

· 质量分析研究 ·

水蔓菁中 5 种主要化学成分的分离及含量测定

吴华燕, 薛海兵, 张刘强, 李医明(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

摘要: **目的** 分析水蔓菁中的苷类化合物, 建立同时测定 5 种主要苷类化合物含量的方法。 **方法** 对水蔓菁的苷类化合物进行分离和纯化, 根据化合物的波谱数据进行结构鉴定; 运用高效液相色谱(HPLC)的面积归一化法测定其 5 种主要苷类化合物的含量。采用安捷伦 Extend-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 25 ℃; 检测波长: 260、340 nm。 **结果** 分离鉴定了水蔓菁中 5 个主要苷类化合物, 分别为毛蕊花苷(1)、梓苷(2)、胡黄连苷 II(3)、梓醇 6-咖啡酸酯(4)、水蔓菁苷 II(5), 纯度分别为 99.5%、99.5%、99.8%、99.8%及 98.1%。在 75 min 内, 水蔓菁中毛蕊花苷、梓苷、胡黄连苷 II、梓醇 6-咖啡酸酯和水蔓菁苷 II 能达到良好的分离, 分别在 0.597~9.552, 0.212~3.398, 0.200~3.146, 0.300~4.806, 0.300~4.813 μg 范围内呈良好线性关系(*r* 分别为 0.999 9、0.999 9、0.999 9、0.999 8、0.999 9), 平均回收率为 98.57%、103.10%、103.97%、99.66%、103.60%, 相对标准偏差(RSD)分别为 2.45%、1.83%、2.11%、3.32%、1.96%。 **结论** 该研究建立的方法操作简便、准确, 专属性强, 重复性好, 可用于水蔓菁中 5 种主要苷类化合物的含量测定, 并为水蔓菁药材及其制剂的质量控制提供依据。

关键词: 水蔓菁; 毛蕊花苷; 梓苷; 胡黄连苷 II; 梓醇 6-咖啡酸酯; 水蔓菁苷 II; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)07-1012-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.07.015

Separation and Content Determination of Five Main Chemical Constituents from *Pseudolysimachion linariifolium* subsp. *dilatatum*

WU Huayan, XUE Haibing, ZHANG Liuqiang, LI Yiming (School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

Abstract: **Objective** To analyze the glycosides from *Pseudolysimachion linariifolium* subsp. *dilatatum*, and establish a method for simultaneous determination of five main glycosides. **Methods** The glycosides of *P. linariifolium* subsp. *dilatatum* were isolated and purified by means of various of chromatography materials and separation technologies, and their structures were established through spectroscopic methods. The purities of five main glycosides were determined by HPLC area normalization method, and the analysis was performed at 25 ℃ on an Extend-C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), eluted with a gradient program using methanol(A)-0.1% formic acid aqueous solution(B) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelengths were 260 nm and 340 nm. **Results** Five compounds were isolated and identified, included verproside(1), catalposide(2), pictoside II(3), verminoside(4) and linariifolioside II(5), with the purities of

收稿日期: 2020-12-08

作者简介: 吴华燕, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效物质基础。Email: 2303395147@qq.com。共同第一作者: 薛海兵, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效物质基础。Email: xhbshutcm@163.com。通信作者: 李医明, 男, 教授, 博士研究生导师。研究方向: 中药药效物质基础研究。Email: ymliu@163.com。张刘强, 男, 讲师。研究方向: 中药药效物质基础。Email: 04100217@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81973458, 81673570); 上海科技创新行动计划项目(18401931100)。

99.5%, 99.5%, 99.8%, 99.5%, 98.1%, respectively. The five components, verprosides (1), catalposides (2), pictosides II (3), verminosides (4), and linariifoliosides II (5) could be well separated within 75 minutes. Their calibration curves were with good linear relationships in the ranges of 0.597–9.552 μg ($r=0.999\ 9$), 0.212–3.398 μg ($r=0.999\ 9$), 0.200–3.146 μg ($r=0.999\ 9$), 0.300–4.806 μg ($r=0.999\ 8$), 0.300–4.813 μg ($r=0.999\ 9$), respectively. The average recovery rates were 98.57%, 103.10%, 103.97%, 99.66%, 103.60%, and RSDs were 2.45%, 1.83%, 2.11%, 3.32%, 1.96%. **Conclusion** The method established in this research for simultaneous determination of the five components was specific, simple, accurate, and reproducible, which can provide a scientific basis for quality control of *P. linariifolium* subsp. *dilatatum*.

Keywords: *Pseudolysimachion linariifolium* subsp. *dilatatum*; verprosides; catalposides; pictosides II; verminosides; linariifoliosides II; high performance liquid chromatography; determination of content

水蔓菁为车前科兔尾儿苗属细叶穗花植物水蔓菁 *Pseudolysimachion linariifolium* subsp. *dilatatum* 的干燥全草, 始载于《救荒本草》《植物名实图考》, 别名勒马回, 又称追风草、气管炎草、哮喘草等, 分布于甘肃至云南以东, 陕西、山西和河北以南各省区^[1]。水蔓菁目前为兔尾儿苗属 (*Pseudolysimachion*), 根据其不同的染色体数目 ($x=17$)、长而密的顶穗和较长的花冠筒从婆婆纳属中 (*Veronica*) 分离出来^[2]。因此, 水蔓菁的拉丁名已经从 *Veronica linariifolia* Pall. ex Link subsp. *dilatata* (Nakai et Kitagawa) 修正为 *Pseudolysimachion linariifolium* (Pallas ex Link) Holub subsp. *dilatatum* (Nakai & Kitagawa) D. Y. Hong。水蔓菁在民间应用广泛, 被誉为“中药抗生素”^[3]。曾收载于《中国药典》1977 年版一部, 味苦, 性微寒, 具有清热解毒、利尿、止咳化痰的功效, 用于治疗支气管炎、肺脓疡、急性肾炎、尿路感染、疖肿^[4]。

现代研究表明, 水蔓菁的化学成分主要包括 4 种类型: 环烯醚萜苷类^[5-6]、黄酮类^[3,7]、酚类^[3,8-9]和挥发油^[10]。药理研究^[11-17]发现水蔓菁具有抗菌、止咳、抗炎等作用。因其良好的抗菌消炎效果, 水蔓菁主要用于治疗慢性气管炎、肺化脓症、咳吐脓血、急性肾炎、尿路感染等^[18]。目前以水蔓菁作为原料的制剂有勒马回片、勒马回胶囊、勒马回注射液和复方勒马回颗粒等, 在临床上应用广泛且疗效确切。朱彩平等^[19]发现勒马回胶囊与抗菌药物合用可有效改善支气管扩张患者临床症状, 显著降低患者血清炎症水平。但是, 目前水蔓菁在《卫生部颁药品标准》中的水蔓菁类制剂仅以总黄酮作为质控标准^[20], 缺乏对该属植物普遍存在的环烯醚萜苷的研究。王斌等^[21]对水蔓菁 10 批药材建立了指纹图谱, 不同批次也具有较好的相似度, 但其未对每个峰的物质进行标定。

樊巧串^[22]也进行了水蔓菁药材指纹图谱的相关研究, 却仅仅对其中的原儿茶酸的含量进行了测定。因此, 有必要系统地开展水蔓菁的主要活性成分的定量分析, 为评价与控制水蔓菁药材的质量提供依据, 也为其相关制剂的质量控制研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Thermo LCOFLEET 型质谱仪 (美国 Thermo 公司); Bruker AV-500/600 型核磁共振仪 (德国布鲁克公司); 美国 Agilent 1260 HPLC 色谱仪、DAD 检测器、Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) (美国安捷伦公司); CP313 型千分之一电子天平 (奥豪斯仪器有限公司); XSE105DU 型十万分之一分析天平 (瑞士梅特勒托利多仪器厂); SK5200H 超声仪 (上海科导超声仪器有限公司); XL-10B 型粉碎机 (广州市旭朗机械设备有限公司); 柱色谱硅胶 (青岛海洋化工有限公司); MCI Gel Chp20p 树脂填料 (日本 Mitsubishi Chemical 公司); Sephadex LH-20 凝胶 (瑞典 GE Healthcare 公司); ODS-A-HG50 反相柱色谱、YMC-Pack ODS-A C₁₈ 半制备色谱柱 (250 mm×10 mm, 5 μm) (日本 YMC 公司); 分析纯氯仿、二氯甲烷、丙酮、甲醇、乙醇、D101 大孔树脂 (国药集团试剂有限公司); 饮用纯净水 (娃哈哈集团有限公司); 色谱级乙腈、甲醇 (德国默克公司)。

1.2 药材及其制剂 样品来源信息见表 1。用于分离纯化的水蔓菁药材于 2016 年 7 月 8 日采集于山西省运城市万荣县高村乡高村, 经上海中医药大学张刘强博士鉴定为车前科 (*Plantaginaceae*) 兔尾儿苗属植物水蔓菁 *Pseudolysimachion linariifolium* subsp. *dilatatum* 的地上干燥全草。

表1 水蔓菁药材及其制剂来源

Table 1 The source of medicinal materials and preparations of *P. linariifolium* subsp. *dilatatum*

编号	名称	批号	来源
S1	水蔓菁	201607	山西万荣
S2	水蔓菁	201707	山西万荣
S3	水蔓菁	202022	安徽亳州
S4	水蔓菁	20200816	河北安国市公司
S5	郎致勒马回片	1904161	朗致集团万荣药业有限公司
S6	勒马回胶囊	8J030570088	陕西东泰制药有限公司

2 方法与结果

2.1 化学成分研究

2.1.1 提取分离 取水蔓菁药材 15 kg, 粉碎成粗粉, 用 8 倍量的 95%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 提取液减压浓缩成浸膏(5.7 kg); 将浸膏加水混悬后, 用等体积的二氯甲烷萃取 3 次脱脂, 剩余水层经减压浓缩至 10 L, 经 D101 大孔树脂柱层析, 分别用 3 倍柱体积的水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇及 95%乙醇梯度洗脱; 收集 40%乙醇洗脱部位并减压浓缩得 795.0 g; 该样品经硅胶柱层析, 用氯仿: 甲醇体系(20:1~1:1)进行梯度洗脱, 得到 9 个洗脱部位(1~9), 对洗脱部位 6(27.5 g)采用 MCI 柱层析, 用 3 倍柱体积的 30%、35%、40%、45%甲醇水溶液洗脱, 得到组分 A~F。对 C 采用 ODS 柱层析, 用 35%、37.5%、40%、42.5%、45%甲醇梯度洗脱, 合并相似馏分并减压浓缩后经 Sephadex LH-20 柱色谱纯化, 得到化合物 3。对组分 A 采用上述方法分离得到化合物 1、2。对洗脱部位 8(116.5 g)、洗脱部位 9(120 g)采用 MCI 柱层析、ODS 柱层析及 Sephadex LH-20 柱色谱进行系统分离纯化, 得到化合物 4、5。各化合物的化学结构见图 1。

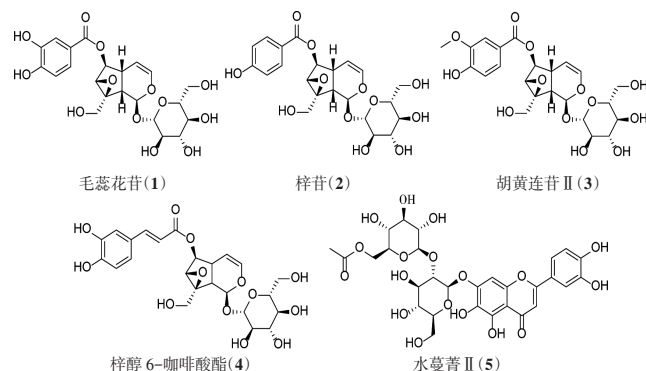


图1 水蔓菁化合物 1~5 的化学结构

Figure 1 Chemical structures of compounds 1~5 from *P. linariifolium* subsp. *dilatatum*

2.1.2 对照品的制备 分别称取 0.3 g 化合物 1~4, 用 1 mL 甲醇超声溶解; 称取 0.2 g 化合物 5, 用 1 mL DMSO 超声溶解。上述 5 份样品过 0.22 μm 滤膜, 备用。上述 5 份样品分别经过半制备型高效液相色谱仪进行纯化[YMC-Pack ODS-A C_{18} 柱(250 mm $\times$ 10 mm, 5 μm)]；柱温为室温；检测波长为 260、340 nm；化合物 1~3 流动相为乙腈-水(15:85)；化合物 4、5 流动相为乙腈~水(20:80)；流速为 3.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 在相应的保留时间收集所需组分, 减压回收溶剂并冷冻干燥制得化合物 1~5。精密称取 5 种对照品, 用流动相制成浓度为 1 mg $\cdot\text{min}^{-1}$ 的样品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 进样 10 μL , 样品显示为单峰, 用面积归一化法计算化合物 1~5 的含量分别为 99.5%、99.5%、99.8%、99.8%及 98.1%(保留时间分别为 22.5、47.3、57.2、62.0、70.1 min), 符合中药化学对照品含量测定用要求的对照品。

2.1.3 结构鉴定 毛蕊花苷(1): 白色无定形粉末。ESI-MS(pos.): 516 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; ESI-MS(neg.): 497 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR(600 MHz, CD_3OD): δ_{H} 5.19(1H, d, $J=9.2$ Hz, H-1), 6.38(1H, d, $J=5.7$ Hz, H-3), 5.00(1H, dd, $J=3.7/5.9$ Hz, H-4), 2.65(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-5), 5.09(1H, d, $J=6.9$ Hz, H-6), 3.74(1H, d, $J=1.0$ Hz, H-7), 2.62(1H, d, $J=7.5$ Hz, H-9), 4.18(1H, d, $J=13.2$ Hz, H-10a), 3.84(1H, d, $J=13.2$ Hz, H-10b), 4.80(1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 3.25~3.46(4H, m, H-2', 3', 4', 5'), 3.93(1H, dd, $J=1.9/11.9$ Hz, H-6'a), 3.65(1H, dd, $J=6.6/12.0$ Hz, H-6'b), 7.47(1H, m, H-2''), 6.82(1H, d, $J=8.8$ Hz, H-5''), 7.46(1H, m, H-6'')。 ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD): δ_{C} 95.1(C-1), 142.4(C-3), 103.0(C-4), 36.8(C-5), 81.6(C-6), 60.3(C-7), 66.8(C-8), 43.2(C-9), 61.3(C-10), 99.7(C-1'), 74.8(C-2'), 78.7(C-3'), 71.8(C-4'), 77.7(C-5'), 62.9(C-6'), 122.0(C-1''), 116.0(C-2''), 146.3(C-3''), 152.2(C-4''), 117.5(C-5''), 123.9(C-6''), 168.0(C-7'')。以上数据与文献报道^[23]基本一致, 故鉴定该化合物为毛蕊花苷(verproside)。

梓苷(2): 白色无定形粉末。ESI-MS(pos.): 500 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; ESI-MS(neg.): 481 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR(600 MHz, CD_3OD): δ_{H} 5.19(1H, d, $J=9.2$ Hz, H-1), 6.38(1H, dd, $J=1.3/6.0$ Hz, H-3), 5.00(1H, dd, $J=4.0/6.0$ Hz, H-4), 2.67(1H, m, H-5), 5.11(1H, dd, $J=1.0/7.7$ Hz, H-6), 3.74(1H, d,

$J=0.91$ Hz, H-7), 2.63(1H, d, $J=7.67$ Hz, H-9), 4.18(1H, d, $J=13.1$ Hz, H-10a), 3.84(1H, d, $J=13.2$ Hz, H-10b), 4.80(1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 3.25(1H, m, H-2'), 3.28(1H, m, H-4'), 3.41(1H, m, H-5'), 3.93(1H, dd, $J=2.0/11.9$ Hz, H-6'a), 3.65(1H, dd, $J=6.6/12.0$ Hz, H-6'b), 7.92(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2''), 6.85(1H, s, H-3''), 6.83(1H, s, H-5''), 7.91(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6''). ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD): δ_{c} 95.1(C-1), 142.5(C-3), 103.0(C-4), 36.8(C-5), 81.6(C-6), 60.3(C-7), 66.9(C-8), 43.3(C-9), 61.4(C-10), 99.8(C-1'), 74.9(C-2'), 78.7(C-3'), 71.9(C-4'), 77.8(C-5'), 63.0(C-6'), 121.8(C-1''), 133.0(C-2''), 116.3(C-3''), 163.9(C-4''), 116.3(C-5''), 133.0(C-6''), 167.9(C-7''). 以上数据与文献报道^[24]基本一致, 故鉴定该化合物为梓苷(catalposide)。

胡黄连苷 II (3): 白色无定形粉末。ESI-MS(pos.): 530 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; ESI-MS(neg.): 511 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR(600 MHz, CD_3OD): δ_{H} 5.22(1H, d, $J=9.2$ Hz, H-1), 6.40(1H, dd, $J=1.5/6.0$ Hz, H-3), 5.03(1H, dd, $J=4.2/6.0$ Hz, H-4), 2.69(2H, m, H-5, 9), 5.15(1H, dd, $J=1.1/7.9$ Hz, H-6), 3.77(1H, d, $J=1.0$ Hz, H-7), 4.20(1H, d, $J=13.2$ Hz, H-10a), 3.87(1H, d, $J=13.2$ Hz, H-10b), 4.82(1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 3.30(2H, m, H-2', 4'), 3.43(1H, t, $J=9.0$ Hz, H-3'), 3.35(1H, dd, $J=2.2/6.9$ Hz, H-5'), 3.67(1H, dd, $J=6.8/12.0$ Hz, H-6'a), 3.95(1H, s, H-6'b), 7.60(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2''), 6.88(1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5''), 7.62(1H, dd, $J=2.0/8.3$ Hz, H-6''), 3.93(3H, s, OCH_3)。 ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD): δ_{c} 95.1(C-1), 142.5(C-3), 103.0(C-4), 36.8(C-5), 81.8(C-6), 60.3(C-7), 66.9(C-8), 43.3(C-9), 61.4(C-10), 99.8(C-1'), 74.9(C-2'), 78.7(C-3'), 71.9(C-4'), 77.8(C-5'), 63.0(C-6'), 122.1(C-1''), 113.7(C-2''), 153.2(C-3''), 148.9(C-4''), 116.0(C-5''), 125.4(C-6''), 167.9(C-7''), 56.5(OCH_3)。以上数据与文献报道^[25]基本一致, 故鉴定该化合物为胡黄连苷 II(picroside II)。

梓醇 6-咖啡酸酯(4): 白色无定形粉末。ESI-MS(pos.): 542 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; ESI-MS(neg.): 523 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR(600 MHz, CD_3OD): δ_{H} 5.17(1H, d,

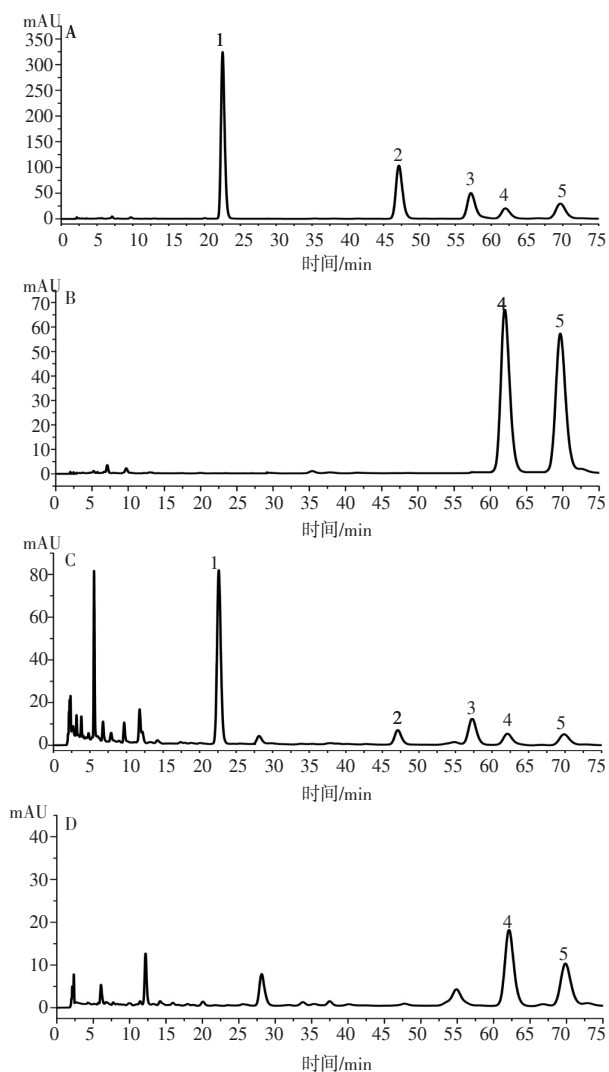
$J=9.0$ Hz, H-1), 6.37(1H, d, $J=5.9$ Hz, H-3), 4.98(1H, dd, $J=4.1/5.9$ Hz, H-4), 2.59(1H, m, H-5), 5.03(1H, d, $J=7.5$ Hz, H-6), 3.70(1H, d, $J=5.2$ Hz, H-7), 2.62(1H, t, $J=7.7/9.0$ Hz, H-9), 4.17(1H, d, $J=13.2$ Hz, H-10a), 3.83(1H, d, $J=13.2$ Hz, H-10b), 4.79(1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 3.28(1H, m, H-2'), 3.41(1H, dd, $J=8.7/9.2$ Hz, H-3'), 3.25(1H, m, H-4'), 3.34(1H, m, H-5'), 3.93(1H, dd, $J=2.0/12.0$ Hz, H-6'a), 3.65(1H, dd, $J=6.6/11.9$ Hz, H-6'b), 7.06(1H, d, $J=2.0$ Hz, H-2''), 6.78(1H, d, $J=8.2$ Hz, H-5''), 6.97(1H, dd, $J=2.0/8.2$ Hz, H-6''), 7.60(1H, d, $J=15.9$ Hz, H-7''), 6.32(1H, d, $J=15.9$ Hz, H-8'')。 ^{13}C NMR(150 MHz, CD_3OD): δ_{c} 95.1(C-1), 142.4(C-3), 103.0(C-4), 36.8(C-5), 81.4(C-6), 60.3(C-7), 66.9(C-8), 43.2(C-9), 61.4(C-10), 99.8(C-1'), 74.9(C-2'), 78.7(C-3'), 71.8(C-4'), 77.8(C-5'), 63.0(C-6'), 127.7(C-1''), 115.2(C-2''), 146.9(C-3''), 149.8(C-4''), 116.6(C-5''), 123.2(C-6''), 147.7(C-7''), 114.6(C-8''), 169.0(C-9'')。以上数据与文献报道^[26]基本一致, 故鉴定该化合物为梓醇 6-咖啡酸酯(verminoside)。

水蔓菁苷 II (5)为黄色无定形粉末。ESI-MS(pos.): 669 $[\text{M}+\text{H}]^+$; ESI-MS(neg.): 667 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR(600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{H} 12.77(1H, s, 5-OH), 6.71(1H, s, H-3), 6.98(1H, s, H-8), 7.40(1H, d, $J=2.1$ Hz, H-2'), 6.90(1H, d, $J=8.24$ Hz, H-5'), 7.43(1H, dd, $J=2.2/8.3$ Hz, H-6'), 5.24(1H, d, $J=7.4$ Hz, H-1''), 3.61(1H, m, H-2''), 3.50(1H, m, H-3''), 3.29(1H, d, $J=9.1$ Hz, H-4''), 3.53(1H, s, H-5''), 3.52(1H, m, H-6'a), 3.74(1H, d, $J=9.8$ Hz, H-6'b), 4.65(1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'''), 3.03(1H, d, $J=8.3$ Hz, H-2'''), 3.20(1H, d, $J=16.0$ Hz, H-3'''), 3.14(1H, m, H-4'''), 3.37(1H, m, H-5'''), 3.78(1H, m, H-6'''), 3.92(1H, m, H-6'''), 1.85(3H, s, $\text{H}_3\text{-8}''')$; ^{13}C NMR(150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{c} 164.1(C-2), 102.4(C-3), 182.2(C-4), 145.7(C-5), 130.6(C-6), 60.3(C-7), 66.8(C-8), 143.2(C-9), 61.3(C-10), 122.0(C-1'), 116.0(C-2'), 146.3(C-3'), 152.2(C-4'), 117.5(C-5'), 123.9(C-6'), 99.7(C-1''), 74.8(C-2''), 78.7(C-3''), 71.8(C-4''), 77.7(C-5''),

62.9(C-6'''), 104.0(C-1'''), 74.3(C-2'''), 75.7(C-3'''), 69.3(C-4'''), 73.4(C-5'''), 62.6(C-6'''), 170.1(C-7'''), 20.3(C-8''')。以上数据与文献报道^[27]基本一致,故鉴定该化合物为水蔓菁苷Ⅱ(linariifolioside Ⅱ)。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B)系统, 梯度洗脱(0~75 min, 24% A; 75~90 min, 24% A~45% A; 90~100 min, 45% A; 100~105 min, 45% A~24% A; 105~120 min, 24% A); 柱温: 25 ℃; 进样量: 10 μL; 检测波长: 260、340 nm。在上述色谱条件下, 各组分分离度良好, 理论塔板数均不低于 7 000, 见图 2。



注: A. 混合对照品(260 nm); B. 混合对照品(340 nm); C. 水蔓菁样品(260 nm); D. 水蔓菁样品(340 nm)

图 2 混合对照品及水蔓菁样品的高效液相色谱(HPLC)图

Figure 2 HPLC chromatograms of mixed reference substances and sample of *P. linariifolium* subsp. *dilatatum*

2.2.2 对照品溶液的制备 分别取毛蕊花苷、梓苷、胡黄连苷Ⅱ、梓醇 6-咖啡酸酯、水蔓菁苷Ⅱ单体化合物适量, 精密称定, 加 24% 甲醇分别制成每 1 mL 含毛蕊花苷 2.985 mg、梓苷 1.062 mg、胡黄连苷Ⅱ 0.983 mg、梓醇 6-咖啡酸酯 1.502 mg、水蔓菁苷Ⅱ 1.504 mg 的混合对照品溶液, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取水蔓菁药材粗粉(过 3 号筛)约 1 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 50 mL, 称质量, 浸泡 1 h 后, 超声提取(功率 1 000 W, 频率 40 kHz) 1 h, 取出, 放凉, 称质量, 用 50% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 过 0.22 μm 滤膜, 取续滤液, 即得。勒马回片去糖衣后按上述方法制备供试品溶液, 勒马回胶囊取内容物按上述方法制备供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mL 置于 5 mL 容量瓶中, 用 24% 甲醇定容, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。以混合对照品浓度(X , mg·mL⁻¹)为横坐标, 以色谱峰面积(Y)为纵坐标, 对 5 种成分进行线性回归, 结果见表 2。5 个成分在各自的浓度范围内线性关系良好。

表 2 水蔓菁各成分线性关系

Table 2 Linear relationships of various constituents

成分	线性方程	r	线性范围/μg
毛蕊花苷	$Y=12\ 387X-11.479$	0.999 9	0.597~9.552
梓苷	$Y=19\ 618X-4.708\ 3$	0.999 9	0.212~3.398
胡黄连苷Ⅱ	$Y=12\ 275X-11.497$	0.999 9	0.200~3.146
梓醇 6-咖啡酸酯	$Y=16\ 094X-7.641\ 7$	0.999 8	0.300~4.806
水蔓菁苷Ⅱ	$Y=15\ 950X-198.1$	0.999 9	0.300~4.813

2.2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次。结果毛蕊花苷、梓苷、胡黄连苷Ⅱ、梓醇 6-咖啡酸酯、水蔓菁苷Ⅱ峰面积的 RSD($n=6$)分别为 0.13%、0.46%、0.27%、0.20%、0.24%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液(按“2.2.3”项下方法制备), 分别在 2、4、6、8、10、12 h 进样, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 计算峰面积 RSD。结果显示毛蕊花苷、梓苷、胡黄连苷Ⅱ、梓醇 6-咖啡酸酯、水蔓菁苷Ⅱ峰面积的 RSD 分别为 0.18%、1.10%、1.32%、0.18%、0.48%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.2.7 重复性试验 精密称取 6 份同一批号水蔓菁粗

粉, 每份约 1 g, 按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件进行测定, 结果显示毛蕊花苷、梓苷、胡黄连苷 II、梓醇 6-咖啡酸酯、水蔓菁苷 II 含量的 RSD 分别为 1.66%、2.52%、1.98%、1.66%、2.34%, 表明该方法的重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取适量已知含量的水蔓菁粗粉 6 份, 每份约 0.5 g, 分别精密加入混合对照品溶液适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 计算各成分的加样回收率和 RSD。结果见表 3。毛蕊花苷、梓苷、胡黄连苷 II、梓醇 6-咖啡酸酯、水蔓菁苷 II 的平均加样回收率分别为 98.57%、103.10%、103.97%、99.66%、103.60%, RSD 分别为 2.45%、1.83%、2.11%、3.32%、1.96%。结果表明该方法准确度良好。

表 3 水蔓菁 5 个成分的加样回收率试验结果($n=6$)

Table 3 Results of recovery rate tests($n=6$)

成分	称样量 /g	原有量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
毛蕊花苷	0.506 2	6.074 4	6.086 0	12.246 5	101.41	98.57	2.45
	0.501 8	6.021 6	6.086 0	12.009 9	98.40		
	0.502 9	6.034 8	6.086 0	11.846 9	95.50		
	0.504 2	6.050 4	6.086 0	12.160 3	100.39		
	0.504 6	6.055 2	6.086 0	11.894 7	95.95		
梓苷	0.500 0	6.000 0	6.086 0	12.070 7	99.75	103.10	1.83
	0.506 2	0.607 4	0.607 0	1.239 8	104.18		
	0.501 8	0.602 2	0.607 0	1.221 1	101.96		
	0.502 9	0.603 5	0.607 0	1.209 6	99.86		
	0.504 2	0.605 0	0.607 0	1.243 1	105.12		
胡黄连苷 II	0.504 6	0.605 5	0.607 0	1.235 0	103.70	103.97	2.11
	0.500 0	0.600 0	0.607 0	1.229 7	103.75		
	0.506 2	1.872 9	1.932 0	3.854 6	102.57		
	0.501 8	1.856 7	1.932 0	3.860 1	103.70		
	0.502 9	1.860 7	1.932 0	3.823 0	101.57		
梓醇 6-咖啡酸酯	0.504 2	1.865 5	1.932 0	3.885 9	104.58	99.66	3.32
	0.504 6	1.867 0	1.932 0	3.866 2	103.48		
	0.500 0	1.850 0	1.932 0	3.935 0	107.92		
	0.506 2	2.455 1	2.393 0	4.937 0	103.72		
	0.501 8	2.433 7	2.393 0	4.764 6	97.40		
水蔓菁苷 II	0.502 9	2.439 1	2.393 0	4.725 4	95.54	103.60	1.96
	0.504 2	2.445 4	2.393 0	4.891 6	102.23		
	0.504 6	2.447 3	2.393 0	4.777 2	97.36		
	0.500 0	2.425 0	2.393 0	4.859 6	101.74		
	0.506 2	1.771 7	1.726 0	3.583 2	104.96		
	0.501 8	1.756 3	1.726 0	3.500 8	101.07		
	0.502 9	1.760 2	1.726 0	3.518 8	101.89		
	0.504 2	1.764 7	1.726 0	3.585 1	105.47		
	0.504 6	1.766 1	1.726 0	3.534 0	102.43		
	0.500 0	1.750 0	1.726 0	3.575 4	105.76		

2.2.9 样品含量测定 取 4 批水蔓菁药材及其制剂, 按“2.2.3”项下方法每批平行制备 3 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 将测得的峰面积分别代入回归方程计算各成分含量。结果见表 4。

表 4 水蔓菁样品含量测定结果($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

Table 4 The results of sample determination($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

编号	毛蕊花苷	梓苷	胡黄连苷 II	梓醇 6-咖啡酸酯	水蔓菁苷 II
S1	12.0	1.2	3.7	4.8	3.5
S2	50.6	4.0	5.3	18.6	17.1
S3	6.4	1.8	2.1	2.0	4.5
S4	1.2	-	-	-	3.6
S5	0.6	-	-	-	5.4
S6	3.4	-	-	-	2.6

注: “-”表示样品中未检测到该成分

3 讨论

3.1 水蔓菁化学成分研究 本研究对水蔓菁进行了相关化学成分研究, 利用溶剂提取和正、反相硅胶柱色谱, Sephadex LH-20 凝胶柱色谱等技术进行分离纯化, 并通过 MS、NMR 波谱技术鉴定了水蔓菁中含量较高的 5 个化合物: 毛蕊花苷(1)、梓苷(2)、胡黄连苷 II(3)、梓醇 6-咖啡酸酯(4)、水蔓菁苷 II(5)。其中 1~4 为环烯醚萜类化合物。毛蕊花苷具有抗哮喘、抗炎、抗伤害、抗氧化等活性^[16]; 梓苷可调节肝脏脂质代谢、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等^[17]; 胡黄连苷 II 具有抗氧化、抗细胞凋亡、神经保护、肝保护、抗炎、抗胆甾、免疫调节、抗抑郁等活性^[28]; 梓醇 6-咖啡酸酯具有抗炎、抗氧化、抗肝癌等药理作用^[29]。本课题组首次从水蔓菁中分离得到了一个 6-羟基木犀草素糖苷衍生物^[27], 命为水蔓菁苷 II。而木犀草素及其糖苷衍生物也具有抗氧化、抗炎、抗癌、保护心血管和神经系统、抑制病毒复制等^[30-31]药理活性。本研究分离的 5 个化合物在水蔓菁中含量较高, 且均有抗炎活性, 有潜力作为水蔓菁及其相关制剂的质控成分。

3.2 水蔓菁的含量测定 DAD 检测器全波长扫描结果显示, 水蔓菁化合物 1、2、3 在 260 nm 处有最大吸收, 而化合物 4、5 在 260 nm 处吸收较弱, 其最大吸收波长在 340 nm, 故选取双波长 260、340 nm 进行 HPLC 含量测定。HPLC 初步分析发现水蔓菁中的 4 个环烯醚萜苷成分与王斌^[21]建立的水蔓菁 HPLC 指纹图谱及杜小波^[32]对勒马回注射液高效液相色谱指纹图谱的特征峰基本一致。

从前3批水蔓菁药材中5种活性成分的含量测定结果来看,不同批次间含量差异较大,可能与药材采集年份以及储存方式等有关。前两批来自同一产地的药材, S1样品为2016年采收后常温保存样品, S2样品为2017年采收阴干后冰箱-20℃保存样品, 两批药材从外观上的主要区别是S1样品为灰黑色, 而S2样品为绿色; 而S4样品中只含有毛蕊花苷和水蔓菁苷Ⅱ, 其外观颜色为黑色。此外, 对市售的勒马回片和勒马回胶囊也进行了水蔓菁5种活性成分的含量测定, 结果测得勒马回片中含0.06%毛蕊花苷和0.54%水蔓菁苷Ⅱ, 勒马回胶囊中含0.34%毛蕊花苷和0.26%水蔓菁苷Ⅱ, 且勒马回片和勒马回胶囊中均检测不到梓苷、胡黄连苷Ⅱ以及梓醇6-咖啡酸酯, 这提示勒马回片和勒马回胶囊的制备工艺对水蔓菁的活性成分有明显的影响, 值得进一步研究。本研究填补了水蔓菁指纹图谱中特征峰物质含量测定的空白, 阐明了环烯醚萜类物质在水蔓菁中的重要性, 为其合理开发利用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002, 7: 406-407.
- [2] XUE H B, CHEN K X, ZHANG L Q, et al. Review of the ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of the Genus *veronica*[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2019, 47(6): 1-29.
- [3] 洪俊丽, 秦民坚, 吴刚, 等. 水蔓菁中的酚性成分[J]. 中国天然药物, 2008, 6(2): 126-129.
- [4] 国家卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 100.
- [5] 朱开贤, 杨丁铭, 河野, 等. 水蔓菁的化学成分研究[J]. 中草药, 1989, 20(11): 6.
- [6] 朱开贤, 杨丁铭, 河野, 等. 水蔓菁的化学成分研究Ⅱ[J]. 中草药, 1991, 22(2): 57-58.
- [7] 马翠英, 朱开贤, 杨丁铭, 等. 水蔓菁中黄酮类化合物的研究[J]. 药学学报, 1991, 26(3): 203.
- [8] 张利梅, 胡占兴, 徐必学, 等. 勒马回化学成分的研究[J]. 安徽医药, 2015, 19(6): 1033-1034.
- [9] 马芳芳, 胡占兴, 徐广灿, 等. 勒马回化学成分的研究[J]. 贵阳中医学院学报, 2016, 38(3): 29-31.
- [10] 李峰. 水蔓菁挥发油成分的气相色谱/质谱分析[J]. 分析化学, 2002, 30(7): 822.
- [11] 谢宗万. 全国中草药汇编: 下册[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 550.
- [12] 张子梅, 苗明三, 张玉林. 水蔓菁总黄酮对小鼠前列腺腺炎模型的影响[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 43-44.
- [13] 张子梅, 苗明三, 张玉林. 水蔓菁总黄酮对大鼠前列腺腺炎模型的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(16): 1358-1361.
- [14] 苗明三, 张玉林, 纪晓宁, 等. 水蔓菁总黄酮对前列腺增生小鼠模型的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 63-64.
- [15] 苗明三, 王智明, 张玉林, 等. 水蔓菁总黄酮对大鼠前列腺增生模型的影响[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(1): 4-7.
- [16] KIM J H, HWANG D K, MOON J Y, et al. Multiple UDP-glucuronosyltransferase and sulfotransferase enzymes are responsible for the metabolism of verproside in human liver preparations[J]. Molecules, 2017, 22(4): 1-16.
- [17] HWANG D K, KIM J H, SHIN Y, et al. Identification of catalposide metabolites in human liver and intestinal preparations and characterization of the relevant sulfotransferase, UDP-glucuronosyltransferase, and carboxylesterase enzymes[J]. Pharmaceutics, 2019, 355(11): 1-13.
- [18] 刁海鹏, 杜艳, 孙体健, 等. 水蔓菁滴丸的制备工艺和质量评价研究[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1612-1614.
- [19] 朱彩平, 周少芬. 勒马回胶囊联合抗菌药物治疗支气管扩张效果及对症状改善、血清炎症因子的影响[J]. 中医临床研究, 2018, 10(24): 76-77, 86.
- [20] 国家食品药品监督管理局信息中心信息服务处. 卫生部颁布药品标准[S]. 国家食品药品监督管理局信息中心, 2014: Z18-Z298.
- [21] 王斌, 伍蔚萍, 冯旭, 等. 水蔓菁 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2004, 27(2): 95.
- [22] 樊巧串. 水蔓菁的指纹图谱和质量控制研究[J]. 中国药物与临床, 2015, 15(8): 1182-1183.
- [23] KWAK J H, KIM H J, LEE K H, et al. Antioxidative iridoid glycosides and phenolic compounds from *Veronica peregrina*[J]. Archives of Pharmacol Research, 2009, 32(2): 207-213.
- [24] 王奇志, 梁敬钰. 梓实化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(1): 15-17.
- [25] 张刘强, 韩曼飞, 易婧羽, 等. 西藏胡黄连根茎的化学成分研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2070-2074.
- [26] STICHER O, AFIFI-YAZAR F Ü. Minecosid und verminosid, zwei neue iridoidglucoside aus *Veronica officinalis* L.(Scrophulariaceae)[J]. Helvetica Chimica Acta, 1979, 62(2): 535-539.
- [27] XUE H B, LIU J W, MA G H, et al. Phenols and γ -Lactams from the aerial part of *Pseudolysimachion linariifolium* subsp. *Dilatatum*[J]. Chem Biodiversity, 2020, 17(10): e2000387.
- [28] WANG L, LIU X H, CHEN H, et al. Picroside II protects rat kidney against ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and inflammation by the TLR4/NF- κ B pathway[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2015, 9(4): 1253-1258.
- [29] SANTORO A, BIANCO G, PICERNO P, et al. Verminoside- and verbascoside-induced genotoxicity on human lymphocytes: Involvement of PARP-1 and p53 proteins[J]. Toxicology Letters, 2008, 178(2): 71-76.
- [30] 徐秋红, 杨洁, 李庆, 等. 密蒙花中木犀草素及其糖苷的药理研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(4): 53-57, 62.
- [31] WILLIAMS C A, HARBORNE J B, GEIGER H, et al. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties[J]. Phytochemistry, 1999, 51(3): 417-423.
- [32] 杜小波, 孙素馨. 勒马回注射液高效液相色谱指纹图谱的初步探讨[J]. 儿科药科学杂志, 2010, 16(5): 51-53.

(编辑: 梁进权)