

四数九里香药材中补骨脂素的定性定量分析方法研究*

Qualitative and Quantitative Analysis of Psoralen in *Murraya tetraera* Huang

张柯媛^{1,3}, 黄艳^{1,2}, 刘布鸣^{1,2**}, 陈明生^{1,2}, 李齐修^{1,2}, 粮文旺^{1,2}, 卢文杰^{1,2}
 ZHANG Ke-yuan^{1,3}, HUANG Yan^{1,2}, LIU Bu-ming^{1,2}, CHEN Ming-sheng^{1,2},
 LI Qi-xiu^{1,2}, LANG Wen-wang^{1,2}, LU Wen-jie^{1,2}

(1. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022; 2. 广西中医药研究院, 广西南宁 530022; 3. 广西卫生职业技术学院, 广西南宁 530021)

(1. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, 530022, China; 3. Guangxi Health Vocational and Technical College, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:采用薄层色谱法对四数九里香药材中补骨脂素定性鉴别, 高效液相色谱法测定补骨脂素含量, 建立四数九里香中补骨脂素的定性定量分析方法。色谱柱为大连依力特 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(52:48), 流速 1.0 ml/min; 检测波长 246 nm。结果表明, TLC 斑点清晰, 补骨脂素在 0.06~0.36 μg 范围内呈良好线性关系($r=0.9992$), 平均回收率为 101.6%, RSD 为 1.84% ($n=6$)。该方法准确、可靠, 可以作为四数九里香药材的质量标准制定分析方法。

关键词:分析方法 补骨脂素 四数九里香 薄层色谱 高效液相色谱

中图分类号: O657.7, R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2012)04-0352-03

Abstract: The qualitative and quantitative methods were established to estimate psoralen in *Murraya tetraera* Huang. *Murraya tetraera* Huang was identified by using TLC and the content of psoralen in the material was determined by HPLC. SinoChrom ODS-BP column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was adopted with methol-water (52:48) at the flow of 1.0 ml/min, and the detection wavelength was 246 nm. The results showed that the TLC spots were clear, and the calibration curve of psoralen was linear within the range of 0.06~0.36 μg, $r=0.9992$; the average recovery was 101.6% and RSD was 1.84% ($n=6$). The method is accuracy and reliable, and can be adopted as a standard for the quality control of *Murraya tetraera* Huang.

Key words: analysis method, psoralen, *Murraya tetraera* Huang, TLC, HPLC

中药材四数九里香为芸香科九里香属植物 *Murraya tetraera* Huang 的干燥茎叶, 产于广西的百色、德保和云南东部的砚山、富宁、文山、西畴, 常见于石灰岩山顶阳光充足的地方^[1], 以叶和根入药, 夏秋采叶, 秋季采根, 洗净切段, 均可鲜用或阴干备用。四

数九里香具有祛风解表、行气止痛、活血散淤、抗炎、镇痛、解热之功效^[2], 用于感冒发热, 支气管炎, 哮喘, 风湿麻木, 筋骨疼痛, 跌打瘀血肿痛, 皮肤瘙痒, 湿疹, 毒蛇咬伤, 疟疾, 胃痛, 水肿等^[3]。四数九里香中含有补骨脂素等化合物^[4], 补骨脂素(psoralen, PSO)具有广泛的生物学活性及药理作用, 如光敏作用、保护心血管、抗组胺、抗肿瘤、促进粒细胞生长、抗生育和雌激素样作用, 对子宫、鼻和牙龈等出血有止血作用, 对支气管平滑肌有舒张作用等^[5]。目前四数九里香中补骨脂素的定性定量分析方法未见有文献报道。本研究采用薄层色谱法和高效液相色谱法, 对四数九里

收稿日期: 2012-09-28

修回日期: 2012-10-16

作者简介: 张柯媛(1981-), 女, 硕士研究生, 主要从事医药和卫生检验与教学工作。

* 广西中药质量标准研究重点实验室系统性研究课题(桂中重系 201209)资助。

** 通讯作者。

香中补骨脂素进行定性定量分析方法研究,为四数九里香药材质量标准的提高和进一步开发利用,提供科学依据。

1 仪器与试药

威玛龙高效液相色谱仪,UC3282 泵,UC3292 可变波长检测器;威玛龙 WM2010 通用多媒体色谱工作站;Agilent Syr. LC 50 μ l FN 微量进样器;KQ5200B 型超声清洗器。补骨脂素对照品是中国药品生物制品检定所产品(批号:110739-201115),纯度大于 98%。HPLC 所用试剂均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。硅胶 G 由青岛海洋化工厂生产。

四数九里香药材采自广西德保、河池等地,原植物经广西中医药研究院赖茂详研究员鉴定为 *Murraya tetraera* Huang,植物标本保存在广西中医药研究院标本馆(GXMI)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

取本品粉末 2g,置具塞锥形瓶中,加乙酸乙酯 30 ml,超声处理 15 min,取出,滤过,滤液蒸干,残余用少量乙酸乙酯使溶解作为供试品溶液。另取四数九里香对照药材 2g,同法制成对照药材溶液。再取补骨脂素对照品,加乙酸乙酯制成每 1 ml 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。按照薄层色谱法(中国药典 2010 年版一部附录 VI B)试验,吸取上述 3 种溶液各 2~3 μ l,分别点于同一含羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙酸乙酯(6:4)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 氢氧化钾甲醇溶液,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品色谱(图 1)中,在与对照药材和对照品色谱相应的位置上,显相同的颜色的荧光斑点。经多批样品试验,薄层色谱的重现性好,可以作为四数九里香药材的定性鉴别方法。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件和提取条件的选择

色谱柱为大连依力特 C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相为甲醇-水(52:48)。检测波长 246 nm,柱温为室温,进样量 20 μ l。理论塔板数按补骨脂素计算不低于 3000。补骨脂素对照品、四数九里香供试品溶液 HPLC 图如图 2 所示。

补骨脂素难溶于水,易溶于醇,分别比较甲醇和乙醇、50%乙醇和 50%甲醇不同溶液的提取率,结果甲醇溶液的提取含量高,故选择甲醇溶液为提取溶剂。对超声时间进行比较实验的结果显示,超声 30

min、60 min、90 min、120 min 的提取含量分别为 0.18mg/g、0.23mg/g、0.23mg/g、0.24mg/g,超声 60 min 的提取含量与超声 90 min、120 min 的提取率基本相当,说明超声 60 min 基本可以将样品中的补骨脂素提取完全,为缩短分析时间,实验选择超声时间为 60 min。

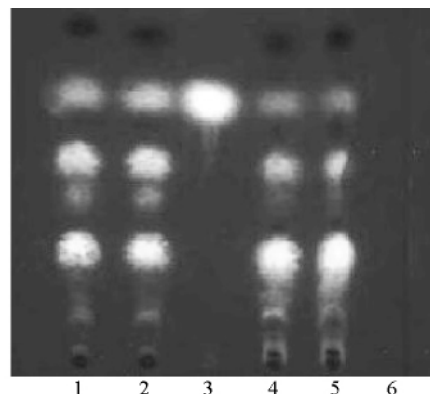


图 1 四数九里香的薄层色谱

Fig. 1 TLC of *Murraya tetraera* Huang

1. 四数九里香药材对照;2,4,5:四数九里香药材;3. 补骨脂素对照品;6. 空白溶剂。

1. Material reference of *Murraya tetraera* Huang;2,4,5: Sample of *Murraya tetraera* Huang;3. Psoralen;6. Blank solvent.

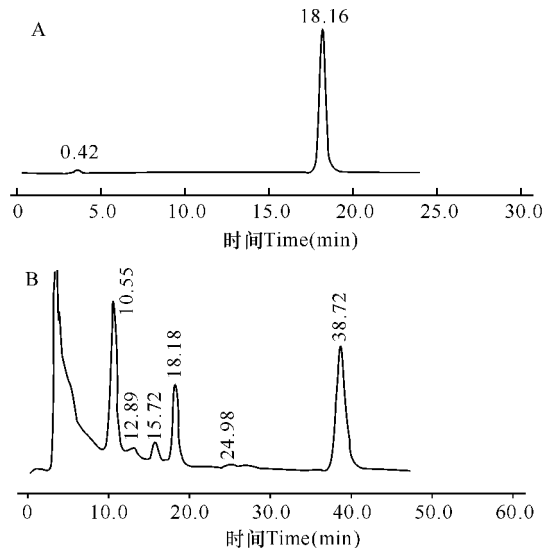


图 2 四数九里香的 HPLC

Fig. 2 HPLC of *Murraya tetraera* Huang

A. 补骨脂素对照品;B. 四数九里香药材。

A. Reference Substance of psoralen; B. Sample of *Murraya tetraera* Huang.

2.2.2 对照品溶液及供试品溶液的制备

精密称取补骨脂素对照品适量,加甲醇制成 10 μ g/ml 的对照品溶液,即得对照品溶液。

精密称取四数九里香药材粉末 1 g,精密称定,置 100ml 具塞锥形瓶中,加入甲醇 25 ml,精密称定,超声处理(功率 320 W,频率 80 kHz)1 h,用甲醇补重,

滤过,用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察

精密称取补骨脂素对照品 10 mg, 置入 100 ml 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 0.3 ml、0.6 ml、0.9 ml、1.2 ml、1.5 ml、1.8 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得系列浓度对照品溶液, 分别精密吸取 20 μ l, 按上述色谱条件注入色谱仪, 测定峰面积值, 以峰面积值为纵坐标 (Y), 进样量 (μ g) 为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 并求得标准曲线回归方程为: $Y = 8908695.2381 X - 50506.0000$, $r = 0.9992$ ($n = 6$), 补骨脂素进样量在 0.06~0.36 μ g 范围呈良好线性关系。

2.2.4 精密度、稳定性和重现性试验

取同一对照品溶液, 连续重复进样 6 次, 测得补骨脂素峰面积平均值为 1671850, $RSD = 1.60\%$ 。取同一供试品溶液, 连续重复进样 6 次, 测得补骨脂素峰面积平均值为 1780290, $RSD = 1.66\%$ 。实验的精密度高。

取同一供试品溶液, 每隔 2h 进样, 进行 10h 稳定性考察。结果补骨脂素峰面积平均值为 1617524, $RSD = 1.72\%$ 。实验的稳定性良好。

精密称取同一批四数九里香药材样品各 6 份, 按上述供试品溶液制备方法和色谱条件测定峰面积并计算, 结果测得补骨脂素平均含量为 0.228 mg/g, $RSD = 1.84\%$ ($n = 6$)。实验的重现性良好。

2.2.5 加样回收率试验

称取已测知补骨脂素平均含量 (0.228 mg/g) 的四数九里香药材粉末, 共 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定。置入具塞锥形瓶中, 编号 1~6 号, 精密加入对照品溶液 (0.11 mg/ml) 1 ml, 按供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测补骨脂素含量, 计算回收率, 结果平均回收率为 101.63%, $RSD = 1.84\%$ ($n = 6$)。详见表 1。

表 1 四数九里香药材回收率试验结果

Table 1 The recovery results of *Murraya tetraera* Huang

编号 No.	供试品 取样量 Weight (g)	供试品中补 骨脂素含量 Content of psoralen (mg)	加入补 骨脂素 的量 Addition (mg)	测得值 Mes- sured value (mg)	回收率 Recov- ery(%)
1	0.5016	0.1143	0.1100	0.2249	100.53
2	0.5042	0.1149	0.1100	0.2283	102.93
3	0.5079	0.1158	0.1100	0.2277	101.66
4	0.5065	0.1154	0.1100	0.2277	98.85
5	0.5075	0.1157	0.1100	0.2276	101.63
6	0.5135	0.1170	0.1100	0.2320	104.22

2.2.6 样品含量测定

分别取 3 个产地的四数九里香, 按上述供试品溶液制备方法和色谱条件依法测定补骨脂素含量。结果(表 2)显示, 四数九里香样品中补骨脂素的含量为 0.20%~0.23%。

表 2 四数九里香样品中补骨脂素含量测定结果 ($n = 3$)

Table 2 The content of *Murraya tetraera* Huang from different region

序号 No.	产地 Region	补骨脂素含量 The content of psor- alen(mg/g)
1	广西德保 Debao Guagnxi	0.23
2	广西河池 Hechi Guagnxi	0.20
3	广西武鸣 Wuming Guagnxi	0.21

3 结束语

本研究采用薄层色谱法对四数九里香中补骨脂素定性鉴别, 高效液相色谱法测定补骨脂素含量, 建立四数九里香药材中补骨脂素的定性定量分析方法, 并对不同样品进行了测定。四数九里香药材样品用甲醇溶液为提取溶剂, 超声 60 min 进行提取。色谱柱为大连依力特 C_{18} 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水 (52 : 48), 流速 1.0 ml/min; 检测波长 246 nm。该方法的 TLC 斑点清晰, 补骨脂素在 0.06~0.36 μ g 范围内呈良好线性关系 ($r = 0.9992$), 平均回收率为 101.6%, RSD 为 1.84% ($n = 6$)。该方法准确、可靠, 可以作为四数九里香药材的质量标准制定分析方法。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑部委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1997: 145-146.
- [2] 中华本草编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 947-948.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 (上册) [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 10.
- [4] 牙启康, 卢文杰, 陈家源, 等. 四数九里香的化学成分研究 [J]. 广西科学, 2010, 17(4): 347-348, 352.
- [5] 李祝, 宋宝安. 补骨脂素抗肿瘤机理及其应用研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(3): 255-260.

(责任编辑: 邓大玉)