

马鞭草药材的质量标准研究

舒积成^{1,2}, 俞桂新^{1,3*}, 王峥涛^{1,3}(1.上海中医药大学中药研究所, 上海 201203; 2.江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 3.上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

摘要: 目的 建立马鞭草药材的定性、定量标准。方法 采用薄层色谱法鉴别马鞭草药材中马鞭草苷、戟叶马鞭草苷和毛蕊花苷成分; 以高效液相色谱法测定以上3种成分的含量。色谱柱为 Agilent Eclipse XDB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-水梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 238 nm。结果 马鞭草药材中马鞭草苷、戟叶马鞭草苷和毛蕊花苷的薄层色谱鉴别特征明显, 专属性强; 药材中马鞭草苷、戟叶马鞭草苷和毛蕊花苷的线性范围分别为 0.05~1.26 μg($r=0.999\ 9$)、0.10~2.58 μg($r=0.999\ 8$)和 0.09~2.20 μg($r=0.999\ 5$), 平均回收率($n=9$)分别为 96.8%(RSD=1.15%)、98.3%(RSD=2.34%)和 98.2%(RSD=2.28%)。结论 所建立的马鞭草药材定性定量测定方法简单准确, 能够为马鞭草药材的质量控制提供有效数据。

关键词: 马鞭草药材; 马鞭草苷; 戟叶马鞭草苷; 毛蕊花苷; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号: R931.5 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2011)05-0433-04

Quality Control of Verbenae Herba

SHU Jicheng^{1,2}, CHOU Guixin^{1,3*}, WANG Zhengtao^{1,3}(1.Institute of Chinese Materia Medica of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2.Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicines, Ministry of Education, Nanchang 330004, China; 3.Shanghai R & D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for quality control of Verbenae Herba. **METHODS** Verbenalin, hastatoside and acteoside in *Verbena officinalis* L. were identified by TLC. Their contents were determined by HPLC equipped with Agilent Eclipse XDB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, the mobile phase consisted of acetonitrile-methanol-water, the analysis was done at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C and the detection wavelength was 238 nm. **RESULTS** The linearities of verbenalin, hastatoside and acteoside were in the ranges of 0.05–1.26 μg($r=0.999\ 9$), 0.10–2.58 μg($r=0.999\ 8$) and 0.09–2.20 μg($r=0.999\ 5$), respectively. The average recoveries ($n=9$) were 96.8% (RSD=1.15%) for verbenalin, 98.3% (RSD=2.34%) for hastatoside, and 98.2% (RSD=2.28%) for acteoside. **CONCLUSION** This method is simple, accurate with good reproducibility. It is suitable for quality control of Verbenae Herba.

KEY WORDS: Verbenae Herba; verbenalin; hastatoside; acteoside; TLC; HPLC

马鞭草为马鞭草科植物马鞭草 *Verbena officinalis* L.的地上部分或全草, 为常用中药。味苦, 性微寒。有凉血、通经、利水消肿、清热解毒的功能。用于闭经、腹部肿块、水肿腹胀、湿热黄疸、痢疾、白喉、咽喉肿痛、痈肿、疮毒等^[1]。中国药典 2005 年版一部马鞭草药材的质量标准收录了以熊果酸为指标性成分的薄层鉴定及薄层色谱扫描法含量测定^[2], 显然不能全面反映马鞭草的内在质量。中国药典 2010 年版一部虽然在 2005 年版药典的基础上对薄层鉴别项展开系统进行了优化, 并增加了 HPLC 测定齐墩果酸和熊果酸含量的指标, 该法以 ELSD 作为检测器^[3], 样品制备

较为繁琐。因此 2010 年版药典新增的定量方法, 无论是指标成分的选择上, 还是方法上都存在着一定的缺陷, 为此笔者对马鞭草药材的定性、定量标准进行了研究。

1 仪器与材料

Linomat-VI 薄层色谱自动点样器(CAMAG, 瑞士); Reprostar 3 薄层色谱摄影仪(CAMAG, 瑞士); 10 cm×20 cm 双槽展开缸(CAMAG, 瑞士); HPTLC-Fertigplatten Nano-DURASIL-20 UV254 200 mm×100 mm 硅胶预制板(德国 MN, 批号: 502046); HSGF254 200 mm×100 mm 硅胶预制板(烟台化学工业研究所, 批号: 080527); HSGF254

基金项目: 国家自然科学基金(u0732004)

作者简介: 舒积成, 男, 博士, 副教授
Tel: (021)50271706

Tel: (0791)7118785

E-mail: chouguixin@yahoo.com.cn

E-mail: shujc210@yahoo.com.cn

*通信作者: 俞桂新, 男, 博士, 教

200 mm×100 mm 硅胶预制板 (烟台江友硅胶开发有限公司,批号:090503);高效板 GF254 200 mm×100 mm 硅胶预制板(青岛海洋化工,批号:090514);GF254 硅胶手铺板(青岛海洋化工有限公司,批号:080616; 0.5%羟甲基纤维素钠;厚度0.4 mm)。

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 色谱柱: Sepax HP-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Waters Symmetry C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); Agilent Eclipse XDB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); Sartorius BT124S、BT25S 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

试剂为色谱纯或分析纯; 水为纯净水。

对照品: 马鞭草苷、戟叶马鞭草苷及毛蕊花苷(从马鞭草中分离得到,通过 MS, ¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 确定,经 HPLC 面积归一法计算,含量均在 98%以上); 马鞭草对照药材(中国药品生物制品检定所,批号:1002-200202)。

马鞭草药材: 收集了 11 个省份的马鞭草商品药材, 1(滁州百姓缘大药房,产地:安徽,批号:091122), 2(北京同仁堂药店,产地:湖北,批号:091129), 3(重庆,产地:四川,批号:070509), 4(泉州东南制药,产地:福建,批号:090801), 5(广州老百姓大药房,产地:湖北,批号:091202), 6(南宁生源中药饮片厂,产地:广西,批号:0970603), 7(湖南九芝堂药店,产地:湖南,批号:070630), 8(南京康怡中药饮片厂,产地:江苏,批号:071116), 9(江西敦寿堂药店,产地:江西,批号:091125), 10(上海养生堂,产地:安徽,批号:091204), 11(嘉兴东方国药饮片厂,产地:浙江,批号:091029), 其性状与中国药典 2005 版规定一致。

2 定性鉴别

取本品粉末 1 g, 加入甲醇 10 mL, 超声提取 30 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另取马鞭草对照药材 1 g, 同法制成对照药材溶液。再取马鞭草苷、戟叶马鞭草苷和毛蕊花苷对照品, 加甲醇制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 10 μL, 分别点于同一以羟甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-甲醇-水(9:2:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10%浓硫酸乙醇溶液, 加热至斑点显色清晰, 供试品色谱中,

在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 分别显相同颜色的斑点, 见图 1。

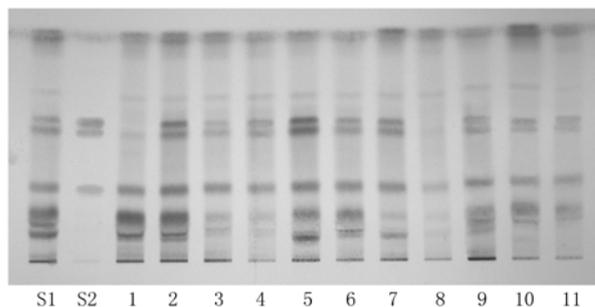


图 1 马鞭草药材薄层色谱图

S1-马鞭草对照药材; S2-对照品(由上至下分别是毛蕊花苷、马鞭草苷和戟叶马鞭草苷); 1~11-样品

Fig 1 TLC identification of Verbenae Herba

S1-control of Verbenae Herba; S2-control of acteoside, verbenalin and hastatoside; 1-11-sample

3 含量测定

3.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以水为流动相 A, 以甲醇为流动相 B, 以乙腈为流动相 C, 按表 1 进行梯度洗脱, 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 30 °C, 检测波长: 238 nm, 进样量: 10 μL。

表 1 色谱洗脱条件

Tab 1 Elution conditions of HPLC

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流动相 C/%
0	85	0	15
5	75	10	15
10	75	10	15
15	70	15	15
20	70	15	15

3.2 溶液制备

3.2.1 对照品溶液 精密称取马鞭草苷、戟叶马鞭草苷和毛蕊花苷对照品适量, 置于量瓶中, 加甲醇至刻度, 分别制成含马鞭草苷约为 1 mg·mL⁻¹, 戟叶马鞭草苷和毛蕊花苷约为 2 mg·mL⁻¹ 对照品储备液。

3.2.2 供试品溶液 取本品粗粉约 0.4 g, 精密称定, 置 100 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 80%甲醇 20 mL, 称定重量, 回流提取 2 h, 放冷, 补足重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

3.3 线性关系的考察

取对照品储备液用甲醇等倍稀释为储备液浓度的 2⁻ⁿ 倍 (n = 1, 2, 3, 4, 5), 进样量为 10 μL,

以对照品进样量为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，回归方程如下：马鞭草苷： $Y=1.304X+20.182$ ， $r=0.999\ 9(0.05\sim 1.26\ \mu\text{g})$ ；戟叶马鞭草苷： $Y=0.985X-64.636$ ， $r=0.999\ 8(0.10\sim 2.58\ \mu\text{g})$ ，毛蕊花苷： $Y=0.577X-40.758$ ， $r=0.999\ 5(0.09\sim 2.20\ \mu\text{g})$ 。结果表明在各对照品对应的进样量范围内线性关系良好。

3.4 仪器精密度试验

取对照品溶液 10 μL ，连续进样 5 次，测得马鞭草苷、戟叶马鞭草苷和毛蕊花苷峰面积 RSD 分别为：0.78%，0.92%和 2.00%。

3.5 重复性试验

取马鞭草药材(样品 7)粉末，精密称定，按“3.2.2”项下方法操作，平行制备 6 份供试品，在上述色谱条件下进行测定，戟叶马鞭草苷、马鞭草苷和毛蕊花苷色谱峰的峰面积 RSD 分别为 1.62%，2.41%和 2.35%。

3.6 稳定性试验

取马鞭草药材(样品 7)粉末，精密称定，按“3.2.2”项下方法操作，在上述色谱条件下，分别于 0，1，2，4，8，12，24，36，48，72 h 测定。戟叶马鞭草、马鞭草苷和毛蕊花苷的峰面积 RSD 分别为 1.86%，2.33%和 2.28%，表明供试品溶液 72 h 内稳定性良好。

3.7 加样回收试验

取马鞭草药材(样品 7)粉末，约合 0.4 g，精密称定，分别按已知含量的 80%，100%，120% 三个水平加入对照品戟叶马鞭草苷、马鞭草苷和毛蕊花苷，按“3.2.2”项下方法操作，在上述色谱条件下进行测定，结果见表 2，3 与 4。

表 2 戟叶马鞭草苷加样回收试验结果($n=9$)

Tab 2 Results of recovery test of hastatoside($n=9$)

药材重/g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均值/ %	RSD/ %
0.412 0	2.049 8	1.578 0	3.515 2	96.65		
0.405 6	2.018 0	1.553 2	3.498 1	97.10		
0.412 6	2.052 8	1.582 0	3.583 3	100.71		
0.403 8	2.009 0	1.935 4	3.911 0	99.27		
0.404 8	2.014 0	1.940 0	3.979 0	102.52	98.29	2.34%
0.408 7	2.033 4	1.958 1	3.932 4	99.20		
0.406 1	2.020 4	2.335 2	4.255 5	97.02		
0.407 8	2.029 0	2.344 3	4.269 8	97.26		
0.407 2	2.025 9	2.340 0	4.210 0	94.86		

表 3 马鞭草苷加样回收试验结果($n=9$)

Tab 3 Results of recovery test of verbenalin($n=9$)

药材重/g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.412 0	1.037 2	0.767 1	1.742 2	95.85		
0.405 6	1.021 1	0.755 3	1.739 6	97.03		
0.412 6	1.038 7	0.769 0	1.761 5	98.11		
0.403 8	1.016 6	0.976 2	1.963 0	97.95		
0.404 8	1.019 1	0.979 1	1.968 7	98.23	96.79	1.15%
0.408 7	1.028 9	0.983 3	1.958 7	96.81		
0.406 1	1.022 4	1.072 4	2.038 3	96.20		
0.407 8	1.026 7	1.084 4	2.042 4	95.52		
0.407 2	1.025 1	1.062 1	2.020 5	95.43		

表 4 毛蕊花苷加样回收试验结果($n=9$)

Tab 4 Results of recovery test of acteoside($n=9$)

药材重/g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/%	平均值/ %	RSD/%
0.412 0	2.259 3	1.618 9	1.554 8	96.03		
0.405 6	2.224 2	1.592 4	1.522 5	95.57		
0.412 6	2.262 6	1.600 6	1.508 7	94.23		
0.403 8	2.214 4	2.281 7	2.213 1	96.98		
0.404 8	2.219 9	2.286 4	2.224 1	97.24	98.17	2.28%
0.408 7	2.241 6	2.205 7	2.222 7	100.75		
0.406 1	2.227 0	2.695 9	2.669 5	99.01		
0.407 8	2.236 3	2.602 2	2.659 7	102.22		
0.407 2	2.233 0	2.601 0	2.638 2	101.47		

3.8 样品含量测定

取所收集的 11 批马鞭草药材，粗粉，按上述建立的含量测定方法进行测定，每批药粉平行制备两份供试品。每一批进行水分含量测定，扣除水分。其干燥品含量结果见表 5，色谱图见图 2。

表 5 11 批马鞭草药材的含量结果($n=2$)

Tab 5 Results of determination of 11 batches Verbenae Herba($n=2$)

编号	药材含量/%			
	戟叶马鞭草苷	马鞭草苷	2 个环烯醚萜苷成分的加和	毛蕊花苷
1	0.365 5	0.224 7	0.590 2	0.176 8
2	0.377 3	0.134 5	0.511 8	0.388 0
3	0.159 7	0.055 2	0.214 9	0.243 3
4	0.505 0	0.419 1	0.924 1	0.768 0
5	0.440 4	0.194 9	0.635 3	0.680 4
6	0.351 5	0.107 8	0.459 3	0.167 0
7	0.441 9	0.339 5	0.781 4	0.672 5
8	0.388 8	0.149 9	0.538 7	0.268 2
9	0.347 4	0.117 6	0.465 0	0.195 4
10	0.428 6	0.353 1	0.781 7	0.612 3
11	0.377 0	0.142 1	0.519 1	0.353 3
均值			0.583 7	0.411 4

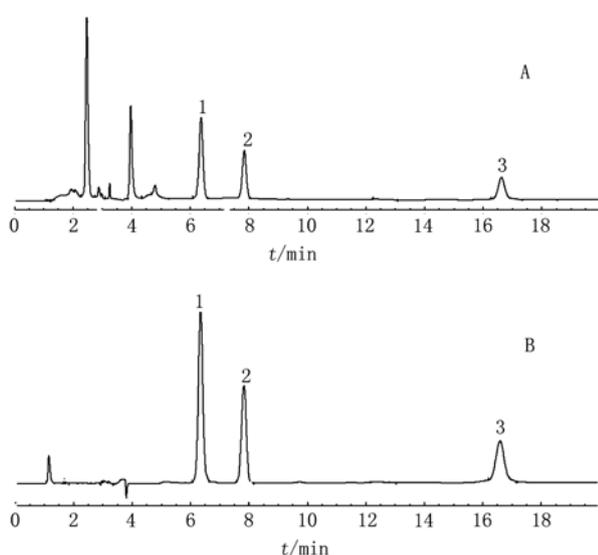


图2 供试品溶液(A)及对照品溶液(B)高效液相色谱图

1-戟叶马鞭草苷; 2-马鞭草苷; 3-毛蕊花苷

Fig 2 HPLC chromatograms of sample(A) and reference substance(B)

1-hastatoside; 2-verbenalin; 3-acteoside

4 讨论

4.1 薄层色谱展开剂的选择

参照药典中含苷类成分药材的鉴别条件进行优化, 分别以氯仿-甲醇-水(7:3:0.1)、正丁醇-乙酸-水(4:1:5)、乙酸乙酯-甲醇-水(9:2:1)为展开系统, 进行比较。结果显示以乙酸乙酯-甲醇-水(9:2:1)为展开剂, 马鞭草苷、戟叶马鞭草苷及毛蕊花苷斑点与干扰成分有较好的分离, 故选该条件为展开剂。

4.2 薄层条件耐用性试验

实验中比较了MN公司生产的UV254板、烟台化工所生产的SGF254板、烟台江友硅胶开发有限公司生产的HSGF254和青岛海洋化工生产的GF254高效板及1种手铺板(青岛海洋化工, GF254)5种薄层板薄层层析情况, 结果显示MN公司生产的UV254板、烟台化工所生产的SGF254板和烟台江友硅胶开发有限公司生产的HSGF254板均对以上两个成分具有较好的分离; 实验表明温湿度对此3种成分分离影响不大。

4.3 检测波长的选择

分别取马鞭草苷、戟叶马鞭草苷及毛蕊花苷对

照品溶液适量, 以流动相稀释成一定浓度, 以流动相为参比, 在波长200~400 nm内扫描测定, 马鞭草苷和戟叶马鞭草苷最大吸收波长为238 nm, 而毛蕊花苷在343 nm具有最大吸收, 在238 nm处响应值也较大, 故本实验选定238 nm为检测波长。

4.4 供试品溶液制备方法考察

通过分别对提取溶剂、提取方法、提取次数、提取时间及提取溶剂倍量的考察, 确定供试品溶液制备方法如“3.2.2”项下。

4.5 含量限度的制订

由实验结果可以看出, 收集地为江苏的药材马鞭草苷、戟叶马鞭草苷及毛蕊花苷含量均很少, 而收集地为北京的药材含量较高, 所以此两收集地的药材不参与制定限量。不同地方药材所含戟叶马鞭草苷、马鞭草苷的量不尽相同, 有的药材含马鞭草苷较多, 而有的含戟叶马鞭草苷量较多。综合考虑本次实验的数据结果, 通过两者加和来制定本品的限量。本品的限量为: 马鞭草药材按干燥品计算, 含戟叶马鞭草苷与马鞭草苷之和不得少于0.45%, 毛蕊花苷不得少于0.30%。

5 结论

本实验建立了马鞭草药材的定性及定量分析方法, 该法的三个指标成分马鞭草苷、戟叶马鞭草苷及毛蕊花苷在专属性、特征性、含量上均优于现行药典标准中的齐墩果酸和熊果酸, 并且在功效上也与药材的基本吻合^[4-5], 在方法上也具有操作简单、准确度高、重复性好等特点。

REFERENCES

- [1] China Bencao Editor Committee. China Bencao(中华本草)[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1997.
- [2] Ch. P (2005) Vol I (中国药典 2005 版. 一部) [S]. 2005.
- [3] Ch. P (2010) Vol I (中国药典 2010 版. 一部) [S]. 2010.
- [4] ZHANG T, LI W, LUAN J L. Study on effects of chemical constituents from *Verbena officinalis* L on uterine smooth muscle *in vitro* in rats [J]. Chin J Tradit Med Sci Technol (中国中医药科技), 2001, 8(5): 313.
- [5] GUI C H, TANG R J. Antitussive activities constituents from *Verbena officinalis* L [J]. J Chin Mater Med (中国中药杂志), 1985, 10(10): 35.

收稿日期: 2010-09-25