

炮制时间对盐补骨脂中 10 种化学成分的影响

李 凯, 许梦莹, 周 宁, 张振凌*

河南中医药大学, 河南 郑州 450008

摘 要: **目的** 建立同时测定补骨脂 *Psoralea corylifolia* 中补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂定、补骨脂二氢黄酮甲醚、异补骨脂二氢黄酮、补骨脂二氢黄酮、异补骨脂查耳酮、补骨脂宁、新补骨脂异黄酮和补骨脂酚 10 种化学成分的方法, 并探讨炒制时间对盐补骨脂中 10 种成分的影响。**方法** 采用 UPLC 法, 色谱条件: C_{18} 柱 (50 mm×4.6 mm, 1.8 μ m), 流动相为乙腈-水, 采用梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 检测波长 250 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C。**结果** 被测定的 10 种成分色谱峰在 15 min 分析时间内均有良好的分离度, 精密度 RSD 均小于 3%; 在室温条件下 24 h 内稳定; 各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系 ($r \geq 0.997 0$); 平均加样回收率 96%~105%, RSD 均小于 3%。**结论** 本方法操作简便, 快速, 测定结果准确可靠, 可用于补骨脂的质量控制。随炒制时间的延长, 香豆素类成分呈现先降后升再降趋势, 黄酮类、补骨脂酚及 10 种成分总量有降低趋势。

关键词: 炮制; 盐炙; 补骨脂; 补骨脂素; 异补骨脂素; 补骨脂定; 补骨脂二氢黄酮甲醚; 异补骨脂二氢黄酮; 补骨脂二氢黄酮; 异补骨脂查耳酮; 补骨脂宁; 新补骨脂异黄酮; 补骨脂酚; UPLC

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)04-0710-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.04.016

Determination of 10 components in stir-frying *Psoralea Fructus* with salt solution by different processing time

LI Kai, XU Meng-ying, ZHOU Ning, ZHANG Zhen-ling

Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

Abstract: Objective To establish UPLC method for the simultaneous determination of 10 components, such as psoralen, isopsoralen, psoralidin, bavachinin, isobavachenin, corylifolin, isobavachalcone, corylin, neobavaisoflavone, and bakuchiol in *Psoralea Fructus*, and to study the effect of processing time on 10 components in stir-frying *Psoralea Fructus* with salt solution. **Methods** The chromatographic separation was achieved on a C_{18} column (50 mm×4.6 mm, 1.8 μ m) with acetonitrile (A)-water (B) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min for gradient elution; The column temperature was 30 $^{\circ}$ C. The determination wavelength was 250 nm. **Results** The 10 components were well separated within 15 min. The RSD values of reproducibility were less than 3%. The stability was good in 24 h. The linear relationship between the concentration and peak areas of the 10 components was good ($r \geq 0.997 0$). The average recoveries were 96%—105% and the RSD values were all less than 3%. **Conclusion** The method is simple, reliable and accurate, could be used for the quality control of *Psoralea Fructus*. With processing time prolonged, the content of coumarins showed first decreased, then increased and last decreased. Flavonoids, bakuchiol and the total content of 10 components above were decreased. **Key words:** processing; stir-frying with salt water; *Psoralea Fructus*; psoralen; isopsoralen; psoralidin; bavachinin; isobavachenin; corylifolin; isobavachalcone; corylin; neobavaisoflavone; bakuchiol; UPLC

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻功效; 外用消风祛斑。用于肾阳不足、阳痿遗精、遗尿尿频、腰膝冷痛、肾虚作喘、五更泄泻; 外用治白癜风, 斑秃^[1]。补骨脂主要含有香豆素类、黄酮类、单萜酚类 (主要有补骨脂酚等) 等成分, 各成分之间相互作用, 才能形成多样的生理作用,

如光敏作用、扩张冠状动脉、抑菌、抗肿瘤、抗病毒、增强免疫、抗哮喘^[2-3]等。

药物炮制前后化学成分的变化一直是炮制研究的热点问题。有学者建立了同时测定补骨脂中多种成分的方法及炮制工艺^[4-5], 研究了补骨脂炮制前后香豆素类、黄酮类、单萜酚类成分的变化^[6-7], 但分析时间长, 方法较复杂, 且尚未探讨炮制时间与成

收稿日期: 2016-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目——补骨脂盐炙“入肾”机制研究 (81403102)

作者简介: 李 凯 (1982—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为中药炮制研究。Tel: (0371)86635596 E-mail: cpulikai@163.com

*通信作者 张振凌, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制研究。Tel: (0371)86635596 E-mail: zhangzhenling@163.com

分量的关系。《中国药典》2015年版收载补骨脂测定指标性成分仅为补骨脂素和异补骨脂素^[1],质量控制标准有待进一步提高。为此,本实验建立了快速测定补骨脂中10种成分(香豆素类:补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂定;黄酮类:补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、异补骨脂查耳酮、补骨脂宁、异补骨脂二氢黄酮、补骨脂二氢黄酮甲醚;酚萜类:补骨脂酚)量的方法,并探讨不同盐炙程度补骨脂中成分的变化情况。

1 仪器与材料

补骨脂药材产自亳州,由河南中医药大学李凯副教授鉴定为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实; Waters 1525 高效液相色谱仪(Waters 2489 紫外检测器, Breeze2 色谱管理系统); Agilent, ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(50 mm×4.6 mm, 1.8 μm); AUW120D 型十万分之一分析天平(岛津); KDM 型电热套(山东菏泽石油化工学校仪器设备厂); FW-200 型万能粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司); 微孔滤膜(津腾, 0.45 μm); 移液枪(Dragon Laboratory Instruments Limited, 1 000 μL); 甲醇(天津市四友精细化学品有限公司, 色谱纯); 乙腈(天津市致远化学试剂有限公司, 色谱纯); 超纯水(Milli-Q Advantage A10 自制); 补骨脂素(批号 110739-200814)、异补骨脂素(批号 110738-200511)购自中国食品药品检定研究院, 补骨脂二氢黄酮(即补骨脂甲素)购自南京泽朗植物提取物有限公司, 新补骨脂异黄酮(批号 14042521, 质量分数 98%)、异补骨脂查耳酮(即补骨脂乙素, 批号 14121331, 质量分数 97%)、补骨脂宁(批号 15021931, 质量分数 98%)、异补骨脂二氢黄酮(批号 15031022, 质量分数 98%)、补骨脂二氢黄酮甲醚(批号 15031023, 质量分数 98%)、补骨脂定(批号 15021831, 质量分数 97%)、补骨脂酚(批号 15031024, 质量分数 97%)购自同田生物有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件

流动相为乙腈-水, 梯度洗脱: 0~3 min, 35% 乙腈; 3~3.5 min, 35~45% 乙腈; 3.5~8 min, 45% 乙腈; 8~13 min, 45%~90% 乙腈; 13~15 min, 90%~35% 乙腈; 体积流量 1 mL/min, 检测波长 250 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 4 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取补骨脂素(2.07 mg)、异补骨脂素(2.08 mg)、补骨脂定(1.21 mg)、补骨脂二氢

黄酮甲醚(1.02 mg)、补骨脂二氢黄酮(1.58 mg)、异补骨脂二氢黄酮(0.97 mg)、异补骨脂查耳酮(1.10 mg)、补骨脂宁(1.03 mg)、新补骨脂异黄酮(1.00 mg)、补骨脂酚(2.75 mg), 置同一个 10 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品储备液, 于 4 ℃ 条件下保存, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

取补骨脂生品, 分别加盐水拌匀, 闷润 4 h^[5], 置炒炙容器中, 以文火(130±20)℃加热, 分别炒制 0、2.5、4.5、6.5、8.5、10.5、12.5 min, 取出, 放凉, 至 40 ℃减压干燥箱中连续干燥 24 h, 测定含水量, 备用。每 100 千克补骨脂用食盐 2 kg。

取上述补骨脂粉末(过 3 号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加甲醇 70 mL, 加热回流 2 h, 放冷, 提取液移至 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液置离心管中, 于 4 ℃ 条件下保存, 备用^[1]。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取“2.2”项下的混合对照品储备液 1 mL, 置 2 mL(2 号)、5 mL(3 号)、10 mL(4 号)、50 mL(5 号)、100 mL(6 号)量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 得系列混合对照品溶液, 测定峰面积。以质量浓度为横坐标(X)、峰面积积分为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 1, 色谱图见图 1。

2.4.2 精密度试验 4 号混合对照品溶液连续进样 6 次, 记录补骨脂中所测成分的峰面积积分值, 计算得补骨脂中补骨脂素、异补骨脂素、异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、补骨脂定、异补骨脂查耳酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂酚质量分数的 RSD 值分别为 1.48%、1.81%、1.65%、2.34%、1.74%、2.48%、2.95%、1.90%、2.02%、0.48%。

2.4.3 稳定性试验 取称取同一炮制品(炒 4.5 min)溶液分别在 0、2、4、6、8、10、24 h 进样, 按照“2.1”项分别测定各指标成分的峰面积, 各成分峰面积的 RSD 值均<2.0%。

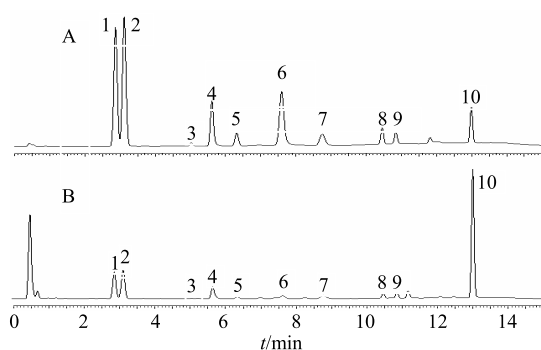
2.4.4 重复性试验 称取同一炮制品(炒 4.5 min)6 份, 按“2.3”项制备供试品溶液, 按照“2.1”项测定并计算各指标成分质量分数, 各成分峰面积的 RSD 值均<2.5%。

2.4.5 加样回收率试验 分别称取同一炮制品(炒 4.5 min)(过 3 号筛)0.5 g, 精密称定, 分别精密

表 1 10 种成分的线性回归方程

Table 1 Linear regression equations of 10 components

对照品	标准曲线	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
补骨脂素	$Y=26\,554X+13\,109$	0.999 3	2.07~207.00
异补骨脂素	$Y=28\,742X+9\,518$	0.999 3	2.08~208.00
异补骨脂二氢黄酮	$Y=1\,219X-826$	0.998 4	0.97~97.00
新补骨脂异黄酮	$Y=17\,700X-7\,062$	0.998 2	1.00~100.00
补骨脂二氢黄酮	$Y=5\,477X+292$	0.999 0	1.58~158.00
补骨脂宁	$Y=31\,986X-19\,053$	0.998 6	1.03~103.00
补骨脂定	$Y=10\,270X-11\,070$	0.998 9	1.21~121.00
异补骨脂查耳酮	$Y=6\,938X-4\,599$	0.997 7	1.10~110.00
补骨脂二氢黄酮甲醚	$Y=4\,754X-1\,005$	0.999 1	1.02~102.00
补骨脂酚	$Y=4\,621X+24\,947$	0.998 4	2.36~236.00



1-补骨脂素 2-异补骨脂素 3-异补骨脂二氢黄酮 4-新补骨脂异黄酮 5-补骨脂二氢黄酮 6-补骨脂宁 7-补骨脂定 8-异补骨脂查耳酮 9-补骨脂二氢黄酮甲醚 10-补骨脂酚

1-psoralen 2-isopsoralen 3-isobavainen 4-neobavaisoflavone 5-corylifolin 6-corylin 7-psoralidin 8-isobavachalcone 9-bavachinin 10-bakuchiol

图 1 混合对照品溶液 (A) 和供试品溶液 (B) UPLC 图谱
Fig. 1 UPLC chromatograms of mixed reference substance (A) and test sample (B)

加入同等质量的各对照品,按“2.3”项制备供试品溶液,按“2.1”项中色谱条件考察结果,同时测定补骨脂中补骨脂素、异补骨脂素、异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮、补骨脂宁、补骨脂定、异补骨脂查耳酮、补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂酚的量,计算回收率。结果平均回收率分别为 97.6%、99.4.0%、96.2%、104.3%、101.5%、101.1%、96.4%、102.3%、103.2%、103.7%,RSD 分别为 1.24%、0.97%、0.58%、2.11%、1.56%、1.18%、0.94%、2.25%、2.31%、1.09%。各成分的加样回收率在 96%~105%,RSD 值<3%。

2.4.6 样品测定 用上述方法测定不同炮制时间补骨脂中的 10 种成分的峰面积,以干燥品计质量分数。色谱图见图 1,各成分质量分数见表 2,补骨脂

中香豆素类、黄酮类、补骨脂酚及 10 种成分总量变化曲线见图 2。

3 讨论

根据所测定 10 种化学成分的性质,本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-冰醋酸、乙腈-磷酸水溶液等流动相系统,结果显示甲醇-水系统柱压变化较大,基线漂移,流动相加酸后对色谱峰的分离效应以及峰型影响不大,故采用乙腈-水溶液作为梯度洗脱流动相,并优化流动相比比例,使 10 种化学成分色谱峰在 15 min 内分离度、对称性和理论塔板数均符合要求。

本实验中补骨脂中香豆素类成分量(以干燥品计)变化较为明显:炒制 0~6.5 min 质量分数逐渐减少,6.5~10.5 min 质量分数增加,10.5~12.5 min 质量分数又有所降低,呈现“先降后升再降”的趋势,该研究结果与杨滨等^[8]的研究结果有相似之处。前期他人研究认为:补骨脂炮制后种皮破裂,更易溶出,黄酮和补骨脂酚量升高^[4]。本实验在制备供试品溶液时采用补骨脂粉末提取,消除了种皮破裂对成分含量的影响。结果显示,黄酮类、补骨脂酚成分随着炒制时间的增加,质量分数逐渐降低,这种下降趋势特别是油脂类成分量降低,是否与补骨脂盐炙后“缓和燥性”有关,还需要确证。综合分析香豆素类、黄酮类成分量之和,也呈现与香豆素类成分相似的“先降后升再降”的趋势。

整体而言,随着炒制时间的延长,指标成分含量最终总体呈现下降趋势,提示随着加热时间的延长和程度的加深,补骨脂中化学成分会受到破坏。值得注意的是,香豆素类、香豆素+黄酮类成分在炒制一定时间内其量上升,可能原因是加热促进了补骨脂中香豆素糖苷类成分与香豆素类成分互相转

表 2 不同炮制时间补骨脂中 10 种成分的质量分数 ($n = 3$)

Table 2 Determination of 10 components in *Psoralea Fructus* with salt solution by different processing time ($n = 3$)

炮制时间/min	质量分数/%									
	补骨脂素	异补骨脂素	异补骨脂二氢黄酮	新补骨脂异黄酮	补骨脂二氢黄酮	补骨脂宁	补骨脂定	异补骨脂查耳酮	补骨脂二氢黄酮甲醚	补骨脂酚
0	0.63	0.63	0.22	0.42	0.20	0.09	0.38	0.40	0.63	9.12
2.5	0.55	0.57	0.26	0.42	0.22	0.10	0.41	0.40	0.62	8.51
4.5	0.56	0.55	0.11	0.4	0.19	0.09	0.39	0.38	0.57	8.50
6.5	0.56	0.53	0.13	0.39	0.17	0.09	0.38	0.35	0.53	8.15
8.5	0.62	0.54	0.16	0.42	0.15	0.10	0.43	0.34	0.47	8.13
10.5	0.78	0.62	0.22	0.41	0.13	0.10	0.42	0.30	0.43	8.21
12.5	0.70	0.56	0.24	0.38	0.10	0.09	0.39	0.27	0.39	7.42

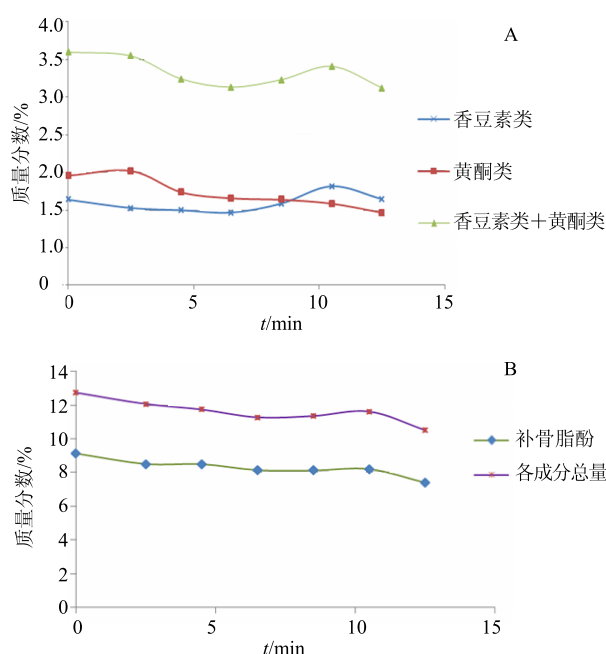


图 2 不同炮制时间下补骨脂中香豆素类、黄酮类 (A) 和补骨脂酚及各成分总量 (B) 变化曲线

Fig. 2 Change curves of coumarins and flavones (A), bakuchiol and total components (B) in *Psoralea Fructus* by different processing time

化;此外,黄酮类成分与香豆素类成分结构有相似之处,黄酮类成分加热后是否可以先生成其他物质,在进一步加热炒制逐渐生成香豆素类成分,还有待确证。另外,这种化学成分的变化趋势与补骨脂盐炙后可以引药入肾,即增强补肾助阳、纳气止泻作

用^[6]有何联系也需要进一步研究。

从本实验研究结果看,如仅考虑化学成分量高低,补骨脂“文火炒干”即可(本实验中炒制 8.5 min 及之后样品含水量低于 9%),时间太短含水量较高,太长成分损失较大。这与炙法药物一般应“文火炒干”^[9],以利于储存和保存药效的观点一致。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 吴 疆,魏 巍. 补骨脂的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 217-219.
- [3] 梁 正,杨 春,李 峥,等. 异补骨脂查耳酮抑制 IL-4 产生及其机制研究 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1299-1304.
- [4] 郭晏华,罗志冬,贾天柱. 补骨脂炮制前后补骨脂素和异补骨脂素的变化 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1652-1653.
- [5] 励 娜,张小梅,姚媛媛,等. D-最优设计响应面法结合 UHPLC 优选补骨脂药材炮制工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 233-239.
- [6] 丁黎艳,周 璐,王丽娜,等. 一测多评法测定补骨脂中不同类型成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 152-154.
- [7] 颜翠萍,吴 育,翁泽斌,等. 盐制对补骨脂中主要化学成分的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(11): 2470-2474.
- [8] 杨 滨,姚三桃,崔淑莲. 补骨脂古今主要炮制方法的比较 [J]. 中国中药杂志, 1996, 21(9): 537-539.
- [9] 贾天柱. 中药炮制学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008.