

超高效液相色谱法测定杜仲中松脂醇二葡萄糖苷

赵骏铭^{1,2,3}, 张紫佳^{2,3*}, 孙庆龙⁴, 陈洁^{2,3}, 朴虎日¹, 王峥涛^{2,3}

(1 延边大学药学院, 吉林 延边 133000; 2 上海中医药大学中药研究所 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203; 3 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 4 沃特士科技有限公司, 上海 200233)

摘要:目的 建立超高效液相色谱法(UPLC)测定杜仲中主要活性成分松脂醇二葡萄糖苷(pinoresinol diglucoside, PDG)的方法。方法 采用Acquity C₁₈BEH(1.0 mm×100 mm, 1.7 μm)UPLC™色谱柱, 以乙腈-水为流动相, 使用Waters Acquity UPLC system进行测定。结果 PDG的线性范围为4.655~465.5 μg, R²=0.999 9, 平均回收率为99.4%, RSD=1.7%。结论 本方法准确、简便、高效、重现性好, 可用于杜仲中PDG的定量测定。同时UPLC在分析强保留、高分离度要求、成分复杂、大批量的样品时具有非常明显的优势, 尤其适合对中药复杂体系的分析。

关键词:超高效液相色谱法(UPLC); 杜仲; 松脂醇二葡萄糖苷

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)11-1896-03

超高效液相色谱(UPLC)作为一种新兴的色谱分析手段, 近年来被广泛应用到与质谱联用中。由于UPLC具有高速、高分离度、低消耗等特点, 目前也越来越广泛地应用于药物质量评价中^[1-2], 尤其是针对中药复杂体系的分析, 更具有明显的优势。

杜仲为我国特有珍稀植物, 现代药理研究表明, 杜仲具有增强机体非特异性免疫功能, 降压、强壮、抗炎、抗病原微生物等作用。其主要活性成分有绿原酸、京尼平苷、京尼平苷酸、松脂醇二葡萄糖苷等^[3]。其中松脂醇二葡萄糖苷(pinoresinol diglucoside, PDG)为杜仲主要降压活性成分^[4], 是评估杜仲质量的重要指标成分^[5-6]。本实验针对杜仲药材及盐制杜仲中PDG的量进行测定, 在全面地评估杜仲质量的同时, 给出了杜仲盐制前后PDG的变化趋势。在研究过程中发现, 按照2005年版《中国药典》中杜仲定量测定项下规定的色谱条件甲醇-水(25:75)测定对照品和样品^[7], 得到的PDG色谱峰是一个单峰, 但以乙腈-水为流动相, 可将该PDG色谱峰分离出一个占总量7.54%的杂质峰(化合物A)。本研究针对这一发现重新建立了杜仲中PDG的测定方法。由于使用HPLC无法在适宜的时间内将化合物A与PDG完全分离, 而延长保留时间则需要消耗大量溶剂且峰形不佳, 故选用UPLC作为分析手段, 收到了理想的效果。UPLC和HPLC相比具有高速、高分离度、节约溶剂等优势, 对解决中药类似的疑难问题提供了可行的方法。

1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC超高效液相色谱仪, 包括二元泵处理器、样品处理器、柱温箱、PDA检测器以及Empower II色谱工作站; Saptious BP211D十万分之一分析天平, Mettler AE200万分之一分析天平; Milli-Q system超纯水制备器。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

PDG对照品购自中国药品生物制品鉴定所(批号111537-200502)。杜仲药材及饮片购自各地药材公司或产地, 由上海中医药大学中药研究所吴立宏博士鉴定为*Eucommia ulmoides* Oliv.。杜仲药材留样保存在上海中医药大学中药研究所标本室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Acquity C₁₈BEH(1.0 mm×100 mm, 1.7 μm)UPLC™色谱柱, 乙腈-水(9:91)等度洗脱, 检测波长为227 nm, 柱温为25℃, 体积流量0.1 mL/min。此条件下PDG可与化合物A达到基线分离(分离度约为1.5), 色谱图见图1。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取PDG对照品适量, 置10 mL量瓶中, 加10%乙腈适量使溶解, 用10%乙腈定容至刻度, 即得对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备: 参考2005年版《中国药典》杜仲测定项下供试品溶液的制备方法^[7]。取本品粗粉2 g, 置索氏提取器中, 加三氯甲烷适量, 加热回流6 h, 提取液回收三氯甲烷至干, 再置索氏提取器中, 加甲醇适量, 加热回流6 h, 提取液回收甲醇至干, 残渣加10%乙腈适量使溶解, 并转移至10 mL量瓶中, 加10%乙腈至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

①收稿日期: 2010-04-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(青年基金 30901952); 教育部高等学校科技创新工程重大项目培育资金(706025)

* 通讯作者 张紫佳 Tel: (021) 51322505 E-mail: zijiazhang66@hotmail.com

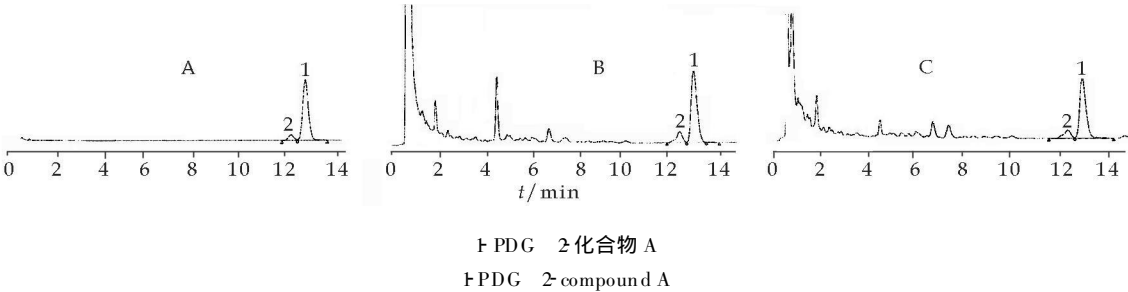


图 1 PDG 和化合物 A (A)、杜仲药材 (B)、盐杜仲 (C) 的 UPLC 图

Fig 1 UPLC Chromatograms of PDG and compound A (A), *Eucommiae Cortex* (B), and salted *Eucommiae Cortex* (C)

2.4 线性关系的考察:精密量取上述对照品储备液适量,加 10% 乙腈分别制成 PDG 4 655、9 310、18 62、37.24、46.55、93 10、186.2、465.5 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。各进样 0.5 μL ,进样 3 次,以质量浓度(X)为横坐标,峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,计算回归方程 $Y = 7\,094.9X + 5\,625.8$, $R^2 = 0.9999$ 。结果表明,PDG 在 4 655~465.5 $\mu\text{g/mL}$ 有较好的线性关系。同时以仪器的信噪比 S/N 测定最低检测限(LOD)和最低定量限(LOQ),当 S/N 为 3 时,0.47 $\mu\text{g/mL}$ 为 PDG 的最低检测限,当 S/N 为 10 时,1.40 $\mu\text{g/mL}$ 为 PDG 的最低定量限。

2.5 精密度试验:吸取上述对照品溶液(46.55 $\mu\text{g/mL}$),重复进样 6 次,结果 PDG 的峰面积值的 RSD 为 0.48%,说明精密度良好。

2.6 稳定性试验:精密吸取供试品溶液 0.5 μL ,分别于 0、4、8、12、24、36、72 h 进样,考察供试品溶液的稳定性,结果 PDG 峰面积值的 RSD 为 2.0%,说明供试品溶液在 72 h 内保持稳定。

2.7 重现性试验:取同一批杜仲样品 6 份,各 2 g,精密称定,制成供试品溶液,进行测定,以标准曲线计算其质量分数,结果 RSD 为 1.5%,说明该方法重现性良好。

2.8 加样回收率试验:取已测定 PDG 的杜仲粗粉 1 g,精密称定 9 份,每 3 份加入相同量(分别为已知量的 50%、100%、150%)的 PDG 对照品,按供试品溶液制备项下方法操作,进行测定。结果的平均值分别为 98.6%、98.2%、101.3%,RSD 为 1.7%。

2.9 样品测定:按上述 2.3 项下制备供试品溶液,并按 2.1 项下条件进行测定,按标准曲线进行计算,样品的量按干质量计算,结果见表 1。

3 讨论

3.1 化合物 A 经 LC-MS 分析,为 PDG 的同分异构体,色谱行为与 PDG 极为相似,分别以甲醇-水和乙腈-水系统进行测试,结果表明 PDG 与化合物 A 在甲醇-水系统中分离度不理想,而在乙腈-水系统

表 1 杜仲药材和盐杜仲中 PDG 的量

Table 1 PDG Content in *Eucommiae Cortex* and salted *Eucommiae Cortex*

杜仲药材	水分/%	PDG/%	盐杜仲	水分/%	PDG/%
上海康桥	9.43	0.12	四川	10.38	0.08
安徽亳州 1	9.57	0.04	上海雷允上	7.32	0.06
山东济南	9.84	0.24	上海雷允上	8.69	0.19
云南菊花村	9.31	0.09	贵州济人堂	8.31	0.15
西宁	9.97	0.14	浙江杭州	7.57	0.11
安徽亳州 2	10.31	0.06	上海康桥	8.77	0.20
四川五块石	9.96	0.07	山东济南	6.86	0.04
均值	9.77	0.11	西宁	10.78	0.21
			成都	10.21	0.15
			均值	8.76	0.13

中可实现基线分离。为了兼顾分离度和保留时间,故选择乙腈-水(9:91),可在 14 min 内使其分离度达到 1.5。

3.2 在对照品溶液和供试品溶液的制备过程中,应尽量使用流动相进行溶解和定容,避免高浓度有机相在分析过程中产生溶剂效应,影响 PDG 与化合物 A 的色谱峰形及分离度。

3.3 经 UPLC 分析,PDG 对照品中含有 7.54% 的化合物 A,故以上实验数据均为按 PDG 对照品称样量或浓度的 92.46% 作为对照品的实际称样量或浓度计算得来。

3.4 样品测定结果表明,盐杜仲中 PDG 的量略高于杜仲药材,可见盐制作为中国传统炮制方法,可以提高杜仲中某些有效成分的量。此外,由于杜仲中含有大量的杜仲胶,使其原药材具有很高的韧性,不便打粉或与其他辅药混匀,经炮制以后,胶丝失去弹性而易断裂,从而解决了原药材的不便之处。

3.5 将本法与 HPLC 进行比较的结果证明,在得到相同分离度(1.5)的前提下,UPLC 需要 14 min,消耗溶剂 1.4 mL;HPLC 需要约 60 min,消耗溶剂约 60 mL。可见 UPLC 具有快速简捷和经济高效等优势。

3.6 由于 UPLC 和 HPLC 具有相同的运行原理,故常规 HPLC 方法可以简单地转化为 UPLC 方法,

无需花费大量时间进行摸索测试条件。

致谢:上海高校创新团队建设资金资助。

参考文献:

- [1] 杨义芳. 超高效/高分离及快速/超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1259-1263
- [2] 杨立伟, 郑伟奇, 蒋忠军, 等. 超高效液相色谱法测定西洋参中人参皂苷 R_{g1}、R_e、R_{b1} 的含量[J]. 中药材, 2008, 31(1): 55-57

- [3] 李钦, 杜红岩, 杜兰英, 等. HPLC 法测定杜仲雄花和杜仲雄花茶中京尼平苷酸、绿原酸和京尼平苷[J]. 中草药, 2009, 40(1): 71-72
- [4] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代化研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1998
- [5] 李芳东, 杜洪岩, 杜仲[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001
- [6] 戚友维. 杜仲化学成分研究进展[J]. 中草药, 1989(4): 42-44
- [7] 中国药典[S]. 一部. 2005

菝葜 RAPD 扩增条件优化

仇萍^{1,2}, 刘春林¹, 盛孝邦^{1*}, 黄宇明², 张光贤²

(1 湖南农业大学, 湖南长沙 410128; 2 怀化正好制药有限公司, 湖南怀化 418000)

摘要:目的 研究菝葜的 RAPD-PCR 扩增体系最适宜的条件。方法 采用 CTAB 提取方法, 从菝葜的嫩叶中提取总基因组 DNA, 以此为模板, 优化菝葜 RAPD-PCR 的反应条件。结果 最适宜的 PCR 扩增体系为: 反应体积 30 μ L, 内含 0.20 μ mol/L 引物、200 μ mol/L dNTP、40 ng 模板 DNA、2 U *Taq* DNA 聚合酶、2 μ mol/L Mg²⁺。结论 通过扩增条件优化实验, 建立了重复性好、稳定性高的药用植物菝葜 RAPD-PCR 扩增体系最适宜的条件, 筛选出条带清晰多态性好的 14 条随机引物, 共扩增得到 144 条电泳带, 其中有多态性带 62 条, 检测到了 62 个多态性位点, 多态率为 43%。

关键词:菝葜; RAPD; 条件优化

中图分类号: R286.01

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1898-04

菝葜 *Smilax china* L. 为百合科菝葜属植物, 别名金刚藤、金刚刺、铁菱角、马加勒、筋骨柱子、红灯果等。在我国 400 年前就有菝葜药用的记载, 始载于《名医别录》。民间称药用菝葜为金刚藤, 其根茎具有祛风利湿、解毒散瘀的功效, 多用于治疗风湿关节痛、跌打损伤、胃肠炎、痢疾、消化不良、糖尿病、乳糜尿、白带、癌症等, 其叶外用可治疗疗疮、烫伤^[1-2]。目前市场上以菝葜根茎的提取物为主要组分的药品有金刚藤糖浆、金刚藤颗粒、金刚藤片、金刚藤胶囊、三金片、金鸡胶囊等, 主要用于治疗附件炎和附件炎性包块及妇科多种炎症等, 年销售量达 5~10 亿元人民币, 是临床上治疗妇科炎症的常用药品; 复方菝葜颗粒则用于治疗癌症。因此, 菝葜的药用价值很高, 极具开发潜力。

RAPD 技术是 DNA 分子标记技术的一项创新, 可直接反映染色体组 DNA 多态性, 不受环境限制, 具有操作简单快捷、成本低、通用性好、灵敏度高, 且无需预知基因组的相关分子生物学信息等优点, 广泛应用于遗传多样性、生物种群划分、遗传图谱构建、基因定位等方面的研究^[3-10]。在用 RAPD

技术进行植物种的遗传多样性分析时, 首先要建立稳定的反应体系, 以确保其结果的可靠性、重复性^[11]。为此, 本实验就菝葜 RAPD 反应中的模板 DNA 浓度、引物浓度、dNTPs 浓度、Mg²⁺ 浓度、*Taq* 酶用量等因素进行实验, 初步建立稳定性好、重复性高的 RAPD 反应体系, 为深入分析菝葜遗传多样性提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料: 根据菝葜的分布情况, 于 2005 年 5 月和 8 月分别从金刚藤主产区湖南省芷江、会同、靖州、雪峰山和鸡公界 5 个地区采集。其中材料 1 采自芷江明山下、材料 2~4 采自会同、材料 5~7 采自靖州寨芽、材料 8~10 采自雪峰山大峰、材料 11~15 采自鸡公界。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 试剂: *Taq* DNA 聚合酶、15 个随机引物 (Sangon 公司)、10 $\times$ Buffer、MgCl₂、dNTP、DNA Ladder Marker、琼脂糖 (西班牙分装)。

1.2.2 仪器: 凝胶成像系统 (Gel DOC 1000, BIO-RAD), 台式高速冷冻离心机 (TGL-16M), Smart

①收稿日期: 2010-05-24

作者简介: 仇萍 (1965—), 女, 湖南省怀化市人, 高级工程师, 在读博士, 湖南正清制药集团股份有限公司总工程师, 长期从事药品的研发、工艺技术及生产管理工作, 先后获得新药证书 6 个, 发明专利 11 个, 先后获得省科技进步奖, 省优秀发明人称号, 研究方向为遗传育种。Tel: 13973161359 Fax: (0731) 88807044 E-mail: qiu_zq@vip.163.com

* 通讯作者 盛孝邦