

UPLC 法测定不同产地五指毛桃中补骨脂素的含量

伍世恒¹, 黄志海², 龚又明¹

1. 广东省中医院药学部, 广东 广州 510120; 2. 广东省中医药科学院, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 采用 UPLC 法测定 11 批不同产地五指毛桃中补骨脂素的含量, 为其质量标准的建立提供一定参考依据。方法: 采用 XBridge™ BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 2.5 μm), 流动相: 乙腈—水 (40 : 60), 流速: 0.5 mL/min, 柱温: 35℃, 检测波长: 245 nm。结果: 补骨脂素对照品在 0.78~78 μg 之间线性范围良好, 线性回归方程 $Y=54.227X+90.378$ ($r=0.9999$), 平均加样回收率为 99.6%, RSD=2.05% ($n=6$)。各产地的五指毛桃含量在 0.039%~0.070% 之间, 其中, 含量排名前三的产地为: 广东河源、广东从化、广东翁源, 分别为 0.070%、0.063%、0.058%。结论: 不同产地五指毛桃的补骨脂素含量差异较大。UPLC 测定方法出峰时间快, 操作简单、准确, 可为五指毛桃质量标准建立提供方法学支持。

[关键词] 五指毛桃; 补骨脂素; 超高效液相色谱 (UPLC); 含量测定; 质量标准

[中图分类号] R284 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 08-0016-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.08.005

Determination of Psoralen Content in Ficus Hirta Vahl from Different Habitats by UPLC

WU Shiheng, HUANG Zhihai, GONG Youming

Abstract: Objective: To determine psoralen content in Ficus Hirta Vahl from eleven different habitats by UPLC (ultra performance liquid chromatography), and to provide a reference for the establishment of its quality standard. Methods: XBridge™ BEH C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 2.5 μm) was applied. The mobile phase was acetonitrile-water (40 : 60), flow rate was 0.5 mL/min, column temperature was 35℃, and wave length was 245 nm. Results: The reference substance of psoralen displayed good linear range between 0.78 and 78 μg. The linear regression equation was $Y=54.227X+90.378$ ($r=0.9999$) and the average recovery was 99.6%, RSD=2.05% ($n=6$). The content of Ficus Hirta Vahl from various habitats ranged from 0.039% to 0.070%. Heyuan, Conghua and Wengyuan in Guangdong province were the first three habitats that had the highest content, being respectively 0.070%, 0.063%, 0.058%. Conclusion: Psoralen content in Ficus Hirta Vahl varies in different habitats. UPLC has advantages of fast peak time, simple and accurate operation. It can provide support for the establishment of quality standard of Ficus Hirta Vahl.

Keywords: Ficus Hirta Vahl; Psoralen; Ultra performance liquid chromatography (UPLC); Content determination; Quality standard

五指毛桃为桑科植物粗叶榕(*Ficus hirta* Vahl)的干燥根, 主要分布于广东、广西、福建、云南、贵州等省区, 广东通称五爪龙, 有健脾利湿、益肺止咳、舒筋通络的功效^[1-2]。现代研究表明, 从五指毛桃药材中分离鉴定出的补骨脂素为呋喃香豆素类化合物, 是五指毛桃所散发出的香气的主要成分, 具有抗菌、抗病毒、抑制肿瘤、抗凝、免疫调节、激素样作用和影响药物代谢等作用^[3-7]。目前, 药材市场上充斥着多种外观上易与五指毛桃混淆的榕属植物, 然而仅凭香气的强弱来判定其质量的优劣难以保证药材质量。含量测定是评价五指毛桃

质量的重要手段之一, 2004年版《广东省中药材标准》则没有收录五指毛桃含量测定项^[8]。文献研究发现, 五指毛桃质量控制多采用 HPLC 法测定补骨脂素含量^[9-13], 但该方法测定过程中补骨脂素保留时间稍长。本文将建立五指毛桃中补骨脂素的 UPLC 含量测定方法, 可大大缩短补骨脂素的出峰时间, 提高含量测定的效率, 并比较不同产地五指毛桃中补骨脂素的含量, 为五指毛桃质量标准的建立提供支持。

1 材料

1.1 试验仪器 H-class 型超高效液相色谱仪(美国 waters 公

[收稿日期] 2017-04-12

[基金项目] 2015年广东省中医药局科研项目(20152144)

[作者简介] 伍世恒(1980-), 男, 主管药师, 研究方向: 临床药学、医院药学。

[通讯作者] 龚又明, E-mail: ccozy@vip.sina.com。

司), XBridge™ BEH C18 型色谱柱(100 mm × 4.6 mm, 2.5 μm); FA-1004 型高精度分析天平(邦亿精密量仪有限公司)。

1.2 药品和试剂 补骨脂素对照品(批号: 20140311-01, 纯度 ≥ 98%)由南京泽郎生物科技有限公司提供; 11 批五指毛桃药材分别采集于广东河源、广东从化、广东翁源等 11 地(见表 1), 均为当年新鲜采集后经低温干燥处理, 密封保存, 由康美药业股份公司提供, 经广东省中医院林华主任中药师鉴定为桑

表 1 11 个产地的五指毛桃来源

| 编号 | 产地 | 部位 |
|----|--------|----|
| 1 | 广东河源 | 根 |
| 2 | 广东从化 | 根 |
| 3 | 广东翁源 | 根 |
| 4 | 广东清远 | 根 |
| 5 | 广西玉林 | 根 |
| 6 | 广东连平 | 根 |
| 7 | 云南(市售) | 根 |
| 8 | 贵州遵义 | 根 |
| 9 | 广西桂林 | 根 |
| 10 | 福建(市售) | 根 |
| 11 | 海南(市售) | 根 |

科植物粗叶榕(*Ficus hirta* Vahl)的干燥根; 乙腈为色谱纯(欧普森公司), 甲醇等试剂为分析纯(广州化学试剂厂), 水为纯化水(屈臣氏公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: XBridge™ BEH C₁₈ 柱(100 mm × 4.6 mm, 2.5 μm), 流动相: 乙腈—水(40 : 60); 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 35℃; 检测波长: 245 nm。进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液制备 取 105℃ 干燥至恒重的补骨脂素对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含补骨脂素 0.395 mg 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取五指毛桃供试样品, 粉碎成粉, 取过三号筛的粉末 0.5 g, 精密称定, 加入甲醇 20 mL, 摇匀, 连续超声提取(功率 250 W, 频率 40 KHz)30 min, 放冷至室温, 滤过, 取滤液 1。滤渣加甲醇 20 mL, 重复上述操作提取 15 min, 取滤液 2。合并滤液 1 和滤液 2, 浓缩至 4~5 mL, 置于 5 mL 容量瓶中, 并加甲醇定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 取滤液即得。

2.3 专属性试验 见图 1。使用 UPLC 测定不同产地五指毛桃中补骨脂素含量的专属性。由图 1 可以看出, 供试品溶液与补骨脂素对照品溶液色谱图中主峰保留时间一致, 而空白溶液中无此峰, 表明空白溶液对测定无干扰。

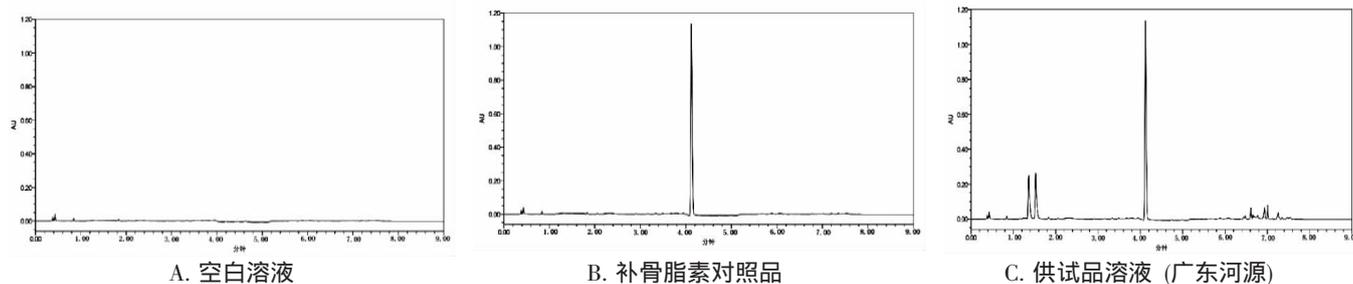


图 1 五指毛桃样品 UPLC 谱图

2.4 标准曲线制备 精密吸取补骨脂素对照品溶液, 用流动相溶液分别将其稀释为 0.78 mg/L、3.9 mg/L、7.8 mg/L、15.6 mg/L、31.2 mg/L、62.4 mg/L、78 mg/L 的对照品溶液, 放入 UPLC 样品盘, 采用 2.1 的色谱条件, 进样 10 μL, 测定补骨脂素的峰面积。以峰面积积分为纵坐标, 补骨脂素对照品含量为横坐标进行线性回归, 求得回归方程为 $Y=54.227X+90.378$ ($r=0.9999$), 线性范围 0.78~78 μg。

2.5 精密度试验 精密吸取补骨脂素对照品溶液 10 μL, 按上述色谱条件重复进样 5 次, 进样 10 μL, 测定其峰面积积分值, 实验结果表明补骨脂素的峰面积的 RSD=0.39% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一批五指毛桃样品, 按照供试品溶液制备的方法, 采用上述液相色谱条件, 分别于 0 h、4 h、8 h、

16 h、24 h 进样 10 μL, 测定其峰面积积分值, 测得补骨脂素峰面积的 RSD=0.67% ($n=6$), 实验结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批五指毛桃样品 5 份, 按供试品溶液制备方法, 采用上述色谱条件分别进样 10 μL, 测定其峰面积积分值, 测得补骨脂素峰面积的 RSD=1.82% ($n=6$), 表明此方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验 见表 2。精密称定五指毛桃粉末(过三号筛)0.5 g, 按照上述含量测定方法进行测定, 由标准曲线求出其含量。另取同批药材粉末(过三号筛)0.25 g, 精密称定, 平行操作 5 次, 分别加入补骨脂素对照品适量, 按照上述供试品制备方法, 测定其含量, 并计算其回收率(%)。试验结果显示补骨脂素的平均回收率为 99.63%, 其中, RSD=2.05% ($n=5$)。

表2 补骨脂素加样回收率考察结果

| 编号 | 样品含量(μg) | 加入量(μg) | 测得量(%) | 回收率(%) | 平均回收率(%) |
|----|-----------------------|----------------------|--------|--------|----------|
| 1 | 130 | 124 | 252.2 | 98.55 | 99.63 |
| 2 | 130 | 124 | 256.8 | 102.26 | |
| 3 | 130 | 124 | 251.0 | 97.58 | |
| 4 | 130 | 124 | 253.3 | 99.44 | |
| 5 | 130 | 124 | 254.4 | 100.32 | |

2.9 样品含量测定 见表3。精密称定五指毛桃样品粉末(过三号筛)0.5 g,按照上述含量测定方法,测定不同产地五指毛桃中补骨脂素的含量。不同产地五指毛桃中补骨脂素含量差异较大,其含量在0.039%~0.070%之间,其中广东河源含量最高,为0.070%,福建(市售)含量最低,为0.039%。

表3 不同产地五指毛桃补骨脂素含量测定结果($n=10$)

| 编号 | 产地 | 部位 | 补骨脂素含量(%) |
|----|--------|----|-----------|
| 1 | 广东河源 | 根 | 0.070 |
| 2 | 广东从化 | 根 | 0.063 |
| 3 | 广东翁源 | 根 | 0.058 |
| 4 | 广东清远 | 根 | 0.052 |
| 5 | 广西玉林 | 根 | 0.048 |
| 6 | 广东连平 | 根 | 0.054 |
| 7 | 云南(市售) | 根 | 0.040 |
| 8 | 贵州遵义 | 根 | 0.042 |
| 9 | 广西桂林 | 根 | 0.051 |
| 10 | 福建(市售) | 根 | 0.039 |
| 11 | 海南(市售) | 根 | 0.046 |

3 讨论

五指毛桃为华南地区著名的药食同源植物和常用药材,文献资料记载,五指毛桃始载于清代何克谦的《生草药性备要》,具有抗炎镇痛、免疫调节、护肝、抗心脑血管缺血缺氧等作用^[4]。

五指毛桃分布较广,且其采收有一定的季节性,故为了保证本实验样品的代表性,把采收时间设定为4~5月,在广东河源、广东从化、广东翁源等11个五指毛桃的主要产区收集。本实验以补骨脂素为质量评价指标,但补骨脂素为挥发性成分,放置过程中其含量会下降,为了保证实验的科学性,实验将采集的样品及时进行低温干燥,并密封保存处理^[14~16]。

本实验中对含量测定的流动相组成进行考察,发现流动性乙腈—水比甲醇—水的分离效果好。五指毛桃中补骨脂素为脂溶性成分,在提取过程中,对其提取溶剂甲醇和乙酸乙酯进行考察,提取方法考察了回流提取法和超声提取法^[17~18]。实验结果表明,用甲醇超声的提取效果较好。本研究建立五指毛桃UPLC含量测定方法,具有精密度好、灵敏度高、且出峰时间短的特点,可作为五指毛桃质量控制的有效手段,对其质量标准的制定有重要意义,可提供一定的参考依据。

实验研究发现,不同产地五指毛桃中补骨脂素含量差异较大,说明地域因素对其质量有较大的影响,质量难以控制。另外,五指毛桃多为野生品,其采收时间具有随机性,难以保证药材生长年限。因此有必要建立规范的五指毛桃中药材生产质量管理规范基地,采用规范的种植技术,保证临床用药的安全性和有效性^[19~20]。

[参考文献]

- [1] 宋立人,洪恂,丁绪亮,等.现代中药学大词典[M].北京:人民卫生出版社,2001:371.
- [2] 刘文啟,严华,李韦,等.五指毛桃生药学研究[J].中草药,2014,45(7):1011-1015.
- [3] 张云燕,钟森,彭彩钰,等.五指牛奶化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].亚太传统医药,2013,9(3):52-55.
- [4] 熊友健,杨玉明,姜松,等.呋喃香豆素类成分及其药理作用研究进展[J].中成药,2010,32(10):1764-1770.
- [5] 吴少华,张仲海,赵建斌.补骨脂素体内外抗癌活性的实验研究[J].中国中药杂志,1998,23(5):303-305.
- [6] 刘春玲,魏刚,何建雄,等.五指毛桃不同采收部位挥发油及醇提物成分的分析[J].广州中医药大学学报,2004,21(3):204-205.
- [7] Xin D, Wang H, Yang J, et al. Phytoestrogens from *Psoralea acorylifolia* reveal estrogen receptor subtypes electivity[J]. Phytomedicine, 2010, 17(2): 126-131.
- [8] 广东省食品药品监督管理局.广东省中药材标准[M].广州:广东科技出版社,2004:35.
- [9] 黄文华,宋艳刚,李占永,等.广东不同产地五指毛桃药材中补骨脂素及微量元素的含量测定及质量评价[J].西部中医药,2013,26(4):14-16.
- [10] 王晓平,黄翔,陆奇丰,等.HPLC测定不同叶型五指毛桃中补骨脂素的含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):93-95.
- [11] 马雅静,刘焕,史晶晶,等.五指毛桃的质量标准研究[J].中草药,2017,48(4):782-791.
- [12] 李明,陈志维,黎玉翠,等.HPLC法测定五指毛桃中补骨脂素和芹菜素的含量[J].中药新药与临床药理,2009,20(1):52-54.
- [13] 叶碧颜,彭小敏,邓广海.正交试验优选五指毛桃中补骨脂素的提取工艺[J].中国民族民间医药杂志,2016,25(16):27-28.
- [14] 林慧,梅全喜,曾聪彦.五指毛桃化学成分及其药理活性研究概况[J].今日药学,2012,22(8):484-486.
- [15] 林励,钟小清,魏刚.五指毛桃挥发性成分的GC-MS分析[J].中药材,2000,23(4):206-207.

- [16] 罗宇东, 蒋林. 瑶药五指毛桃的质量控制、生产工艺及药理作用研究进展[J]. 中国当代医药, 2014, 21(32): 193-196.
- [17] 熊文, 彭四威, 刘海涛, 等. 补骨脂不同提取工艺的比较研究[J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32(2): 98-100.
- [18] 刘俊娥, 刘俊红, 赵铁彦. 高效液相色谱法测定健脾益肾颗粒中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 中国医药导报, 2011, 8(34): 70-72.
- [19] 李林轩, 吴庆华, 蔡锦源, 等. 五指毛桃组织培养获得再生植株的研究[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2547-2551.
- [20] 韦荣昌. 五指毛桃种植关键技术[J]. 农业研究与应用, 2016, 3(2): 63-65.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

丹芪通脉破壁饮片颗粒对 apoE^{-/-} 小鼠 主动脉粥样硬化影响的实验研究

李亮, 张俊杰, 张文霞, 王家赐, 林红军, 陈巧玲, 朱盈盈

广州中医药大学附属中山医院, 广东 中山 528400

[摘要] 目的: 观察丹芪通脉破壁饮片颗粒对 apoE^{-/-}小鼠血脂及氧化应激指标的影响, 初步探讨其对主动脉粥样硬化的作用机制。方法: 将 40 只 apoE^{-/-}小鼠以高脂饲料喂养 8 周构建动脉粥样硬化小鼠模型, 随机分为模型组、饮片组、低浓度颗粒组、中浓度颗粒组、高浓度颗粒组, 每组 8 只, 另取 8 只 C57BL/6 雄性小鼠为空白对照组。饮片组以丹芪饮片煎剂 12 g/(kg·d) 灌胃; 低浓度颗粒组、中浓度颗粒组及高浓度颗粒组分别以 1.5、3、6 g/(kg·d) 浓度灌胃丹芪通脉破壁饮片颗粒, 模型组和空白对照组灌胃等量生理盐水。空白对照组以普通饲料喂养, 其余各组小鼠均以高脂高胆固醇饲料喂养。ELISA 法检测血清血脂四项, 检测主动脉组织超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 含量, HE 染色观察小鼠胸主动脉管腔内粥样斑块。结果: 与空白对照组比较, 模型组小鼠从第 4 周开始体质量显著升高, 血清甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 及低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平均显著升高, 小鼠主动脉组织 SOD 和 NO 浓度显著下降, MDA 浓度显著升高; 各给药组小鼠 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 水平均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 从第 4 周开始, 饮片组及各浓度颗粒组小鼠体质量显著减少, 饮片组、中浓度颗粒组、高浓度颗粒组 TC、TG、LDL-C、MDA 水平均显著下降, 主动脉组织 SOD 和 NO 浓度均显著升高, 低浓度颗粒组 SOD 和 NO 浓度均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 丹芪饮片煎剂及丹芪通脉破壁饮片颗粒均具有改善血脂谱、减轻氧化应激及抗动脉粥样硬化等作用, 疗效一致。

[关键词] 丹芪通脉破壁饮片颗粒; 动脉粥样硬化; 血脂; 氧化应激; 动物实验; apoE^{-/-}小鼠; C57BL/6 小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 08-0019-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.08.006

Danqi Tongmai Wall-broken Decoction Pieces Granules Have Improving Effect on Aortic Atherosclerosis of ApoE^{-/-}Mice

LI Liang, ZHANG Junjie, ZHANG Wenxia, WANG Jiaci, LIN Hongjun, CHEN Qiaoling, ZHU Yingying

Abstract: objective: To observe effect of Danqi Tongmai wall-broken pieces granules on serum lipids and oxidative stress indexes of apoE^{-/-}mice, and to do preliminary discussion of its mechanism on aortic atherosclerosis. Methods: Selected 40 apoE^{-/-}mice and fed them with high fat diet for eight weeks to establish mice model of atherosclerosis, and divided them into the model group, pieces group, and low, medium and high concentration granule groups, being 8 cases in each. Another 8 C57BL/6 male mice were selected as the blank control group. The pieces group was given Danqi decoction pieces of 12 g/(kg·d) by gavage, low concentration granule group, medium

[收稿日期] 2017-04-11

[基金项目] 中山市科研计划项目(2014A1FC170); 广东省中医药局项目(20141283)

[作者简介] 李亮(1973-), 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 主要从事老年疾病、抗衰老及中医养生研究。