

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.01.011

高效液相色谱法同时测定炒防风中升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷含量

焦 坤

(安徽省阜阳市食品药品检验检测中心, 安徽 阜阳 236500)

摘要:目的 建立同时测定炒防风中升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为Rigol-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(40:60), 流速为1.0 mL/min, 进样量为5 μL, 检测波长为254 nm, 柱温为35℃。结果 可在20 min内完成对升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的色谱分析, 升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的质量浓度线性范围分别为0.011 6~0.292 0 g/L($r=0.999\ 4$)和0.011 4~0.285 0 g/L($r=0.999\ 4$), 平均回收率分别为95.82%和107.70%, RSD分别为2.92%和2.45%($n=6$)。结论 该法方便、快捷、准确、简便、重复性好, 可用于炒防风的质量控制。

关键词:炒防风; 升麻素苷; 5-O-甲基维斯阿米醇苷; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R284.2; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)01-0035-03

Simultaneous Determination of Prim-O-Glucosylcimifugin and 5-O-Methylvisammioside in Fried *Radix Saposhnikovia Divaricata* by HPLC

Jiao Kun

(Fuyang Center for Food and Drug Control, Fuyang, Anhui, China 236500)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of prim-O-glucosylcimifugin and 5-O-methylvisammioside in fried *Radix Saposhnikovia divaricata*. **Methods** The Rigol-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was methanol-water(40:60), the flow rate was 1.0 mL/min, the sample size was 5 μL, the detection wavelength was set at 254 nm, and the column temperature was 35℃. **Results** The chromatographic analysis of prim-O-glucosylcimifugin and 5-O-methylvisammioside were completed within 20 min. Prim-O-glucosylcimifugin and 5-O-methylvisammioside showed good linear relationship within the ranges of 0.011 6~0.292 0 g/L($r=0.999\ 4$) and 0.011 4~0.285 0 g/L($r=0.999\ 4$), the average recoveries were 95.82% and 107.70% and RSDs were 2.92% and 2.45% ($n=6$). **Conclusion** The method is convenient, quick, accurate, simple and reproducible, which can be used for quality control of fried *Radix Saposhnikovia divaricata*.

Key words: fried *Radix Saposhnikovia divaricata*; prim-O-glucosylcimifugin; 5-O-methylvisammioside; HPLC; content determination

防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根, 具有解表、祛风、胜湿、止痉的功效, 用于感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒及破伤风等^[1]。炒防风为防风的加工炮制品, 临床应用广泛, 常与白术、陈皮、白芍同用, 健脾止泻, 用于肝旺脾虚、肠鸣腹痛、大便泄泻、泻必腹痛。防风的化学成分主要有色原酮类^[2]、香豆素类^[3-4]、挥发油^[5-8]、多糖类^[9]等。研究显示, 防风中的色原酮是其发挥疗效的物质基础^[10-12]。目前, 关于防风有效成分含量测定的研究较多。胡紫艳等^[13]测定了不同产地防风中的升麻素、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷4种色原酮。邵留英等^[14]对不同产地的防风中升麻苷及5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量进行了对比分析。赵博等^[15]用高效液相色谱法(HPLC)同时测定了防风中6个主要成分的含量。2015年版《中国药典(一部)》规定防风的质量分析, 以升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷为指标性成分。而关于炒防风含量测定方面研究较少, 缺乏有效的质量

控制指标。本研究中建立了同时测定升麻素和5-O-甲基维斯阿米醇苷含量的HPLC法, 现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: Thermo UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司), 包括DAD3000型检测器、变色龙7.2软件工作站; 梅特勒XPE205DR型电子天平(0.01 mg); ELMA-E100H型超声清洗仪(德国艾尔玛仪器公司)。

试剂: 升麻素苷(Prim-O-glucosylcimifugin)对照品(批号为111522-201310, 含量为95.0%), 5-O-甲基维斯阿米醇苷(5-O-methylvisammioside)对照品(批号为111523-201509, 含量为95.8%), 均由中国食品药品检定研究院提供。炒防风(编号分别为CFF01, CFF02, CFF03, CFF04, CFF05, CFF06, CFF07, CFF08, CFF09, CFF10, 安徽省万生中药饮片厂)经阜阳市食品药品检验检测中心许世辉主任中药师鉴定为防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的炒制品;

甲醇(分析醇, 国药集团化学试剂有限公司); 纯化水(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱: Rigol-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(40:60); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35℃; 检测波长: 254 nm; 进样量: 5 μL。理论板数按升麻素苷峰计算应不低于 4000。在此色谱条件下, 样品中升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷能达到有效分离。见图 1。

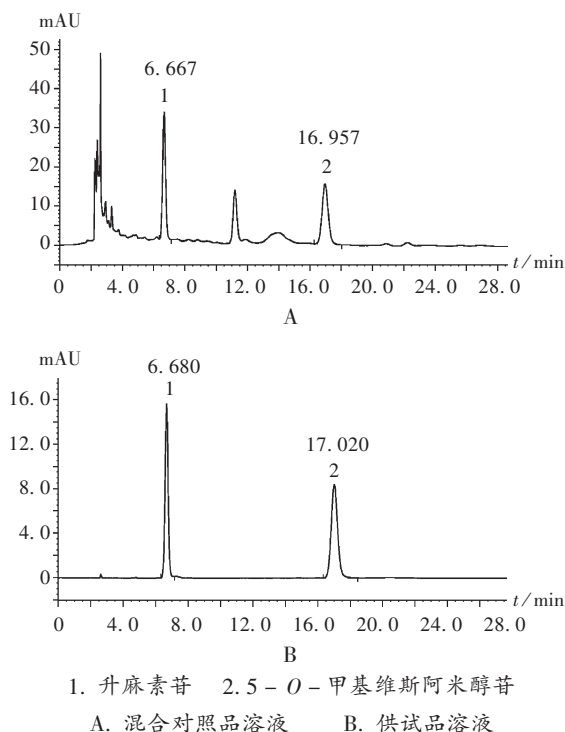


图 1 高效液相色谱图

2.2 溶液制备

对照品贮备液: 取升麻素苷对照品 15.39 mg, 5-O-甲基维斯阿米醇苷 14.85 mg, 精密称定, 置 50 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇溶液, 超声溶解, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得质量浓度为 0.2924 g/L 的升麻素苷对照品溶液和 0.2845 g/L 的 5-O-甲基维斯阿米醇苷混合对照品溶液。

供试品溶液: 取炒防风粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入甲醇 20 mL, 精密称定, 加热回流 2 h, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察: 分别精密吸取升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷混合对照品溶液 1.0, 2.0, 2.5, 5.0, 10.0 mL, 分别置 25 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶液定容, 摇匀, 再加入贮备液, 得 6 个不同质量浓度的混合对照

品溶液。按拟订色谱条件测定, 以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标, 绘制升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的标准曲线, 分别得回归方程 $Y = 119.7064X + 0.03829$ ($r = 0.9994$), $Y = 135.7045X + 0.08354$ ($r = 0.9994$)。结果表明, 升麻素苷的质量浓度在 0.0116~0.2920 g/L 范围内, 5-O-甲基维斯阿米醇苷的质量浓度在 0.0114~0.2850 g/L 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取线性关系考察项下稀释 10 倍的混合对照品溶液, 依法连续进样 5 次, 每次 5 μL。结果麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 分别为 1.309% 和 1.347% ($n = 5$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取炒防风(编号为 CFF02)约 0.5 g, 按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按拟订色谱条件进样。结果麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的平均含量为 0.2345% 和 0.2051%, RSD 分别为 1.895% 和 2.058% ($n = 6$), 表明方法重复性好。

稳定性试验: 取炒防风(编号为 CFF02)约 0.5 g, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 时按拟订色谱条件进行分析。结果麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷峰面积的 RSD 分别为 0.9937% 和 0.9964% ($n = 6$)。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

加样回收试验: 取炒防风(编号为 CFF02)6 份, 各 0.25 g, 精密称定, 分别置 100 mL 具塞锥形瓶中, 再分别加入 2.2 项下混合对照品贮备液各 2.0 mL, 按 2.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 按拟订色谱条件依法测定。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 10 批不同产地的炒防风各 0.5 g, 每批 2 份, 精密称定, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按拟订色谱条件进行分析。精密量取供试品溶液 5 μL, 记录色谱峰面积, 按外标一点法计算各批炒防风含量。结果见表 2。可见, 不同产地炒防风所含的麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷差异较大, 可能与各地气候条件、土壤状况、纬度、海拔、高度、日照强度、栽培条件、采集季节及药材的储存条件等因素不同有关^[5]。

3 讨论

3.1 指标成分的选择

防风中主要含有色原酮类物质, 常见的色原酮包括升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷等。2015 年版《中国药典(一部)》中, 防风项下有二者含量测定, 但炒防风未见相关报道。参考 2015 年版《中国药典(一部)》防风的质量标准, 选择升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷作为炒防风的质量控制指标, 为进一步研究其质量标准提供科学参考。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}(\%)$		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.597 6	0.522 6	0.584 8	0.569 1	1.135 6	1.115 6	92.00	104.20				
0.594 6	0.519 9	0.584 8	0.569 1	1.142 4	1.128 1	93.67	106.87				
0.588 2	0.514 4	0.584 8	0.569 1	1.146 7	1.122 3	95.50	106.82	95.82	107.70	2.92	2.45
0.598 6	0.523 4	0.584 8	0.569 1	1.179 4	1.156 1	99.32	111.19				
0.597 4	0.522 4	0.584 8	0.569 1	1.158 3	1.129 1	95.91	106.63				
0.598 1	0.523 0	0.584 8	0.569 1	1.174 4	1.151 6	98.55	110.48				

注:A为升麻素苷,B为5-O-甲基维斯阿米醇苷。表2同。

表2 样品含量测定结果(%)

编号	含量		编号	含量	
	A	B		A	B
CFF01	0.421	0.144	CFF06	0.231	0.360
CFF02	0.235	0.205	CFF07	0.243	0.434
CFF03	0.483	0.334	CFF08	0.389	0.341
CFF04	0.258	0.368	CFF09	0.608	0.333
CFF05	0.240	0.330	CFF10	0.583	0.364

3.2 测定波长的选择

经在线全波长紫外吸收光谱扫描分析,上述2个分析物在254 nm波长处有良好的紫外吸收强度。本研究中,采用254 nm作为检测波长时,升麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷同时成为主要吸收峰,分离度好,峰形良好,且其他物质对二者的测定无干扰,故选择254 nm作为测定波长。

3.3 流动相的选择

分别比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸水等流动相,结果以甲醇-水作为流动相时基线较平稳,且对色谱柱损伤小,各色谱峰的分离度和理论板数均能达到要求,且其他物质对麻素苷和5-O-甲基维斯阿米醇苷的测定无干扰,最终采用甲醇-水作为流动相。

3.4 提取方法的选择

考察了以甲醇、乙醇、50%甲醇为提取溶剂的提取方法,结果甲醇的提取效率高于乙醇和50%甲醇。由于炒防风中含有大量的多糖^[15]和单宁等,难以直接进行HPLC分析。采用甲醇为提取溶剂,样品较清洁,又兼顾了甲醇对色原酮提取效率高的特性。故选择甲醇为提取溶剂。

3.5 方法的适用性

本试验所建立的HPLC法经方法学验证,具有方便、快捷、准确、简便、重复性好等特点,可用于炒防风的质量控制,亦为含有炒防风的成方制剂的质量控制提供了参考。含量测定结果表明,不同批次的炒防风中二者的含量差异较大。

3.6 不足

中药发挥疗效是其所含有的化学物质共同作用的结果。限于条件,本试验中只测定了炒防风中所含色原酮类物质中的2种,因防风经过炒制后,化学成分会发生一定变化,其他色原酮类物质如升麻素、亥茅酚苷等暂未进行研究。

参考文献:

- [1] 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: 149-150.
- [2] 丁安荣, 王奇志, 李淑莉, 等. 防风化学成分的研究[J]. 中草药, 1987, 18(6): 7-9.
- [3] 赵博, 杨鑫宝, 张连学, 等. 防风灵——防风中1个新的香豆素类化合物[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1418-1420.
- [4] 赵博, 杨鑫宝, 张连学, 等. 防风化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(12): 1569-1572.
- [5] 夏伦祝, 彭代银, 汪永忠, 等. 三种方法提取防风挥发油的气质联用成分分析[J]. 安徽医药, 2009, 13(8): 885-886.
- [6] 陈勇, 李晓如, 曾笑, 等. 气相色谱-质谱和化学计量学解析法分析防风挥发油成分[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(6): 500-502.
- [7] 严云丽, 张华, 金高娃, 等. 防风挥发油化学成分分析比较[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2009, 11(3): 400-406.
- [8] 李洪峰, 于喆英, 金星海, 等. 不同产地防风中挥发油成分分析[J]. 黑龙江水专学报, 2007, 34(4): 101-104.
- [9] 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(2): 66-68.
- [10] 薛宝文, 李文, 李丽, 等. 防风色原酮甙类成分的药理活性研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5): 297-299.
- [11] 高鸿霞, 邵世和, 王国庆. 中药防风的研究进展[J]. 井冈山医专学报, 2004, 11(4): 12-14.
- [12] 杨波, 曹玲, 王喜军. CO₂超临界萃取物的药效学研究[J]. 中医药学报, 2006, 34(1): 14-15.
- [13] 胡紫艳, 冯振斌, 蒋健. HPLC测定不同产地防风中4种有效成分的含量[J]. 中国执业药师, 2016, 13(11): 31-34.
- [14] 邵留英, 喻志斌, 瞿发林. 不同产地防风中有效成分含量比较[J]. 海峡药学, 2013, 25(2): 52-54.
- [15] 赵博, 杨鑫宝, 杨秀伟, 等. HPLC法同时测定防风中6个主要成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(3): 382-387.

(收稿日期: 2017-10-11)