

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℃; 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, ferulic 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℃; 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, ferulic acid, 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

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

Agilent 1100 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: zhangzhengqiu@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 °C; 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。

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)	<i>r</i>	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 (ferulic 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

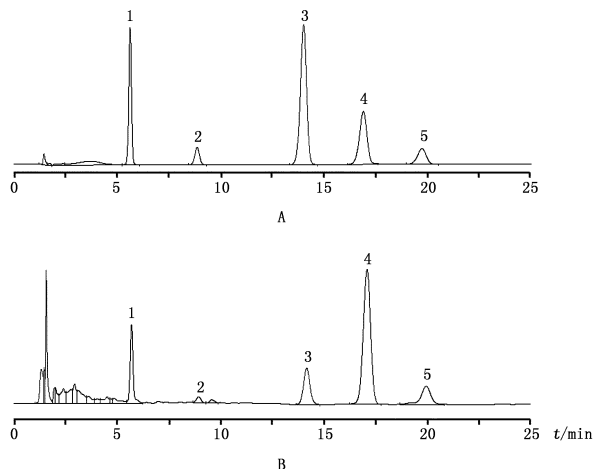


图 1 对照品 (A)、样品 (B) 的高效液相色谱图

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 (ferulic 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。

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 μ L, 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
	0.5235	0.5347	
升麻素苷 (cimicifuga glycodides)	0.1856	0.1879	0.1884
	0.1847	0.1846	
阿魏酸 (ferulate acid)	0.3526	0.3649	0.3697
	0.3509	0.3585	
异阿魏酸 (iso-ferulic acid)	1.454	1.497	1.501
	1.419	1.470	
升麻素 (Cimicifuga Su)	0.1538	0.1583	0.1588
	0.1542	0.1555	

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 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$), 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 μ L 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 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)

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 (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 *Cnicifuga*(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)