

参考文献

[1]Lawson LJ,Perry VH,Dri P,et al.Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain [J]. Neuroscience,1990,39(1):151-170

[2]Streit WJ,Conde JR,Fendrick SE,et al.Role of microglia in the central nervous system's immune response [J].Neurol Res,2005,27 (7): 685-691

[3]Wilms H,Zecca L,Rosenstiel P,et al.Inflammation in Parkinson's diseases and other neurodegenerative diseases: cause and therapeutic implications[J].Curr Pharm Des,2007,13(18):1925-1928

[4]Haixia Hu,Zuanfang Li,Xiaoqin Zhu,et al.Gua Lou Gui Zhi decoction suppresses LPS-induced activation of TLR4/NF-κ B pathway in BV-2murine microglia cells[J].Int J Mol Med,2013,31(6):1327-1332

[5]Taylor RA,Sansing LH.Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage[J].Clin Dev Immunol,2013:746068

[6]Ouyang YB.Inflammation and stroke[J].Neurosci Lett,2013,548:1-3

[7]Kumral A,Tuzun F,Ozbal S,et al.Lipopolysaccharide-preconditioning protects against endotoxin-induced white matter injury in the neonatal rat brain[J].Brain Res,2012,1489:81-89

[8]陈莹莹,孙光玲,兰倩,等.Toll 样受体与脑缺血[J].现代生物医学进

展,2014,14(12):2369-2375

[9]Marsh BJ,Williams-Karnesky RL,Stenzel-Poore MP.Toll-Like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke [J]. Neuroscience,2009,158(3):1007-1020

[10]付剑亮,刘雨,聂成福,等.转化生长因子-β1 与脑缺血[J].卒中与神经疾病,2000,7(2):125-126

[11]Henrich-Noack P,Prehn JH,Kriegelstein J.TGF-beta 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms[J].Stroke,1996,27(9):1609-1614

[12]Bsibsi M,Persoon-Deen C,Verwer RW,et al.Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators[J].Glia,2006,53(7):688-695

[13]Spera PA,Ellison JA,Feuerstein GZ,et al.IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke[J].Neurosci Lett,1998,251(3):189-192

[14]张莉,杜冠华.细胞因子在脑缺血损伤机制中的作用[J].国外医学:脑血管疾病分册,2004,12(5):379-382

[15]Takeda K,Akira S.TLR signaling pathways [J].Semin Immunol, 2004,16(1):3-9

(收稿日期: 2016-12-30)

蜂胶中短叶松素的提取分离与含量测定*

文萍 刘雯 张娣 康明 陈乐#
(江西省中医药研究院 南昌 330046)

摘要:目的:研究蜂胶中短叶松素的制备工艺及含量测定方法,并测定和比较 12 个产地蜂胶中短叶松素的含量。方法:采用溶剂提取、大孔树脂吸附及葡聚糖凝胶色谱和重结晶等方法进行分离纯化,根据理化性质和核磁数据对化合物进行结构鉴定为短叶松素;用 HPLC 法测定蜂胶中短叶松素含量,YMC C₁₈ 柱(4.6 mm× 250 mm,5 μm),流速为 1.0 ml·min⁻¹,甲醇-0.1%磷酸溶液(60:40),检测波长:292 nm。结果:所得短叶松素的纯度在 98.5%以上,短叶松素在 8.512~425.6 μg 线性关系良好,平均回收率(n=6)为 98.60%,RSD 为 0.97%,12 个产地的蜂胶中短叶松素以新疆、云南、陕西三地含量较高。结论:提取分离的短叶松素含量高,可作为含量测定用对照品,含量测定方法稳定、可靠,可作为蜂胶中短叶松素含量测定方法。

关键词:蜂胶;短叶松素;提取分离;含量测定

中图分类号:R284.2

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2017.01.091

蜂胶具有抗过敏、抗炎、抗氧化、强化血管、抑制病毒、抗肿瘤、增强机体免疫力等保护身体健康、抵御疾病入侵的作用^[1-2]。蜂胶中含有丰富的黄酮类^[3]等生物活性成分,具有极为丰富的药理活性。短叶松素及其衍生物具有强化血管、抗菌、抗炎、抗氧化作用^[4-5],还具防止肝功能损伤、保肝护肝的作用^[6],也是发挥蜂胶功效的物质基础之一。蜂胶的分布非常广泛,不同产地的蜂胶中各成分含量参差不齐^[7]。本文采用简单有效的方法提取分离出蜂胶中的短叶松素,并采用高效液相色谱法对 12 个产地的 54 批蜂胶中短叶松素含量进行了测定和比较,为蜂胶质量标准的制定及资源开发利用提供参考依据。现报告如下:

1 仪器与试剂

1.1 仪器 旋转蒸发仪(Eyela 公司),低温循环水式真空泵(郑州长城科工贸有限公司),Waters 1525-2487-2707 型高效液相色谱仪,TU-1810 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),中压液相色谱仪(Bruker 公司),400 MHz 和 600 MHz 核磁共振仪(Varian 公司),Micromass Auto specultima ETOF 型质谱仪,CQ-250 超声波清洗器(上海船舶电子设备研究所),MettlerTkledoAG135 双量程电子天平(十万分之一),Simplicity™ 超纯水系统(Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂 蜂胶为课题组收集云南(样品编号 16、17)、四川(编号 35、37、38)、江西(编号 90、

* 基金项目:江西省科技计划项目(编号:20141BBG70075)

通讯作者:陈乐,E-mail: 76349830@qq.com

99、103、104、106)、湖南(编号 110、111、117、118、119)、山东(编号 128、129、142、151)、河南(编号 27、28、30、43、45、46、47)、山西(编号 49、50、52、57)、内蒙(编号 130、134、136)、辽宁(编号 53、138)、陕西(编号 1、2、4、6、9)、甘肃(编号 10、15)、新疆(编号 31、41)、浙江(编号 86、87、88、89)等地 48 个蜂胶及汪氏蜜蜂园有限公司提供的 6 批蜂胶,经江西省中医药研究院余良忠研究员鉴定为蜜蜂 *Apis cerana* Fabr. 将采自植物的枝条、叶芽及愈伤组织等的分泌物与上腭腺、蜡腺等的分泌物同少量花粉混合后所形成的黏性物质。短叶松素对照品(自制,纯度 98.69%),AB-8 型大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科技有限公司),葡聚糖凝胶 Sephadex LH-20、CG161 型大孔树脂(美国罗门哈斯公司),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 短叶松素的提取分离 参考文献^[8]称取蜂胶原料约 200 g,置于冰箱冷冻层 24 h 后,用粉碎机粉碎,过 1 号筛,加入 1 000 ml 的 95%乙醇,振摇提取 2 次,每次提取 4 h,滤过,回收乙醇,浓缩,真空干燥(80 ℃,-0.1 MPa) 12 h,得蜂胶提取物。取蜂胶提取物倒入圆底烧瓶,加入 200 ml 95%乙醇回流,至蜂胶提取物全部溶解。将蜂胶提取物乙醇溶液减压浓缩至适宜浓度,湿法上样,上大孔吸附树脂柱。甲醇-水溶剂系统(1:10、2:10、3:10、4:10、5:10、10:10)梯度洗脱,收集各段的洗脱液 2 000 ml,按极性大小分为 A、B、C、D、E、F。取 D 洗脱液,浓缩,将浓缩液上 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱。甲醇-水溶剂系统(1:10、2:10、3:10、4:10、5:10、10:10)梯度洗脱,收集各段的洗脱液 2 000 ml,按极性大小分为 AA、BB、CC、DD、EE、FF。组分 CC 经硅胶柱(石油醚-丙酮 2:1)及制备液相(40%~70%)得化合物(1 g)。经高效液相色谱归一法测定,其纯度>98.5%。

2.2 短叶松素的结构鉴定 淡黄色针状结晶(甲醇)。¹H-NMR(600 MHz,DMSO-d₆)δ:11.89(1H,s,5-OH),10.85(1H,s,7-OH),5.85(1H,d,J=6.6 Hz,3-OH),7.38~7.53(5H,m,B 环上的 H),5.90(1H,d,J=1.8 Hz,H-6),5.94(1H,d,H-8),4.64(1H,dd,J=11.4,6.0 Hz,H-3),5.19(1H,d,J=11.4 Hz,H-2)。¹³C-NMR(150 MHz,DMSO-d₆)δ:83.4(C-2),72.0(C-3),198.1(C-4),163.8(C-5),96.7(C-6),167.4(C-7),95.6(C-8),163.0(C-9),101.0(C-10),137.8(C-1'),128.6(C-2',6'),128.7(C-3',5'),129.1(C-4')。

以上数据与文献报道^[9]一致,故鉴定为短叶松素(pinobaksin)。

2.3 短叶松素的含量测定

2.3.1 色谱条件的选择 取对照品短叶松素约 10 mg,精密称定,置 25 ml 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 400 μg·ml⁻¹ 的对照品溶液。精密吸取上述溶液 1 ml 于 10 ml 容量瓶中,加甲醇至刻度摇匀。取上述对照品溶液置紫外分光光度计上进行光谱扫描,在 292 nm 有明显吸收峰。结果见图 1。色谱条件选择 YMC C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流速为 1.0 ml·min⁻¹,检测波长:292 nm,按甲醇-0.1%磷酸溶液(60:40)进行洗脱,结果蜂胶分离峰型好,分离度满足液相色谱要求。见图 2、图 3。

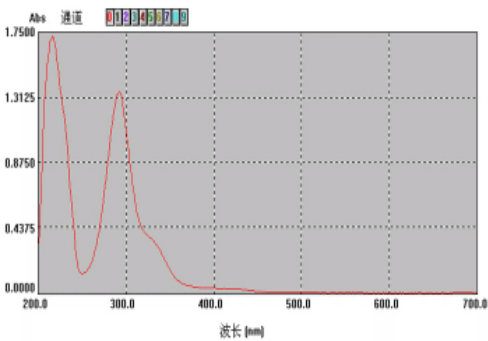


图 1 短叶松素紫外光谱图

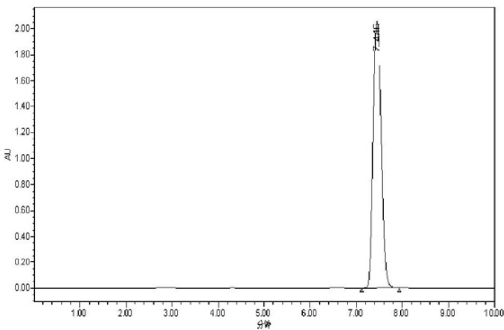


图 2 短叶松素对照品色谱图

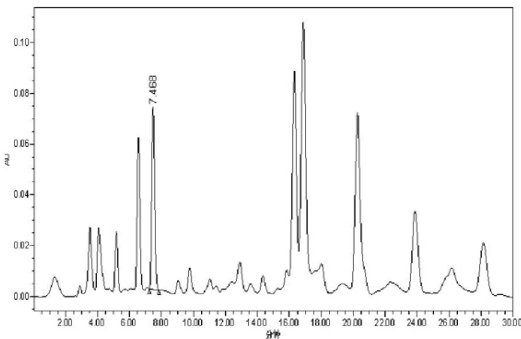


图 3 蜂胶供试品色谱图

2.3.2 供试品溶液的制备 取蜂胶药材约 50 mg,精密称定,至 25 ml 容量瓶中,加甲醇适量,超声处理 15 min 取出,放置至室温,加甲醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液。

2.3.3 线性关系的考察 取对照品短叶松素约 10.64 mg,精密称定,置 25 ml 量瓶中,加甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀得浓度为 425.6 μg•ml⁻¹ 的对照品溶液。将此对照品溶液分别稀释至 1 ml 含 8.512、17.024、34.048、42.560、85.120 μg 短叶松素的溶液。精密吸取上述短叶松素对照品溶液各 10 μl,注入液相色谱仪中,在 292 nm 波长处测定其峰面积,将浓度对峰面积值进行回归,回归方程为 Y=61 451.82X+22 195.95(R²=0.999 9),短叶松素在进样量 8.512~425.6 μg,与峰面积值呈良好的线性关系。

2.3.4 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μl,注入液相色谱仪中,重复进样 6 次,在 292 nm 处测定其峰面积,经数据分析,RSD=1.39%。

2.3.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μl,在不同时间点 0、2、4、8、12、24 h 注入液相色谱仪中,分别测定短叶松素峰面积,经数据分析,RSD=1.23%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.6 重复性试验 取同一批蜂胶药材共 6 份,测定短叶松素平均含量为 0.60%,RSD=0.01%。

2.3.7 回收率试验 取蜂胶供试品约 25 mg 共 6 份,精密称定,置 25 ml 量瓶中,分别精密加入短叶松素对照品溶液 5 ml(1 ml 含短叶松素 42.56 μg),加入适量甲醇,超声处理 15 min,取出,放置至室温,加甲醇至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,注入液相色谱仪测定短叶松素含量,计算回收率。见表 1。

表 1 回收率试验结果

样品号	原有量 (μg)	加入量 (μg)	测得总量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	188.8	212.8	399.8	99.15	98.60	0.97
2	189.0	212.8	395.6	97.09		
3	186.4	212.8	397.5	99.20		
4	186.2	212.8	394.2	97.74		
5	191.6	212.8	401.9	98.83		
6	186.3	212.8	398.2	99.58		

2.4 样品中短叶松素和咖啡酸的含量测定 取 54 批蜂胶样品,按上述方法测定其短叶松素含量。见表 2。

表 2 合格蜂胶中短叶松素测定结果

序号	蜂胶编号	短叶松素(%)	序号	蜂胶编号	短叶松素(%)	序号	蜂胶编号	短叶松素(%)
1	样品 1	0.98	19	样品 45	2.08	37	样品 111	1.42
2	样品 2	2.06	20	样品 46	1.66	38	样品 117	1.64
3	样品 4	2.84	21	样品 47	1.91	39	样品 118	1.97
4	样品 6	3.85	22	样品 49	2.83	40	样品 119	2.54
5	样品 9	1.48	23	样品 50	1.47	41	样品 128	2.68
6	样品 10	2.02	24	样品 52	2.15	42	样品 129	1.21
7	样品 15	1.24	25	样品 53	1.04	43	样品 130	1.71
8	样品 16	2.60	26	样品 57	1.98	44	样品 134	1.33
9	样品 17	2.24	27	样品 86	1.17	45	样品 136	1.94
10	样品 27	2.46	28	样品 87	1.02	46	样品 138	1.14
11	样品 28	2.59	29	样品 88	0.95	47	样品 142	1.33
12	样品 30	3.42	30	样品 89	1.02	48	样品 151	1.71
13	样品 31	2.70	31	样品 90	0.98	49	20110831	1.76
14	样品 35	1.01	32	样品 99	1.54	50	20120318	1.76
15	样品 37	2.64	33	样品 103	1.27	51	20120813	1.68
16	样品 38	2.42	34	样品 104	1.31	52	20120510	1.43
17	样品 41	2.61	35	样品 106	2.31	53	20120712	1.68
18	样品 43	2.00	36	样品 110	1.29	54	20120727	1.84

3 讨论

本文以蜂胶中短叶松素为研究对象,考察其提取分离技术,成功在蜂胶中分离出短叶松素。从本文表 2 测定结果可知,54 批合格蜂胶短叶松素的含量范围为 0.95%~3.85%,平均含量为 1.85%,结合本项目前期研究测得结果^[9],规定蜂胶中短叶松素含量不得低于 0.95%。由表 2 实验结果可以看出各地蜂胶中短叶松素平均含量有显著差异,云南 2.42%、四川 2.02%、江西 1.48%、湖南 1.77%、山东 1.73%、河南 2.30%、山西 2.11%、内蒙 1.66%、辽宁 1.09%、陕西 2.42%、甘肃 1.63%、新疆 2.66%,其中以新疆、云南、陕西三地含量最高。汪氏蜜蜂园有限公司提供的 6 批蜂胶中短叶松素平均含量为 1.69%,也在合格范围内。通过对 12 省 54 批蜂胶药材中短叶松素的含量测定和比较,规定了短叶松素含量下限,为以后蜂胶质量和资源开发利用提供参考依据。

参考文献

[1]孟晓英,王玉华,魏春琴.蜂胶药理作用研究概述[J].中国现代药物应用,2010,4(18):245
[2]蒋春红,吕武清,胡棠洪.蜂胶的药理作用研究概况[J].中国医药指南,2011,9(17):42-43
[3]张翠平,胡福良.蜂胶中的黄酮类化合物[J].天然产物研究与开发,2009,21(6):1084-1090
[4]王馨.蜂胶黄酮对小鼠 N2a 细胞缺氧缺糖所致损伤的保护作用及机理研究[D].北京:中国农业科学院.2014.1-10
[5]尹志华.云南蜂胶对四种牙周主要可疑致病菌作用的实验研究[D].昆明:昆明医科大学.2012.24-44
[6]杜夏.蜂胶保肝活性成分的分离及其保肝机制初探[D].北京:中国农业科学院.2013.23-33
[7]吴健全,高蔚娜,韦京豫,等.不同产地蜂胶成分含量的比较[J].中国食物与营养,2013,19(7):62-65
[8]吕武清,文萍,姚剑平,等.蜂胶提取物制备工艺研究[J].中草药,2014,45(6):791-794
[9]安宁,杨世林,邹忠梅,等.高良姜黄酮类化学成分的研究[J].中草药,2006,37(5):663-664
[10]文萍,范婷婷,吕武清,等.RP-HPLC 测定蜂胶中乔松素、白杨素和高良姜素的含量[J].中国实验方剂学,2013,19(19):108-110

(收稿日期:2016-09-27)