

HPLC切换波长法同时测定升麻中 5种成分的含量

王冰, 张振秋*, 孙艳涛

(辽宁中医药大学药学院, 大连 116600)

摘要 目的: 建立以切换波长的方法同时测定升麻中咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素 5种成分含量的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, Agilent Eclipse XDB- C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液 (13: 87); 检测波长: 0~ 7 min 323 nm; 7~ 12 min 254 nm; 12~ 17 min 316 nm; 17~ 20 min 254 nm; 柱温: 40 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL。结果: 不同商品地的升麻中 5种成分的含量差异显著, 升麻素苷和升麻素在部分样品中未检出。结论: 切换波长法可用于升麻中 5种成分含量的同时测定, 为升麻质量评价提供了科学依据。

关键词: 升麻; 咖啡酸; 升麻素苷; 阿魏酸; 异阿魏酸; 升麻素; 切换波长法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254- 1793(2011)02- 0391- 04

HPLC wavelength switching simultaneous determination of the content for 5 kinds of constituents in cimicifuga

WANG Bing ZHANG Zheng-qiu*, SUN Yan-tao

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method of wavelength switching simultaneous determination of the content for caffeic acid, cimicifuga glycosides, ferulate acid, iso-ferulic acid, Cimicifuga Su 5 kinds of constituents in cimicifuga. **Methods** Agilent Eclipse XDB- C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) columns, mobile phase: acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (13: 87); the detection wavelength 0- 7 min, 323 nm; 7- 12 min, 254 nm; 12- 17 min, 316 nm; 17- 20 min, 254 nm; column temperature 40 °C; velocity 1.0 mL·min⁻¹; the injection volume 10 μL. **Results** Prim places in different commodities 5 kinds of constituents in significantly different cimicifuga glycosides and Cimicifuga Su were undetected in some samples. **Conclusion** The method of wavelength switching can be used for the simultaneous determination 5 kinds of constituents in cimicifuga which provide a scientific basis for quality assessment to Cimicifuga.

Key words cimicifuga, caffeic acid, cimicifuga glycosides, ferulate, iso-ferulic acid, Cimicifuga Su, wavelength switching

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kam.、兴安升麻 *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim 或升麻 *Cimicifuga foetida* L. 的干燥茎。始载于《神农本草经》, 列为上品。其味辛、微甘, 性微寒。归肺、脾、胃、大肠经。具有发表透疹、清热解毒、升举阳气的功效。用于风热头痛, 齿痛, 口疮, 咽喉肿痛, 麻疹不透, 阳毒发斑; 脱肛, 子宫脱垂^[1]。咖啡酸具有利胆、升高白细胞的作用; 升麻素苷和升麻素具有抗菌、降压、抑制心肌、减慢心率、镇静的作用; 阿魏酸和异阿魏酸具有抗炎、镇痛的作用^[2]。

本文建立了采用切换波长法同时测定升麻中 5种成分含量的方法^[3,4], 为升麻药材及其炮制品的质量评价提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪 (仪器编号: 20041191 DE43607375); 配置四元梯度泵; 在线脱气机; VWD 检测器; Agilent Eclipse XDB- C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱; METTLER AB135- S 十万分之一电子分析天平 (瑞士); AR2140 电子分析天平 (上海奥豪斯公司); XW- 80A 微型旋涡混合仪

* 通讯作者 Tel: (0411)87586058 E-mail: zhangzhenqiu@sina.com

(上海沪西分析仪器厂有限公司); 876-1型真空干燥箱(上海阳光实验仪器有限公司)。

咖啡酸(中国药品生物制品检定所,批号110885-200102),升麻素苷(中国药品生物制品检定所,批号111522-200607),阿魏酸(中国药品生物制品检定所,批号110773-200611),异阿魏酸(中国药品生物制品检定所,批号111698-200602),升麻素(中国药品生物制品检定所,批号111710-200501)。升麻药材分别购自吉林、河北、山东、辽宁、广东、江苏、上海、山西、北京、黑龙江,经辽宁中医药大学李峰教授鉴定均为正品药材,样品编号依次为批1-10升麻蜜炙品购自上海,样品编号为批11;炒炭品由北京商品地生品自制,样品编号为批12。乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯),水为重蒸馏水,甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯),磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,分析纯)。

2 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)色谱柱;流动相:乙腈-0.1%磷酸水溶液(13:87);检测波长:0~7 min, 323 nm; 7~12 min, 254 nm; 12~17 min, 316 nm; 17~20 min, 254 nm;柱温:40℃;流速:1.0 mL·min⁻¹;进样量:10 μL。对照品及样品色谱图见图1。

3 溶液的制备

3.1 对照品储备液 分别精密称取咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、升麻素对照品适量,加甲醇分别制成每1 mL中含咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、升麻素各183.2, 113.2, 447.6, 12.00 μg的对照品溶液;精密称取精密称取异阿魏酸对照品适量,加10%乙醇制成每1 mL中含异阿魏酸202.8 μg的对照品溶液。

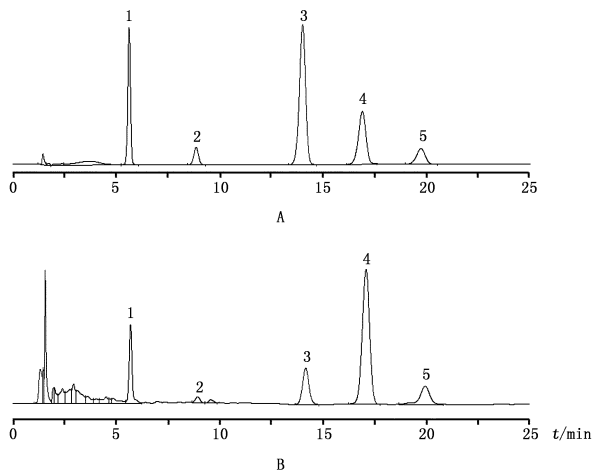


图1 对照品(A)、样品(B)的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and sample(B)
1. 咖啡酸(caffeic acid) 2. 升麻素苷(cimicifuga glycosides) 3. 阿魏酸(ferulate acid) 4. 异阿魏酸(iso-ferulic acid) 5. 升麻素(Cimicifuga Su)

3.2 混合对照品溶液 分别精密量取上述对照品储备液适量,加甲醇混匀,制成每1 mL含咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素分别为18.32, 4.528, 17.90, 101.4, 4.800 μg的混合对照品溶液。

3.3 供试品溶液 分别取不同商品地升麻药材粉末(过二号筛)约1 g精密称定,置50 mL烧瓶中,加入30%乙醇20 mL,密塞,加热回流1.5 h,放冷,滤过,滤液置25 mL量瓶中,加30%乙醇稀释至刻度,摇匀,取续滤液,即得。

4 方法与结果

4.1 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液1, 2, 4, 6, 8, 12, 20 μL进样,以峰面积Y为纵坐标,进样量X(μg)为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表1。

表1 各对照品的线性关系
Tab 1 The result of linear range

对照品 (reference substances)	回归方程 (regressive equation)	r	线性范围 (linear range)/μg
咖啡酸(caffeic acid)	$Y = 6417.70X + 36.77$	0.9997	0.037-0.36
升麻素苷(cimicifuga glycosides)	$Y = 2527.30X - 0.64$	0.9995	0.0057-0.13
阿魏酸(ferulate acid)	$Y = 5880.30X + 23.71$	0.9996	0.012-0.35
异阿魏酸(iso-ferulic acid)	$Y = 6521.30X - 10.03$	0.9998	0.041-0.81
升麻素(Cimicifuga Su)	$Y = 3828.50X + 7.29$	0.9997	0.012-0.24

4.2 精密度试验 精密量取8号供试品溶液在上述色谱条件下连续进样5次,每次10 μL,计算咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸和升麻素峰面积的

RSD分别为1.6%, 1.3%, 2.1%, 2.0%, 1.1%,表明该仪器精密度良好。

4.3 稳定性试验 取8号供试品溶液,分别于0

2, 4, 6, 8, 12 h各进样 10 μL, 结果咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸和升麻素峰面积的 RSD 分别为 1.8%, 1.1%, 2.4%, 2.2%, 1.2%, 表明样品在 12 h 内稳定。

4.4 重复性试验 取 8号样品约 1 g 精密称定 6

表 2 各成分的重复性试验结果 (n = 6)

Tab 2 Determination of the repeatability of constituents

成分名称 (component name)	测得值 (found) /mg	测得量平均值 (average found) /mg	RSD /%	
咖啡酸 (caffeic acid)	0.5461	0.5444	0.5460	2.0
	0.5235	0.5347	0.5514	
升麻素苷 (cimicifuga glycodides)	0.1856	0.1879	0.1884	1.1
	0.1847	0.1846	0.1903	
阿魏酸 (ferulate acid)	0.3526	0.3649	0.3697	2.3
	0.3509	0.3585	0.3766	
异阿魏酸 (iso-ferulic acid)	1.454	1.497	1.501	2.2
	1.419	1.470	1.536	
升麻素 (Cimicifuga Su)	0.1538	0.1583	0.1588	1.6
	0.1542	0.1555	0.1609	

4.5 加样回收率试验 取 8号升麻药材粉末 0.5 g (其中咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸和升麻素的含量分别为 0.5369, 0.1853, 0.3599, 1.476, 0.1561 mg·g⁻¹), 精密称定 6份, 分别为 0.5001, 0.4740, 0.4435, 0.5007, 0.5167, 0.4654 g 分别精密加入咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素对照品储备液 1.2, 1.0, 0.4, 3.0, 6.0 mL, 按“3.3”项下方法处理, 平行 6份。分别吸取 10 μL 进样, 测定, 结果见表 3。

4.6 含量测定 分别取不同商品地升麻药材粉末约 1 g 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 在上述

色谱条件下测定各商品地升麻中咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸、异阿魏酸、升麻素的含量, 结果见表 4。

表 3 各成分的加样回收率结果 (n = 6)

Tab 3 Determination of the recoveries of constituents

成分名称 (component name)	平均回收率 (average recovery) %	RSD /%
咖啡酸 (caffeic acid)	99.4	1.7
升麻素苷 (cimicifuga glycodides)	100.4	1.0
阿魏酸 (ferulate acid)	99.7	1.7
异阿魏酸 (iso-ferulic acid)	99.0	1.3
升麻素 (Cimicifuga Su)	99.8	1.3

表 4 各商品地及炮制品升麻中指标性成分的含量 (mg·g⁻¹)

Tab 4 Various commodities and processed products to cimicifuga content of indicator elements

批号 (Lot No.)	商品地 (merchandise)	咖啡酸 (caffeic acid)	升麻素苷 (cimicifuga glycodides)	阿魏酸 (ferulate acid)	异阿魏酸 (iso-ferulic acid)	升麻素 (Cimicifuga Su)
1	吉林 (Jilin)	0.3966	-	0.3526	1.524	0.1111
2	河北 (Hebei)	0.2241	0.1481	0.5063	1.687	0.2423
3	山东 (Shandong)	0.3472	-	0.3326	1.244	-
4	辽宁 (Liaoning)	0.4623	0.1172	0.4670	2.114	0.5385
5	广东 (Guangdong)	0.1930	-	-	-	-
6	江苏 (Jiangsu)	0.4826	0.0301	0.3219	1.249	-
7	上海 (Shanghai)	0.3589	0.2387	0.3400	2.285	0.5236
8	山西 (Shanxi)	0.5369	0.1853	0.3599	1.476	0.1561
9	北京 (Beijing)	0.2030	-	0.2861	1.685	0.1701
10	黑龙江 (Heilongjiang)	0.2911	-	0.2736	1.535	0.08590
11	上海 (蜜炙) Shanghai (Mizhi)	1.686	0.4511	0.6773	0.2916	1.139
12	北京 (炒炭) Beijing (Fried carbon)	0.2012	0.05970	0.1663	3.105	0.2332

5 讨论

5.1 不同产地的升麻药材中 5 种成分含量差异较大,可能与各产地升麻的来源有关。咖啡酸含量最高的生品产地为山西;升麻素苷含量最高的产地为上海;阿魏酸含量最高的产地为河北;异阿魏酸含量最高的产地为上海;升麻素含量最高的产地为辽宁。未检出升麻素苷的产地有吉林、山东、广东、北京、黑龙江;未检出阿魏酸的产地为广东;未检出异阿魏酸的产地为广东;未检出升麻素的产地有山东、广东、江苏。

5.2 升麻生品升散作用甚强,蜜升麻辛散作用减弱,升阳作用缓和而较持久,减少了对胃的刺激性。升麻炒炭辛散作用极弱,兼具涩性,可用于肠风下血^[5]。与生品比较,蜜炙升麻中咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸和升麻素的含量均显著升高,异阿魏酸的含量有所降低;升麻炒炭中异阿魏酸的含量升高,而咖啡酸、升麻素苷、阿魏酸和升麻素的含量显著降低。这与蜜炙升麻辛散作用减弱,升阳作用缓和而较持久,减少了对胃的刺激性以及升麻炒炭辛散作用极弱,兼具涩性的理论相符。

5.3 选择回流、超声、索氏等提取方式和甲醇、乙醇、水等提取溶剂进行考察,确定升麻采用乙醇加热回流提取^[6]。对其提取条件以乙醇浓度、乙醇用量、提取时间、提取次数四因素进行正交试验,结果溶剂倍数和提取次数对有效成分的提取影响较大,

是显著性因素,确定提取升麻中 5 种成分测定采用 30% 乙醇 20 mL 加热回流提取 1.5 h。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005 Vol I (一部): 50
- 2 GAO Jin-ming(高锦明), ZHANG An-ling(张鞍灵), ZHANG Kang-jian(张康健), *et al* Advances in the researches of distribution, extraction and bioactivities of chlorogenic acids(绿原酸分布、提取生物活性研究综述). *J Northwest Forest Univ* (西北林学院学报), 1999, 14(2): 73
- 3 MI Bao-li(米宝丽), LI Ke-qiang(李可强), ZHANG Zhen-qiu(张振秋). Determination of multi-index components in preparation of Yanlixiao(炎立消制剂多指标成分的含量测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29(3): 504
- 4 ZHANG Guang-cai(张广财), ZHANG Zhen-qiu(张振秋), ZHANG Shuo(张硕), *et al* RP-HPLC wavelength switching simultaneous determination of a variety of indicators content in *Herba Sarcandrae*(RP-HPLC 波长切换法同时测定肿节风中多种指标成分的含量). *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2008, 28(23): 2051
- 5 GONG Qian-feng(龚千锋). *Science of Processing Chinese Material Medica*(中药炮制学). China Traditional Chinese Medicine Publishing House(中国中医药出版社), 2003. 1
- 6 WANG Jian-guang(王剑光). The extraction process of ferulic acid and iso-ferulic acid in *Cimicifuga*(升麻中阿魏酸和异阿魏酸的提取工艺研究). *Chin J Tradit Med Sci Technol*(中国中医药科技), 2007, 14(5): 353

(本文于 2010 年 1 月 10 日收到)