

高效液相色谱法测定肉苁蓉中京尼平苷酸的含量

李莉, 曹进*, 张庆生

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 建立一种高效液相色谱法测定肉苁蓉中京尼平苷酸含量的分析方法。**方法** 采用 60% 甲醇为溶剂, 超声提取样品。选择 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇和 0.5% 乙酸水溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 237 nm。**结果** 京尼平苷酸在 5.0~100.0 μg/mL 范围内线性关系良好($r=0.9999$), 平均回收率在 95%~101% 之间, RSD 0.55%~1.96%。肉苁蓉、管花肉苁蓉和盐生肉苁蓉中京尼平苷酸的含量存在差异。**结论** 本方法快捷、简便、准确, 可用于测定肉苁蓉中京尼平苷酸的含量。**关键词:** 肉苁蓉; 京尼平苷酸; 高效液相色谱法

Determination of geniposidic acid in herba cistanche by high performance liquid chromatography

LI Li, CAO Jin*, ZHANG Qing-Sheng

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of the content of geniposidic acid in herba cistanche by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Samples were extracted ultrasonically with 60% methanol as the solvent. An Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase consisted of methanol and 0.5% acetic acid. The flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was set at 30 ℃. The UV detection wavelength was 237 nm. **Results** There was a good linearity when the concentration of geniposidic acid was 5.0~100.0 mg/mL ($r=0.9999$). The average recovery was 95%~101%, and the RSD was 0.55%~1.96%. There were differences between the 3 different sources of herba cistanche (*Cistanche deserticola*, *Cistanche tubulosa* and *Cistanche salsa*) in geniposidic acid content. **Conclusion** This method is simple and accurate, and it can be used for determination of geniposidic acid in herba cistanche.

KEY WORDS: herba cistanche; geniposidic acid; high performance liquid chromatography

1 引言

肉苁蓉(herba cistanche)为列当科植物肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y.C. Ma)的干燥带鳞叶的肉质茎^[1], 具有补肾阳、益精血、润肠通便等功效, 是中

国传统的名贵中药材。近年来, 由于野生肉苁蓉资源日益枯竭, 肉苁蓉及寄生梭梭已被列为国家二级保护植物, 同时被收入《国际野生植物保护名录》^[2], 2005 年版《中国药典》首次将管花肉苁蓉(*Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight)载入, 作为共同药材来源

*通讯作者: 曹进, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: caojin@gmail.com

*Corresponding author: CAO Jin, Researcher, National Institutes for Food and Drug Control, No. 2, Tiantanxili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: caojin@gmail.com

[3]。由于药源稀缺,我国不少地区将本属其他植物入药使用,目前市场上流通的药材肉苁蓉除主要来源于上述2种肉苁蓉属植物外,常见的还有盐生肉苁蓉(*Cistanche salsa* (C.A.Mey) G. Beck)^[4]。京尼平苷酸(geniposidic acid)又称梔子苷酸,是一种环烯醚萜葡萄糖苷,具有消炎利胆等功能,临床上用于降血压、止痛、镇静,为肉苁蓉中生物活性成分之一^[5-8]。目前对肉苁蓉中京尼平苷酸定量分析的报道甚少。其他药材(如杜仲等)中京尼平苷酸含量测定方法虽报道较多,但由于中药材成分复杂,含量差异明显,相关方法不能满足肉苁蓉中京尼平苷酸的检测^[9-14]。本研究建立了一种能快速、准确检测肉苁蓉中京尼平苷酸的高效液相色谱分析方法,并对3种不同种类的肉苁蓉(肉苁蓉、管花肉苁蓉和盐生肉苁蓉)中京尼平苷酸含量进行了测定分析及比较。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2695 型高效液相色谱仪(配有 2998 型二极管阵列检测器,美国 Waters 公司); AL 204 型分析天平(瑞士 METTLER 公司)和 XP 205 型分析天平(瑞士 METTLER 公司); CR22GIII 型离心机(日本 HITACHI 公司); KQ-3200DE 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

肉苁蓉为对照药材(中国食品药品检定研究院,批号 121276-200501); 管花肉苁蓉为对照药材(中国食品药品检定研究院,批号 121101-200402); 盐生肉苁蓉(宁夏盐池); 京尼平苷酸标准品(中国食品药品检定研究院,批号: 11828-201102,纯度 96%); 甲醇(色谱纯, Merck); 乙酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 试验用水为超纯水。

2.2 仪器条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: A: 甲醇, B: 0.5%乙酸水溶液, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL; 检测波长为 237 nm。

2.3 标准溶液的制备

精密称取京尼平苷酸标准品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。

表 1 梯度洗脱比例

Table 1 Gradient elution ratio

时间(min)	溶液 A(%)	溶液 B(%)
0	5	95
10	20	80
25	20	80
35	60	40
45	5	95

2.4 样品前处理

取粉碎均匀的固体样品约 2 g, 加 60%甲醇 30 mL, 超声提取 30 min 后过滤, 以少量 60%甲醇洗涤残渣, 收集合并滤液, 定容至 50 mL, 用 0.45 μm 有机相滤膜过滤, 为待测液。

3 结果与讨论

3.1 前处理方法的优化

本研究比较了不同溶剂(甲醇、乙醇、乙腈)对样品提取效率的影响, 每个条件平行 3 次试验, 结果表明 3 种溶剂提取效果无显著性差异, 考虑到流动相的选择与溶剂毒性, 选择甲醇作为提取溶剂。此外还考察了不同比例提取液对样品提取效率的影响, 试验表明当提取液中甲醇和水的体积比为 60:40 时提取效率最高。此外, 本研究还比较了不同的超声提取时间(15、30、45 min)对样品提取效率的影响。结果表明, 提取时间在 30 min 后提取效率不再增加, 因此选择 30 min 作为超声提取时间。

3.2 液相色谱条件的优化

3.2.1 检测波长的选择

扫描京尼平苷酸 190~400 nm 的紫外吸收图, 可知其在 237 nm 处有特征吸收峰, 故选用 237 nm 作为检测波长, 经实际样品验证检测, 不存在干扰, 方法特异性好。

3.2.2 流动相的选择

在色谱洗脱条件方面, 本实验考察了甲醇-水和乙腈-水对京尼平苷酸色谱行为的影响, 两者无显著性差异。京尼平苷酸中有羧基, 在中性溶剂中易电离, 使固定相表面存在双保留, 色谱峰有拖尾现象, 为此在流动相中加入少量冰醋酸, 使羧基的电离被抑制, 峰形得到改善。试验结果显示, 使用甲醇+0.5%乙酸溶液作为流动相, 色谱峰峰形及分离效果均较好。标准品及样品液相色谱图见图 1。

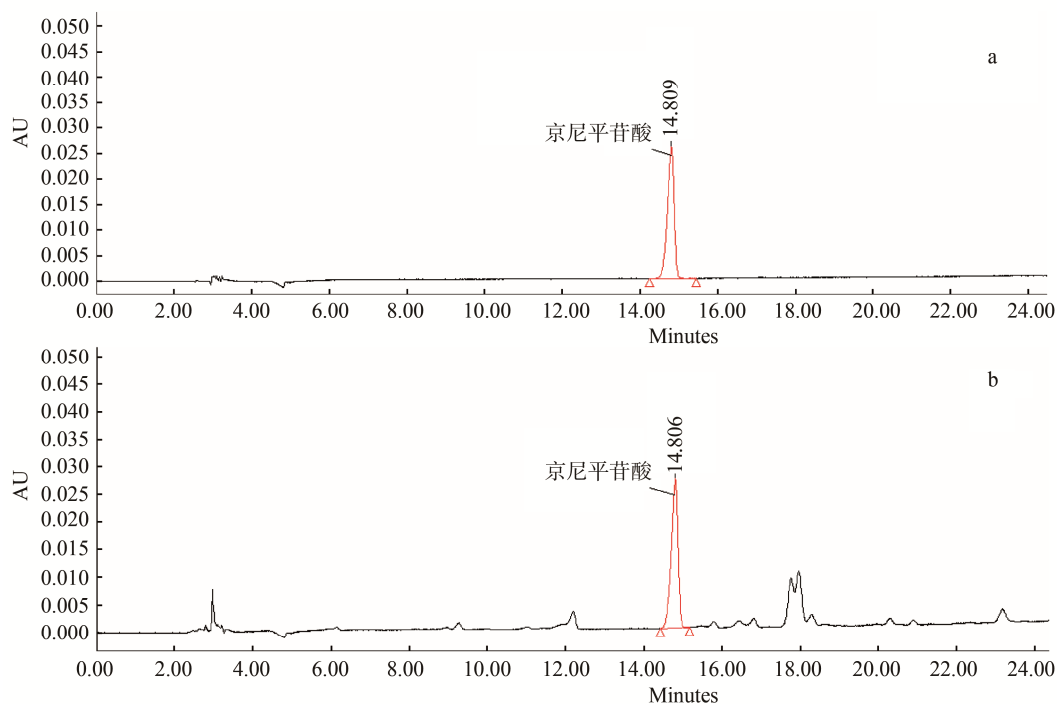


图1 标准品及样品液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatograms of geniposidic acid

a: 京尼平苷酸标准溶液色谱图; b: 肉苁蓉样品色谱图

a: Spectrum of geniposidic acid standard; b: Spectrum of sample

3.2.3 柱温的选择

本实验比较了柱温在 20、30、40 °C 下对目标物保留时间和色谱峰形的影响, 结果表明在不同柱温下色谱峰形无明显变化, 因此选择常规 30 °C 为分析温度。

3.3 方法学考察

3.3.1 线性关系考察

精密量取京尼平苷酸标准品储备液, 用 60% 甲醇逐级稀释成 6 个浓度梯度, 京尼平苷酸的浓度为分别为 5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 。分别取 10 μL 注入液相色谱仪, 测定京尼平苷酸的峰面积, 并以峰面积(Y)和对应的浓度(X, $\mu\text{g/mL}$)计算标准曲线和相关系数(r)。计算得到回归方程为 $Y=7139.4X+947.02(r=0.9999)$ 。结果表明京尼平苷酸在 5.0~100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内线性关系良好。

3.3.2 加标回收试验

向已知含量的样品中, 分别加入 3 个添加水平 (125、1000、2500 $\mu\text{g/g}$) 的京尼平苷酸标准溶液(每个水平平行 6 份), 之后按照 2.4 项下方法制备供试品溶

液, 各取 10 μL 注入液相色谱仪分析检测, 计算回收率, 结果见表 2。

3.3.3 重复性

按照 2.4 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 注入 HPLC 测定京尼平苷酸含量, 结果 RSD 为 1.02%, 说明方法重复性良好。

3.3.4 精密度

取浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的京尼平苷酸标准溶液, 连续进样 6 次, 测定京尼平苷酸含量, 结果 RSD 为 0.14% 和 0.06%, 说明仪器精密度良好。

3.3.5 稳定性

取同一供试液, 于室温分别放置 0、2、4、8、12、24、48、72 h, 用 HPLC 进行测定, 结果京尼平苷酸含量 RSD 为 0.75%($n=6$), 说明样品在 72 h 内稳定。

3.3.6 检测限和定量限

逐级稀释京尼平苷酸标准溶液, 用液相色谱仪测定, 以 3 倍信噪比对应的样品浓度为检出限, 以 10 倍信噪比对应的样品浓度为定量限, 可得京尼平苷酸的检出限和定量限分别为 15 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 。

表 2 回收率测定结果(n=6)
Table 2 The results of recoveries (n=6)

样品本底值(μg/g)	添加量(μg/g)	测定量(μg/g)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
118.35	125	237.07	94.97	95.3	0.95
118.35	125	237.42	93.66		
118.35	125	237.54	95.35		
118.35	125	239.64	97.03		
118.35	125	238.37	96.01		
118.35	125	236.27	94.33	99.79	0.69
118.35	1000	1126.1	100.8		
118.35	1000	1100.7	98.24		
118.35	1000	1111.0	99.27		
118.35	1000	1119.2	100.1		
118.35	1000	1119.5	100.1	99.5	0.55
118.35	1000	1121.1	100.3		
118.35	2500	2619.4	100.0		
118.35	2500	2624.2	100.2		
118.35	2500	2593.6	99.01		
118.35	2500	2619.1	100.0		
118.35	2500	2590.9	98.90		
118.35	2500	2595.7	99.10		

3.4 样品测定

按照上述方法测定肉苁蓉、管花肉苁蓉和盐生肉苁蓉中京尼平苷酸的含量, 结果见表 3。3 种肉苁蓉中京尼平苷酸含量差异较大, 其中盐生肉苁蓉中未检出京尼平苷酸。测定结果与文献报道的盐生肉苁蓉中不含京尼平苷酸一致^[15]。

表 3 实际样品测定结果
Table 3 The content of geniposidic acid in samples

样品	京尼平苷酸含量(μg/g)	RSD(%)
肉苁蓉	153.8	0.02
管花肉苁蓉	556.5	0.15
盐生肉苁蓉	/	/

注: “/”表示未检出。

4 结 论

本研究建立了一种高效液相色谱方法测定含肉

苁蓉中京尼平苷酸含量的分析方法。该方法快速、准确、操作简便, 重现性好。在实际样品检测中发现, 不同来源的肉苁蓉样品中京尼平苷酸的含量有一定的差异。京尼平苷酸或可作为肉苁蓉品种差异和质量控制的评价指标之一。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
China Pharmacopoeia Committee. Chinese pharmacopoeia (2010 Edition) [M]. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2010.

[2] 盛晋华, 瞿志席, 杨太新, 等. 肉苁蓉寄生生物学的研究[J]. 中国农业科技导报, 2004, 6(1): 57–62.
Sheng JH, Zhai ZX, Yang TX, et al. Study on biology of parasitism in *Cistanche* [J]. Rev China Agric Sci Technol, 2004, 6(1): 57–62.

[3] 贾晓光, 倪慧, 张娟, 等. 管花肉苁蓉研究及产业发展现状[J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35(7): 878–880.
Jia XG, Ni H, Zhang J, et al. Present situation of research and

- development of *Cistanche tubulosa* [J]. J Xinjiang Med Univ, 2012, 35(7): 878–880.
- [4] 杨建华, 胡君萍, 热娜·卡斯木, 等. 盐生肉苁蓉栽培品中苯乙醇苷类的指纹图谱研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 4(8): 1128–1133.
- Yang JH, Hu JP, ReNa KSM, et al. Studies on fingerprint of phenylethanoid glycosides in cultivated *Cistanche salsa* [J]. Chin Pharm J, 2005, 4(8): 1128–1133.
- [5] 颜贵卉, 田金虎, 龙本文, 等. 肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10(9): 692–694.
- Yan GH, Tian JH, Long BW, et al. Advances in research of phenylethanoid glycosides in *Cistanche* [J]. Central South Pharm, 2012, 10(9): 692–694.
- [6] 刘秀华, 李芸, 张晶. 肉苁蓉属植物化学成分的研究进展[J]. 兰州医学院学报, 2004, 30(3): 96–97.
- Liu XH, Li Y, Zhang J. Advances in studies on chemical constituents of *Herba cistanches* [J]. J Lanzhou Med Coll, 2004, 30(3): 96–97.
- [7] 宋海龙, 贾晓光, 谢海辉. 管花肉苁蓉化学成分研究进展[J]. 新疆中医药, 2010, 28(1): 76–78.
- Song XL, Jia XG, Xie HH. Advances in research of chemical constituents of *Cistanche tubulosa* [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med, 2010, 28(1): 76–78.
- [8] 雷丽, 宋志宏, 屠鹏飞, 等. 盐生肉苁蓉化学成分研究[J]. 中草药, 2003, 34(4): 293–294.
- Lei L, Song ZH, Tu PF, et al. Studies on chemical constituents of *Cistanche salsa* [J]. Xinjiang J Tradit Chin Med, 2003, 34(4): 293–294.
- [9] 程东岩, 李明洋, 王友联, 等. HPLC 测定结肠炎奇效颗粒中京尼平苷酸的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(9): 1268–1269.
- Cheng DY, Li MY, Wang YL, et al. Determination of geniposidic acid in Jiechangyan Qixiao granules by HPLC [J]. China Pharm, 2011, 14(9): 1268–1269.
- [10] 刘慧, 张盛, 刘仲华. HPLC 法同时测定杜仲皮中京尼平苷酸、绿原酸、京尼平苷和松脂醇二葡萄糖苷[J]. 中草药, 2012, 243(8): 1547–1549.
- Liu H, Zhang S, Liu Z. Simultaneous determination of geniposidic acid, chlorogenic acid, geniposide, and pinorensin diglucoside in *Eucommia ulmoides* by HPLC [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2012, 243(8): 1547–1549.
- [11] 李钦, 赫锦锦, 马凤仙. RP-HPLC 法测定杜仲冲剂中 3 种成分的含量[J]. 河南大学学报(医学版), 2008, 27(3): 5–7.
- LI Q, He JJ, Ma FX. Determination of the contents of geniposidic acid, chlorogenic acid and geniposide in *Eucommia ulmoides* granules by RP-HPLC [J]. J Henan Univ (Med Sci) Anti Infect Pharm, 2008, 27(3): 5–7.
- [12] 党会章, 刘磊磊, 赵帅. 杜仲饮片片京尼平苷酸和京尼平苷的含量测定[J]. 抗感染药学, 2014, 11(4): 315–317.
- Dang HZ, Liu LL, Zhao S. Determination of geniposidic acid and geniposide in *Eucommia ulmoides* cortex by HPLC [J]. Anti Infect Pharm, 2014, 11(4): 315–317.
- [13] 郑礼胜, 倪娜, 刘向前, 等. 京尼平苷和京尼平研究及应用现状[J]. 药物评价研究, 2012, 35(4): 291–295.
- Zheng LS, Ni N, Liu XQ, et al. Study and application of geniposide and genipin [J]. Drug Eval Res, 2012, 35(4): 291–295.
- [14] 宋鹏, 屠鹏飞. 中药肉苁蓉质量控制及评价的研究进展[J]. 北方药学, 2011, 8(2): 61–62.
- Song P, Tu PF. Research progress on quality control and assessment of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma [J]. J North Pharm, 2011, 8(2): 61–62.
- [15] 屠鹏飞, 王邠, 张正高, 等. 肉苁蓉类生药中苯乙醇苷类成分的 RP-HPLC 分析[J]. 药学报, 1997, 32(4): 294–300.
- Tu PF, Wang B, Zhang ZG, et al. Analysis of phenylethanoid glycosides of *Herba Cistanchis* by RP-HPLC [J]. ACTA Pharm Sin, 1997, 32(4): 294–300.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



李莉, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: lili_nicbp@126.com



曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: caojin@nifdc.org.cn