下的色谱条件进行测定,进样10  $\mu\text{l}$ ,采用外标法以峰面积计算3个苯乙醇苷的含量,结果见表3。

表3 螃蟹甲中3个苯乙醇苷的测定结果(n=3)

样品来源	毛蕊花糖苷		alyssonoside		异毛蕊花糖苷	
	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)
对照药材(中检所)	10.59	1.17	0.85	1.45	0.59	1.94
四川成都	1.97	1.74	1.00	1.56	1.92	0.76
西藏林芝	3.14	1.72	1.08	0.26	1.38	2.85
西藏拉萨	6.11	0.29	1.39	1.63	2.45	1.32
七味螃蟹甲丸	0.59	1.63	0.28	3.24	0.36	2.03

### 3 讨论

3.1 本实验首次建立了藏药螃蟹甲中苯乙醇苷类

化合物的HPLC含量测定方法,并测定了不同产地螃蟹甲药材和1个螃蟹甲制剂中3个苯乙醇苷的含量  
(下转第400页)

有差异,其中的钙拮抗剂与 $\beta$ 受体阻断药又因为同具有扩张血管作用而属于抗心绞痛药,此情况表明药物可存在多种作用。因此,根据其不同表现与临床应用来进行划分,其所属类别亦可不同。学习药物以某类药物从总到分,同时分与分还可再汇总成另外一类药物。尝试从不同角度去了解药物,活跃思维,可以将药物的多个作用连贯起来,帮助学习记忆。

## 5 材料互联记忆

首先要掌握本学科中药物间的关联。比如毛茛菪香碱能激动虹膜上 M 受体,使眼睛产生缩瞳、降低眼压、调节痉挛的作用;而阿托品作为 M 受体阻断剂,因其阻断 M 受体与拟似药或者乙酰胆碱的结合,产生拮抗作用,使眼睛出现扩瞳、升高眼压、调节麻痹等作用。其次,由于药理学是基础医学与临床医学、医学与药学相互联系的桥梁学科,故应掌握各学科之间的知识关联,以基础医学中的生理学、生物化学、病理生理学等为基础,并由此拓展出临床诊断、内科、外科、妇科等临床学科的知识。比如抗心律失常药是药理学的重点与难

点之一,内容多且复杂,要清楚了解药物治疗心律失常的机制,必须有扎实的生理学基础知识,包括正常心肌电生理与异常心肌电生理,由此使心律失常发生机制与抗心律失常药物的作用机制关联理解,易于记忆。

教学是一门艺术,药理学教学在医学基础教育中又占有重要地位,因本身又存在抽象难懂的特点,更需要教师在教学中运用记忆规律掌握重点药物和概念,从而有效地提高学生的记忆效果,以达到长期记忆的目的,为今后的临床应用打下良好的基础。

## 【参考文献】

- [1] 杨治良,郭力平,王 沛,等. 记忆心理学[M]. 第二版. 上海:华东师范大学出版社,1999: 3~4.
- [2] 邵永富. 开发人的右半球[M]. 上海:上海文化出版社,1988: 26.
- [3] 钟道隆. 记忆的窍门——普通人提高记忆力的方法[M]. 第三版. 北京:清华大学出版社,2005: 35.

[收稿日期] 2011-02-21

[修回日期] 2011-06-16

(上接第 381 页)

量,方法稳定可靠,重复性好,适合于螃蟹甲的质量控制。

**3.2** 在供试品制备方法上,考察了甲醇、70% 甲醇和 50% 甲醇对苯乙醇苷提取效率的影响,结果表明以 70% 的甲醇作为提取溶剂效率最高。在此基础上,比较了热回流和超声对提取结果的影响,结果表明超声法提取效率高。以 70% 甲醇做提取溶剂,分别超声 30、45、60 min,结果超声 45、60 min 均较 30 min 提取完全,但两者差异较小。故确定 70% 甲醇超声提取 45 min 作为供试品制备方法,既简便可靠,又不会造成有效成分的破坏。

**3.3** 检测波长的选择:利用二极管阵列紫外检测器检测,将对照品溶液在 200~500 nm 进行在外扫描,结果表明,3 个苯乙醇苷成分在 330 nm 波长下均有较大吸收,故选择 330 nm 作为检测波长。

**3.4** 实验结果表明,在不同产地螃蟹甲药材和 1 个螃蟹甲制剂中均检测到 3 个苯乙醇苷类成分的存在,总体看来,毛蕊花糖苷 > isoacteoside > 异毛蕊花糖苷。但是,这种含量差异与其中的环烯醚萜苷类

成分一样没有明显的规律性<sup>[5]</sup>。考虑到螃蟹甲药材采集困难,样本量较少,其普遍性还有待进一步研究。苯乙醇苷和环烯醚萜苷类成分在螃蟹甲药材中含量很大,很可能为螃蟹甲中的活性成分。因此,建议在建立螃蟹甲药材及其制剂质量标准的同时应测定苯乙醇苷和环烯醚萜苷类成分。

## 【参考文献】

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(65 卷第二分册)[M]. 北京:化学工业出版社,1995: 126,231.
- [2] 赵 斌,董小萍,吴健明. HPLC 法测定螃蟹甲中山梔苷甲酯的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(2):323.
- [3] 张军莉,徐 娟,李茂星. HPLC 法测定了藏药螃蟹甲中 8-乙酰氧基山梔子苷甲酯的含量[J]. 解放军药学报,2009,25(3):261.
- [4] 靖 会,佐建锋,李教社. 苯乙醇苷类化合物的药理研究进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(3): 440.
- [5] 许敬英,苏 奎,周 静. 苯丙素苷类化合物的研究进展(II)[J]. 时珍国医国药,2007,18(7): 1770.

[收稿日期]2011-02-23

[修回日期]2011-04-04