

· 药物分析 ·

HPLC法测定防风中升麻苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的含量

李悦悦, 王慧, 陈俊, 赵亮, 张海, 张国庆 (第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定防风中升麻苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的含量。方法 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (5 μm, 150 mm × 4.6 mm id) 柱, 甲醇-水流动相体系梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 流速 0.7 ml/min, 柱温 25℃, 进样量 5 μl。结果 成功建立了防风中 4 种主要成分的 HPLC 含量测定方法, 且方法学考察结果良好。结论 该方法简便可行, 定量准确, 可用于防风中 4 种主要成分的质量控制。

[关键词] 防风; 升麻苷; 升麻素; 5-O-甲基维斯阿米醇苷; 亥茅酚苷; HPLC

[中图分类号] R92 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)06-0445-04

Determination of prim-O-glucosylcimifugin, cimifugin, 4'-O-glucosyl-5-O-methylvisaminol and sec-O-β-D-glucosylhammudol in *Radix Saposhnikovia* by HPLC

LI Yueyue, WANG Hui, CHEN Jun, ZHAO Liang, ZHANG Hai, ZHANG Guoqing (Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for the determination of prim-O-glucosylcimifugin, cimifugin, 4'-O-glucosyl-5-O-methylvisaminol and sec-O-β-D-glucosylhammudol in *Radix Saposhnikovia*. **Methods** The sample was analyzed on an Agilent Zorbax SB-C₁₈ (5 μm, 150 mm × 4.6 mm id) column with methanol-water mobile phase for the gradient elution. The detection wavelength was 254 nm and flow rate was 0.7 ml/min. The column temperature was 25℃ and injection volume was 5 μl. **Results** The HPLC method for the determination of four major components in *Radix Saposhnikovia* was established. The result of method was good. **Conclusion** The method was simple and feasible and accurate which could be available for the quality control of *Radix Saposhnikovia*.

[Keywords] *Radix Saposhnikovia*, prim-O-glucosylcimifugin, cimifugin, 4'-O-glucosyl-5-O-methylvisaminol, sec-O-β-D-glucosylhammudol, HPLC

防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk 的未抽花茎植株的干燥根。味辛甘, 性温, 能解表祛风, 胜湿, 止痉。用于感冒头痛, 风湿痹痛, 风疹瘙痒, 破伤风。药理实验研究表明, 其具有解热、镇痛、镇静、抗炎、抗过敏、抗惊厥、抑菌和增强机体非特异性免疫功能的作用^[1-6]。防风主产于东北地区和华北地区, 为我国常用中药材。迄今为止, 已从生药防风中分离出来各种化学成分达 100 种以上, 其中主要报道了挥发油、色原酮类、有机酸、香豆素类、聚炔类、多糖类、谷甾醇、胡萝卜苷、甘露醇、蔗糖、木腊酸以及微量元素等化合物^[7-9]。目前 2010 年版《中国药典》标准中只对防风中升麻苷和 5-O-甲基维

斯阿米醇苷 2 个成分进行了含量测定, 药理实验证明升麻苷与 5-O-甲基维斯阿米醇苷均有解热、镇痛、抗炎等药理作用^[4,5]。而由作者经 HPLC-TOF/MS 分析鉴别防风入血, 入尿成分结果^[10]可知, 防风在血浆中含量最高的成分是升麻素, 且其为防风的主要代谢形式, 升麻苷与 5-O-甲基维斯阿米醇苷可能转化为升麻素吸收入血, 因而测定防风药材中升麻素的含量也十分必要。亥茅酚苷作为防风中一个主要的色原酮类成分, 在防风药材中含量也较高。基于此, 本研究建立了这 4 个色原酮类成分的含量测定方法, 其结构如图 1 所示。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 配有低压四元泵, 二极管阵列检测器, 自动进样器, 柱温箱, ChemStation 色谱工作站; 上海淀久 DJ-04 药材粉碎机。共收集了 10 个批次的防风样品, 来源信息如表

[作者简介] 李悦悦 (1985-), 女, 硕士研究生。E-mail: llyue429@gnail.com

[通讯作者] 张国庆。Tel: (021) 81875571。

3所示;对照品升麻苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷(含量测定用)均购自中国药品生

物制品检定所。甲醇为色谱纯(Fisher USA),水为市售娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。

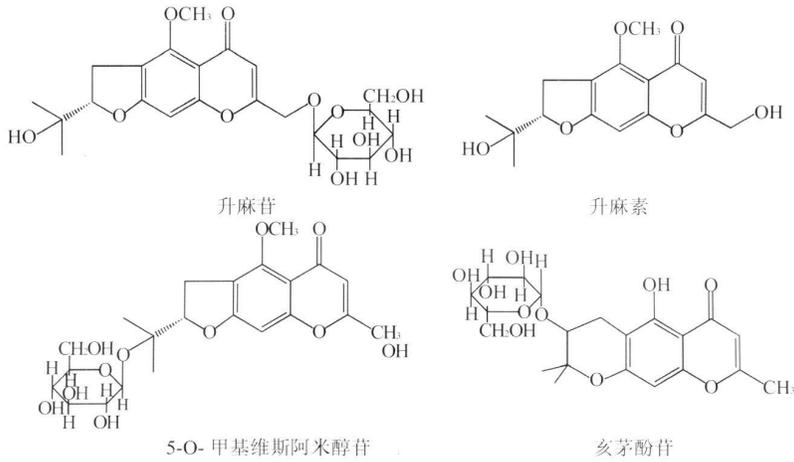


图 1 防风中 4 个色原酮类成分的结构示意图

2 方法与结果

2.1 对照品储备液的制备 取升麻苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷对照品各约 5 mg 精密称定,分别置于 10 ml 容量瓶,甲醇定容,分别得 487、496、512、519 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的对照品溶液,作为对照品储备液。将对照品储备液逐级稀释后混合,得 6 个浓度梯度的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取防风药材粉末约 0.3 g 精密称定,置 100 ml 圆底烧瓶中,加入甲醇 20 ml 称定重量,水浴回流提取 2 h,甲醇补重,过 0.45 μm 微孔滤膜,进样 5 μl 。

2.3 色谱条件和系统适应性试验 色谱柱: Agilent

Zorbax SB-C₁₈ (5 μm , 150 mm \times 4.6 mm id), 流动相: 甲醇 (B)-水 (A) 流动相体系, 梯度洗脱: 0~5 min, 40%~45% B; 5~15 min, 45%~60% B; 15~20 min, 60%~60% B; 20~20.1 min, 60%~95% B; 分析时间 30 min, 流速 0.7 ml/min, 检测波长 254 nm, 进样量 5 μl ; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。在此色谱条件下,以供试品溶液进样 5 μl 根据色谱参数计算系统适应性。供试品中升麻苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的理论塔板数分别为 69 277、96 479、144 947 和 87 520, 保留时间分别为 6.52、9.82、12.23、18.22 min, 各成分分离度分别为 4.33、3.34、1.54 和 2.31。进样混合对照品和样品溶液色谱图见图 2。

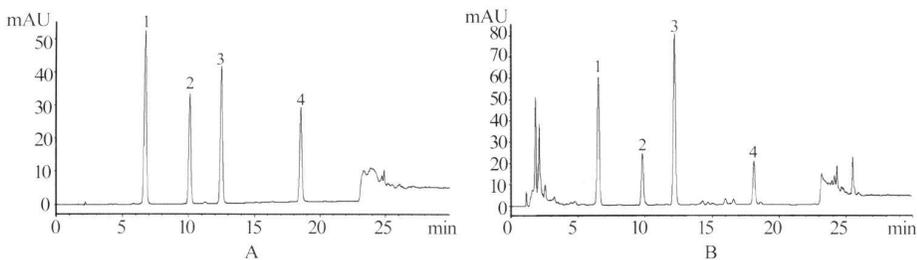


图 2 防风中 4 个色原酮类成分的液相色谱图

A 对照品; B 样品; 1 升麻苷; 2 升麻素; 3 5-O-甲基维斯阿米醇苷; 4 亥茅酚苷

2.4 线性关系 分别吸取 6 个浓度梯度的混合对照品溶液 5 μl 注入高效液相色谱仪分析,以对照品溶液中各成分的浓度 (g/ml) 为横坐标,以色谱峰面积为纵坐标,计算升麻苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿

米醇苷和亥茅酚苷的线性回归方程。结果分别为: 升麻苷 $Y = 12.63X + 3.253$, $r = 0.9999$; 升麻素 $Y = 20.29X + 2.891$, $r = 0.9999$; 5-O-甲基维斯阿米醇苷 $Y = 14.21X + 3.519$, $r = 0.9999$; 亥茅酚苷 $Y =$

19.54X + 0.175, $r = 0.999$ 。结果表明 4 个成分分别在 0.619 0~1.98 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.228 0~73.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.420 0~134.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 0.219 0~70.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内呈良好线性关系。

2.5 精密度实验 分别精密吸取低、中、高 3 个浓度梯度的对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件于 1 d 之内连续进样 5 次,以及连续 3 d 分别进样,计算各成分浓度的 RSD 值,进行日内精密度和日间精密度考察。结果表明精密度 RSD 均小于 3%,精密度良好。

2.6 重复性试验 按 2.2 项下供试品制备方法制备 5 份样品,各取 5 μl 进样,分别测定升麻苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的含量,计算其 RSD,分别为 1.37%、0.50%、0.73% 和 1.89%,均小于 3%,表明测定方法的重复性良好。

2.7 准确度(加样回收率)试验 取 0.3 g 1 号防风样品 9 份,精密称定,分别精密加入 3 个浓度梯度的混合对照品溶液,各 3 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,测定其中 4 个成分的含量,计算回收率及 RSD。结果见表 1、表 2 所示,回收率均在 93%~103% 范围内,RSD 均小于 5%,符合要求。

表 1 升麻苷、升麻素回收率试验结果 ($n = 9$)

| 化合物 | 原有量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 回收率 (%) | RSD (%) |
|--------|----------|----------|----------|---------|---------|
| 升麻苷 | 1.276 | 0.622 1 | 1.926 | 104.5 | 2.79 |
| | 1.278 | 0.622 1 | 1.922 | 103.5 | |
| | 1.275 | 0.622 1 | 1.893 | 99.34 | |
| | 1.274 | 1.290 | 2.576 | 100.9 | |
| | 1.280 | 1.290 | 2.551 | 98.55 | |
| | 1.282 | 1.290 | 2.631 | 104.6 | |
| | 1.271 | 1.935 | 3.209 | 100.1 | |
| | 1.279 | 1.935 | 3.141 | 96.24 | |
| | 1.275 | 1.935 | 3.235 | 101.3 | |
| | 升麻素 | 0.359 1 | 0.170 4 | 0.536 6 | |
| 0.3596 | | 0.170 4 | 0.532 8 | 101.7 | |
| 0.3604 | | 0.170 4 | 0.523 3 | 95.62 | |
| 0.3594 | | 0.360 2 | 0.701 9 | 95.10 | |
| 0.3596 | | 0.360 2 | 0.712 3 | 97.91 | |
| 0.3602 | | 0.360 2 | 0.703 6 | 95.34 | |
| 0.3593 | | 0.535 5 | 0.918 2 | 104.4 | |
| 0.3596 | | 0.535 5 | 0.911 3 | 103.0 | |
| 0.3598 | | 0.535 5 | 0.917 0 | 104.1 | |

2.8 稳定性考察 取 1 号样品 0.3 g 精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,在 2.3 项色谱条件下,分别于 0.2、4、8、16、24 h 进样 5 μl 进行测定,计算 4 个成分峰面积的 RSD 值,进行稳定性考察。升麻苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的 RSD 值分别为 1.32%、0.59%、0.54% 和 0.67%,均小于 3%,表明各成分在 24 h 内基本稳定。

表 2 5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷回收率试验结果 ($n = 9$)

| 化合物 | 原有量 (mg) | 加入量 (mg) | 测得量 (mg) | 回收率 (%) | RSD (%) | | |
|--------------|----------|----------|----------|---------|---------|-------|------|
| 5-O-甲基维斯阿米醇苷 | 0.535 6 | 0.268 5 | 0.793 5 | 96.0 | 3.88 | | |
| | 0.535 1 | 0.268 5 | 0.802 5 | 99.6 | | | |
| | 0.534 7 | 0.268 5 | 0.791 | 95.5 | | | |
| | 0.535 8 | 0.551 9 | 1.102 | 102.6 | | | |
| | 0.536 1 | 0.551 9 | 1.079 | 98.3 | | | |
| | 0.535 6 | 0.551 9 | 1.113 | 104.7 | | | |
| | 0.536 4 | 0.795 5 | 1.299 | 95.8 | | | |
| | 0.535 9 | 0.795 5 | 1.359 | 103.5 | | | |
| | 0.535 7 | 0.795 5 | 1.369 | 104.8 | | | |
| | 亥茅酚苷 | 0.338 4 | 0.168 5 | 0.510 7 | | 102.2 | 2.26 |
| | | 0.338 7 | 0.168 5 | 0.509 1 | | 101.1 | |
| | | 0.337 9 | 0.168 5 | 0.507 7 | | 100.8 | |
| | | 0.338 6 | 0.351 0 | 0.675 6 | | 96.00 | |
| | | 0.339 0 | 0.351 0 | 0.683 2 | | 98.06 | |
| | | 0.338 4 | 0.351 0 | 0.698 7 | | 102.6 | |
| 0.338 4 | | 0.514 8 | 0.852 9 | 99.94 | | | |
| 0.338 3 | | 0.514 8 | 0.861 0 | 101.5 | | | |
| 0.338 5 | | 0.514 8 | 0.841 9 | 97.79 | | | |

2.9 检测限与定量限 将升麻苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷对照品溶液进行稀释,以信噪比为 3:1 确定其最低检测限分别为 76.7、81.13、82.83、81.17 ng/ml 以信噪比为 10:1 确定其最低定量限分别为 153.7、213.5、165.7、156.0 ng/ml 。

3 样品测定

共收集了 10 个批次的防风样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,测定其中 4 个成分的含量,每份供试品溶液重复测量 3 次,取其平均值,结果见表 3。

4 讨论

4.1 液相色谱条件的优化 ①考察了甲醇-水和乙腈-水的流动相体系,选择甲醇-水流动相体系。梯度程序的最后 10 min 为 93% 的甲醇流动相,使保留在色谱柱中的防风其他成分被洗脱出来,以免对后续测定发生干扰。②考察了流动相流速 (0.7、1.0、1.2 ml/min) 对各成分峰分离度的影响,综合考虑,选择 0.7 ml/min 的流速。③考察了不同色谱柱对样品中各成分分离的影响,具体型号如下: Agilent Zorbax Extend-C₁₈ (5 μm , 250 mm \times 4.6 mm id), Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (5 μm , 150 mm \times 4.6 mm id) 和 Zorbax SB-C₁₈ (5 μm , 150 mm \times 4.6 mm id)。根据 4 个被测物质色谱峰的分离度、柱效和峰对称性,发现在 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (5 μm , 150 mm \times 4.6 mm id) 上能得到较满意的结果。

(下转第 474 页)

酸钠,大大增加了水溶性,然而,由于丹参酮 II A 磺酸钠易水解,故有不溶性的丹参酮 II A 磺酸析出。因此,丹参酮 II A 磺酸钠注射液在长期储存过程中会有轻微沉淀产生^[4],产生的微粒进入体内,导致不良反应。

2.4 不良反应与配伍、机体的个体差异都有显著关系,特别是年龄偏大,体质较差的患者发生过敏反应的机率较大,李立红等^[5]通过收集资料分析,年龄大于 60 岁以上患者,体质、抵抗力较弱,发生不良反应机率偏大。

建议厂家在说明书上增加不良反应项,用药前医生应询问患者是否有药物过敏史,同时医护人员在患者用药 30 min 内应注意观察,提高警惕,以便出现不良反应时能及时进行处理,保证患者用药安全。

(上接第 447 页)

表 3 防风中四种成分含量测定结果

| 编号 | 样品来源 | 升麻苷 (%) | 升麻素 (%) | 5-O-甲基维斯阿米醇苷 (%) | 亥茅酚苷 (%) |
|----|------|---------|---------|------------------|----------|
| 1 | 内蒙 | 0.49 | 0.14 | 0.29 | 0.18 |
| 2 | 内蒙 | 0.41 | 0.10 | 0.28 | 0.14 |
| 3 | 吉林 | 0.43 | 0.14 | 0.33 | 0.14 |
| 4 | 山西 | 0.31 | 0.09 | 0.44 | 0.16 |
| 5 | 山西 | 0.24 | 0.06 | 0.15 | 0.01 |
| 6 | 河北 | 0.37 | 0.09 | 0.43 | 0.08 |
| 7 | 河北 | 0.19 | 0.12 | 0.43 | 0.05 |
| 8 | 甘肃 | 0.31 | 0.03 | 0.23 | 0.04 |
| 9 | 四川 | 0.14 | 0.02 | 0.12 | 0.04 |
| 10 | 四川 | 0.15 | 0.09 | 0.10 | 0.05 |

4.2 前处理方法的考察 ①提取方法和提取溶剂的选择:本研究比较了水浴回流提取与超声提取方法,结果表明水浴回流提取率要远高于超声提取,因而选择水浴回流为样品提取方法。②分别以 30%、50%、100% 甲醇以及 30%、50% 和 70% 乙醇各 20 ml 为提取溶剂,考察其对提取效率的影响。结果表明,甲醇溶剂对 4 个成分的提取效率最高,选择其为提取溶剂。③提取时间的考察:分别水浴回流提取 1、2、2.5 h 考虑提取量与时间因素,采取 2 h 为提取时间。

4.3 药材含量测定结果的分析 由表 3 所得含量测定结果,可知来自内蒙古,吉林(关防风)的药材中 4 个成分的含量最高,河北,甘肃,山西(口防风)其次,四川产防风含量最低。可见防风道地药材(主产于北方地区)中的 4 种色原酮类成分的含量高于口防风与川防风,其道地性不可取代。

4.4 本研究在系统考察了色谱条件和样品前处理

【参考文献】

- [1] 梁增益. 丹参酮 II A 磺酸钠治疗不稳定心绞痛 73 例的临床分析 [J]. 广西医学, 2008, 30(11): 1809
- [2] 赵 娇, 舒 杰. 丹参注射剂的不良反应及原因分析 [J]. 医药产业资讯, 2005, 21(2): 30
- [3] 郭 颖. 注射用甲氧芬酯与诺新康配伍禁忌 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2006, 14(6): 466
- [4] 石 远, 姜同英, 王思玲, 等. 丹参酮 II A 及其制剂开发 [J]. 世界临床药物, 2007, 28(7): 441
- [5] 李立红, 孙支芳, 李秀斌. 丹参酮 II A 磺酸钠注射液不良反应分析 [J]. 实用药物与临床, 2010, 13(1): 55

[收稿日期] 2010-05-13

[修回日期] 2010-06-29

方法对防风中色原酮类成分含量测定方法的影响的基础上,建立了采用 HPLC 法同时测定防风中 4 个色原酮类成分的含量测定方法,并对该方法进行了系统的方法学验证。方法学验证结果表明该法适合于防风中 4 个色原酮类成分的含量测定。

【参考文献】

- [1] 张宝娣, 万山红. 防风的化学成分与药理研究近况 [J]. 中药药信息, 2003, 20: 23
- [2] 王成章, 张崇禧. 防风国内外研究进展 [J]. 人参研究, 2008, 1: 35
- [3] Okuyama E, Hasegawa T, Matsushita T, et al. Analgesic Components of Saposhnikovia Root (*Saposhnikovia divaricata*) [J]. Chem Pharm Bull 2001, 49: 154
- [4] 薛宝云, 李 文, 李 丽, 等. 防风色原酮类成分的药理活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2001, 25: 297
- [5] 李 文, 李 丽, 是元艳, 等. 防风有效部位的药理作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6): 29
- [6] 黎建斌, 刘丽萍, 丘振文. 生防风挥发油抗炎止血作用的药理研究 [J]. 新中医, 2007, 39: 105
- [7] 姜艳艳, 刘 斌, 石任兵, 等. 防风化学成分的分离与结构鉴定 [J]. 药学学报, 2007, 42, 5: 505
- [8] 王松柏, 秦雪梅, 刘焕蓉, 等. 防风多糖化学成分的研究 [J]. 化学研究, 2008, 19: 66
- [9] Kang J, Sun JH, Zhou L, et al. Characterization of compounds from the roots of *Saposhnikovia divaricata* by high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22: 1899
- [10] 李悦悦, 王 慧, 陈 俊, 等. RRLC-TOF MS 鉴别防风血浆、尿液中成分及代谢产物 [J]. 第二军医大学学报 (在排印中).

[收稿日期] 2010-07-08

[修回日期] 2010-09-09