

UPLC 测定多伞阿魏中倍半萜烯香豆素 (DAW22) 的含量

朱芸¹, 张珂¹, 梁旭¹, 谭勇¹, 黄健², 王金辉^{1*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆石河子 832002;
2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:利用超高效液相色谱法测定了分布于新疆的不同生长时期多伞阿魏中 DAW22 的含量。方法:采用固相萃取(SPE)净化,测定条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),以甲醇-1% 甲酸水溶液为流动相,进行梯度洗脱,流速 0.2 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,波长 316 nm,进行含量测定。结果:DAW22 进样量在 6.21 ~ 124.2 ng (r = 1.000 0) 与其峰曲线下面积呈良好的线性关系,平均回收率 99.81%,RSD 2.0%,生长在 5 月 9 日的多伞阿魏植株中 DAW22 的含量最高。结论:建立的多伞阿魏中 DAW22 的质量控制研究方法准确、可靠、重复性好,能够用于多伞阿魏的质量控制。

[关键词] 多伞阿魏; 倍半萜烯香豆素; 超高效液相色谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0063-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016190063

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1121.072.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 11:21

Content Determination of Sesquiterpene Coumarin (DAW22) in *Ferula ferulaeoides* by UPLC

ZHU Yun¹, ZHANG Ke¹, LIANG Xu¹, TAN Yong¹, HUANG Jian², WANG Jin-hui^{1*}

(1. Key Laboratory of Phytomedicine Resources & Modernization of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China;
2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish UPLC method for the determination of DAW22 from *Ferula ferulaeoides* of different growth periods in Xinjiang. **Method:** Solid phase extraction (SPE) was used for purification, and the determination was performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) with methanol-1% formic acid solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. Column temperature was 30 ℃ and UV detection wavelength was 316 nm. **Result:** The sample volume showed good linear relationship with area under the peak curve within the range of 6.21-124.2 ng (r = 1.000 0) for DAW22. The average recovery was 99.81%, and the RSD was 2.0%. The content of DAW22 was highest for those grown in May 9th. **Conclusion:** This method is accurate, simple and reproducible, and can be applied to the quality control of *F. ferulaeoides*.

[Key words] *Ferula ferulaeoides*; DAW22; UPLC; content determination

多伞阿魏有“香阿魏”之称,其根或茎分泌的树脂风干后成块,具有健胃消积、散寒止痛之效,主治食积、消化不良、腕肋冷痛、风湿关节痛、积肿和胃肠炎等疾病^[1-3]。阿魏为我国哈萨克民族民间传统常

用药材,收载于哈萨克医用药志《奇帕格尔巴彦》书中,是新疆特有珍稀药用植物资源^[4-5]。虽在当地应用广泛,但未收载于 2015 年版《中国药典》^[1]。阿魏化学成分十分丰富,主要含有挥发油、树胶、树

[收稿日期] 20150923(014)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAI30B02);国家自然科学基金项目(81460574,81303270);石河子大学高层次科研启动基金项目(RCZX201440);石河子大学应用基础研究青年项目(2015ZRKXYQ16)

[第一作者] 朱芸,博士,副教授,从事新疆药用植物的开发与利用工作,Tel:0993-2057010,E-mail:whitecloud2002001@163.com

[通讯作者] *王金辉,博士,教授,从事新疆特色药用植物开发与利用工作,Tel:0993-2057010,E-mail:tcm_syphu@163.com

脂和多糖等^[6]成分,其特征性化学成分包括倍半萜类、香豆素类^[7]和多硫化合物。已鉴定的挥发油成分中,萜类占80%以上,其中萜类中主要有单萜和倍半萜两大类,均以环化结构成分为主^[8]。现代药理学研究表明阿魏具有抗生育、免疫抑制、解热、镇痛、抗炎等广泛的药理活性^[9]。其所含的倍半萜香豆素类化合物对癌细胞有很强的抑制活性,课题组前期研究中对多伞阿魏中化学成分进行了系统分离,分离出一系列倍半萜香豆素类化合物,在活性筛选的研究中发现化合物 DAW22 具有显著诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡的作用^[10]。目前,关于阿魏中倍半萜香豆素类化合物含量测定的相关研究未见报道,为进一步摸清倍半萜烯香豆素类化合物在多伞阿魏生长期中的含量变化,本研究采用 UPLC 测定多伞阿魏中倍半萜香豆素类化合物的含量,为拓展新疆阿魏资源的开发利用和质量控制研究提供科学依据。

1 材料

ACQUITY 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),KQ3200 型超声清洗仪(昆山超声仪器有限公司),EL-104 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),OSB-2100 型旋转蒸发仪(上海爱朗有限公司);SPE 固相萃取柱(500 mg/3 mL, Waters 公司)。

多伞阿魏采自于石河子阿魏滩,由石河子大学药学院谭勇教授鉴定为伞形科多年生草本多伞阿魏 *Ferula ferulaeoides* 的根或茎分泌的树脂,保存于石河子大学药学院。甲醇和甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。DAW22 对照品(化学名为 2,3-dihydro-7-hydroxy-2R*,3R*-dimethyl-2-[4,8-dimethyl-3(E),7-nonadienyl-furo[3,2-c] coumarin, 纯度 >99%)为实验室自制,结构式见图 1。

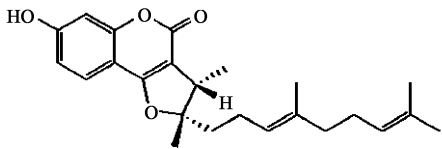


Fig. 1 Chemical structural formula of compound DAW22

图 1 化合物 DAW22 的结构式

2 方法与结果

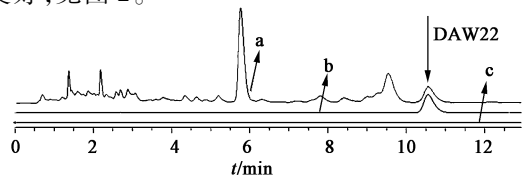
2.1 色谱条件^[11-12] Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相甲醇(A)-1%甲酸(B)溶液系统,梯度洗脱程序(0 ~ 0.5 min, 55% ~ 77% A; 0.5 ~ 13 min, 77% A),流速 0.2 mL·min⁻¹,检测波长 316 nm,柱温 30 °C。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取 DAW22 对照

品 6.9 mg 置于 5 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得 1.38 g·L⁻¹对照品储备液。精密移取对照品储备液 225 μL,置于 5 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成含 62.1 mg·L⁻¹的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取多伞阿魏粉末(24 目筛)约 0.5 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声处理 30 min(功率 100 W,频率 40 kHz),放冷,补重,以 4 000 r·min⁻¹离心 5 min,精密移取上清液 2.5 mL,过固相萃取柱(加甲醇 10 mL 活化),加甲醇 5 mL 洗脱至 10 mL 量瓶,加甲醇定容,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 专属性考察 分别精密吸取对照品溶液,供试品溶液和空白溶剂各 1.0 μL,注入超高效液相色谱仪,得出供试品溶液具有相同保留时间的色谱峰,空白溶剂在此峰位无吸收,对本品中 DAW22 含量测定无干扰,待测目标物分离度良好,说明该方法专属性良好,见图 2。



a. 供试品溶液; b. 对照品溶液; c. 空白溶剂

图 2 多伞阿魏 UPLC

Fig. 2 UPLC chromatograms of *Ferula ferulaeoides*

2.5 线性关系考察 分别精密吸取对照品溶液 0.1, 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.0 μL 注入超高效液相色谱仪,测定峰面积,以峰面积(Y)为纵坐标,对照品进样量(X)为横坐标,绘制标准曲线,得线性回归方程为 $Y = 13\,973.02 X + 11\,692.28$ ($r = 1.0000$),结果表明 DAW22 在 6.21 ~ 124.2 ng 与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,按照 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,结果 RSD 0.2%,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一时期药材(2015-05-15 采级)粉末 6 份约 0.5 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,结果多伞阿魏 DAW22 质量分数 1.04%,RSD 2.0%,表明本法重复性良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,按照 2.1 项下色谱条件,在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样测定,结果 DAW22 峰面积的 RSD 0.8%。表明供试品

溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收试验 称取多伞阿魏样品粉末(24 目筛)6 份,每份约 0.25 g,精密称定,分别加入 DAW22 对照品溶液适量,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,精密吸取 1.0 μ L,按照 2.1 项下色谱条件测定峰面积,得出各样品的平均回收率在 98.26% ~ 102.80%,RSD 2.0%。

2.10 样品测定 分别取不同时期阿魏药材粉末约 0.5 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积,并用外标法计算样品中 DAW22 的含量,结果见表 1。从测定结果可以看 5 月 9 日的多伞阿魏中 DAW22 含量最高。

表 1 不同采收期阿魏中 DAW22 质量分数(n=3)

Table 1 DAW22 content of *Ferula ferulaeoides* in picking time (n=3) %

No.	采收期	DAW22	No.	采收期	DAW22
1	2015-03-29	0.407 5	5	2015-05-09	0.574 5
2	2015-04-11	0.468 5	6	2015-05-15	0.449 6
3	2015-04-25	0.393 2	7	2015-05-25	0.303 8
4	2015-05-02	0.310 3			

3 讨论

本实验使用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm,1.7 μ m),各成分分离度良好,保留时间在 10.597 min 内;流动相分别考察了甲醇-水,甲醇-1% 甲酸水。结果表明使用甲醇-1% 甲酸水为流动相,待测目标物分离度良好;检测波长的选择,对 DAW22 成分进行全波长扫描(190 ~ 400 nm),结果表明在 316 nm 处有最大吸收。

分别考察了甲醇、乙醇、水、三氯甲烷和乙酸乙酯为溶剂进行超声提取,结果显示以甲醇为溶剂能大量地提取出多伞阿魏中的 DAW22 成分。以甲醇为溶剂,分别考察了超声、回流以及索氏提取 3 种方法,结果表明回流提取、索氏提取、超声提取 3 种提取方法的 UPLC 色谱图峰形及含量测定结果无明显差异,其中超声法具有稳定、可靠、操作简便、可重复性高、处理批量大的优势。以甲醇为溶剂,使用超声提取方法,分别考察 15,30,45 min 3 个时间段,结果表明 15 min 提取出多伞阿魏中 DAW22 成分最少,30 min 和 45 min 提取出多伞阿魏中的 DAW22 成分无明显差异,故本实验选用 30 min 为提取时间。

在我国阿魏属植物大多分布于内陆干旱荒漠地区,国内不少学者将其称为早春类短命植物。阿魏是新疆特有的珍稀药材资源之一,但自从 1970 年代以来,阿魏资源的过度开发和生态环境的破坏致使

一些阿魏种质资源遗失,现在新疆阿魏和阜康阿魏几乎灭绝。目前国内市场的阿魏药材主要依赖进口^[13-15]。从阿魏目前研究情况来看,阿魏属植物来源丰富,其中有 6 种植株均能分泌出特殊葱蒜样臭味,多伞阿魏在新疆分布资源量较丰富。合理利用多伞阿魏资源和化学成分必须了解其化学成分,本研究建立的 UPLC 测定不同采收期多伞阿魏中 DAW22 的含量,结果表明 5 月上旬的 DAW22 的含量最高。建立的多伞阿魏中 DAW22 的质量控制研究方法准确、可靠、重复性好,可作为药材质量控制的方法。

[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,2015:190-191.

[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 15 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:949-950.

[3] 宋东伟,赵文军,吴雪萍,等. 新疆多伞阿魏化学成分研究[J]. 中草药,2006,37(11):1627-1629.

[4] 单人骅,余孟兰. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1992:85-117.

[5] 韩爱玲,帕里罕,阿迪列提. 多伞阿魏与阿魏的初步定性研究[J]. 中国当代医药,2008,15(24):20.

[6] Mohammad F, Freshteh F, Zahra F. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract[J]. J Ethnopharmacol,2004,91(2/3):321-324.

[7] Mohamed H Abd El-Razek, Shinji Ohta, Toshifumi Hirata, et al. Terpenoid coumarins of the genus *Ferula* [J]. Heterocycles,2003,34(22):689-716.

[8] 刘启新,惠红. 阿魏挥发油成分及其分类学意义[J]. 植物资源与环境,1997,6(2):26-31.

[9] 凯撒·苏来曼. 阿魏种植初步研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2005.

[10] Zhang L, Tong X P, Wang J H, et al. DAW22, a natural sesquiterpene coumarin isolated from *Ferula ferulaeoides*(Steud.) Korov. that induces C6 glioma cell apoptosis and endoplasmic reticulum (ER) stress[J]. Fitoterapia,2015(103):46-54.

[11] 韩永成,刘伟,陈宁,等. 不同产地金银花药材的 UPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(2):67-69.

[12] 刘和平,彭招华,张润容,等. 黄芪药材中黄芪甲苷 UPLC-ELSD 含量测定方法的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):92-94.

[13] 沈观冕. 中草药丛书——阿魏[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,1986:10-15.

[14] 秦雪梅,沈观冕. 新疆阿魏属及其相关属间的分类研究[D]. 乌鲁木齐:中国科学院新疆生物土壤沙漠所,1989.

[15] 秦雪梅,沈观冕. 新疆阿魏属及其相近属间的分类学研究[J]. 干旱区研究,1990,7(4):23-33.

[责任编辑 顾雪竹]