

不同炮制工艺盐菟丝子中4种黄酮类成分的定量分析

刘艳芳*,姚惠凤#,陈文举,李秋莉(解放军第150中心医院药剂科,河南 洛阳 471031)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)15-2128-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.15.38

摘要 目的:考察不同炮制工艺对盐制菟丝子中4种黄酮类成分含量的影响。方法:以不同烘制温度(70、100、130、160、190、210℃)、烘制时间(10、15、30、45、60、75 min)、闷润时间(0.5、1、2、4、6 h)制备盐制菟丝子饮片。采用高效液相色谱法测定饮片中金丝桃苷、芦丁、槲皮素和山柰素的含量;色谱柱为Synergi 4u Hydro-Rp 80A,流动相为甲醇-0.1%磷酸(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为360 nm,柱温为35℃。结果:金丝桃苷、芦丁、槲皮素、山柰素检测进样量线性范围分别为0.416~12.48 μg($r=0.999\ 9$)、0.14~4.2 μg($r=0.999\ 9$)、0.185~5.55 μg($r=0.999\ 9$)、0.078~2.34 μg($r=0.999\ 8$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为95.55%~99.74%(RSD=2.12%, $n=6$)、95.96%~101.42%(RSD=2.01%, $n=6$)、95.76%~102.75%(RSD=2.77%, $n=6$)、99.42%~104.93%(RSD=2.02%, $n=6$)。烘制温度为160℃,烘制时间为60 min,闷润2 h时盐制菟丝子黄酮类成分含量最高。结论:不同炮制工艺对盐菟丝子中黄酮类成分含量有较大影响。
关键词 盐菟丝子;烘制温度;烘制时间;闷润时间;黄酮;高效液相色谱法

Quantitative Analysis of Four Flavonoids in Salt-processed *Cuscuta chinensis* with Different Processing Methods

LIU Yanfang, YAO Huifeng, CHEN Wenju, LI Qiuli (No.150 Central Hospital of PLA, Henan Luoyang 471031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effect of different processing methods on 4 kinds of flavonoids contents in salt-processed *Cuscuta chinensis*. METHODS: Salt-processed *C. chinensis* piece was processed with different baking temperature (70℃, 100℃, 130℃, 160℃, 190℃ and 210℃), baking time (10 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min and 75 min) and moistening time (0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h). HPLC was adopted for contents determination of hyperoside, rutin, quercetin and kaempferol: the column was Synergi 4u Hydro-Rp 80A with mobile phase of methanol - 0.1% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 360 nm, and column temperature was 35℃. RESULTS: The linear range was 0.416-12.48 μg for hyperoside ($r=0.999\ 9$), 0.14-4.2 μg for rutin ($r=0.999\ 9$), 0.185-5.55 μg for quercetin ($r=0.999\ 9$) and 0.078-2.34 μg ($r=0.999\ 8$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recoveries were 95.55%-99.74% (RSD=2.12%, $n=6$), 95.96%-101.42% (RSD=2.01%, $n=6$), 95.76%-102.75% (RSD=2.77%, $n=6$), 99.42%-104.93% (RSD=2.02%, $n=6$). The flavonoids in salt-processed *C. chinensis* showed highest contents when baking temperature was 160℃, baking time was 60 min and moistening time was 2 h. CONCLUSIONS: Different processing methods have certain effects on flavonoids contents in salt-processed *C. chinensis*.
KEYWORDS Salt-processed *Cuscuta chinensis*; Baking temperature; Baking time; Moistening time; Flavonoids; HPLC

菟丝子为中医临床常用药,系旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam.的干燥成熟种子,有滋补肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻的功效,盐制后能引药归肾,增强补肾固涩的作用,用于下元虚弱、阳痿早泄、腰膝酸软等^[1]。菟丝子含有黄酮、多糖、有机酸、脂肪酸、氨基酸、卵磷脂和脑磷脂等成分,其中盐制饮片的黄酮类化合物以槲皮素、芦丁及山柰酚为主,具有较高的抗氧化活性^[2]。目前的研究主要集中在不同炮制品中黄酮类成分的比较上^[3-5],对其炮制工艺还没有深入的研究。因此,本试验对不同工艺条件炮制的菟丝子盐制品中金丝桃苷、芦丁、槲皮素和山柰素含量变化进行了研究,为优选菟丝子炮制工艺,探讨其炮制机制提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

* 主管中药师,硕士。研究方向:医院制剂生产与质量管理。电话:0379-64169466。E-mail:liuyanfang0617@163.com

通信作者:主管药师。研究方向:医院制剂生产与质量管理。电话:0379-64169466。E-mail:yjkly150@163.com

LC-2010T型高效液相色谱仪,包括二极管阵列检测器(日本 Shimadzu 公司);AE240型十万分之一电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);TDL-40B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);KQ-500DV型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);HH-S型恒温水浴锅(北京中兴都科技有限公司);BS210S型万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

金丝桃苷对照品(批号:111521-200303,纯度:98.0%)、芦丁对照品(批号:100080-200707,纯度:92.5%)、槲皮素对照品(批号:100081-200406,纯度:97.3%)、山柰素对照品(批号:110861-200808,纯度:95.9%)均购自中国食品药品检定研究院;试验所用试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 药材

菟丝子饮片(采购于河南药材市场)经河南中医学院陈随清教授鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 不同烘制温度的盐制菟丝子饮片 取净菟丝子饮片适量,加2%盐水,闷润2 h,置烘箱内,分别于70、100、130、160、190、210 ℃烘制1 h,取出放凉,即得。

2.1.2 不同烘制时间的盐制菟丝子饮片 取净菟丝子饮片适量,加2%盐水,闷润2 h,置烘箱内,在160 ℃下分别烘制10、15、30、45、60、75 min,取出放凉,即得。

2.1.3 不同闷润时间的盐制菟丝子饮片 取净菟丝子饮片适量,加2%盐水,分别闷润0.5、1、2、4、6 h,置烘箱内,于160 ℃下烘制30 min,取出放凉,即得。

2.2 色谱条件与系统适用性试验^[6-7]

色谱柱:Synergi 4u Hydro-Rp 80A(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~15 min,15%→23%;15~50 min,23%→35%;50~85 min,37%→60%);流速:1.0 ml/min;检测波长:360 nm;柱温:35 ℃。在上述色谱条件下,理论板数以金丝桃苷、芦丁、槲皮素、山柰素峰计不少于3 000,分离度>1.5,各成分基线分离良好。色谱见图1。

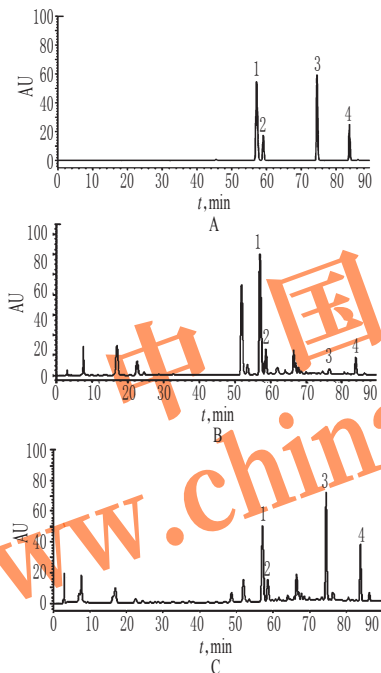


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.菟丝子生品;C.菟丝子盐制品;1.金丝桃苷;2.芦丁;3.槲皮素;4.山柰素

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance;B.C. chinensis;C.salt-processed C. chinensis;1.hyperoside; 2.rutin; 3.quercetin; 4.kaempfer

2.3 溶液的制备^[7-8]

2.3.1 混合对照品溶液 分别精密称取金丝桃苷、芦丁、槲皮素、山柰素对照品适量,加80%甲醇制成金丝桃苷、芦丁、槲皮素、山柰素质量浓度分别为0.416、0.14、0.185、0.078 mg/ml的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 取不同工艺条件下炮制的样品粉末适量,精密称定,精密加入80%甲醇40 ml,超声(功率:250 W,频率:50 kHz)提取15 min,提取2次,静置,第一次提取液滤过得滤液,第二次提取液以半径为12.5 cm、4 000 r/min离心15 min得上清液,将滤液和上清液合并置于蒸发皿中,于90 ℃

下水浴挥尽溶剂,得残留物,置于5 ml量瓶中,用80%甲醇定容,摇匀,即得。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.3.1”项下混合对照品溶液1.0 ml,置于10 ml量瓶中,加80%甲醇定容,摇匀,制成混合对照品溶液。精密量取上述混合对照品溶液1、5、10、15、20、30 μl,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以金丝桃苷、芦丁、槲皮素、山柰素进样量(x,μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表1。

表1 回归方程与线性范围

待测成分	回归方程	r	线性范围,μg
金丝桃苷	y=2 315 658x-496 940	0.999 9	0.416~12.48
芦丁	y=1 700 451x-140 754	0.999 9	0.14~4.2
槲皮素	y=401 6904x-399 388	0.999 9	0.185~5.55
山柰素	y=389 0847x-199 219	0.999 8	0.078~2.34

2.5 精密度试验

取“2.3.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.2”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,金丝桃苷、芦丁、槲皮素、山柰素峰面积的RSD<1.30%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.3.2”项下供试品溶液(不同烘制温度的盐制菟丝子饮片)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、10、12、24 h时进样测定,记录峰面积。结果,金丝桃苷、芦丁、槲皮素、山柰素峰面积的RSD<2.53%(n=7),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(不同烘制温度的盐制菟丝子饮片)适量,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,金丝桃苷、芦丁、槲皮素、山柰素峰面积的RSD<2.93%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(不同烘制温度的盐制菟丝子饮片)1 g,共6份,分别加入一定质量的金丝桃苷、芦丁、槲皮素、山柰素对照品,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,计算样品含量并计算加样回收率,结果见表2。

2.9 样品含量测定^[9-12]

取样品各适量,分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,计算样品含量,结果见表3~表5。

由表3~表5可知,盐制菟丝子饮片最佳条件为烘制温度160 ℃,烘制时间60 min,闷润2 h。

3 讨论

菟丝子以烘制法炮制具有受热均匀,温度易于控制,饮片得率高,重现性好,使有效成分的损失降至最低的优点。

菟丝子中金丝桃苷、芦丁与槲皮素等黄酮类成分是菟丝子的主要有效成分。金丝桃苷与芦丁均为苷类,加热水解转

化为苷元和糖,二者的苷元为槲皮素;山柰素为苷元。本研究

表2 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 2 Results of recovery tests (n=6)						
待测成分	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
金丝桃苷	0.747 1	0.832 0	1.576 9	99.74	97.4	2.12
	0.746 7	0.832 0	1.547 5	96.25		
	0.746 7	0.832 0	1.549 9	96.54		
	0.747 0	0.832 0	1.542 0	95.55		
	0.746 4	0.832 0	1.554 8	97.16		
芦丁	0.747 1	0.832 0	1.572 4	99.19	99.0	2.01
	0.288 2	0.280 0	0.567 5	99.75		
	0.288 0	0.280 0	0.567 4	99.78		
	0.288 0	0.280 0	0.568 0	99.99		
	0.288 1	0.280 0	0.572 1	101.42		
槲皮素	0.287 9	0.280 0	0.556 6	95.96	99.8	2.77
	0.288 2	0.280 0	0.560 8	97.36		
	0.538 4	0.370 0	0.913 8	101.45		
	0.538 1	0.370 0	0.918 3	102.75		
	0.538 1	0.370 0	0.912 9	101.29		
山柰素	0.538 3	0.370 0	0.912 1	101.02	102.6	2.02
	0.537 9	0.370 0	0.892 2	95.76		
	0.538 4	0.370 0	0.896 7	96.83		
	0.309 1	0.156 0	0.464 2	99.42		
	0.308 9	0.156 0	0.466 0	100.69		
	0.308 9	0.156 0	0.470 6	103.64		
	0.309 0	0.156 0	0.470 4	103.43		
	0.308 8	0.156 0	0.470 3	103.53		
	0.309 1	0.156 0	0.472 8	104.93		

表3 不同烘制温度的盐制菟丝子饮片黄酮类成分含量测定结果(n=3)

Tab 3 Results of content determination of flavonoids by different baking temperature (n=3)				
烘制温度,℃	金丝桃苷,mg/g	芦丁,mg/g	槲皮素,mg/g	山柰素,mg/g
70	2.151	0.607	0.037	0.156
100	1.984	0.583	0.047	0.183
130	1.102	0.455	0.153	0.227
160	0.876	0.314	0.758	0.262
190	0.540	0.269	0.592	0.274

表4 不同烘制时间的盐制菟丝子饮片黄酮类成分含量测定结果(n=3)

Tab 4 Results of content determination of flavonoids by different baking time (n=3)				
烘制时间,min	金丝桃苷,mg/g	芦丁,mg/g	槲皮素,mg/g	山柰素,mg/g
10	1.638	0.573	0.11	0.205
15	1.472	0.516	0.093	0.228
30	1.259	0.443	0.216	0.247
45	1.005	0.398	0.405	0.253
60	0.898	0.324	0.631	0.287

表5 不同闷润时间的盐制菟丝子饮片黄酮类成分含量测定结果(n=3)

Tab 5 Results of content determination of flavonoids by different moistening time (n=3)				
闷润时间,h	金丝桃苷,mg/g	芦丁,mg/g	槲皮素,mg/g	山柰素,mg/g
0.5	1.154	0.429	0.305	0.245
1	1.074	0.394	0.372	0.263
2	0.887	0.375	0.366	0.280
4	0.718	0.336	0.383	0.269
6	0.701	0.314	0.387	0.237

同时测定盐菟丝子炮制后4种黄酮类成分,发现不同工艺条件炮制后黄酮苷金丝桃苷与芦丁降低的同时,黄酮苷元槲皮素与山柰素升高。

预试验时采用正交试验得出烘制温度对炮制工艺的影响最显著,田树革等^[12]研究发现温度升高在100~160℃之间可使总黄酮的提出率提高,但温度升高超过160℃总黄酮含量开始减少,故考察烘制温度对黄酮成分影响时,选取70~190℃之间。

烘制温度高于160℃,黄酮类成分受到破坏,无法抑制酶的活性,故4种黄酮类成分的含量大大减低。而从烘制时间60 min、闷润1~2 h对黄酮类成分的影响来看,可能与菟丝子为种子类药材,烘制时间太短、闷润程度不够,有效成分不易溶出有关。

研究炮制工艺条件对菟丝子成分变化的影响,对整体评价盐菟丝子提供了依据,有助于阐明菟丝子盐制的作用机制,提高和保证饮片质量,为制定饮片炮制工艺技术评价体系提供应用基础。因此,继续对其炮制前后的成分进行研究,探讨炮制原理,很有必要。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:309.

[2] 郭澄,王雅君,张剑萍.菟丝子的化学成分和药理活性研究[J].时珍国医国药,2005,16(10):1 035.

[3] 杨青月,张学兰,李慧芬,等.菟丝子不同炮制品中3种黄酮类成分比较[J].中成药,2011,33(11):1 945.

[4] 杨颂,蒯丹平,李莎莎,等.菟丝子生品及3种炮制品中总黄酮含量的比较研究[J].世界科学技术,2015,17(1):178.

[5] 肖岚,杨梓麟,石继连.HPLC法测定菟丝子不同炮制品中5种主要活性成分含量[J].湖南中医药大学学报,2012,32(7):50.

[6] 娜仁高娃,王青虎,那音台,等.HPLC法同时测定蒙药菟丝草中3种成分的含量[J].中国药房,2014,25(7):649.

[7] 胡丽萍,王跃飞,宋殿荣,等.HPLC-UV-MS法同时测定菟丝子中5种成分的含量[J].中药材,2010,33(8):1 277.

[8] 李怀国,叶家宏,李子鸿,等.HPLC法同时测定菟丝子中5种成分的含量[J].中药新药与临床药理,2014,25(1):64.

[9] 肖岚,刘塔斯,杨梓懿,等.菟丝子及炮制品高效液相指纹图谱研究[J].时珍国医国药,2014,25(8):1 858.

[10] 都盼盼,石延榜,张振凌,等.不同炮制方法对槐角黄酮类成分量的影响[J].中草药,2014,45(22):3 271.

[11] 丁安伟,张丽,赵学龙,等.不同炮制工艺丹皮炭中黄酮类成分的动态变化[J].中国中药杂志,2009,34(8):965.

[12] 田树革,周晓英,肖新芳,等.菟丝子及其不同炮制品中有有效成分含量的研究[J].新疆医科大学学报,2001,24(1):68.

(收稿日期:2015-05-04 修回日期:2015-08-23)

(编辑:张 静)