

· 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-C<sub>18</sub> (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-methylvisamminol 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-methylvisamminol and sec-O-β-D-glucosylhammudol in *Radix Saposhnikovia*. **Methods** The sample was analyzed on an Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (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*.

**[Key words]** *Radix Saposhnikovia*, prim-O-glucosylcimifugin, cimifugin, 4'-O-glucosyl-5-O-methylvisamminol, 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<sup>[1-6]</sup>。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<sup>[7-9]</sup>。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<sup>[4,5]</sup>。而由作者经 HPLC-TOF/MS 分析鉴别防风入血, 入尿成分结果<sup>[10]</sup>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。

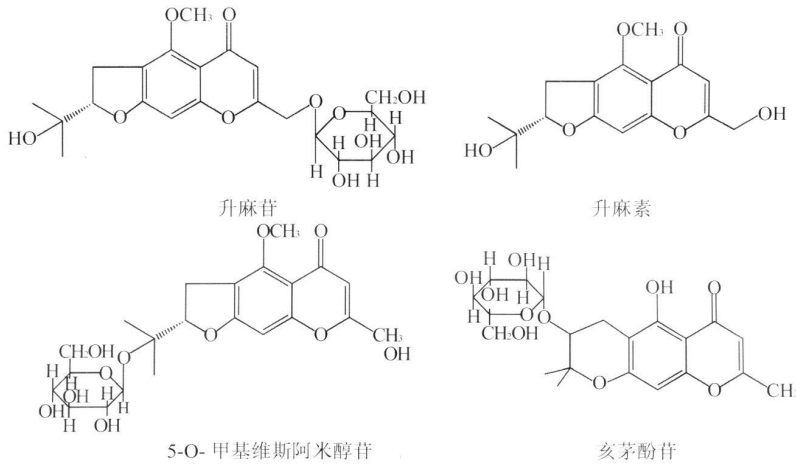


图 1 防风中 4 个色原酮类成分的结构示意图

## 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  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,进样 5  $\mu\text{l}$ 。

**2.3 色谱条件和系统适应性试验** 色谱柱:Agilent

Zorbax SB-C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{l}$ ; 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ 。在此色谱条件下,以供试品溶液进样 5  $\mu\text{l}$  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 4.3、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。

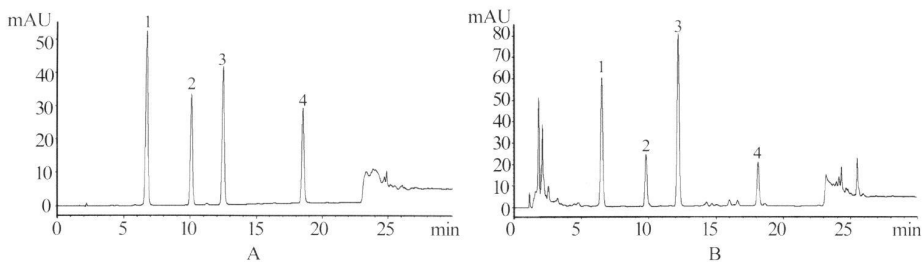


图 2 防风中 4 个色原酮类成分的液相色谱图

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  $\mu\text{l}$  注入高效液相色谱仪分析,以对照品溶液中各成分的浓度 ( $\text{g}/\text{ml}$ ) 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  $\mu\text{l}$  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 95%~105% 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	
	1.275	1.935	3.235	101.3	
升麻素	0.359 1	0.170 4	0.536 6	104.2	4.09
	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  $\mu\text{l}$  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			
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  $\text{ng}/\text{ml}$  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  $\text{ng}/\text{ml}$ 。

### 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 95% 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  $\text{ml}/\text{min}$ ) 对各成分峰分离度的影响,综合考虑,选择 0.7  $\text{ml}/\text{min}$  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-C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm id), Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  4.6 mm id) 和 Zorbax SB-C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 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-C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 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<sup>[4]</sup>,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<sup>[5]</sup>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]. 实用心肺脑血管病杂志, 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