

炮制对王不留行中刺桐碱及黄酮苷类成分 含量及溶出率的影响

周国洪, 唐力英, 寇真真, 王婷, 郭日新, 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刺桐碱及黄酮苷类成分含量的影响,探索炮制对王不留行主要化学成分及其溶出率的影响。**方法:**采用 HPLC 测定炮制前后王不留行中刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2''-O-阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H 的含量及水煎溶出率,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~12 min,13% A;12~18 min,17% A;18~30 min,20% A),检测波长 280 nm。**结果:**炮制前,这 5 个成分的质量分数分别为 0.13%、0.70%、0.018%、0.051%、0.11%,炮制后则分别为 0.12%、0.52%、0.016%、0.098%、0.091%;5 个成分的水煎溶出率分别升高了 7.7%、10.2%、10.8%、11.4%、17.8%。**结论:**炮制后异牡荆素-2''-O-阿拉伯糖苷含量有较大幅度上升,而王不留行黄酮苷含量有较大下降,其余成分含量有少量下降。炮制对王不留行中刺桐碱及黄酮苷类成分含量的影响存在一定差异,但炮制后这些成分的水煎溶出率均上升。

[关键词] 王不留行; 炮制; 黄酮苷; 刺桐碱; 溶出率; 水煎液

[中图分类号] R283.1;R284.1;R284.2;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0018-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220018

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160830.0741.004.html>

[网络出版时间] 2016-08-30 7:41

Influence of Processing on Contents and Dissolution Rates of Hypaphorine and Flavonoid Glycosides in Vaccariae Semen

ZHOU Guo-hong, TANG Li-ying, KOU Zhen-zhen, WANG Ting, GUO Ri-xin, WANG Zhu-ju*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of processing on contents of hypaphorine and flavonoid glycosides in Vaccariae Semen. **Method:** Before and after processing, HPLC was employed to determined contents and dissolution rates of hypaphorine, vaccarin, saponarin, isovitexin-2''-O-arabioside and vaccarin H in Vaccariae Semen with the mobile phase of acetonitrile-water for gradient elution and detection wavelength at 280 nm. **Result:** Before processing, their contents were 0.13%, 0.70%, 0.018%, 0.051% and 0.11%; after processing, their contents were 0.12%, 0.52%, 0.016%, 0.098% and 0.091%, respectively. However, dissolution rates of these five ingredients were raised by 7.7%, 10.2%, 10.8%, 11.4% and 17.8%, respectively. **Conclusion:** Processing has different influence on contents of hypaphorine and flavonoid glycosides in Vaccariae Semen, but their dissolution rates raise.

[Key words] Vaccariae Semen; processing; flavonoid glycosides; hypaphorine; dissolution rate; decoction

王不留行能活血通经、下乳消肿、利尿通淋,临床用于治疗经闭、痛经、乳汁不下、乳痈肿痛、淋证涩

[收稿日期] 20160112(010)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673602)

[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:496079805@qq.com

[通讯作者] *王祝举,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

痛等^[1],主要化学成分有黄酮苷、生物碱、三萜皂苷、环肽和挥发油等^[2-5]。黄酮苷类成分是王不留行催乳的有效成分,具有促进乳汁分泌的作用^[6]。另外,王不留行黄酮苷类成分还能保护血管内皮细胞^[7-8],而刺桐碱能抗炎、增强免疫和抗肝损伤^[9]。王不留行的炮制,自明代开始用炒法,一直沿用至今,但是对于王不留行的炒制并无定论。目前认为炒制能提高王不留行有效成分的水溶出率,从而提高其生物利用度。王不留行炒制后,其总溶出率确实能够提高^[10],但主要药效成分在炮制及溶出过程中的变化尚不明确。故本实验选择王不留行中含量较高的主要药效成分刺桐碱及王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷、王不留行黄酮苷 H 等黄酮苷类成分为指标,考察炮制对王不留行中主要化学成分含量及水煎溶出率的影响,为揭示该药材的炮制原理提供参考。

1 材料

U-3000 型高效液相色谱仪(戴安中国有限公司),BSA124S-CW 型 1/1 万电子天平和 CPA225D 型 1/10 万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。王不留行药材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;刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H(自制,经 HPLC 测定,纯度均 >98%),水为娃哈哈纯净水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

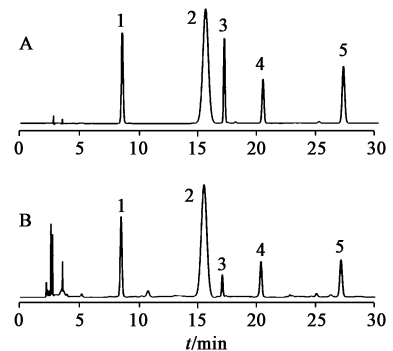
2.1 样品炮制 取净王不留行,按 2015 年版《中国药典》清炒法^[11]炒至大多数爆开白花,呈类球形爆花状,表面白色,质松脆。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H 对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,加 70% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 0.098,0.439,0.058,0.040,0.111 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取王不留行生品和炮制品粉末(过三号筛,下同)各约 1.2 g,分别置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 20 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得^[1]。

2.4 色谱条件 Acclaim™ 120 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)

梯度洗脱(0~12 min,13% A;12~18 min,17% A;18~30 min,20% A),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 刺桐碱;2. 王不留行黄酮苷;3. 肥皂草苷;4. 异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷;5. 王不留行黄酮苷 H

图 1 王不留行 HPLC

Fig. 1 HPLC of Vaccariae Semen

2.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1, 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,得刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷、王不留行黄酮苷 H 的回归方程分别为 $Y = 16.223X - 0.030$ ($r = 0.9997$), $Y = 12.559X + 1.928$ ($r = 0.9981$), $Y = 21.509X + 0.144$ ($r = 0.9990$), $Y = 21.700X - 0.088$ ($r = 0.9999$), $Y = 13.228X - 0.184$ ($r = 0.9999$),线性范围依次为 0.098~2.45, 0.439~10.975, 0.058~1.45, 0.040~1.00, 0.111~2.775 μg。

2.6 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液,按 2.4 项下色谱条件连续进样 6 次,计算刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H 峰面积的 RSD 分别为 0.6%,0.8%,0.9%,0.9%,1.3%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于配制后 0,2,4,8,12,24 h 按 2.4 项下色谱条件进样,计算刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H 峰面积的 RSD 分别为 0.5%,0.6%,0.7%,1.0%,1.1%,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生品 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。结果刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H 平均质量分数分别为 0.13%,0.70%,0.018%,

0.051% ,0.11% ,RSD 分别为 2.2% ,2.2% ,1.6% ,1.4% ,1.8% ,表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收试验 精密称取王不留行粉末(已知含量)约 300 mg,共 6 份,分别加入刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H 质量浓度分别为 0.466, 2.711,0.151,0.198,0.512 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液 1 mL,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,计算刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H 的平均加样回收率分别为 102.3% ,101.6% ,99.8% ,100.9% ,102.0% ,RSD 依次为 1.6% ,2.2% ,1.4% ,1.7% ,1.6% 。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,计算各成分的含量,见表 2。

2.11 水煎溶出率的测定 精密称取王不留行生品和炮制品各 6 份,每份约 1.2 g,置 100 mL 圆底烧瓶中,精密加水 20 mL,称定质量,加热回流 60 min,放冷,加水补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,按 2.4 项下条件测定,计算各成分在样品中的水煎出量及溶出率(溶出率 = 水煎出量/药材中质量分数 × 100%),见表 2。

3 讨论

本研究建立了同时测定王不留行中刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H 共 5 个化学成分含量的分析方法,该方法快速、简便,有助于该药材或饮片的质量控制与评价。通过研究炮制前后王不留行中这 5 个成分的含量变化,结果显示这 5 个成分在王不留行中含量均较高,而炮制后这 5 个成分含量变化趋势并不一致。异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷质量分数上升了 92.2% ,王不留行黄酮苷质量分数下降了 25.7% ,刺桐碱、肥皂草苷和王不留行黄酮苷 H 质量分数则分别下降了 7.7% ,11.1% 和 17.3% 。推测王不留行黄酮苷在酶或加热等因素作用下,失去了 4' 位的葡萄糖而产生了异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷,从而使后者含量大幅升高。将王不留行(生品或打碎生品)加水在 37 ℃ 分别浸泡 1,2,3,4 h,以检验此过程中是否有酶解反应发生,观察王不留行黄酮苷和异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷的含量变化,结果二者与不处理的生品含量基本一致;另外将适量王不留行黄酮苷密封至 1 mL 的安瓿瓶中,置于 200 g 王不留行中,按 2015 年版《中国药典》方法,在热锅

表 1 王不留行中各指标成分的加样回收率试验

Table 1 Recovery test of index ingredients in Vaccariae Semen

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
刺桐碱	0.389	0.466	0.855	100.0	102.3	1.6
	0.398	0.466	0.872	101.7		
	0.401	0.466	0.876	101.9		
	0.399	0.466	0.875	102.2		
	0.398	0.466	0.886	104.7		
	0.403	0.466	0.885	103.4		
王不留行黄酮苷	2.096	2.711	4.783	99.1	101.6	2.2
	2.141	2.711	4.897	101.7		
	2.157	2.711	4.930	102.3		
	2.146	2.711	4.831	99.0		
	2.142	2.711	4.968	104.2		
	2.169	2.711	4.974	103.5		
肥皂草苷	0.054	0.151	0.202	98.0	99.8	1.4
	0.055	0.151	0.205	99.3		
	0.055	0.151	0.205	99.3		
	0.055	0.151	0.205	99.3		
	0.055	0.151	0.209	102.0		
	0.056	0.151	0.208	100.7		
异牡荆素-2"-O-阿拉伯糖苷	0.153	0.198	0.347	98.0	100.9	1.7
	0.156	0.198	0.355	100.5		
	0.157	0.198	0.357	101.0		
	0.156	0.198	0.356	101.0		
	0.156	0.198	0.360	103.0		
	0.158	0.198	0.360	102.0		
王不留行黄酮苷 H	0.329	0.512	0.838	99.4	102.0	1.6
	0.336	0.512	0.858	102.0		
	0.339	0.512	0.857	101.2		
	0.337	0.512	0.860	102.1		
	0.337	0.512	0.871	104.3		
	0.341	0.512	0.869	103.1		

中清炒 3 ~ 4 min,约 80% 的王不留行爆花后,出锅放凉,取出安瓿瓶中的王不留行黄酮苷样品进行 HPLC 检测,结果该成分未发生变化。说明上述推测未被证实,仍需进一步研究确认。

素有“逢子必炒”之说,现代认为子类中药炒制后可能增加其生物利用度^[12-13]。有研究表明王不留行炒制后,其浸出物含量有较大幅度上升^[14]。本研究进一步比较了王不留行生品和炮制品水煎液中刺桐碱、王不留行黄酮苷、肥皂草苷、异牡荆素-2"-O-

表 2 王不留行中各指标成分含量、水煎出量和水煎溶出率的测定 (n = 6)

Table 2 Contents and dissolution rates of index ingredients in *Vaccariae Semen* (n = 6) %

成分	质量分数		水煎出量		溶出率	
	生品	炮制品	生品	炮制品	生品	炮制品
刺桐碱	0.130	0.120	0.080	0.083	61.5	69.2
王不留行黄酮苷	0.700	0.520	0.400	0.350	57.1	67.3
肥皂草苷	0.018	0.016	0.006 5	0.007 5	36.1	46.9
异牡荆素-2"- O-阿拉伯糖苷	0.051	0.098	0.015	0.040	29.4	40.8
王不留行黄酮苷 H	0.110	0.091	0.042	0.051	38.2	56.0

阿拉伯糖苷和王不留行黄酮苷 H 共 5 个成分水煎溶出率的差异,发现炮制后这 5 个化学成分的水煎溶出率均有升高。说明炮制能提高这 5 个成分在王不留行水煎液的溶出率。王不留行黄酮苷类成分是该药材催乳的有效成分,能促进乳汁分泌^[6],所以王不留行炮制增效可能与炮制后黄酮苷类成分在水煎液中的溶出率提高有关。

[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,2015:53.

[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] Zhou G, Tang L, Wang T, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of *Vaccaria hispanica* (Miller) Rauschert; a review [J]. *Phytochem Rev*, 2015, doi: 10.1007/s11101-015-9425-1.

[6] 秦君,李庆章,高学军. 王不留行主要成分对小鼠乳腺上皮细胞增殖及β-酪蛋白表达的影响[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(8) :2442-2447.

[7] 谢凤珊,冯磊,马丽萍,等. 王不留行黄酮苷对过氧化氢和高糖诱导损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2014, 26(7) :1009-1013.

[8] Xie F S, Cai W W, Liu Y L, et al. Vaccarin attenuates the human EA. hy926 endothelial cell oxidative stress injury through inhibition of Notch signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(1) :135-142.

[9] 陈学芬,钟正贤,李燕婧,等. 海帕刺桐碱药理作用的研究[J]. *中国中医药科技*, 2009(5) :372-373.

[10] 吕文海. 从煎出效果看果实种子药炮制[J]. *中药材*, 1985(4) :39-40.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:31.

[12] 张亚丽,王东青. 果实种子类药物炮制浅见[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2009, 11(6) :216.

[13] 郭建民. “逢子必炒”之探索[J]. *贵阳中医学院学报*, 1994(3) :59-60.

[14] 吕文海. 王不留炒制程度的实验观察[J]. *中成药研究*, 1986(2) :20.

[责任编辑 刘德文]