

## · 基础研究 ·

# HPLC 测定不同产地博落回茎叶中 *N*-对香豆酰酪胺的含量<sup>△</sup>

曾诚<sup>1,2</sup>, 曾建国<sup>1,2\*</sup>

1. 中兽药湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学, 湖南 长沙 410007

**[摘要]** 目的: 建立测定博落回茎叶中非生物碱 *N*-对香豆酰酪胺含量的方法, 为博落回茎叶微粉兽药质量控制提供新的评价指标。方法: 采用 HPLC, 色谱柱为资生堂 MG3 C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇:水 (40:60) 梯度洗脱<sup>[1]</sup>; 检测波长为 290 nm; 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为 35 °C。结果: *N*-对香豆酰酪胺的含量在 0.077 5 ~ 0.470 4 mg ( $r=0.999\ 6$ ) 与峰面积呈良好的线性关系, 该测定 *N*-对香豆酰酪胺含量方法的平均回收率为 99.45%。结论: 所建立的方法操作简单, 方便快捷, 重复性好, 适合用于测定博落回茎叶中 *N*-对香豆酰酪胺的含量。

**[关键词]** 博落回; *N*-对香豆酰酪胺; 高效液相色谱法; 含量测定

**[中图分类号]** R282.71; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)05-0622-04

**doi:** 10.13313/j.issn.1673-4890.20190125001

## Content Determination of *N*-*p*-Coumaroyltyramine in Stems and Leaves of *Macleaya cordata* from Different Place of Production by HPLC

Zeng Cheng<sup>1,2</sup>, Zeng Jian-guo<sup>1,3\*</sup>

1. Hunan Key Laboratory of Chinese Veterinary Medicine, Changsha, Hunan 410128, China;

2. Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410007, China

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for the determination of non-alkaloid *N*-*p*-Coumaroyltyramine in stems and leaves of *Macleaya cordata*. This study provided a new evaluation index for the quality control of micropowder veterinary drugs in the stems and leaves of *M. cordata*. **Methods:** HPLC method was used in this paper, the chromatographic column was Shiseido MG3 C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol:water (40:60) gradient elution<sup>[1]</sup>, the detection wavelength was 290 nm, the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and the column temperature was 35 °C. **Results:** The content of *N*-*p*-coumaroyltyramine ranged from 0.077 5 mg to 0.470 4 mg ( $r=0.999\ 4$ ), which showed a good linear relationship with the peak area. The average recovery of the method for the determination of *N*-*p*-coumaroyltyramine was 99.45%. **Conclusion:** The method is simplicity of operator, convenient and reproducible. It is suitable for the determination of *N*-*p*-coumaroyltyramine in the stems and leaves of *M. cordata*.

**[Keywords]** *Macleaya cordata*; *N*-*p*-coumaroyltyramine; HPLC; content determination

博落回 *Macleaya cordata* (willd.) R. Br 系罂粟科博落回属多年生草本植物。主要分布于长江中下游各省, 最早记载于《本草拾遗》, 此外李时珍所著《本草纲目》、2006 版《中药大辞典》等中药典籍均有载入, 全草皆可入药, 在中国已有 1000 多年的用药历史。

研究表明, 博落回植物中活性成分除生物碱以外, 还有其他非生物碱皂苷<sup>[2]</sup>、香豆素类内酯、苯丙酰胺类等。近年来大多数研究对象均是博落回中的生物碱, 鲜有研究博落回中的非生物碱。博落回提取物具有调节肠道菌群<sup>[3]</sup>、抗菌<sup>[4]</sup>、抗炎<sup>[5-6]</sup>等作用, 通过查阅文献, 证实 *N*-对香豆酰酪胺同样具有

<sup>△</sup> [基金项目] 中药材全产业链发展(2016SK3002)。

\* [通信作者] 曾建国, 教授, 研究方向: 中药资源与中兽药创制等综合利用; Tel: (0731)84673824, E-mail: zengjianguo@hunau.edu.cn

较好的抗炎、抑菌作用<sup>[7-9]</sup>。孙晶<sup>[10]</sup>利用 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型实验中,证明 *N*-对香豆酰酪胺在  $IC_{50}$  为  $13.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时能有效抑制 LPS 细胞释放一氧化氮,同时 *N*-对香豆酰酪胺对宫颈癌等肿瘤细胞也有良好的抑制作用<sup>[11-13]</sup>。为实现博落回植物资源的综合利用,本实验选取非生物碱 *N*-对香豆酰酪胺为指标,首次对贵州凯里、河南卢氏县、安徽岳西等 10 个产地博落回茎叶样本进行含量测定,为博落回茎叶微粉相关兽药产品提供新的质控标准。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1525 高效液相色谱仪,包括 2707 自动进样器和 2998 PAD 检测器(美国 Waters 公司),十万分之一分析天平 [梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司]; KQ-250B 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); DZKW-D-2 型水浴锅(上海医疗器械厂)。

### 1.2 试药

*N*-对香豆酰酪胺对照品(成都普思生物科技股份有限公司,纯度  $\geq 98.0\%$ ); 甲醇(色谱纯); 乙酸乙酯(分析纯); 重蒸水; 其他试剂均为分析纯。

博落回茎叶样本采集自安徽岳西、贵州凯里、河南卢氏县、湖北英山、江西新余、陕西西安、湖北通山、娄底涟源、河南洛阳、广西桂林,样本由湖南中医药大学杨广民教授鉴定为罂粟科博落回属植物博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. 的茎叶。

## 2 方法与结果

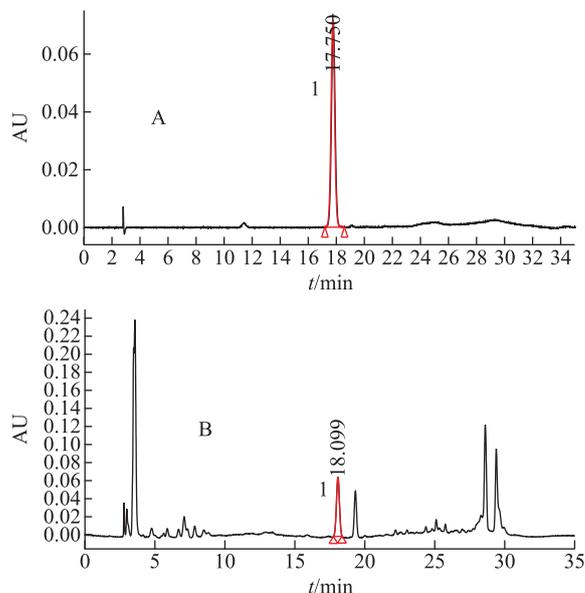
### 2.1 色谱条件

色谱柱为资生堂 MG3  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为甲醇-水(40:60); 梯度洗脱,洗脱时间为 35 min; 检测波长为 290 nm; 流速为  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 柱温为  $35^\circ\text{C}$ , 进样量为 10  $\mu\text{L}$ , 见图 1。

### 2.2 对照品溶液的制备

对照品母液:准确称取适量 *N*-对香豆酰酪胺对照品,加甲醇制成质量浓度为  $0.1962 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液。

对照品溶液:准确吸取对照品母液 3.0 mL,用甲醇定容至 10.0 mL,制成质量浓度为  $0.0235 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶液。



注: A. 对照品; B. 样品; 1. *N*-对香豆酰酪胺。

图 1 *N*-对香豆酰酪胺对照品和博落回茎叶样品的 HPLC 图

### 2.3 供试品溶液的制备

准确称取博落回茎叶微粉样品 10.0 g, 用滤纸包好, 置索氏提取器中, 加入乙酸乙酯 150 mL, 称质量, 浸泡 12 h, 水浴 ( $90^\circ\text{C}$ ) 提取至管内液体无色, 放冷, 称质量, 加乙酸乙酯补足质量, 经硅胶柱色谱, 以二氯甲烷-甲醇(25:1)洗脱, 收集所需洗脱液, 经减压浓缩至流浸膏状, 加 5.0 mL 甲醇悬浮, 超声 15 min, 滤过, 续滤液经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 即得。

### 2.4 线性关系考察

分别吸取 *N*-对香豆酰酪胺对照品母液, 进样量依次为 10、8、6、4、2  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项条件下测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标, *N*-对香豆酰酪胺浓度为横坐标, 经线性回归处理, 得回归方程  $Y = 43\ 589\ 644.47X - 5\ 951.833$  ( $r = 0.9996$ )。 *N*-对香豆酰酪胺含量在 0.0775 ~ 0.4704 mg 呈良好的线性关系。

### 2.5 精密度试验

准确吸取 *N*-对香豆酰酪胺对照品溶液, 同一天内, 重复进样 6 次, 记录 *N*-对香豆酰酪胺对照品的峰面积和保留时间, 其 RSD 分别为 0.52% 和 0.10%。结果表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

准确称取同一产地(湖北通山)博落回茎叶粉末

10.0 g, 按 2.3 项方法制备样品溶液, 分别于配制后 0、2、4、8、16、24 h 进行测定, RSD 为 2.03%, 表明供试样品在 24 h 内稳定。

### 2.7 重复性试验

取湖北通山博落回茎叶粉末 6 份, 按 2.3 项方法制备供试样品溶液, 按 2.1 项下条件测定, 经计算得 *N*-对香豆酰酪胺峰面积均值为 322 128, RSD 为 0.566%, 结果表明方法重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

分别准确称取已知含量的江西新余博落回茎叶粉末(0.001 5%)6 份, 每份 10.0 g, 按 2.3 项制备供试品溶液, 分别吸取每份供试品溶液 2.5 mL 置于 5 mL 容量瓶中, 每瓶中分别准确加入 1.30 mL 对照品溶液, 用甲醇溶液定容至 5 mL, 按 2.1 项条件下测定并计算回收率, 平均回收率为 98.7%, RSD 为 2.40%, 结果见表 1。

表 1 *N*-对香豆酰酪胺回收率

编号	取样量/mL	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	2.50	0.030 1	0.030 6	0.061 4	102.5	99.45	2.06
2	2.50	0.030 1	0.030 6	0.060 1	98.3		
3	2.50	0.030 1	0.030 6	0.059 9	97.6		
4	2.50	0.030 1	0.030 6	0.061 1	101.5		
5	2.50	0.030 1	0.030 6	0.060 8	100.5		
6	2.50	0.030 1	0.030 6	0.059 5	96.3		

### 2.9 样品含量测定

准确称取 10 个不同产地的博落回茎叶微粉各 10.0 g, 按 2.3 项方法制备供试品溶液, 按 2.1 项条件下测定含量, 记录峰面积, 结果见表 2。

表 2 不同产地博落回茎叶中 *N*-对香豆酰酪胺含量测定( $n=3$ )

产地	称样量/g	质量分数/%	RSD/%
安徽岳西	10.005	0.000 6	0.02
湖北英山	10.002	0.001 8	0.18
江西新余	10.024	0.001 5	0.03
陕西西安	10.005	0.001 7	0.03
湖北通山	10.017	0.000 8	0.13
娄底涟源	10.025	0.001 1	0.30
河南洛阳	10.002	0.006 7	0.11
广西桂林	10.010	0.002 7	0.26
贵州凯里	10.018	0.000 4	0.23
河南卢氏县	10.001	0.002 5	0.04

## 3 讨论

本实验目的在于建立非生物碱 *N*-对香豆酰酪胺的含量测定方法, 为博落回茎叶微粉相关兽药开发奠定基础, 并提供新的质控标准。

在提取工艺的考察上, 先对比了水、乙酸乙酯、甲醇分别作为提取溶剂时对 *N*-对香豆酰酪胺提取率的影响, 结果显示, 乙酸乙酯提取的效果优于其他两种溶剂, 再用乙酸乙酯为提取溶剂, 对比冷凝回流法、索氏提取法、超声提取法对提取率的影响, 结果表明, 用索氏提取法得到的 *N*-对香豆酰酪胺含量最高, 提取终点为提取至管内液体无色。故本实验选取乙酸乙酯为提取溶剂, 提取方式为索氏提取法。

因为该非生物碱含量低, 为了进一步实验需求, 对提取后的溶液经硅胶柱层析纯化, 以二氯甲烷-甲醇(25:1)洗脱, 收集所需洗脱液, 经减压浓缩至流浸膏状, 加 5.0 mL 甲醇悬浮, 超声 15 min。

全波长扫描结果及查阅的文献, 均表明在 290 nm 波长处, *N*-对香豆酰酪胺有最大吸收, 从而选取 290 nm 为检测波长。

本实验采用 HPLC 对 10 个不同产地的博落回茎叶样本中非生物碱 *N*-对香豆酰酪胺的含量进行测定, 结果表明, RSD 均小于 5%, 说明本实验方法是稳定的、可行的, 能用于检测博落回其他部位中 *N*-对香豆酰酪胺的含量, 邓安珺等<sup>[4]</sup>从博落回根中分离纯化得到 150 mg *N*-对香豆酰酪胺纯品, 表明博落回其他部位中也含该非生物碱, 其中各部位的含量值得我们进一步研究, 从而达到博落回资源的综合利用开发。

## 参考文献

- [1] 宋捷, 翟延君, 王荣祥, 等. HPLC 测定不同商品水红花子中 *N*-*p*-香豆酰酪胺的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(3): 272-274.
- [2] 何福龙, 郑艳萍, 任娟, 等. 薄层扫描法同时测定三七细粉中皂苷含量[J]. 中国现代中药, 2018, 20(8): 975-978.
- [3] STIBOROVA M, VOSTALOVA J, ZDARILOVA A, et al. Macleaya cordata extract and Sangrovit genotoxicity. *in vivo*[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2008, 152(1): 35-39.
- [4] 王朝元, 童胜兰, 胡鑫. 博落回生物碱成分及其抗菌活性的研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2015, 34(1): 39-42.

(下转第 628 页)

#### 4 讨论

不同的物种有不同的生长习性,因此,应针对华中五味子的生境特征和生长习性建立切实可行且成本较低的野生抚育和产地初加工关键技术。在野生抚育措施方面,采取通过修剪华中五味子的枝条和遮阴植物,实施通风透光抚育的措施。但该措施在被攀援植物为高大乔木使得华中五味子枝稍高度较高时可行性稍差,这类情况通常是华中五味子生长在阔叶林下的林隙内,个体数量较少,为避免对群落的破坏,除采集少量种源外,一般不进行抚育与采集工作。采取于幼苗期立架,该措施易于操作可行性强,能够有效帮助幼苗生长,增强华中五味子的种间竞争力;人工补植增加个体密度,同时调整华中五味子植株的雌雄比例,有助于居群复壮。在药材采收方面,为了保证采集过程中药材质量稳定,同时不引起居群的过度破坏,可采用轮采方式,适度保留种源,并统一采收期。在产地加工方面,当前不同产地加工方式不一,可统一采取自然晾干的干燥方式,特别注意不要采用蒸煮的加工方式,因为高温处理可能会导致对人体有害物质5-羟甲基糠醛(5-HMF)的产生<sup>[9]</sup>。

本文根据实地调研结果,针对华中五味子的生境特征及生物学特性,结合药材产地采收加工的真实情况,确定了华中五味子的野生抚育中的关键技术,具有较强的实践指导意义,为华中五味子野生

资源保护和促进中药材可持续发展奠定基础。

**致谢:**感谢罗仲平先生(四川省平武县水晶合作社)、李策宏先生(四川省峨眉山植物园)、杨林森先生(湖北省神农架保护站)及党学德先生(陕西省柞水县)在本课题组开展产地调研工作时给予了大力支持和帮助!

#### 参考文献

- [1] 陈士林,魏建和,黄林芳,等. 中药材野生抚育的理论与实践探讨[J]. 中国中药杂志,2004(12):5-8.
- [2] 陈嘉谟. 本草蒙筌[M]. 陆拯,赵法新,校点. 北京:中医中药出版社,2013:15.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:244.
- [4] 世界自然基金会(瑞士)北京代表处——成都项目办公室. 南五味子野外识别与可持续采集、加工指南[M]. 成都:[出版者不详],2016.
- [5] 燕瑞勤. 栽培条件下华中五味子茎生物学特性研究[J]. 陕西林业科技,2011,186(2):15-17.
- [6] 卜海东. 华中五味子地上部分生长发育动态研究[D]. 西安:陕西师范大学,2008.
- [7] 魏南玉. 华中五味子果实发育阶段木脂素含量变化的研究[D]. 西安:陕西师范大学,2008.
- [8] 袁仕禄,王玉彦,贾卫国,等. 华中五味子引种栽培[J]. 北方园艺,1998(2):84.
- [9] 安开龙,李德坤,周大铮,等. 不同干燥方法对五味子药材品质的影响[J]. 中国中药杂志,2014,39(15):2900-2906.

(收稿日期:2018-12-26 编辑:姚霞)

(上接第624页)

- [5] 张胜菊,柯治国,南玉生. 博落回抽提物对黄守瓜、菜青虫的田间药效评价[J]. 华中农业大学学报,2003,22(5):450-451.
- [6] 张换成,陈梅,柳亦松,等. 在模拟人工胃肠道环境中博落回主要生物碱类成分的稳定性特征分析[J]. 中国现代中药,2017,19(10):1387-1390,1414.
- [7] 郁建平,赵东亮,孟祥斌,等. 博落回生物碱对8种真菌N抑菌IFgl[J]. 山地农业生物学报,2006,25(1):89-91.
- [8] 郭小清,唐莉苹. 中药博落回的研究进展[J]. 兽药研发,2006(5):11-12.
- [9] 高红梅,付小草,何婷,等. 博落回生物碱对12种植物病原菌的抑制活性研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(18):5810-5812.
- [10] 孙晶. 茄根的抗炎活性成分及其质量标准研究[D]. 北京:北京中医药大学,2015.
- [11] UMEOKOLI B O, MUHARINI R, OKOYE F B, et al. New C-methylated flavonoids and  $\alpha$ -pyrone derivative from roots of *Talinum triangulare* growing in Nigeria[J]. *Fitoterapia*, 2016,109:169-173.
- [12] CARDULLO N, PULVIRENTI L, SPATAFORA C, et al. Dihydrobenzofuran neolignanamide: laccase-mediated biomimetic synthesis and antiproliferative activity[J]. *J Nat Prod*,2016,79(8):21-22.
- [13] KIM H S, LEE J W, JANG H, et al. Phenolic amides from *Tribulus terrestris*, and their inhibitory effects on nitric oxide production in RAW 264. 7 cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2018,41(2):192-195.
- [14] 邓安璐. 小果博落回和土蜜树化学成分研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2008.

(收稿日期:2019-01-25 编辑:王笑辉)