

# 炮制对王不留行中王不留行环肽 A, B, E 含量的影响

周国洪, 唐力英, 寇真真, 王婷, 周喜丹, 王祝举\*

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:研究炮制对王不留行中王不留行环肽 A, B, E 含量的影响,探索王不留行的炮制机制。方法:建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定王不留行中王不留行环肽 A, B, E 含量的方法,采用 Acclaim™ 120 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~8 min, 32% A; 8~13 min, 32%~60% A; 13~20 min, 60%~70% A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 220 nm,柱温 40 ℃,进样量 10 μL。分析炮制前后王不留行环肽 A, B, E 含量及溶出率的变化。结果:炮制前后,王不留行环肽 A, B, E 在王不留行中含量差异较小,炮制前分别为 0.035%, 0.009%, 0.017%, 炮制后分别为 0.033%, 0.009%, 0.015%;但 3 个成分的水煎溶出率分别升高了 13.2%, 5.3%, 17.4%。结论:炮制对王不留行环肽 A, B, E 含量的影响较小,但炮制后 3 个成分的水煎溶出率均有增加。

**[关键词]** 王不留行; 清炒法; 环肽; 催乳作用; 溶出率

**[中图分类号]** R283.1; R284.1; R943.1; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0029-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040029

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151022.1408.030.html>

**[网络出版时间]** 2015-10-22 14:08

## Effects of Processing on Contents of Segetalin A, B, E in Vaccariae Semen

ZHOU Guo-hong, TANG Li-ying, KOU Zhen-zhen, WANG Ting, ZHOU Xi-dan, WANG Zhu-ju\*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate influence of processing on contents of segetalin A, B, E in Vaccariae Semen. **Method:** HPLC was employed to determine contents of segetalin A, B, E with Acclaim™ 120 C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile (A) -water (B) for gradient elution (0-8 min, 32% A; 8-13 min, 32%-60% A; 13-20 min, 60%-70% A), flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength at 220 nm, column temperature at 40 ℃, injection volume of 10 μL. Changes of contents of segetalin A, B, E and dissolution rates were analyzed after Vaccariae Semen being processed. **Result:** After being processed, contents of segetalin A, B, E in processed products of Vaccariae Semen was similar to those of raw herbs, however, their dissolution rates raised 13.2%, 5.3% and 17.4%, respectively. **Conclusion:** Processing has little influence on contents of segetalin A, B, E in Vaccariae Semen, but their dissolution rates increase.

**[Key words]** Vaccariae Semen; frying without adding anything; cyclopeptide; lactagogue effect; dissolution rate

王不留行主要含有三萜皂苷、环肽、黄酮、生物碱和挥发油等化学成分<sup>[1-4]</sup>。现已从中分离得到了 8 个环肽,分别为王不留行环肽 A~H。药理研究表明王不留行环肽 A, B 均具有雌激素样活性<sup>[5]</sup>,王不留行环肽 A, E 均能抑制人类微血管内皮细胞增殖

活性<sup>[6]</sup>,而王不留行环肽 E 还有细胞毒性和驱虫活性<sup>[7]</sup>。王不留行环肽 A, B, E 是王不留行中的特征性成分,且可能是与其催乳活性相关的化学成分。本实验拟建立 HPLC 同时测定王不留行环肽 A, B, E 共 3 个成分的含量,比较炮制前后王不留行中王不

**[收稿日期]** 20150803(005)

**[第一作者]** 周国洪,在读硕士,从事饮片化学成分及炮制原理研究, Tel: 010-64087609, E-mail: Jozshzhou@foxmail.com

**[通讯作者]** \* 王祝举, 硕士, 研究员, 从事饮片化学成分及炮制原理研究, Tel: 010-64087609, E-mail: wangzhuju@sina.com

留行环肽 A, B, E 含量及水煎溶出率的变化, 探讨炮制对这 3 种成分含量的影响, 为该药材的质量控制和炮制机制探索提供参考。

## 1 材料

U-3000 型高效液相色谱仪(戴安中国有限公司), CPA225D 型 1/10 万电子分析天平和 BSA124S-CW 型 1/1 万电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。王不留行环肽 A, B, E 对照品(自制, 经 HPLC 检测, 纯度均 > 98%); 王不留行药材于 2014 年购于河北安国药材市场, 经中国中医科学院中药研究所王祝举研究员鉴定为石竹科植物麦蓝菜 *Vaccaria segetalis* 的干燥成熟种子; 水为纯净水, 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 炮制品的制备** 取王不留行生品, 照 2010 年版《中国药典》清炒法<sup>[1]</sup>炒至大多数爆开白花, 呈类球形爆花状, 表面白色, 质松脆。

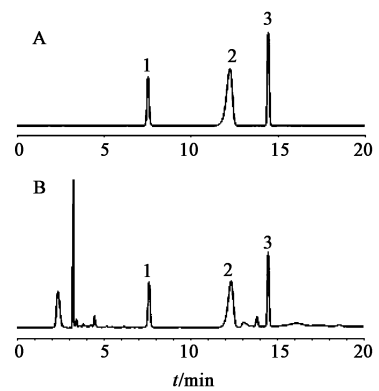
**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取王不留行环肽 A, B, E 对照品各约 1.0 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成质量浓度分别为 46.4, 43.6, 49.6 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液, 备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 取王不留行生品和炮制品粉末(过四号筛)各约 2 g, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 60 min, 放冷, 称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 浓缩至近干, 加适量水溶解, 加乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯溶液, 挥干, 残渣加甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 备用。

**2.4 色谱条件** Acclaim™ 120 C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~8 min, 32% A; 8~13 min, 32%~60% A; 13~20 min, 60%~70% A), 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 220 nm, 柱温 40 °C。见图 1。

**2.5 线性关系考察** 分别精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 8, 16, 25 μL, 按 2.4 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得王不留行环肽 A, B, E 的回归方程分别为  $Y = 38.207X - 0.092$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 55.944X - 0.059$  ( $r = 0.9999$ ),  $Y = 40.498X - 0.061$  ( $r = 0.9999$ ), 线性范围依次为 0.0928~1.16, 0.0872~1.09, 0.0992~1.24 μg。

**2.6 精密度试验** 精密吸取同一份供试品溶液, 按 2.4 项下色谱条件续进样 6 次, 每次 10 μL, 计算王不留行环肽 A, B, E 峰面积的 RSD 分别为 1.9%,



A. 对照品; B. 供试品; 1. 王不留行环肽 B; 2. 王不留行环肽 A; 3. 王不留行环肽 E

图 1 王不留行 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Vaccariae Semen*

1.6%, 2.2%。

**2.7 稳定性试验** 取同一样品溶液, 分别于配制后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 按 2.4 项下色谱条件进样, 结果王不留行环肽 A, B, E 峰面积的 RSD 分别为 2.0%, 2.6%, 2.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.8 重复性试验** 精密称取同一批王不留行药材 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4 项下色谱条件测定, 结果王不留行环肽 A, B, E 平均质量分数分别为 0.035%, 0.009%, 0.017%, RSD 分别为 2.5%, 3.0%, 2.2%。

**2.9 加样回收试验** 精密称取已知各指标成分含量的王不留行粉末约 2 g, 共 6 份。分别精密称取王不留行环肽 A, B, E 对照品适量, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成质量浓度分别为 0.1564, 0.0318, 0.0920 g·L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液, 各精密量取 0.5 mL 加入到 6 份样品中, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密量取 10 μL 按 2.4 项下色谱条件测定, 计算加样回收率, 见表 1。

**2.10 样品测定** 取王不留行生品和炮制品各 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4 项下色谱条件测定, 计算王不留行中王不留行环肽 A, B, E 的含量, 结果见表 2。

**2.11 溶出率的测定** 精密称取王不留行生品和炮制品各 6 份, 每份约 4 g, 置 250 mL 锥形瓶中, 精密加入水 100 mL, 称定质量, 加热回流 60 min, 放冷, 称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 减压回收浓缩至近干, 浓缩物加甲醇定容于 10 mL 量瓶中, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 精密量取 10 μL, 按 2.4 项下色谱条件测定, 计算王不

表 1 王不留行环肽 A, B, E 含量测定的加样回收率试验

对照品	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
王不留行 环肽 A	0.704	0.782	1.503	102.17	101.73	1.5
	0.733	0.782	1.514	99.87		
	0.726	0.782	1.520	101.53		
	0.700	0.782	1.486	100.51		
	0.732	0.782	1.530	102.05		
王不留行 环肽 B	0.185	0.159	0.342	98.74	99.69	2.9
	0.192	0.159	0.348	98.11		
	0.190	0.159	0.350	100.63		
	0.184	0.159	0.341	98.74		
	0.192	0.159	0.346	96.86		
王不留行 环肽 E	0.337	0.460	0.786	97.61	98.33	1.3
	0.351	0.460	0.799	97.39		
	0.347	0.460	0.799	98.26		
	0.335	0.460	0.787	98.26		
	0.350	0.460	0.799	97.61		
	0.335	0.460	0.799	100.87		

表 2 王不留行生品和炮制品中各成分的含量测定

样品	王不留行环肽 A		王不留行环肽 B		王不留行环肽 E	
	生品	炮制品	生品	炮制品	生品	
1	0.037	0.033	0.009 6	0.009 0	0.017	
2	0.036	0.033	0.009 5	0.009 2	0.017	
3	0.035	0.034	0.009 1	0.009 4	0.016	
4	0.034	0.033	0.009 0	0.009 1	0.016	
5	0.034	0.032	0.008 9	0.009 0	0.017	
6	0.035	0.031	0.009 0	0.008 7	0.017	

注:炮制品中王不留行环肽 E 质量分数均为 0.015%。

留行生品(炮制品)常规饮片水煎液中王不留行环肽 A, B, E 的溶出率分别为 68.6% (81.8%), 81.5% (86.8%), 55.9% (73.3%)。见表 3。

表 3 王不留行环肽 A, B, E 溶出量测定

样品	王不留行环肽 A		王不留行环肽 B		王不留行环肽 E	
	生品	炮制品	生品	炮制品	生品	炮制品
1	0.021	0.025	0.007 4	0.007 6	0.008 6	0.010
2	0.024	0.028	0.007 6	0.008 4	0.010 0	0.011
3	0.025	0.026	0.007 2	0.007 4	0.009 0	0.010
4	0.024	0.028	0.007 6	0.007 8	0.010 0	0.011
5	0.026	0.028	0.007 6	0.008 0	0.009 1	0.011
6	0.024	0.029	0.007 7	0.008 3	0.010 0	0.010

### 3 讨论

本文研究结果发现王不留行环肽 A, B, E 在王

不留行中的含量均较低,而炮制后这 3 种成分含量变化不大,稍有下降的趋势,说明王不留行环肽类成分比较稳定,炮制对其影响较小。

通过比较王不留行生品和炮制品常规饮片水煎液中王不留行环肽 A, B, E 溶出率的差异,发现炮制品中 3 个成分的溶出率均比生品高,溶出率分别升高了 13.2% ,5.3% ,17.4%。推测炮制能提高王不留行环肽 A, B, E 在水煎液中的溶出率。

王不留行具有活血通经、下乳消肿的作用,乳汁是在生产后催乳激素的作用下产生的,催乳素是由 199 个氨基酸缩合并含有 3 个硫键的多肽组成。据报道,王不留行中所含的环肽也具有雌激素样作用,是否与催乳作用有关,值得进一步研究。

考察了 70% 甲醇,90% 甲醇和甲醇对提取率的影响,结果显示甲醇的提取效率最高。考察了提取 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 h 对提取率的影响,结果显示提取 1 h 时已提取完全。比较了乙酸乙酯萃取处理前后供试品的色谱图,结果显示萃取后色谱图干扰峰明显减少,基线平整,且被测成分几乎无损失,因此选择乙酸乙酯萃取法进行供试品的前处理。

实验发现王不留行环肽 A, B, E 在 278 nm 处均有较弱吸收,在 220 nm 下均有较强吸收且干扰较少,故选择检测波长 220 nm。常温下,王不留行环肽 A 色谱峰前沿,在柱温 40 °C 时前沿现象会得到明显的改善,所以选择柱温 40 °C。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:49,附录 20.
- [2] Sang S M, Xia Z H, Lao A, et al. Studies on the constituents of the seeds of *Vaccaria segetalis* [J]. *Heterocycles*, 2003, 59(2): 811-821.
- [3] 冯旭,王丽丽,邓家刚,等. 王不留行挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. *广西中医药*, 2010, 33(3): 56-57.
- [4] 李娜,马长华,刘冬,等. 炒王不留行的化学成分分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(10): 73-75.
- [5] Morita H, Yun Y S, Takeya K, et al. Segetalins B, C and D, three new cyclic peptides from *Vaccaria segetalis* [J]. *Tetrahedron*, 1995, 51(21): 6003-6014.
- [6] 花慧,冯磊,张小平,等. 王不留行中抑制血管生成的活性物质研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(3): 698-700.
- [7] Dahiya R, Kaur K. Synthetic and biological studies on natural cyclic heptapeptide: segetalin E [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(11): 1380-1386.

[责任编辑 刘德文]