

HPLC 法同时测定陇西地区防风中色原酮和香豆素类成分

孙晶波¹, 郜玉钢², 张秋菊³, 张连学^{2*}, 金 勇^{4*}

1. 北华大学药学院, 吉林 吉林 132013

2. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

3. 通化师范学院生命科学学院, 吉林 通化 134002

4. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000

摘要: **目的** 建立 HPLC-DAD 法同时测定并比较分析陇西地区防风类药材中升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、亥茅酚苷、补骨脂素、欧前胡素、佛手苷内酯、花椒毒素的量。**方法** 采用甲醇回流法得到提取物, HPLC-DAD 法测定提取物中 8 种成分量, 乙腈-水梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 ℃。**结果** 8 种成分的回归方程 *r* 值均在 0.999 2~0.999 9, 平均加样回收率在 96.2%~104.1%, RSD 均<3%。防风中以 4 种色原酮为主要成分, 同时含有 4 种香豆素; 葛缕子及白花前胡中未检测到色原酮, 而香豆素量均高于防风。**结论** 该方法简便、准确, 重复性好, 可用于防风类药材中 8 种成分的测定。陇西地区的 2 种习用防风从 8 种主要成分量上看不能代替防风使用。

关键词: 防风; 色原酮; 香豆素; 花椒毒素; 佛手苷内酯; 欧前胡素; 补骨脂素; 升麻素; HPLC-DAD

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)24-3557-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.024.024

Simultaneous determination of chromones and coumarins in roots of *Saposhnikovia divaricata* from Longxi area by HPLC

SUN Jing-bo¹, GAO Yu-gang², ZHANG Qiu-ju³, ZHANG Lian-xue², JIN Yong⁴

1. Pharmaceutical College of Beihua University, Jilin 132013, China

2. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China

4. College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China

Abstract: **Objective** To develop an HPLC-DAD method for the simultaneous determination and comparative analysis on the contents of prim-*O*-glucosylcimifugin, 4'-*O*-β-*D*-glucosyl-5-*O*-methylvisamminol, cimifugin, sec-*O*-glucosylhamaudol, psoralen, imperatorin, bergapten, and xanthotoxin in the roots of *Saposhnikovia divaricata* from Longxi areas. **Methods** The extracts were obtained by methanol reflux method and the contents of the eight compounds were determined by HPLC-DAD. The mobile phase, consisting of acetonitrile-water, was programmed for a gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, and the column temperature was 25 ℃. **Results** Excellent linearity with correlation coefficients (*r*) of 0.999 2—0.999 9 was obtained. The average recoveries of the eight compounds were 96.2%—104.1% and all RSD values were less than 3%. The contents of the four coumarins in the roots of *S. divaricata* were much less than those four chromones. The contents of the four coumarins in the roots of *Carum carvi* and *Peucedanum ledebourielloides* were more than those in *S. divaricata*, while no chromones were detected except sec-*O*-glucosylhamaudol in *P. ledebourielloides*. **Conclusion** The method appears to be simple, accurate, and well reproducible, which could be used for the simultaneous determination of the above-mentioned eight compounds in *S. divaricata*. According to the above analysis, *C. carvi* and *P. ledebourielloides* could not be used as the succedaneum of *S. divaricata* on the basis of the eight compound contents.

Key words: *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk; chromones; coumarins; xanthotoxin; bergapten; imperatorin; psoralen; cimifugin; HPLC-DAD

收稿日期: 2013-08-13

基金项目: 国家科技支撑项目 (2011BAI03B01)

作者简介: 孙晶波 (1978—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为中药活性成分及质量评价。Tel: (0432)64608281 Fax: (0432)64608281

E-mail: sjb781219@163.com

*通信作者: 张连学 Tel: (0431)84532952 E-mail: zlx863@163.com

金 勇 Tel: (0433)2436011 E-mail: jiny8029@163.com

伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 的干燥根为我国常用的大宗药材之一, 常用于治疗感冒头痛、风疹瘙痒、破伤风等症^[1]。近年来, 有关防风中色原酮^[2-3]、香豆素^[4]、挥发油^[5-6]等有效成分的研究报道越来越多。我国有些地区以其他植物作为防风使用, 因植物来源不同, 其有效成分固然会存在差异, 对药效也会产生一定的影响。综上所述, 本实验采用 HPLC-DAD 法对甘肃陇西地区的栽培防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. 与 2 种习用防风[华山前胡 *Peucedanum ledebourielloides* K. T. Fu (水防风)、葛缕子 *Carum carvi* L. (旱防风)] 中色原酮、香豆素类成分及其量进行测定方法研究, 以及各药材中成分的对比研究, 以期为后续的药理学研究提供一定的科学依据。

1 仪器与材料

岛津 LC—20A 高效液相色谱仪(LC—20AT 高效泵、SIL—20A 自动进样器、SPD—M 20A 检测器)。

2010 年 8 月 21 日样品采自甘肃陇西, 经吉林农业大学张连学教授鉴定分别为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.、葛缕子 *Carum carvi* L.、华山前胡 *Peucedanum ledebourielloides* K. T. Fu 3 种药材均为人工栽培品。

升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、升麻素、补骨脂素、欧前胡素对照品购自中国药品生物制品检定所; 亥茅酚苷、佛手苷内酯、花椒毒素对照品购自沈阳鼎国试剂公司。甲醇、乙腈为色谱纯。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量, 加甲醇配制成分别含升麻素苷 0.126 mg/mL, 升麻素 0.032 mg/mL, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 0.076 mg/mL, 亥茅酚苷 0.048 mg/mL, 补骨脂素 0.036 mg/mL, 花椒毒素 0.030 mg/mL, 佛手苷内酯 0.028 mg/mL, 欧前胡素 0.022 mg/mL 的混合溶液, 作为混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取防风、葛缕子、华山前胡粉末各 0.5 g, 加 20 mL 甲醇, 称定质量后于 70 °C 水浴回流提取 2 h, 放至室温后称质量, 用甲醇补足损失的质量, 摇匀, 滤过, 即得。

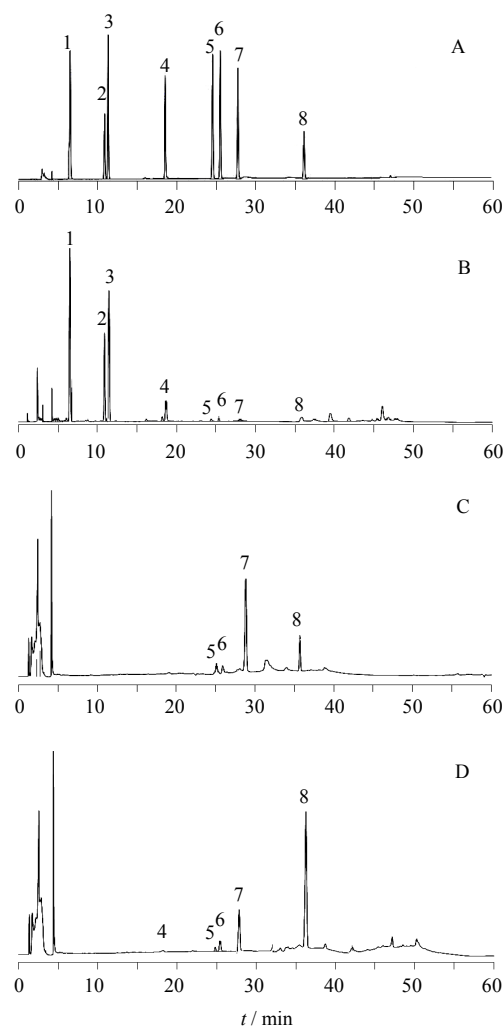
2.3 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-SP (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 0~10 min, 20%~

30%乙腈; 11~25 min, 30%~55%乙腈; 26~40 min, 55%~65%乙腈; 41~45 min, 65%~80%乙腈; 46~50 min, 80%~20%乙腈; 51~60 min, 20%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 30 °C。

2.4 系统适应性及专属性试验

精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 按“2.3”项下色谱条件分析, 结果见图 1。8 种待测成分与其相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 各



1-升麻素苷 2-升麻素 3-5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 4-亥茅酚苷
5-补骨脂素 6-花椒毒素 7-佛手苷内酯 8-欧前胡素
1-prim-*O*-glucosylcimifugin 2-cimifugin
3-5-*O*-Methylvisammioside 4-sec-*O*-glucosylhamaudol
5-psoralen 6-xanthotoxin 7-bergapten 8-imperatorin

图1 对照品 (A)、防风 (B)、葛缕子 (C) 和华山前胡 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), *S. divaricata* (B), *C. carvi* (C), and *P. ledebourielloides* (D)

峰均不受其他组分的干扰,理论塔板数以各色谱峰计,均>30 000,表明该方法专属性良好。

2.5 线性关系考察

对照品溶液分别自动进样 2、4、6、8、10、12、14 μL ,然后以进样量为横坐标(X)对峰面积(Y)进行回归处理,计算得线性回归方程、相关系数及线性范围,结果见表 1。

表 1 对照品标准曲线、相关系数及线性范围

Table 1 Criteria curves, correlation coefficients, and linearity ranges of reference substances

对照品	标准曲线	r	线性范围 / μg
升麻苷	$Y=1\,491\,097\,X+54\,886.48$	0.999 6	0.252~1.764
升麻素	$Y=2\,579\,884\,X+27\,60.222$	0.999 9	0.064~0.448
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$Y=2\,152\,583\,X+7\,656.238$	0.999 9	0.152~1.064
亥茅酚苷	$Y=2\,536\,218\,X-8\,529.517$	0.999 2	0.096~0.672
补骨脂素	$Y=4\,779\,754\,X+7\,028.035$	0.999 9	0.072~0.504
花椒毒素	$Y=5\,820\,020\,X-22\,484.49$	0.999 6	0.060~0.420
佛手苷内酯	$Y=5\,400\,822\,X-57\,228.08$	0.999 5	0.056~0.392
欧前胡素	$Y=3\,545\,010\,X-10\,983.92$	0.999 8	0.044~0.308

2.7 重复性试验

称取 5 份防风,制备供试品溶液,于“2.3”项下条件测定,8 种有效成分的质量分数的 RSD 值分别为 1.4%、2.8%、0.9%、0.6%、1.3%、2.1%、1.7%、1.1%,表明该方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验

取防风供试品溶液 1 份,分别于 0、2、4、8、12、24 h 共进样 6 次,记录色谱图。计算 24 h 内 8 种有效成分峰面积的 RSD 值分别为 0.8%、0.3%、1.4%、2.1%、1.9%、2.1%、0.5%、1.1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验

精密称取 6 份已测定的防风药材粉末 0.5 g,分别加混合对照品溶液适量,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下条件测定并计算各成分的质量分数的回收率。结果 8 种有效成分的平均加

2.6 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 1 mL,定容至 10 mL,按照“2.3”项下条件测定,连续进样 6 次,每次 10 μL ,结果,升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、补骨脂素、花椒毒素、佛手苷内酯、欧前胡素峰面积的 RSD 值分别为 0.5%、1.2%、0.3%、0.8%、2.1%、1.6%、2.4%、0.7%。

样回收率分别为 100.2%、98.1%、96.2%、103.8%、96.9%、102.9%、104.1%、97.3%,RSD 值分别为 1.8%、2.1%、2.9%、1.6%、0.7%、3.0%、1.0%、2.3%,表明回收率良好。

2.10 样品测定

按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,于“2.3”项下条件测定,分析并计算样品中各成分的质量分数,结果见表 2。

3 结果与分析

本研究中的药材样品均采自同一地区、同一时间,防风及 2 种习用防风均为栽培品,三者在本研究条件下具有可比性。

《中国药典》2010 年版规定^[1],防风中升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的总质量分数>0.24%。本研究结果显示,陇西栽培防风中二者总质量分数为 0.81%,远高于《中国药典》2010 年版

表 2 防风药材中色原酮与香豆素的量

Table 2 Chromone and coumarin contents in *S. divaricata*

药材	质量分数 / %								总计
	升麻苷	升麻素	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	亥茅酚苷	补骨脂素	花椒毒素	佛手苷内酯	欧前胡素	
防风	0.440 8	0.256 8	0.370 0	0.096 5	0.000 4	0.003 2	0.007 7	0.013 8	1.189 2
葛缕子	—	—	—	—	0.001 3	0.002 0	0.025 7	0.010 5	0.039 5
华山前胡	—	—	—	0.000 2	0.000 2	0.001 0	0.005 1	0.058 0	0.064 5

的定量标准;而陇西地区2种习用防风葛缕子和华山前胡在相同条件下均未检测到升麻素苷和5-*O*-甲基维斯阿米醇苷。这一结果表明,以《中国药典》2010年版主要成分标准为评价指标,陇西产的2种习用防风无法替代防风而做同一用途使用。升麻素和亥茅酚苷也是防风药材中研究较多的2种色原酮类成分,本研究结果表明,陇西地区的栽培防风中升麻素质量分数较高(0.2568%),而亥茅酚苷的质量分数相对较低,仅占防风总质量的0.096 5%。2种习用防风中只有华山前胡中检测到少量的亥茅酚苷,而其他3种色原酮类成分均未检测到。

从香豆素类成分量上看,2种习用防风中4种香豆素类成分(补骨脂素、花椒毒素、佛手苷内酯、欧前胡素)的总量均高于防风,其中葛缕子以佛手苷内酯量最高(0.025 7%),华山前胡以欧前胡素量最高(0.058 0%)。华山前胡中4种香豆素的总量最高,约为葛缕子4种香豆素总量的1.62倍。从8种成分总量来看,2种习用防风的质量分数分别为0.039 5%和0.064 5%,均显著低于防风(1.189 2%)。因此,从有效成分的角度来看,习用防风与防风差别巨大,无法互相替代使用。

4 讨论

香豆素类化合物多具有抗癌、抗炎、镇痛、抗菌等生物活性。近年来的研究表明,中药材防风中也具有多种香豆素类化合物^[7],虽然质量分数较色原酮类成分少,但其在防风药效发挥过程中也具有重要作用。因此,本实验亦研究比较了陇西地区的防风及习用防风中4种香豆素类成分的量。

本实验所研究的4种色原酮类化合物和4种香豆素类化合物均含有共轭系统,能够满足DAD检测的要求;另外,《中国药典》2010年版规定的防风质量控制标准中亦采用HPLC法测定升麻素苷和

5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的量,因此,本实验选择了HPLC-DAD法定量分析了8种成分,并对研究过程中涉及到的因素进行优化。通过对8种对照品进行全波长扫描,结合已有的文献报道^[8],综合分析并确定检测波长为254 nm。比较了2种常用的HPLC洗脱系统甲醇-水和乙腈-水,结果表明,甲醇-水系统在分析这8种成分的过程中基线不平,而乙腈-水系统无此现象,因此选择了后者。通过对不同梯度洗脱的结果比较,最终确定了“2.3”项下的梯度洗脱程序。

采用HPLC法同时检测了陇西地区的防风及2种习用防风中4种色原酮类成分的量及4种香豆素类成分的量,对各方法学指标进行了考察。结果表明,该方法稳定、可行,能准确、有效的评价防风药材的质量。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 刘焕蓉,秦雪梅,王利平,等.玉屏风散配伍剂量变化与有效成分的相关性研究[J].中草药,2009,40(12):1922-1924.
- [3] 刘双利,张春红,张连学.不同产地防风中4种色原酮成分比较研究[J].中草药,2007,38(5):776-778.
- [4] 汪琼,罗士德,徐永艳.绣球防风化学成分的研究[J].中草药,2012,43(1):27-31.
- [5] 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(8):105-106.
- [6] 葛卫红,郭建友,沈映君,等.荆防挥发油对炎症因子表达和调节的影响[J].中国药学杂志,2007,32(17):1777-1779.
- [7] 窦红霞,高玉兰.防风的化学成分和药理作用研究进展[J].中医药信息,2009,26(2):15-17.
- [8] 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.