

UPLC 测定香鳞毛蕨中绵马素 BB 的含量

汤文伟, 沈志滨*, 尹永芹, 吴洁莹, 张慧, 黄永昌
(广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立超高效液相色谱法测定香鳞毛蕨药材中绵马素 BB 的含量。方法: 采用 XBridge™ BEH C₁₈ (4.6 mm × 100 mm, 2.5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 三氟乙酸水溶液 (90:10) 为流动相, 流速 0.80 mL·min⁻¹, 检测波长 290 nm, 柱温 40 °C, 进行测定。结果: 绵马素 BB 在 0.050 28 ~ 0.301 68 μg 线性关系良好 ($r = 0.999\ 8$), 平均回收率为 98.87% (RSD 0.44%)。结论: 该方法快速、准确、重复性好, 可用于香鳞毛蕨的含量测定和质量控制。

[关键词] 超高效液相色谱; 香鳞毛蕨; 绵马素 BB; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 10-0051-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100051

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000091.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:59

Determination of Aspidin BB in *Dryopteris fragrans* by UPLC

TANG Wen-wei, SHEN Zhi-bin*, YIN Yong-qin, WU Jie-ying, ZHANG Hui, HUANG Yong-chang
(Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an UPLC method for the content determination of aspidin BB in *Dryopteris fragrans*. **Method:** Determination was performed on XBridge™ BEH C₁₈ column (4.6 mm × 100 mm, 2.5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% trifluoroacetic acid with detection wavelength at 290

[收稿日期] 20131120(009)

[基金项目] 国家“十二五”重大新药创制专项 (2011zx09102-007-03); 国家自然科学基金项目 (81202885); 广东省科技计划项目 (2011A030100013); 广州市科技计划项目 (12A062131631); 广东省教育厅高层次人才项目 (2010)

[第一作者] 汤文伟, 硕士生, 从事中药及复方化学成分研究, Tel: 15919659800, E-mail: tanyweit@163.com

[通讯作者] * 沈志滨, 博士, 教授, 从事中药及复方化学成分研究, Tel: 13724866019, E-mail: szb8113@126.com

- [3] 原永芳, 周践, 郑晓梅, 等. 超临界流体 CO₂ 萃取川芎挥发油化学成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 35 (2): 84.
- [4] 王聪, 刘勇, 王曙. 川芎超临界萃取物及其乙醇提取物的药理作用比较 [J]. 华西药理学杂志, 2009, 24 (3): 250.
- [5] Wang Y H, Liang S, Xu D S, et al. Effect and mechanism of senkyunolide I as an anti-migraine compound from *Ligusticum chuanxiong* [J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63 (2): 261.
- [6] 张永祥. 中药药理学新论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 331.
- [7] 李莉, 窦春菊, 姚兰. 超临界 CO₂ 萃取、HPLC 法测定川芎中阿魏酸 [J]. 化学分析计量, 2006, 15 (2): 42.
- [8] 银玲, 彭月, 陈鸿平, 等. 新老产地川芎中 3 种内酯成分的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (7): 120.
- [9] 张贵君, 罗容, 王奕洁. 中药药效组分理论与中药组分子学 [J]. 中药材, 2007, 30 (2): 125.
- [10] 李桂生, 马成俊, 李香玉, 等. 藁本内酯稳定性研究及异构化产物的 GC-MS 分析 [J]. 中草药, 2000, 31 (6): 405.
- [11] 左爱华, 王莉, 肖红斌. 洋川芎内酯 A 和洋川芎内酯 I 的降解产物研究 [J]. 中草药, 2012, 43 (11): 2127.
- [12] Zhang X Z, Xiao H B, Xu Q, et al. Characterization of phthalides in *Ligusticum chuanxiong* by liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci, 2003, 41 (8): 428.

[责任编辑 刘德文]

nm. The flow rate was set to $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, while the column temperature was set at $40 \text{ }^\circ\text{C}$. **Result:** The linear range of aspidin BB was $0.050\ 28\text{--}0.301\ 68 \mu\text{g}$ ($r = 0.999\ 8$) with an average recovery of 98.87% (RSD 0.44% , $n = 6$). **Conclusion:** The method is fast, accurate and reproducible, which can be used to control the quality of *D. fragrans*.

[Key words] UPLC; *Dryopteris fragrans*; aspidin BB; determination

香鳞毛蕨是鳞毛蕨科鳞毛蕨属落叶多年生草本植物^[1]。根据民间验方记载,其对多种皮肤病均有良好的治疗作用,尤其是对由真菌引起的脚气、脚癣治疗效果非常显著^[2]。由于其对皮肤病有良好的疗效,近年来国内外学者对其化学成分,药理药效方面的研究越来越多^[3-5]。香鳞毛蕨中化学成分主要有间苯三酚类、萜类、黄酮类、苯丙素类和挥发油类^[6-8]。其中间苯三酚类衍生物是鳞毛蕨属特征性化学成分。Ito-H^[9]等人已从香鳞毛蕨中分离得到间苯三酚类化合物 aspidin BB, dryofragin, aspidionl, aspidin PB, aspidin BB 和 aspidin AB。并且,有国外研究者发现,间苯三酚类衍生物 Aspidin BB 具有广泛的抗肿瘤活性^[10]。Ito-H 等^[11]发现化合物 Aspidin BB 对非洲淋巴瘤病毒(EBV-EA)的早期抗原有潜在的抑制效果,并明显表现出对小鼠皮肤的癌细胞发生有抑制作用。

本实验采用超高效液相色谱仪(UPLC)建立了香鳞毛蕨中间苯三酚类化合物绵马素 BB 的含量测定方法,可为香鳞毛蕨药材的质量控制提供依据。

1 材料

Waters Acquity Uplctm H-Class UPLC 超高效液相色谱仪,包括四元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱、二级管阵列检测器及 Empower 3 工作站(美国 Waters 公司),DS-8510DT 型超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司),AB135-S 型 1/10 万电子天平(瑞士 Mettler 公司),对照品(绵马素 BB 实验室自制,纯度 $> 98\%$),乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

香鳞毛蕨药材采自黑龙江省五大连池,由哈尔滨商业大学药学院张德连副教授鉴定为鳞毛蕨科鳞毛蕨属香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans*(L.)。

2 方法与结果

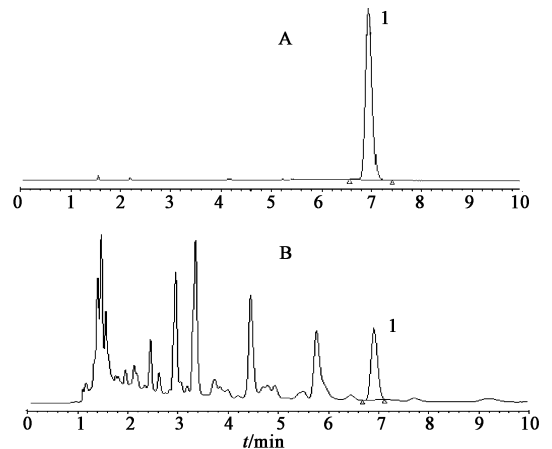
2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取 Aspidin BB 对照品 1.257 mg ,加入乙腈溶解并定容至 25 mL ,得 $50.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取香鳞毛蕨药材粗粉 0.2 g ,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入乙酸乙酯

20 mL ,密塞,称定质量,混匀,静置,充分溶胀 30 min ,超声处理(温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,功率 600 W ,频率 40 kHz) 20 min ,摇匀,滤过,取续滤液 10 mL 置蒸发皿中蒸干,乙腈复溶并定容至适宜浓度, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即制成香鳞毛蕨供试品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性 XBridge™ BEH C₁₈ 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $2.5 \mu\text{m}$),流动相乙腈- 0.1% 三氟乙酸水溶液($90:10$),流速 $0.80 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$,检测波长 290 nm 。在此色谱条件下,供试品色谱中,在与对照品色谱相同的保留时间处有色谱峰,与其他组分能基本达到基线分离,空白溶剂无干扰。aspidin BB 对照品、香鳞毛蕨药材供试品溶液的 UPLC 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. aspidin BB

图 1 香鳞毛蕨药材 UPLC

2.3 检测波长的确定 取 aspidin BB 对照品溶液适量,于 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 扫描。通过对 aspidin BB 的紫外波长扫描显示,aspidin BB 对照品溶液在 $290, 227 \text{ nm}$ 处有较强吸收。由于 227 nm 接近末端吸收,影响较大,故选用 290 nm 作为检测波长。

2.4 线性关系考察 精密称取 aspidin BB 对照品 7.542 mg ,加入乙腈溶解并定容至 25 mL 。用乙腈分别稀释制成 $0.050\ 3, 0.100\ 6, 0.150\ 9, 0.201\ 2, 0.251\ 5, 0.301\ 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。上述各对照品溶液按 2.2 项下色谱条件,分别进样 $1 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪进行测定,以进样量(μg)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程

$Y = 0.4582X + 0.0052$ ($r = 0.9998$)。结果表明, aspidin BB 对照品在 $0.0503 \sim 0.3018 \mu\text{g}$ 线性关系良好。

2.5 精密度考察 精密吸取 2.1.1 项下对照品溶液,连续进样 6 次,每次 $5 \mu\text{L}$,测定峰面积,RSD 0.42%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性考察 精密吸取 2.1.1 项下对照品溶液 $2 \mu\text{L}$,分别在 1,3,5,7,9,11 h 进行检测,记录色谱峰峰面积,平均值为 159 142,RSD 0.58%,表明 aspidin BB 在 11 h 之内稳定性良好。

2.7 重复性考察 精密称定同一批香鳞毛蕨药材粗粉 6 份,每份约 0.2 g,按供试品溶液的制备方法平行制备 6 份样品溶液,分别精密吸取 6 份供试品溶液 $2 \mu\text{L}$,按上述色谱条件进行测定,记录色谱峰峰面积,计算其 RSD 3.29%,表明本法重复性良好。

2.8 加样回收率考察 取已知含量的香鳞毛蕨药材 6 份,精密称定,每份约 0.1 g,分别加入对照品适量,按供试品溶液的制备方法制备。分别取样品供试液 $2 \mu\text{L}$,按上述色谱条件进行测定,记录色谱峰峰面积,计算回收率。结果见下表 1。

表 1 绵马素 BB 的加样回收率试验

称样量 /g	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.1002	1.909	1.896	3.762	98.87		
0.1001	1.907	1.901	3.743	98.29		
0.1000	1.905	1.901	3.799	98.82		
0.1002	1.909	1.899	3.761	98.77	98.86	0.43
0.1003	1.911	1.903	3.768	98.80		
0.1002	1.909	1.905	3.799	99.61		

2.9 样品含量测定 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液 $2 \mu\text{L}$,进样测定,结果 3 份香鳞毛蕨供试品中 aspidin BB 含量分别为 19.15, 19.05, 18.90 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

3 讨论

在本试验的样品制备中,曾采用甲醇、95%乙醇、正己烷、乙酸乙酯以及丙酮提取制备供试品溶液,结果测得用乙酸乙酯提取时, aspidin BB 提取量最高。选定提取溶剂后,考察了不同的超声温度与超声时间,结果为在 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下超声 20 min 时 aspidin BB 具有较好的稳定性并且提取率较高。

aspidin BB 在 UPLC 测定中易出现拖尾现象,该

试验通过对不同流动相进行试验选择,结果显示加入三氟乙酸可改善峰形,减少拖尾,该研究还比较了在不同三氟乙酸浓度下样品的分离情况,结果发现对香鳞毛蕨而言,选择该试验用流动相,待测成分分离较好且峰形最佳。所以,该方法适用于香鳞毛蕨中 aspidin BB 含量测定。

间苯三酚类化合物广泛存在于鳞毛蕨属植物中,具有抗菌作用,对多种皮肤病均有治疗作用,例如:头皮癣、牛皮癣、干癣等。此外也具有抗炎镇痛、抗氧化、抗肿瘤的作用,对银屑病亦有药理作用。本文以间苯三酚类化合物 aspidin BB 为研究对象,建立了香鳞毛蕨中 aspidin BB 的含量测定方法,为香鳞毛蕨药材的质量控制以及进一步的应用与开发提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 冬英. 药用蕨类植物的研究进展[J]. 中医药信息, 1997,14(4):20.
- [2] 宋庆宇. 香鳞毛蕨治疗银屑病的药效物质基础研究[D]. 哈尔滨:黑龙江大学,2006.
- [3] 张燕丽. 香鳞毛蕨化学成分的研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2007.
- [4] 王慧荣. 香鳞毛蕨中有效部位化学成分的提取分离[D]. 哈尔滨:黑龙江大学,2007.
- [5] 朱俊访,李博. 香鳞毛蕨有效部位及药理作用的研究进展[J]. 今日药学,2009,19(10):57.
- [6] Widen C J, Ayras P Reichstein T. The phloroglucinols of *Dryopteris stenolepis* [J]. Ann Bot Fenn, 1992, 29(1):177.
- [7] Fuchino H, Nakamura H, Wada H. Two new acylphloroglucinols from *Dryopteris atrata* [J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(6):1101.
- [8] 沈志滨,罗文英,严优芍,等. 香鳞毛蕨中间苯三酚衍生物的研究[J]. 中药材,2006(6):560.
- [9] Ito H, Muranaka T, Mori K, et al. Dryofragin and aspidin PB. piscicidal components from *Dryopteris fragrans*[J]. Chem Phar Bull, 1997, 45(10):1720.
- [10] Krivut B V, Molodozhnikova L M. Spectrophotometric determination of aspidin. Chemistry of natural compounds[J]. Chem Nat Compd Nov/Dec1970 transl, 1973,6(6):696.
- [11] Ito H, Muranaka T, Mori K. Ichthyotoxic phloroglucinol derivatives from *Dryopteris fragrans* and their anti-tumor promoting activity[J]. Chem Pharm Bull,2000,48(8):1190.

[责任编辑 顾雪竹]