

一测多评法同时测定补骨脂中 16 种化学成分的含量

谭 鹏¹, 许 莉¹, 牛 明², 张定堃³, 文永盛¹, 黄春燕^{1*}, 王 梅⁴

1. 成都市食品药品检验研究院 国家药品监督管理局中药材质量监测评价重点实验室, 四川 成都 610045
2. 中国人民解放军总医院第五医学中心 全军中医药研究所, 北京 100039
3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137
4. 莱顿大学 LU-欧洲中医药与天然产物研究中心, 荷兰 莱顿 2333BE

摘要:目的 建立补骨脂中 16 个化学成分的一测多评分析方法, 结合化学计量学评价不同批次补骨脂药材的质量差异。方法 采用高效液相色谱法, 以异补骨脂素为内参物, 测得待测成分的相对校正因子, 在不同色谱仪和色谱柱上考察每个化学成分的相对校正因子的稳定性和耐用性; 比较一测多评法和外标法测定结果的差异, 以此验证一测多评法在补骨脂中应用的准确性。结果 在建立的色谱条件下, 补骨脂中 15 种化学成分相对于异补骨脂素的相对校正因子准确性较高, 耐用性较好, 且在不同实验条件下重现性良好; 2 种分析方法所得结果无显著差异。不同批次间补骨脂的化学成分群一致性较好, 但不同化学成分的含量差异较大。结论 新建立的同时测定补骨脂中 16 个化学成分的一测多评法, 能为更加全面地评价不同来源补骨脂的整体质量提供参考。

关键词: 补骨脂; 一测多评; 相对校正因子; 异补骨脂素; 异补骨脂二氢黄酮; 补骨脂甲素; 化学计量学; 质量评价

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)16-3937-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.029

Simultaneous determination of 16 chemical components in *Psoraleae Fructus* based on quantitative analysis of multi-component with single-marker

TAN Peng¹, XU Li¹, NIU Ming², ZHANG Ding-kun³, WEN Yong-sheng¹, HUANG Chun-yan¹, WANG Mei⁴

1. Chengdu Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610045, China
2. Department of China Military Institute of Chinese Materia, The Fifth Medical Centre, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100039, China
3. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
4. LU-European Center for Chinese Medicine and Natural compounds, Institute of Biology, Leiden University, Leiden 2333BE, Netherlands

Abstract: Objective The purpose of this study was to establish a QAMS analytical method for 16 compounds in *Psoraleae Fructus*, and attempt to evaluate the quality difference among different batches of *Psoraleae Fructus* by chemometrics. **Methods** All experiments were performed on three different HPLC instruments. Isopsoralen was used as the internal reference substance to determine the relative correction factors of the other 15 compounds. The robustness and durability of the measured relative correction factors of the 15 compounds were evaluated on different chromatograph instruments and columns; And the measurement result deviation was compared between QAMS method and the external standard method. **Results** Under the established chromatographic conditions, the relative correction factors of 15 compounds in *Psoraleae Fructus* had high accuracy, good durability, and good reproducibility under different experimental conditions. The results obtained from two analysis methods showed no significant deviation. The results obtained by the new established QAMS analytical method showed that the consistency of compound types among different batches of *Psoraleae Fructus* were better, but the content of different compounds was relatively different. **Conclusion** The newly established QAMS analytical method for simultaneous determination of 16 compounds in *Psoraleae Fructus* provides a more efficient method to evaluate the comprehensive quality of *Psoraleae Fructus* from different sources.

Key words: *Psoraleae Fructus*; QAMS; relative correction factor; isopsoralen; bavachin; corylifolin; chemometrics; quality evaluation

收稿日期: 2019-03-02

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1707000); 四川省科技厅项目 (2019YJ0640); 成都市科技局项目 (2016-HM01-00312-SF)

作者简介: 谭 鹏 (1987—), 男, 中药学博士, 主要从事中药材品质评价研究。Tel: (0839)85362592 E-mail: 2013tanpeng@sina.com

*通信作者 黄春燕, 副研究员, 主要从事中药材质量标准研究。Tel: (0839)85000721 E-mail: 9730980@qq.com

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 味辛、苦, 性温, 归肾、脾经, 功能温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻; 外用消风祛斑。临床常用于治疗肾阳不足、遗尿尿频、腰膝冷痛、五更泄泻; 外用治白癜风、斑秃等^[1]。现代研究表明, 补骨脂及其所含化学成分具有免疫调节^[2]、抗骨质疏松^[3-6]、抗菌杀虫^[7-8]、抗氧化^[9-10]、抗肿瘤^[11-14]、雌激素样^[15-17]等多种药理作用, 具有较好的药用开发价值。文献报道显示^[18-20], 补骨脂在临床使用时存在一定的光毒性和肝毒性, 因此补骨脂及含有补骨脂的中药复方制剂的临床应用安全性受到公众越来越多的关注^[21-22]。补骨脂中的化学成分主要包括呋喃香豆素类、黄酮类、查耳酮类、单萜酚类、拟雌内酯类等^[23-25], 其中含有的补骨脂素、异补骨脂素等呋喃香豆素类成分既是治疗白癜风等皮肤病的有效成分^[26-27], 也是产生光毒性的毒性成分^[28-29]。目前, 补骨脂药材的质量控制方法主要是采用高效液相色谱法测定补骨脂素和异补骨脂素的含量, 并规定两者之和不得少于 0.7%^[1]。显然, 对于补骨脂这种所含化学成分即是有效成分又是有毒成分的中药而言, 其现行质控方法尚不足以全面表征补骨脂的质量差异。因此, 建立一种多组分化学表征的分析方法来评价补骨脂的质量差异是非常必要的, 对其临床用药的安全性意义重大。

本实验尝试建立补骨脂中 16 个化学成分的一测多评(quantitative determination analysis multi-component by a single-marker, QAMS)分析方法, 用于评价不同批次补骨脂的质量差异, 并结合化学计量学方法阐述补骨脂的质量差异内涵, 以期为更加全面、合理地评控补骨脂的质量提供一种参考方法。

1 仪器与材料

Alliance e2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司, 配有自动进样器, 光电二极管阵列检测器, Empower 色谱工作站; XPE 26 百万分之一电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; 10~100 μ L 移液枪, 德国 Eppendorf 公司; 超声仪, 50 kHz, 上海科导超声仪器有限公司; Milli-Q 超纯水制备系统, 美国 Millipore 公司。

补骨脂对照药材(批号 121056-201605)由中国食品药品检定研究院提供。对照品补骨脂苷(批号 18010502, 质量分数 98.15%)、异补骨脂苷(批号 18010404, 质量分数 98.74%)、8-羟基补骨脂素(批号 16090904, 质量分数 98.46%)、补骨脂素(批号 17110104, 质量分数 99.99%)、异补骨脂素(批号

16062807, 质量分数 99.96%)、8-甲氧基补骨脂素(批号 17111503, 质量分数 99.98%)、异补骨脂二氢黄酮(批号 16081707, 质量分数 99.34%)、新补骨脂异黄酮(批号 17030301, 质量分数 98.13%)、补骨脂甲素(批号 16122801, 质量分数 99.21%)、补骨脂宁(批号 17092503, 质量分数 99.95%)、补骨脂定(批号 16042601, 质量分数 98.12%)、补骨脂乙素(批号 17030902, 质量分数 99.07%)、补骨脂二氢黄酮甲醚(批号 16070103, 质量分数 99.74%)、corylifol A(批号 17031402, 质量分数 98.06%)、4'-O-甲基补骨脂查耳酮(批号 171013, 质量分数 99.64%)、补骨脂酚(批号 170331 质量分数, 99.49%), 均购于由成都普菲德生物科技有限公司。色谱级 85%磷酸水溶液、甲醇、乙腈, 美国 Fisher 公司; 其余试剂为分析纯。

1 批次(批号 BGZ01)补骨脂盐炙品购买于成都福康缘药店; 9 批次补骨脂药材采集于成都荷花池药材市场, 编号为 BGZ02~BGZ10, 经成都市食品药品检定研究院文永盛主任中药师鉴定为补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 粉碎, 过三号筛, 备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 柱温为 32 $^{\circ}$ C, 柱平衡时间为 15 min; 流动相为乙腈和 0.1%磷酸水溶液的混合溶液, 梯度洗脱程序为 0~10.00 min, 13%乙腈; 10.01~35.00 min, 13%~35%乙腈; 35.01~45.00 min, 35%~70%乙腈; 45.01~55.00 min, 70%~85%乙腈; 55.01~60.00 min, 85%乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μ L; 检测波长为 246 nm; 理论塔板数以异补骨脂素峰计不低于 3 000。

2.2 混合对照品溶液的制备

以色谱级甲醇作溶剂, 精密称取补骨脂苷等 16 个对照品适量, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 先用 0.5 mL 二甲基亚砜溶解, 再用甲醇定容至刻度, 超声处理 5 min, 配制成质量浓度为 4~80 μ g/mL 的混合对照品溶液, 采用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

准确称取各批次补骨脂粉末 0.26 g, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称定质量, 水浴加热回流 60 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 采用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

按照《中国药典》2015 年版四部中“药品质量标准分析方法验证指导原则”进行方法学验证考察^[30]。

2.4.1 线性关系、检测限和定量限考察 将已知质量浓度的混合对照品溶液分别稀释成系列不同质量浓度的混合对照品溶液,分别进样测定,每次 10.0 μL ,记录各待测物质的色谱峰面积。以峰面积为纵

坐标 (Y),进样质量为横坐标 (X) 绘制标准曲线,进行线性回归,得到回归方程,见表 1。结果表明 16 个待测成分在一定进样质量范围内的线性关系良好。用已知质量浓度的对照品溶液不断稀释,直至得出能被可靠地检测出(性噪比 S/N 为 3:1)和定量检测的最低质量浓度(性噪比 S/N 为 10:1),结果见表 1。

表 1 16 个化学成分的线性关系、检测限和定量限测定结果

Table 1 Linearity, LOD and LOQ of 16 components by HPLC analysis

化学成分	t_R/min	线性方程	r	线性范围/ μg	检测限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
骨脂昔	12.379	$Y=3\ 836.9 X+62\ 158$	0.999 2	0.040~0.600	2.0	4.0
异补骨脂昔	13.883	$Y=3\ 791.9 X+79\ 322$	0.999 1	0.045~0.675	2.1	4.3
8-羟基补骨脂素	25.098	$Y=3\ 814.3 X+995.2$	0.999 3	0.008~0.120	0.4	0.8
补骨脂素	34.116	$Y=7\ 841.7 X+2\ 607.2$	0.999 4	0.008~0.120	0.5	0.8
异补骨脂素	35.399	$Y=8\ 070 X+1\ 910.7$	0.999 5	0.008~0.120	0.5	0.8
8-甲氧基补骨脂素	35.941	$Y=3\ 435.5 X+5\ 438.6$	0.999 1	0.008~0.120	0.5	0.6
异补骨脂二氢黄酮	43.413	$Y=1\ 519.7 X+2\ 888.9$	0.999 3	0.008~0.120	0.4	0.6
新补骨脂异黄酮	44.306	$Y=4\ 118.3 X+10\ 096$	0.999 1	0.008~0.120	0.2	0.4
补骨脂甲素	45.023	$Y=28\ 706 X+4\ 997.2$	0.999 4	0.008~0.120	0.2	0.4
补骨脂宁	45.965	$Y=2\ 143.4 X+4\ 680.4$	0.999 3	0.007~0.105	0.2	0.4
补骨脂定	46.295	$Y=8\ 457.8 X+10\ 317$	0.999 4	0.007~0.105	0.2	0.4
补骨脂乙素	47.808	$Y=2\ 786.8 X+2\ 776.9$	0.999 3	0.004~0.060	0.4	0.8
补骨脂二氢黄酮甲醚	48.554	$Y=2\ 808.7 X+3\ 244.2$	0.999 2	0.004~0.060	0.2	0.4
corylifol A	48.877	$Y=3\ 050.3 X+11\ 322$	0.999 4	0.016~0.240	0.4	0.8
4'-O-甲基补骨脂查耳酮	50.668	$Y=3\ 348.7 X+6\ 573.9$	0.999 4	0.010~0.150	0.3	1.0
补骨脂酚	53.987	$Y=1\ 022.5 X-1\ 291.4$	0.999 3	0.080~1.200	5.0	8.0

2.4.2 精密度试验 取混合对照品溶液,按“2.1”项色谱条件连续进样 6 次,每次 5.0 μL ,记录各待测成分的色谱峰面积。计算补骨脂昔等 16 个化学成分色谱峰面积的 RSD。结果显示,RSD 均小于 3.16%,表明仪器的精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批(批号 BGZ08)补骨脂样品粉末 0.26 g,准确称定,按上述方法制备供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、8、24、48 h 进样测定,记录各待测物质的色谱峰面积,计算 RSD 值。结果显示,待测物质在 48 h 内色谱峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

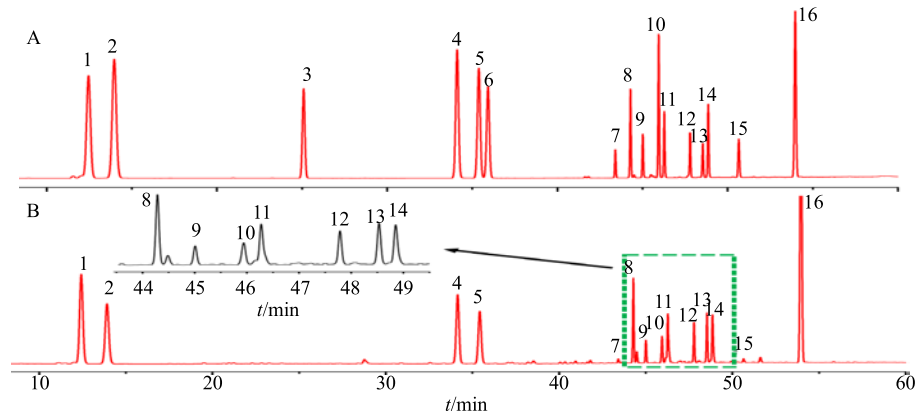
2.4.4 重复性试验 精密称定同一批次(批号 BGZ08)补骨脂样品粉末 0.26 g,平行 6 份,按照上述方法平行制备 6 份供试品溶液。进样测定,记录各色谱峰峰面积,计算各待测成分的重复性,结果显示方法的重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 准确称定已测定含量(BGZ08)的补骨脂样品粉末 0.13 g,平行 6 份,准确称定,置于 50 mL 棕色量瓶中,分别加入与样品

中含有相同质量的对照品(采用移液枪吸取对照品单标溶液形式加入),其中补骨脂昔、异补骨脂昔、补骨脂素、异补骨脂素、异补骨脂二氢黄酮、新补骨脂异黄酮、补骨脂甲素、补骨脂宁、补骨脂定、补骨脂乙素、补骨脂二氢黄酮甲醚、corylifolA、4'-O-甲基补骨脂查耳酮、补骨脂酚分别为 1.8、1.5、0.14、0.14、0.01、0.27、0.16、0.03、0.30、0.27、0.46、0.18、0.01、3.91 mg,按照上述方法平行制备 6 份供试品溶液。进样测定,记录各色谱峰面积,计算各化学成分的加样回收率。结果显示补骨脂昔、异补骨脂昔等 14 个化合物的加样回收率平均值为 93.19%~104.17%,相应的 RSD 值均小于 5.0%,表明方法的准确性较好。

2.5 待测成分色谱峰的定位

待测成分色谱峰的准确定位是建立 QAMS 的前提和关键,本实验根据相对保留时间来准确定位待测成分的色谱峰。以异补骨脂素作为内参物,以其保留时间为参照,计算得到其余 15 个化学成分的相对保留时间,混合对照品溶液和供试品溶液(BGZ08) HPLC-UV 图谱见图 1,结果见表 2。



1-补骨脂苷 2-异补骨脂苷 3-8-羟基补骨脂素 4-补骨脂素 5-异补骨脂素 6-8-甲氧基补骨脂素 7-异补骨脂二氢黄酮 8-新补骨脂异黄酮
9-补骨脂甲素 10-补骨脂宁 11-补骨脂定 12-补骨脂乙素 13-补骨脂二氢黄酮甲醚 14-corylifol A 15-4'-O-甲基补骨脂查耳酮 16-补骨脂酚

1-psoralenoside 2-isopsoralenoside 3-xanthoto 4-psoralen 5-isopsoralen 6-8-methoxypsoralen 7-isobavachin 8-neobavaso flavone
9-corylifolin 10-corylin 11-psoralidin 12-isobavachalcone 13-bavachinin A 14-corylifol A 15-4'-O-methylbroussoschalcone 16-bakuchiol

图 1 混合对照品溶液 (A) 和 BGZ08 供试品溶液 (B) 的典型 HPLC-UV 色谱图

Fig. 1 Typical HPLC-UV chromatograms of mixed substances solution (A) and sample BGZ08 solution (B)

表 2 15 个待测化学成分的相对保留时间测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Results of relative retention time of 15 chemical components ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

待测成分	保留时间/min	相对保留时间	待测成分	保留时间/min	相对保留时间
补骨脂苷	12.379	0.350	补骨脂宁	45.965	1.298
异补骨脂苷	13.883	0.392	补骨脂定	46.295	1.308
8-羟基补骨脂素	25.098	0.709	补骨脂乙素	47.808	1.351
补骨脂素	34.116	0.964	补骨脂二氢黄酮甲醚	48.554	1.372
8-甲氧基补骨脂素	35.941	1.015	corylifol A	48.877	1.381
异补骨脂二氢黄酮	43.413	1.226	4'-O-甲基补骨脂查耳酮	50.668	1.431
新补骨脂异黄酮	44.306	1.252	补骨脂酚	53.987	1.525
补骨脂甲素	45.023	1.272			

2.6 相对校正因子 (f) 确定

根据王智民等^[31]的一测多评法的技术指南,以异补骨脂素峰为内参物,按照公式(1)计算得到其余 15 个待测成分的 f , 结果见表 3。

$$f_{si} = \frac{f_s}{f_i} = \frac{A_s / C_s}{A_i / C_i} \quad (1)$$

f_{si} 为内参物 s 对待测成分 i 的校正因子。 A_s 代表内参物对照品的峰面积, C_s 代表内参物对照品的进样浓度, A_i 代表某待测成分对照品 i 的峰面积, C_i 代表某待测成分对照品 i 的进样浓度。根据公式(1)可以推导出公式(2)。

$$C_i = f_{si} \times C_s \times \frac{A_s}{A_i} \quad (2)$$

根据公式(2), 计算出待测样品中目标成分的进样质量浓度。式中 A_i 为供试品中待测成分 i 的峰

面积, C_i 为供试品中待测成分 i 的质量浓度, A_s 为供试品中内参物 s 的峰面积, C_s 为供试品中内参物 s 的质量浓度。

2.7 校正因子的耐用性考察

2.7.1 不同色谱仪对 f 的影响 为了考察上述 f 的耐用性, 实验过程中分别考察了同一根色谱柱在 3 种不同品牌的 HPLC 色谱仪上的 f 。结果显示, 在不同仪器上测得的校正因子非常接近, 偏差极小, 表明测得的 f 准确性较高, 耐用性较好。结果见表 4。

2.7.2 不同色谱柱对 f 的影响 为了考察上述 f 的耐用性, 实验过程中在同一高效液相色谱仪上分别考察了 4 种不同品牌的 HPLC 色谱柱对各待测成分的 f 测定的影响。结果显示, 由不同色谱柱测得的 f 非常接近, 偏差较小, 表明测得的 f 的耐用性较好, 结果见表 5。

表 3 15 个待测化学成分的 f 测定结果 ($n = 6$)Table 3 Results of relative correction factors for 15 chemical components ($n = 6$)

进样体积/ μL	$f_{\text{PDE/IE}}$	$f_{\text{IDE/IE}}$	$f_{\text{XOL/IE}}$	$f_{\text{PEN/IE}}$	$f_{8\text{-MOP/IE}}$
2	2.64	2.46	0.77	1.00	0.76
4	2.66	2.44	0.78	1.00	0.77
6	2.64	2.49	0.80	0.99	0.78
10	2.66	2.44	0.78	0.99	0.77
12	2.66	2.45	0.79	0.99	0.78
14	2.74	2.48	0.79	0.99	0.78
平均值	2.67	2.46	0.79	0.99	0.77
RSD/%	1.36	0.83	1.02	0.34	1.11
进样体积/ μL	$f_{\text{IIN/IE}}$	$f_{\text{NNE/IE}}$	$f_{\text{BIN/IE}}$	$f_{\text{CIN/IE}}$	$f_{\text{PIN/IE}}$
2	4.64	1.63	3.45	0.91	2.11
4	4.67	1.68	3.37	0.89	2.07
6	4.72	1.66	3.39	0.88	2.04
10	4.67	1.64	3.36	0.89	2.05
12	4.83	1.65	3.39	0.89	2.05
14	4.76	1.65	3.40	0.89	2.03
平均值	4.72	1.65	3.39	0.89	2.06
RSD/%	1.49	0.94	0.95	1.22	1.40
进样体积/ μL	$f_{\text{NE/IE}}$	$f_{\text{BNA/IE}}$	$f_{\text{COL/IE}}$	$f_{4'\text{-MEB/IE}}$	$f_{\text{BOL/IE}}$
2	3.39	4.23	2.20	3.63	3.84
4	3.40	4.16	2.18	3.51	3.79
6	3.40	4.07	2.11	3.56	3.81
10	3.41	4.14	2.12	3.57	3.82
12	3.39	4.13	2.10	3.62	3.80
14	3.38	4.13	2.12	3.59	3.81
平均值	3.39	4.14	2.14	3.58	3.81
RSD/%	0.29	1.27	1.91	1.22	0.51

PDE-补骨脂苷 IDE-异补骨脂苷 XOL-8-羟基补骨脂素 PEN-补骨脂素 IEN-异补骨脂素 8-MOP-8-甲氧基补骨脂素 IIN-异补骨脂二氢黄酮 NNF-新补骨脂异黄酮 BIN-补骨脂甲素 CIN-补骨脂宁 PIN-补骨脂定 INE-补骨脂乙素 BNA-补骨脂二氢黄酮甲醚 COL-corylifol A 4'-MEB-4'-O-甲基补骨脂查耳酮 BOL-补骨脂酚, 表 4 和 5 同

PDE-psoralenoside IDE-isopsoralenoside XOL-xanthotol PEN-psoralen IEN-isopsoralen 8-MOP-8-methoxypsoralen IIN-isobavachin NNF-neobavasoflavone BIN-bavachin CIN-corylin PIN-psoralidin INE-isobavachalcone BNA-bavachinin A COL-corylifol A 4'-MEB-4'-O-methylbroussoschalcone BOL-bakuchiol, same as tables 4 and 5

表 4 在不同色谱仪器上对 f 的耐用性考察结果 ($n = 3$)Table 4 Robustness evaluation results of relative correction factors on different chromatographic instruments ($n = 3$)

色谱仪器	$f_{\text{PDE/IE}}$	$f_{\text{IDE/IE}}$	$f_{\text{XOL/IE}}$	$f_{\text{PEN/IE}}$	$f_{8\text{-MOP/IE}}$
Waters e2695	2.67	2.46	0.79	0.99	0.77
Thermo Ultimate 3000	2.65	2.40	0.80	0.98	0.81
Aglient 1260	2.62	2.38	0.82	1.02	0.80
平均值	2.64	2.42	0.80	1.00	0.80
RSD/%	0.96	1.69	1.98	2.29	2.46
色谱仪器	$f_{\text{IIN/IE}}$	$f_{\text{NNE/IE}}$	$f_{\text{BIN/IE}}$	$f_{\text{CIN/IE}}$	$f_{\text{PIN/IE}}$
Waters e2695	4.72	1.65	3.39	0.89	2.06
Thermo Ultimate 3000	4.74	1.66	3.30	0.90	2.01
Aglient 1260	4.75	1.62	3.33	0.88	1.99
平均值	4.74	1.64	3.34	0.89	2.02
RSD/%	0.39	1.39	1.44	1.18	1.75
色谱仪器	$f_{\text{NE/IE}}$	$f_{\text{BNA/IE}}$	$f_{\text{COL/IE}}$	$f_{4'\text{-MEB/IE}}$	$f_{\text{BOL/IE}}$
Waters e2695	3.39	4.14	2.14	3.58	3.81
Thermo Ultimate 3000	3.42	4.16	2.11	3.60	3.78
Aglient 1260	3.41	4.15	2.09	3.56	3.79
平均值	3.41	4.15	2.11	3.58	3.80
RSD/%	0.38	0.20	1.35	0.59	0.43

表 5 在不同色谱柱上对 f 的耐用性考察结果 ($n = 3$)Table 5 Robustness evaluation results of relative correction factors on different chromatographic columns ($n = 3$)

色谱柱	$f_{\text{PDE/IE}}/n$	$f_{\text{IDE/IE}}/n$	$f_{\text{XOL/IE}}/n$	$f_{\text{PEN/IE}}/n$	$f_{\text{8-MOP/IE}}/n$
sepax Technologies sepax GP-C ₁₈	2.68	2.46	0.81	1.07	0.81
SunFire C ₁₈	2.69	2.34	0.82	1.02	0.79
Aglient ZORBAX Eclipse plus C ₁₈	2.66	2.50	0.78	1.01	0.80
Capcell pak G II	2.69	2.40	0.80	1.02	0.83
Thermo SCIENTIFIC C ₁₈	2.67	2.46	0.79	0.99	0.77
平均值	2.68	2.43	0.80	1.02	0.80
RSD/%	0.55	2.48	1.90	2.67	2.59

色谱柱	$f_{\text{IIN/IE}}/n$	$f_{\text{NNE/IE}}/n$	$f_{\text{BIN/IE}}/n$	$f_{\text{CIN/IE}}/n$	$f_{\text{PIN/IE}}/n$
sepax Technologies sepax GP-C ₁₈	4.78	1.67	3.43	0.93	1.97
SunFire C ₁₈	4.78	1.62	3.36	0.93	1.93
Aglient ZORBAX Eclipse plus C ₁₈	4.60	1.60	3.22	0.90	1.95
Capcell pak G II	4.69	1.61	3.29	0.93	1.93
Thermo SCIENTIFIC C ₁₈	4.72	1.65	3.39	0.89	2.06
平均值	4.71	1.63	3.34	0.92	1.97
RSD/%	1.54	1.76	2.58	2.11	2.81

色谱柱	$f_{\text{INE/IE}}/n$	$f_{\text{BNA/IE}}/n$	$f_{\text{COL/IE}}/n$	$f_{\text{4-MEB/IE}}/n$	$f_{\text{BOL/IE}}/n$
sepax Technologies sepax GP-C ₁₈	3.42	4.20	2.10	3.58	3.84
SunFire C ₁₈	3.41	4.09	2.13	3.57	3.96
Aglient ZORBAX Eclipse plus C ₁₈	3.36	3.92	2.10	3.56	3.78
Capcell pak G II	3.34	4.06	2.03	3.67	3.78
Thermo SCIENTIFIC C ₁₈	3.39	4.14	2.14	3.58	3.81
平均值	3.38	4.08	2.10	3.59	3.83
RSD/%	1.00	2.64	2.05	1.29	1.92

2.8 QAMS 法与外标法测定结果比较

取 10 批补骨脂药材粉末 0.26 g, 按上述方法制备供试品溶液, 进样测定。异补骨脂素作为内标物采用外标法测定, BGZ01~10 中, 异补骨脂素的质量分数分别为 0.89%、0.28%、0.73%、0.27%、0.34%、0.16%、0.19%、0.15%、0.13%、0.15%。其他 15 个化合物分别用 QAMS 法和外标法计算各待测成分的含量, 比较两者测得结果的差异性, 以此验证测得的校正因子的准确性。结果显示, 根据 QAMS 法对各待测成分的计算值与外标法实测值非常接近, 相对误差 < 5%。结果见表 6。

2.9 化学计量学分析

将测得的 10 批次补骨脂药材的 HPLC 谱图, 导入色谱指纹图谱相似度评价软件 (国家药典委员会, 2012 版本), 以中国食品药品检定研究院提供的补骨脂对照药材的色谱图作为参照谱图, 计算各批次样品的相似性, 见图 2。结果显示, 共计得到 21 个共有峰, 能够指认其中 14 个共有色谱峰; 10 批

次补骨脂药材和盐炙品与中国食品药品检定研究院标准图谱比较得到的相似度分别为 0.992、0.983、0.913、0.995、0.999、0.944、0.965、0.963、0.990、0.961, 提示 10 批次补骨脂在 246 nm 波长下反映的化学成分类别差异较小。

指纹图谱的相似度评价结果表明, 在 246 nm 波长下的化学成分特征峰差异较小, 但不同化学成分的量差异如何, 本实验通过热图来表征。以测得的 10 批次补骨脂药材和盐炙品中 14 个化合物的含量作为评价指标, 采用 Heml-1.0 软件进行热图和聚类分析 (图 3)。热图分析结果显示 10 批次的补骨脂药材质量差异主要体现在不同化学成分的含量上, 特别是补骨脂苷、异补骨脂二氢黄酮、补骨脂乙素和补骨脂酚的含量差异明显。聚类分析结果显示 10 批次补骨脂聚类区分并不明显, 这主要是由于 10 批次补骨脂中化学成分含量差异较大所导致。值得注意的是, 样品 BGZ01 为盐炙品, 与其他批次区分非常明显。统计分析结果表明 9 批次补骨脂和

表 6 QAMS 法与外标法结果比较 ($n = 3$)Table 6 Accuracy comparison between QAMS method and external standard method ($n = 3$)

批次	补骨脂苷/%		异补骨脂苷/%		8-羟基补骨脂素/%		补骨脂素/%		8-甲氧基补骨脂素/%	
	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法
BGZ01	1.74	1.73	1.56	1.55	ND	ND	0.88	0.88	ND	ND
BGZ02	2.12	2.11	1.70	1.69	ND	ND	0.33	0.33	ND	ND
BGZ03	0.85	0.85	0.70	0.70	ND	ND	0.78	0.78	ND	ND
BGZ04	1.92	1.91	1.40	1.39	ND	ND	0.36	0.36	ND	ND
BGZ05	2.06	2.06	1.64	1.63	ND	ND	0.40	0.40	ND	ND
BGZ06	2.52	2.51	2.27	2.25	ND	ND	0.19	0.19	ND	ND
BGZ07	2.35	2.34	1.82	1.80	ND	ND	0.23	0.23	ND	ND
BGZ08	2.80	2.79	2.32	2.30	ND	ND	0.21	0.21	ND	ND
BGZ09	1.97	1.96	1.55	1.54	ND	ND	0.17	0.17	ND	ND
BGZ10	2.60	2.59	2.16	2.15	ND	ND	0.21	0.21	ND	ND

批次	异补骨脂二氢黄酮/%		新补骨脂异黄酮/%		补骨脂甲素/%		补骨脂宁/%		补骨脂定/%	
	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法
BGZ01	0.84	0.83	0.80	0.80	0.94	0.93	0.80	0.80	0.80	0.79
BGZ02	0.04	0.04	0.32	0.32	0.23	0.23	0.05	0.05	0.44	0.44
BGZ03	0.01	0.01	0.28	0.28	0.18	0.18	0.09	0.09	0.39	0.39
BGZ04	0.04	0.04	0.38	0.38	0.24	0.24	0.07	0.07	0.52	0.52
BGZ05	0.06	0.06	0.33	0.33	0.24	0.23	0.06	0.06	0.46	0.46
BGZ06	0.02	0.02	0.36	0.36	0.25	0.25	0.05	0.05	0.42	0.42
BGZ07	0.02	0.02	0.36	0.36	0.21	0.20	0.05	0.05	0.44	0.44
BGZ08	0.02	0.02	0.42	0.42	0.25	0.24	0.05	0.05	0.46	0.46
BGZ09	0.09	0.09	0.43	0.43	0.37	0.36	0.05	0.05	0.46	0.45
BGZ10	0.02	0.02	0.45	0.44	0.23	0.23	0.05	0.05	0.41	0.41

批次	补骨脂乙素/%		补骨脂二氢黄酮甲醚/%		corylifol A/%		4'-O-甲基补骨脂查耳酮/%		补骨脂酚/%	
	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法
BGZ01	0.75	0.75	0.88	0.88	0.96	0.95	0.82	0.82	3.35	3.36
BGZ02	0.33	0.33	0.49	0.49	0.27	0.27	0.00	0.00	5.43	5.44
BGZ03	0.22	0.22	0.59	0.59	0.24	0.24	0.02	0.02	5.49	5.50
BGZ04	0.41	0.41	0.67	0.67	0.34	0.33	0.02	0.02	5.70	5.71
BGZ05	0.34	0.34	0.73	0.73	0.33	0.32	0.02	0.02	6.01	6.02
BGZ06	0.33	0.33	0.52	0.52	0.27	0.27	0.03	0.03	5.44	5.45
BGZ07	0.34	0.34	0.57	0.57	0.25	0.25	0.02	0.02	5.19	5.20
BGZ08	0.40	0.41	0.70	0.70	0.27	0.27	0.02	0.02	6.01	6.02
BGZ09	0.59	0.60	0.80	0.80	0.33	0.33	0.04	0.04	6.92	6.93
BGZ10	0.42	0.42	0.69	0.69	0.30	0.29	0.03	0.03	6.25	6.26

ND-未检出

ND-represents not detected

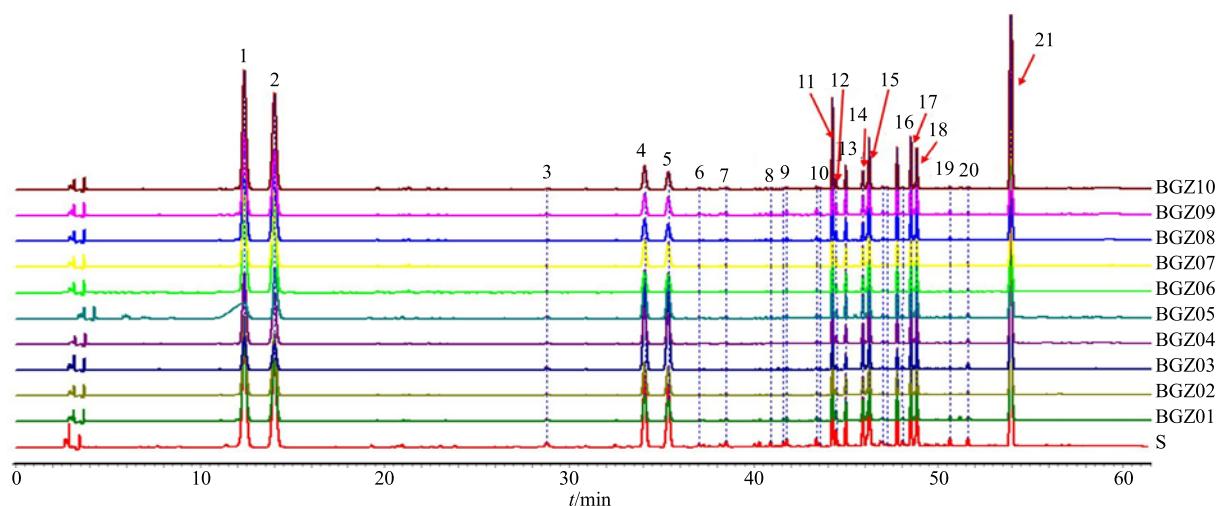


图 2 10 批次补骨脂样品的 HPLC-UV 指纹图谱

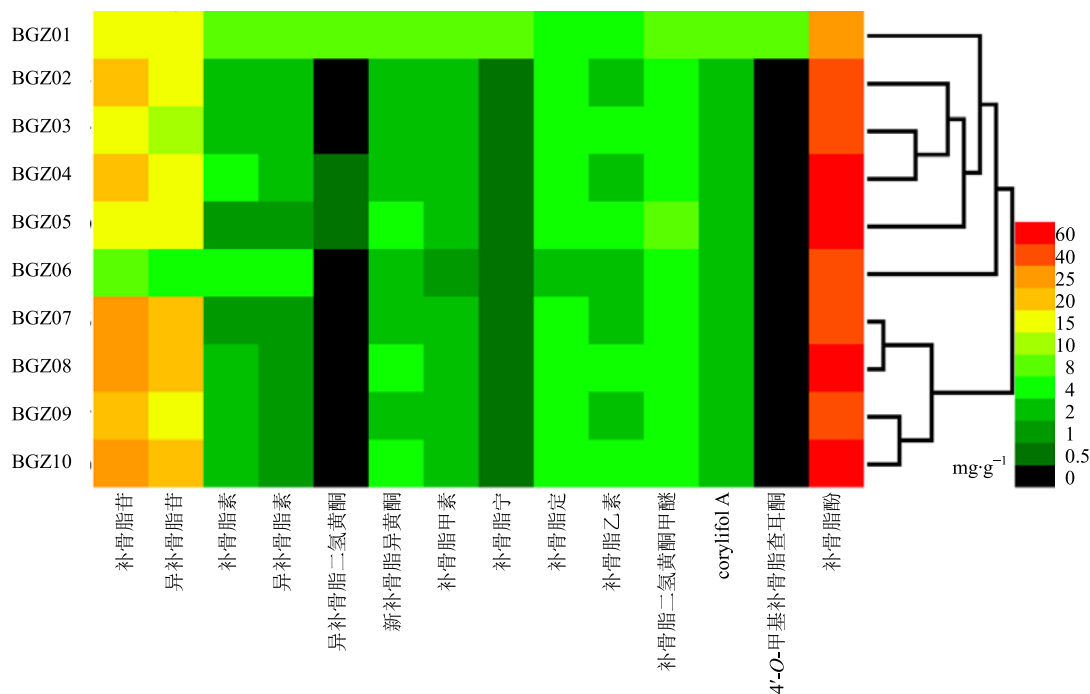
Fig. 2 Chromatographic fingerprint of 10 batches of *Psoraleae Fructus* samples

图 3 10 批次补骨脂样品中 14 个化学成分的含量热图分析和聚类分析

Fig. 3 Heat map and hierarchical clustering analysis of 14 chemical components in 10 batches of samples

1 批次盐炙品的化学成分类型一致性较好；其存在质量差异主要体现在不同化学成分的含量高低上面，这也提示尽可能多地定量测定补骨脂中不同类型成分对于评价不同来源的补骨脂的整体质量差异具有重要意义。

3 讨论

采用二极管阵列检测器对补骨脂苷、异补骨脂苷等 16 个化合物的对照品溶液在 210~400 nm 下

进行全波长扫描，得到各化合物的紫外吸收图。结果显示，其中 15 个待测成分在 246 nm 波长处均有较强的吸收，补骨脂定在 246、372 nm 波长处有较强吸收，结合供试品溶液色谱图分离情况，发现在 246 nm 波长处得到的色谱峰杂质峰较少，基线平稳，因此优选 246 nm 作为检测波长。在 246 nm 波长下，16 个化合物都能被较好地检测到，保障测定结果的准确性。鉴于异补骨脂素对照品价格相对

较低,化合物性质较稳定,并且出峰时间适中,因此优选异补骨脂素作为内参物。

课题组在前期质量检验过程中发现补骨脂新货中补骨脂素和异补骨脂素的总量较难达到《中国药典》2015 年版规定的不低于 0.7% 的限度,但补骨脂陈货则往容易达到标准限度,并且放置年限越长,补骨脂素和异补骨脂素总量越高。为防止用陈货冒充补骨脂新货入药,课题组建议增加补骨脂苷和异补骨脂苷的含量测定,并设定下限值。同时应进一步积累数据,修订补骨脂素和异补骨脂素总量的上、下限度。

鉴于补骨脂中相关化学成分的对照品不易获得,因此本实验建立了同时测定补骨脂中 16 种化学成分含量的 QAMS 方法,并且通过方法学考察、系统耐用性试验和与实测值的准确度对比分析,对 QAMS 法应用于补骨脂的可行性和准确性进行了探讨。本实验建立的同时测定补骨脂中 16 种化学成分含量的 QAMS 法对更加全面、合理地评控补骨脂的质量具有参考价值。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李笑甜, 宋忠臣. 补骨脂及其活性成分免疫调节作用研究进展 [J]. 现代免疫学, 2017, 37(1): 80-83.
- [3] 明磊国, 葛宝丰, 翟远坤, 等. 异补骨脂素对体外培养骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2124-2128.
- [4] 史春民, 王拥军, 苗登顺. 异补骨脂素促进大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化并抑制其向脂肪细胞分化 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(5): 606-611.
- [5] Chen S, Wang Y, Yang Y, *et al.* Psoralen inhibited apoptosis of osteoporotic osteoblasts by modulating IRE1-ASK1-JNK pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2017, doi:10.1155/2017/3524307.
- [6] Yuan X, Bi Y, Yan Z, *et al.* Psoralen and isopsoralen ameliorate sex hormone deficiency-induced osteoporosis in female and male mice [J]. *Biomed Res Int*, 2016, doi:10.1155/2016/6869452.
- [7] 王天晓, 尹震花, 张伟, 等. 补骨脂抗氧化、抑制 α -葡萄糖苷酶和抗菌活性成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2328-2333.
- [8] 关丽杰. 补骨脂抑菌活性成分及其制剂研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2008.
- [9] 张伟, 尹震花, 彭涛, 等. 补骨脂生品及炮制品抗氧化活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 250-254.
- [10] 常艳旭, 朱子微, 张伯礼, 等. 补骨脂抗氧化活性指纹图谱研究 [J]. 天津中医药, 2011, 28(2): 158-160.
- [11] 陈红莉, 冯慧瑾, 李援朝. 补骨脂酚的体外抗肿瘤活性及其关键中间体的合成研究 [J]. 药学报, 2010, 45(4): 467-470.
- [12] Lv L, Liu B. Anti-tumor effects of bakuchiol on human gastric carcinoma cell lines are mediated through PI3K/AKT and MAPK signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8977-8982.
- [13] Hao W, Zhang X, Zhao W, *et al.* Psoralidin induces autophagy through ROS generation which inhibits the proliferation of human lung cancer A549 cells [J]. *Peer J*, 2014, 2: e555.
- [14] Pahari P, Saikia U P, Das T P, *et al.* Synthesis of psoralidin derivatives and their anticancer activity: First synthesis of lespeflorin I [J]. *Tetrahedron*, 2016, 72(23): 3324-3334.
- [15] 赵丕文, 牛建昭, 王继峰, 等. 补骨脂素的植物雌激素作用及其机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(1): 59-63.
- [16] 寿清耀, 杨荣平, 徐嘉红, 等. 补骨脂雌激素样作用的有效成分研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(6): 425-427.
- [17] Liu X, Nam J W, Song Y S, *et al.* Psoralidin, a coumestan analogue, as a novel potent estrogen receptor signaling molecule isolated from *Psoralea corylifolia* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(5): 1403-1406.
- [18] 王宇, 蒋嘉明, 孔思远, 等. 补骨脂 ADME 及其相关毒性的研究进展 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(2): 276-281.
- [19] 姚凤玲, 陈洪, 吕岩, 等. 补骨脂引起急性光毒性接触性皮炎 12 例报告 (附光斑贴试验) [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2000(6): 410-411.
- [20] Middelkamp-Hup M A, Pathak M A, Parrado C, *et al.* Orally administered *Polypodium leucotomos* extract decreases psoralen-UVA-induced phototoxicity, pigmentation, and damage of human skin [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2004, 50(1): 41-49.
- [21] 田文杨, 高学敏, 孙晓波, 等. 补骨脂的安全性评价与风险控制措施探讨 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4059-4066.
- [22] 张玥, 毕亚男, 周昆, 等. 基于靶器官的补骨脂肝毒性成分探讨 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(8): 1844-1847.
- [23] 罗娟敏, 肖雪, 罗国安, 等. HPLC/TOF-MS 和 HPLC/IT-MSⁿ 联合用于补骨脂药材的化学成分分析 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 924-928.

- [24] 董 伟, 王月德, 叶艳青, 等. 补骨脂中 1 个二氢异黄酮类新化合物及其细胞毒活性 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2206-2208.
- [25] 颜冬梅, 高秀梅. 补骨脂化学成分研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(9): 96-99.
- [26] 胡彩霞, 张国强, 冯 佳, 等. 补骨脂汤联合中波高能紫外线照射治疗白癜风临床研究 [J]. 中医学报, 2016, 31(11): 1799-1802.
- [27] 杜文齐. 补骨脂汤治疗白癜风临床研究 [J]. 中医学报, 2015, 30(11): 1677-1679.
- [28] Middelkamp-Hup M A, Pathak M A, Parrado C, *et al.* Orally administered *Polypodium leucotomos* extract decreases psoralen-UVA-induced phototoxicity, pigmentation, and damage of human skin [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2004, 50(1): 41-49.
- [29] 张 炜. 补骨脂素的光毒性: 8-MOP 和 5-MOP 在豚鼠血清和表皮中浓度的关系 [J]. 国外医学: 皮肤病学分册, 1984(1): 58-59.
- [30] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [31] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.
- [32] 吴 疆, 魏 巍, 袁永兵. 补骨脂的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 217-219.
- [33] 曹金一. 补骨脂本草文献与质量研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2009.