



肉苁蓉中主要活性物质的快速检测方法

徐 圣, 柴莎莎

(武汉职业技术学院 生物工程学院, 湖北 武汉 430074)

摘 要:建立 HPLC-DAD 同时检测肉苁蓉中主要活性物质 7 种苯乙醇苷类成分的快速分析方法。使用 Agilent ZORBAX C18 色谱柱 (150mm×4.6mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸为流动相进行梯度洗脱, 二极管阵列检测器, 波长 330nm, 外标法定量。7 种苯乙醇苷类成分在检测范围内有良好的线性, 相关系数均在 0.9995 以上, 检出限为 0.5-2 μg/mL, 定量限为 2-10 μg/mL。在 3 个水平下加标回收率为 85.12%-97.21%, 相对标准偏差低于 5%。该方法快速、准确、简便, 适用于肉苁蓉苯乙醇苷类成分的检测需求, 后续可以为控制肉苁蓉质量提供有力支持和有效保障。

关键词: HPLC; 肉苁蓉; 活性物质; 检测; 质量控制

中图分类号: G714

文献标识码: A

文章编号: 1671-931X (2021) 04-0116-05

DOI: 10.19899/j.cnki.42-1669/Z.2021.04.022

肉苁蓉又名苁蓉、大芸、金笋、地精, 为列当科植物肉苁蓉的带鳞片的干燥肉质茎, 最早在《神农本草经》中有所记载吧, 被列为上品。其味甘、咸, 性温, 归肾、大肠经, 具有补肾阳、益精血、润肠通便的功能, 用于肾阳不足, 精血亏虚, 阳痿不孕, 腰膝酸软, 筋骨无力, 肠燥便秘^[1-3]。肉苁蓉主要产地是内蒙古、新疆、甘肃、宁夏等地^[4]。

到目前为止, 已经从肉苁蓉中分离出了多种类型的物质, 主要可分为苯乙醇苷类、环烯醚萜类、木脂素类、多糖、生物碱等^[5]。现代药理研究表明, 苯乙醇苷类物质具有保肝、抗氧化、清除自由基、保护神经、改善学习记忆、免疫调节等作用^[6-7], 苯乙醇苷类物质是肉苁蓉抗衰老、抗疲劳、补肾助阳、抗老年性

痴呆等药理作用的主要活性成分^[8], 是评价肉苁蓉质量及鉴别肉苁蓉真伪的重要指标。

随着人们对健康重视, 肉苁蓉近年来逐渐成为大众的关注重点, 目前肉苁蓉已被国家批准为新食品原料, 未来肉苁蓉在食品领域的研究具有很大的潜力^[9-10]。但是目前市场上的肉苁蓉存在着品种混乱, 真伪混杂, 质量不一等一系列的问题。

本研究采用 HPLC-DAD 法建立肉苁蓉中主要活性成分苯乙醇苷类物质的快速检测方法, 可同时测定麦角甾苷、异麦角甾苷、管花苷 A、2'-乙酰毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 A、肉苁蓉苷 F、松果菊苷 7 个苯乙醇苷类成分, 实现快速的定性、定量。存在着品种混乱、质量不一、真伪混杂等一系列问题。

收稿日期: 2021-03-18

基金项目: 2020 年武汉职业技术学院科研项目“肉苁蓉有效成分及抗氧化活性谱效关系研究”(项目编号: 2020YK046)。

作者简介: 徐圣(1983-), 男, 湖北咸宁人, 武汉职业技术学院生物工程学院讲师, 研究方向: 生物健康; 柴莎莎(1988-), 女, 湖北广水人, 武汉职业技术学院生物工程学院工程师, 研究方向: 分析检测。

一、材料与方法

(一) 材料与试剂

麦角甾苷对照品(纯度 98%)、异麦角甾苷对照品(纯度 98%)、松果菊苷对照品(纯度 98%)、管花苷 A 对照品(纯度 98%)、2'-乙酰毛蕊花糖苷对照品(纯度 98%)、肉苁蓉苷 A 对照品(纯度 98%)、肉苁蓉苷 F 对照品(纯度 98%), 成都曼思特生物科技有限责任公司; 甲醇(色谱纯), Fisher 公司; 乙腈(色谱纯), Fisher 公司; 甲酸(色谱纯), Fisher 公司; 水为屈臣氏纯净水, 市购;

试验采用的肉苁蓉原料采自主产区, 经湖北省中医药研究院鉴定为肉苁蓉, 共 10 批, 见表 1。

表 1 肉苁蓉原料产地信息

编号	批号	来源	批号	批号	来源
1	190315	新疆	6	190312	新疆
2	190701	新疆	7	190611	内蒙古
3	190721	新疆	8	190722	内蒙古
4	200311	新疆	9	200112	内蒙古
5	200311	新疆	10	200923	内蒙古

(二) 主要仪器与设备

1260 高效液相色谱仪: 美国安捷伦公司, 配有二极阵列检测器; SB-800D 数显普通型超声波清洗机: 宁波新芝公司; XSR105 电子天平: 美国梅特勒公司。十万分之一天平: 美国梅特勒公司; DJ-04B 小型破碎机: 上海鼎广机械设备有限公司。ZORBAXC18 色谱柱 (150mm × 4.6mm, 5 μm): 美国安捷伦公司。

(三) 方法

1. 溶液配制

(1) 标准溶液

分别精密称取麦角甾苷对照品 20mg、异麦角甾苷对照品 20mg、松果菊苷对照品 20mg、管花苷 A 对照品 10mg、2'-乙酰毛蕊花糖苷对照品 10mg、肉苁蓉苷 A 对照品 10mg、肉苁蓉苷 F 对照品 10mg, 于 25mL 容量瓶中, 以甲醇-水(1:1)混合溶液定容至刻度, 即得各标准溶液储备液。分别取各对标准溶液储备液适量于量瓶中, 甲醇-水(1:1)混合溶液定容至刻度, 即得标准混合溶液。

(2) 样品溶液

取肉苁蓉粉末, 过 4 号筛, 精密称取 1g, 置 100mL 棕色量瓶中, 加入甲醇-水(1:1)50mL, 盖上瓶塞, 摇匀, 称定质量, 然后浸泡 30min, 超声处理 40min 后放置室温, 再称定质量, 加甲醇-水(1:1)补

足减失的质量, 摇匀, 静置, 取上清液 [1], 过 0.45 μm 滤膜, 备用。

2. 色谱条件

以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 进样量 10 微升, 柱温 30℃, 检测波长为 330nm, 梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)	流速(mL/min)
0	90	20	0.4
10	80	20	0.4
22	60	40	0.4
25	60	40	0.4
28	30	70	0.4
30	30	70	0.4

二、结果与讨论

(一) 流动相条件的优化

1. 流动相的选择

比较甲醇-水、甲醇-甲酸水、乙腈-水和乙腈-甲酸水系统溶液梯度洗脱对 7 种目标物的分离效果, 结果表明, 在相同色谱条件下, 不加甲酸, 各组分峰形较差, 有明显的拖尾现象; 使用甲醇-0.1% 甲酸水溶液, 各组分的峰出现较密集, 而使用乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相梯度洗脱时, 7 个苯乙醇苷类成分均可获得良好的分离度和峰形。因此采用乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相对 7 种苯乙醇苷类物质进行色谱分离。

2. 波长的确定

通过紫外吸收光谱对 7 种苯乙醇苷类成分进行全波长扫描, 发现 7 个苯乙醇苷类成分在 330nm 处有最大吸收, 故确定本实验的测定波长为 330nm。

3. 柱温的选择

比较了 25℃、30℃、35℃柱温条件下, 对 7 种苯乙醇苷类成分的分离效果, 结果表明在相同色谱条件下, 30℃时分离效果最好, 确定本实验的柱温为 30℃。

(二) 线性方程、线性范围和检出限

按照 2. 色谱条件, 依次对 7 种苯乙醇苷类成分的系列标准工作溶液进样分析, 以保留时间定性, 色谱峰面积定量。以质量浓度为横坐标, 色谱峰的面积作为纵坐标, 进行线性回归, 绘制标准曲线。将信噪比等于 3 时的 7 种苯乙醇苷类物质对应的浓度作为检测限, 信噪比等于 10 时对应的 7 种苯乙醇苷类成分浓度作为定量限, 得到各苯乙醇苷类成分的线性回

归方程、相关系数、检测限和定量限,结果见表3。

表3 7种苯乙醇苷类物质的线性回归方程、相关系数、检测限和定量限

对照品	标准曲线	R2	检测限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
麦角甾苷	$y=29.71x+42.746$	0.9997	0.4	2
异麦角甾苷	$y=22.939x+22.569$	0.9998	0.5	4
松果菊苷	$y=23.087x+26.118$	0.9999	0.5	4
管花苷 A	$y=43.163x+9.4738$	0.9996	0.5	4
2'-乙酰毛蕊花糖苷	$y=17.656x-10.493$	0.9996	0.5	4
肉苁蓉苷 A	$y=19.948x+10.462$	0.9997	2	10
肉苁蓉苷 F	$y=31.918x+7.874$	0.9995	1	6

由表3可知,7种苯乙醇苷类成分在各自线性范围内与色谱峰面积线性关系良好。7种苯乙醇苷类物质的检测限在0.4-2 $\mu\text{g/mL}$ 之间,定量限在2-10 $\mu\text{g/mL}$ 之间。

(三)精密度实验

吸取同一混合标准品溶液,上机验证精密度,分别重复测定6次,记录7种苯乙醇苷类成分的峰面积,并计算相对标准偏差,结果列于表4。结果表明7种苯乙醇苷类成分的峰面积对应的RSD值分别为1.52%、1.29%、1.79%、1.67%、1.80%、1.67%、1.71,表明该方法精密度良好。

表4 精密度实验结果

组分	麦角甾苷	异麦角甾苷	松果菊苷	管花苷 A	2'-乙酰毛蕊花糖苷	肉苁蓉苷 A	肉苁蓉苷 F
峰面积	489.121	359.569	374.582	336.554	236.156	156.71523	250.587
	485.506	354.319	368.369	342.756	242.265	151.71523	258.156
	486.453	356.328	379.956	334.852	238.158	149.71523	254.161
	473.489	347.745	361.158	344.248	235.474	151.1523	245.165
	476.652	351.259	367.489	349.756	231.253	152.7152	253.584
	492.418	348.842	374.369	337.258	242.415	154.71523	252.641
平均值	483.939	353.010	370.987	340.904	237.620	252.382	152.673
RSD/%	1.52	1.29	1.79	1.67	1.8	1.67	1.71

(四)稳定性试验

精密吸取同一混合标准品溶液10 μL ,分别于0、2、4、8、12、24h进样测定,分别重复测定3次,记录各特征峰的相对保留时间及相对峰面积,计算RSD值。结果表明7种苯乙醇苷的特征峰的相对保留时间的RSD<0.5%,峰面积的RSD值分别为1.85%、0.92%、1.63%、0.87%、1.24%、1.65%、1.43%,峰面积的RSD<2%,故7种苯乙醇苷类成分于24h内测定结果

稳定。

(五)回收率实验

对7种苯乙醇苷类物质在1、5、20mg/kg3个水平下进行加标回收实验,平行测定6次,计算加标回收率,结果见表5。7种苯乙醇苷类物质的回收率在85.12%~97.21%之间,相对标准偏差RSD均低于5%,由此可以看出表明该方法精密度良好,结果稳定。

表5 7种苯乙醇苷类物质方法平均回收率和相对标准偏差

对照品	1mg/kg		5mg/kg		20mg/kg	
	回收率 /%	RSD/%	回收率 /%	RSD/%	回收率 /%	RSD/%
麦角甾苷	85.12	2.23	92.5	0.89	91.50	3.11
异麦角甾苷	87.20	3.62	95.6	2.12	95.14	1.64
松果菊苷	90.45	2.89	97.21	4.08	94.25	2.41
管花苷 A	89.54	1.24	92.15	2.24	86.27	1.25
2'-乙酰毛蕊花糖苷	91.24	3.67	94.28	3.25	91.64	3.65
肉苁蓉苷 A	87.64	2.56	87.26	4.25	87.56	2.74
肉苁蓉苷 F	92.36	1.48	89.25	1.95	93.25	1.43

(六) 实际样品的测定

分别按方法制备供试品样品,测定色谱峰面积,

由标准曲线计算 7 种苯乙醇苷类成分含量。测定 10

个批次的样品,每个样品重复测定 3 次,结果见表 6。

表 6 含量测定结果及相对标准偏差

样品	麦角甾苷		异麦角甾苷		松果菊苷		管花苷 A		2'-乙酰毛蕊花糖苷		肉苁蓉苷 A		肉苁蓉苷 F	
	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)	含量 (%)	RSD (%)
1	0.019	2.45	0.144	2.54	0.260	2.45	0.007	4.65	0.006	3.24	0.002	4.86	0.023	4.320
2	0.059	3.24	0.443	2.87	2.855	2.15	0.037	3.65	0.017	2.45	0.009	4.75	0.069	3.250
3	0.048	4.21	0.331	2.87	0.814	2.14	0.062	3.87	0.003	4.25	0.001	3.98	0.015	4.850
4	0.013	4.35	0.166	3.14	0.500	2.12	0.005	4.58	0.016	1.23	0.015	4.52	0.041	2.640
5	0.026	2.14	0.256	2.75	0.634	3.21	0.024	4.12	0.008	3.24	0.021	4.25	0.012	2.410
6	0.048	2.64	0.080	4.32	0.194	0.52	0.026	3.84	0.017	2.54	0.018	4.63	0.022	3.240
7	0.064	2.14	0.395	3.54	1.409	1.65	0.092	3.74	0.003	2.21	0.004	4.23	0.013	4.250
8	0.108	3.20	0.402	1.85	1.519	2.45	0.085	3.65	0.023	3.21	0.045	3.84	0.020	4.650
9	0.055	4.54	0.545	2.14	1.286	1.36	0.161	3.12	0.026	4.65	0.023	4.12	0.013	4.540
10	0.021	3.24	0.122	2.54	0.264	3.56	0.021	4.21	0.041	3.21	0.022	4.57	0.018	4.350

由表中可看出,10 批肉苁蓉原料中,均含有方法中的 7 种苯乙醇苷类物质,但不同产地和批次之间,7 种苯乙醇苷类物质含量有明显的差异,说明肉苁蓉的质量确实存在明显差异。对同一批次的肉苁蓉原料来说,松果菊苷含量最高,含量在 0.264%~2.855%之间,其次为异麦角甾苷,含量在 0.122%~0.545%之间,管花苷 A 和肉苁蓉苷 A 含量相对较低。本实验方法可以为肉苁蓉的质量管理控制提供有力支持和有效保障。

三、结论

基于高效液相色谱建立了一种简单、快速、准确定量分析肉苁蓉中麦角甾苷、异麦角甾苷、松果菊苷、管花苷 A、2'-乙酰毛蕊花糖苷、肉苁蓉苷 A、肉苁蓉苷 F 7 种苯乙醇苷类物质的方法。结果显示,7 种苯乙醇苷类物质的质量浓度与色谱峰面积呈良好的线性关系,相关系数均大于 0.9995,检出限为 0.5~2 $\mu\text{g/mL}$ 之间,定量限为 2~10 $\mu\text{g/mL}$ 。样品的加标回收率为 85.12%~95.14%,相对标准差在 1.24%~4.08% 之间,表明该方法具有良好的精确度和准确度,可在 30min 内完成 7 种苯乙醇苷类物质的快速分离并实现定性、定量分析。

采用该方法对 10 批肉苁蓉原料进行检测发现,不同产地和批次之间,这 7 种苯乙醇苷类成分含量有明显的差异,说明肉苁蓉的质量确实存在明显差异。检测苯乙醇苷类物质的含量可以为控制肉苁蓉质量提供有力支持和有效保障。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2015:135-136.
- [2] 甄亚钦,田伟,王鑫国,等.HPLC同时测定肉苁蓉配方颗粒中 4 种成分的含量[J].现代中医药,2019,(1):83-87.
- [3] 徐姗姗.肉苁蓉及松果菊苷调节 T 淋巴细胞对成骨细胞的影响研究[D].广州:广州中医药大学,2019.
- [4] 陈士林,董林林,郭巧生,等.中药材无公害精细栽培体系研究[J].中国中药杂志,2018,(8):1517-1528.
- [5] 田玉彪,杨广安,黄维杰,等.HPLC测定肉苁蓉微粉中松果菊苷和毛蕊花糖苷的含量[J].安徽农业科学,2015,(33):171-173.
- [6] 徐姗姗,吴康郁,涂兴明.HPLC法测定肉苁蓉水提液中松果菊苷的含量[J].中药新药与临床药理,2019,(5):598-601.
- [7] 黄利兴,王月娥,石明辉,等.管花肉苁蓉 HPLC 指纹图谱研究[J].新疆中医药,2011,(4):54-56.
- [8] 熊慧,刘宇琦,屈文佳,等.酒苁蓉 HPLC 特征图谱及 5 个苯乙

醇苷类成分含量测定[J].药物分析杂志,2019,(2):233-239.
[9] 周刚,高家敏,曹进.肉苁蓉在保健食品中的应用[J].食品安全
质量检测学报,2021,(3):898-903.

[10] 周勇,周朋朋,吴伟伟,等.肉苁蓉的生物活性及食品中的应用
前景[J].饮食保健,2016,(16):217-218.

[责任编辑:鞠守勇]

Rapid Determination of Main Bioactive Compounds in Cistanches Herba

XU Sheng, CHAI Sha-sha

(School of Biological Engineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan430074, China)

Abstract: To establish a method for rapid determination of 7 phenylethanoid glycosides which were main bioactive compounds of Cistanches herba by HPLC-DAD. The solution was gradient eluted by a column of Agilent ZORBAX C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid solution. Detection was performed using a diode array detector with 330nm detection wavelength. The quantification was performed by the external standard method. The 7 food additives showed good linearity in the range of determination, and the correlation coefficients were all above 0.9995. The limits of detection were 0.5-2 μg/mL, and the limits of quantification were 2-10 μg/mL. The recoveries of samples at 3 levels were 85.12%-97.21% and the relative standard deviations were less than 5%. This method is simple, rapid and accurate, which is suitable for the detection of phenylethanoid glycosides. It can provide strong support and effective guarantee for the quality control of Cistanches herba.

Key words: HPLC; Cistanches herba; bioactive; determination; quality control