

HPLC 法同时测定怀牛膝中 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮的含量*

赵变, 常珍珍, 史彪, 孙祥德**

(河南新乡医学院药学院, 新乡 453003)

摘要 目的:建立怀牛膝药材中 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮的高效液相色谱测定方法。**方法:**SHIMADZU shim-pack VP-ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱, 流动相:乙腈-水梯度洗脱, 流速:1.0 mL · min⁻¹, 柱温:30°C, 检测波长:245 nm 和 279 nm。**结果:**可在 2 个波长下同时测定 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮的含量, 5-羟甲基糠醛的线性范围是 0.390 ~ 100 μg · mL⁻¹, 蜕皮甾酮的线性范围是 3.125 ~ 100 μg · mL⁻¹。平均回收率分别为 100.4% 和 99.0%。**结论:**该方法灵敏准确, 为怀牛膝药材的质量控制提供了新的含量测定方法。

关键词:5-羟甲基糠醛; 蜕皮甾酮; 高效液相色谱法

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2011)08-1582-04

HPLC simultaneous determination of contents of 5-hydroxymethylfurfural and ecdysterone in *Achyranthes bidentata* B₁*

ZHAO Bian, CHANG Zhen-zhen, SHI Biao, SUN Xiang-de**

(Xinxiang Medical University, School of Pharmacy, Xinxiang 453003, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the simultaneous determination of the contents of 5-hydroxymethylfurfural and ecdysterone in *Achyranthes bidentata* B₁. **Methods:** A SHIMADZU shim-pack VP-ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted, with a mixture solution of Acetonitrile-water as mobile phase using a gradient elution at flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was 30 °C, and the detection wavelength was 279 nm and 245 nm. **Results:** The contents of two compounds were simultaneously detected at two wavelengths. The calibration curves showed good linearity in the range of 0.39-100 μg · mL⁻¹ (5-hydroxymethylfurfural) and 3.125-100 μg · mL⁻¹ (ecdysterone), and the average recoveries of the method were 100.4% and 98.99%. **Conclusion:** The method is sensitive and accurate, and can be used for the quality control of *Achyranthes bidentata* B₁.

Key words: 5-hydroxymethylfurfural; ecdysterone; HPLC

四大怀药是著名的河南道地药材,产于河南焦作。千百年来,四大怀药以其独特的药效和滋补作用蜚声中外,历代中药典籍都给予了高度评价。四大怀药包括怀牛膝、地黄、山药、菊花。其中牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根,味苦、甘、平,归肝、肾经。具有补肝肾,强筋骨,逐瘀通经,引血下行等功效,用于腰膝酸痛,筋骨无力,肝阳眩晕^[1]的治疗。中国药典 2010 年版一部中将牛膝类药材分为牛膝和川牛膝 2 种收录。现代中药化学和药理学研究表明,牛膝中含有皂苷类^[2,3]、植物甾酮类^[4]、糖类^[5]、黄酮类等化学成分。蜕皮甾酮

(ecdysterone, 即 β 莲 - ecdysone) 为牛膝中主要的活性成分,具有促进蛋白质的合成,抑制由于药物引起的血糖升高,降胆甾醇,使受损的细胞再生^[6]等作用,与牛膝“补肝肾,强筋骨”的功效相吻合。5-羟甲基糠醛也是怀牛膝中的化学成分,据报道,5-羟甲基糠醛的含量与牛膝的泛糖程度有关^[7,8]。目前,关于牛膝中蜕皮甾酮和 5-羟甲基糠醛的含量测定已有不少报道^[4~9],但利用 HPLC 同时测定蜕皮甾酮和 5-羟甲基糠醛的含量还未见报道。本实验通过优化色谱条件,建立了道地牛膝药材中的 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮同时测定的高效液相色谱

* 河南省教育厅自然科学基金课题(No. 2010A350003)

** 通讯作者 Tel: (0373) 3831662; E-mail: wangjiangnan2008@163.com

方法,并比较了不同的土壤环境对牛膝中的5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮含量的影响。

1 仪器与试剂

仪器: SHIMADZU LC-6AD 型高效液相色谱仪; SPD-20A 型紫外-可见分光光度检测器; 分析天平(FA2004 型,上海良品仪器有限公司); 超声波清洗器(45w,上海科导超声仪器有限公司)。

试剂: 乙腈(色谱纯,天津赛孚瑞科技有限公司)。5-羟甲基糠醛对照品(批号: A0298,纯度 98.5%)、蜕皮甾酮对照品(批号: A0217,纯度 97%) 均购自成都曼思特生物科技有限公司。实验中所用的怀牛膝药材采自河南省武陟县大封镇驾部二村,按生长土质分为 1#: 混合土(非 S), 2#: 混合土(S), 3#: 砂土(S), 4#: 炉土(S)。(S 代表经硫磺熏制过)将药材粉碎,过 24 目筛,置广口瓶中密塞备用。

2 溶液的制备

2.1 对照品溶液 取蜕皮甾酮对照品 10 mg,精密称定,以甲醇溶解稀释制成每 1 mL 中含 1.0 mg 的蜕皮甾酮对照品储备溶液。取 5-羟甲基糠醛对照品 11 mg,精密称定,以甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 中含 1.0 mg 的 5-羟甲基糠醛对照品储备溶液。再分别吸取储备液适量配成不同浓度两对照品的混合对照溶液 $0.39 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $3.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $6.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $12.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 供试品溶液 精密称定怀牛膝样品(过 24 目筛) 1.00 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 20 mL 称重,超声(100 W 40 kHz)提取 40 min,冷却后用 50% 甲醇补足重量。摇匀, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

3 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱: SHIMADZU shim-pack VP-ODS (4.6 mm × 250 mm 5 μm) 柱; 检测波长为 279 nm 245 nm; 柱温为 30 °C; 进样量 20 μL; 流动相: 乙腈-水梯度洗脱,流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 梯度洗脱程序为: 0 min: 乙腈-水(9:91), 10 min: 乙腈-水(2:80), 25 min: 乙腈-水(25:75)。该色谱条件下 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮的保留时间分别为 7.760 min 和 22.155 min。样品和对照品溶液的色谱图见图 1。

4 线性关系考察

分别精密吸取各浓度的混合对照品溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图峰面积,以峰

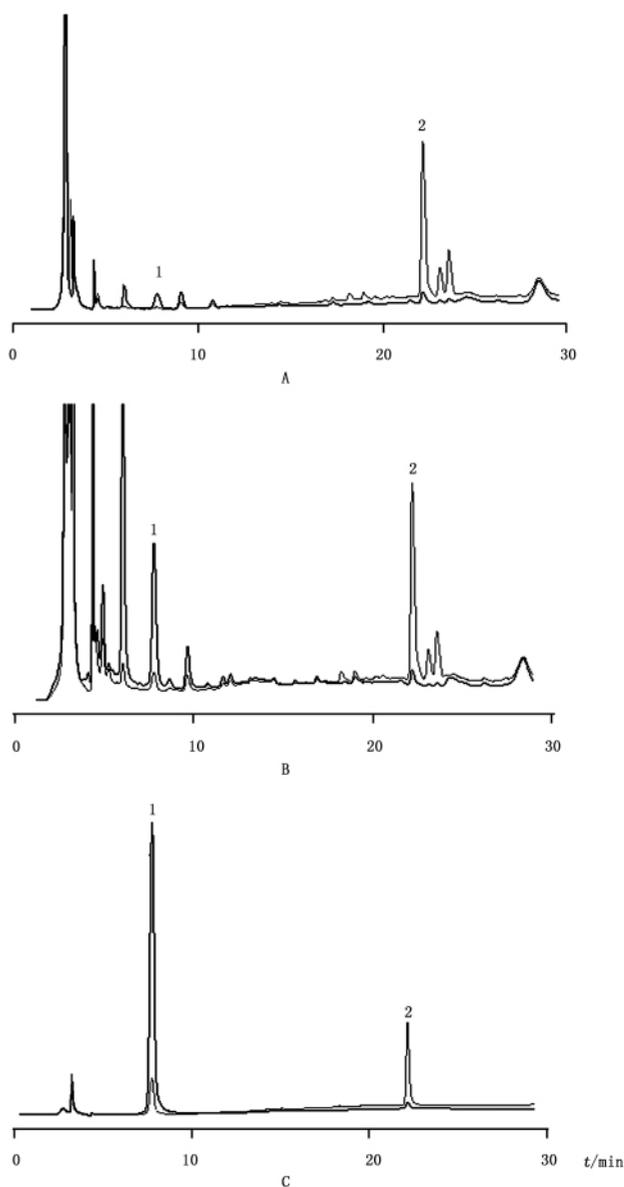


图1 原药材样品(A)、硫磺熏制药材样品(B)、对照品(C)色谱图
Fig 1 HPLC chromatograms of original medicinal sample (A), fumigated by sulfur sample (B) and reference substance (C)

1. 5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural 7.760 min) 2. 蜕皮甾酮(ecdysterone 22.155 min)

面积 A 为横坐标,以浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为纵坐标绘制标准曲线。5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮回归方程分别为:

$$C = -0.5873 + 6.829 \times 10^{-6} A \quad r = 0.99996$$

$$C = -1.450 + 3.675 \times 10^{-5} A \quad r = 0.99995$$

线性范围分别为 $0.39 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $3.125 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5 最低检测限

在选定的色谱条件下,当信噪比 $S/N = 3$ 时,对

各组分最低检测限进行测定。结果表明 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮的最小检出量分别是 1.95 ng 和 2.01 ng。

6 精密性试验

精密吸取 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,连续进样 5 次,测定峰面积,计算日内精密性;在相同条件下,连续 5 d 进样,测定峰面积,计算日间精密性。结果 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮的日内 RSD($n=5$) 分别为 1.7% 和 1.6%; 日间 RSD($n=5$) 分别为 1.3% 和 3.4%。

7 稳定性试验

取 1 份 1[#] 样品 1.0 g 精密称定,按“2.2”项下方法制备溶液后,在上述色谱条件下分别在 0, 2, 4, 6,

12, 24 h 进样测定,记录峰面积。结果 RSD 分别为 1.6% 和 2.0%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

8 重复性试验

精密称取 3[#] 样品 5 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液后测定,记录峰面积。结果 RSD 分别为 1.2% 和 2.0%, 方法的重现性良好。

9 加样回收率试验

取已知含量的 3[#] 样品约 1.0 g 3 份,每份分别精密加入对照品的甲醇溶液 34 μL (含 5-羟甲基糠醛对照品 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和 680 μL (含蜕皮甾酮对照品 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 按“2.2”项下方法制备供试品溶液后测定含量,计算回收率。平均回收率分别为 100.4% 和 99.0%, RSD 分别为 1.3% 和 0.68%, 见表 1。

表 1 回收率试验结果
Tab 1 Results of recoveries

| 成分 (component) | 取样量 (sample) /g | 样品含量 (sample content) / μg | 加入量 (added) / μg | 测得量 (detected) / μg | 回收率 (recovery) /% | 平均回收率 (mean) /% | RSD /% |
|--------------------------------------|--------------------|---|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------|
| 5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural) | 1.001 | 34.01 | 34.00 | 67.76 | 99.3 | 100.4 | 1.3 |
| | 1.021 | 34.69 | 34.00 | 68.72 | 100.1 | | |
| | 1.013 | 34.42 | 34.00 | 69.03 | 101.8 | | |
| 蜕皮甾酮(ecdysterone) | 1.001 | 681.6 | 680.0 | 1360 | 99.8 | 99.0 | 0.68 |
| | 1.021 | 695.2 | 680.0 | 1365 | 98.50 | | |
| | 1.013 | 689.8 | 680.0 | 1361 | 98.7 | | |

10 样品测定

按供试品溶液的制备方法,对 4 批药材进行测定,结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(% $n=3$)

Tab 2 Results of content determination of the samples

| 编号 (No.) | 5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural) | 蜕皮甾酮 (ecdysterone) |
|----------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1 [#] | 0.0001001 | 0.07032 |
| 2 [#] | 0.003045 | 0.07028 |
| 3 [#] | 0.003398 | 0.06809 |
| 4 [#] | 0.002198 | 0.07083 |

11 讨论

11.1 提取方法的选择 比较了回流提取法、索氏提取法以及超声提取法 3 种不同提取方法,3 种提取法提取效果接近,因此选用操作简便省时的超声提取法。就不同提取时间(30, 40, 60 min),不同醇浓度(50% 甲醇、80% 甲醇、100% 甲醇、95% 乙醇、50% 乙醇、正丁醇)进行了比较试验,结果确定 50% 甲醇超声 40 min 不仅提取完全,而且对被测两组分的干扰较小,作为供试品溶液的制备方法。

11.2 检测波长的选择 经紫外扫描,245 nm 和 279 nm 分别为 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮最大吸收波长。因此确定了 245 nm, 279 nm 双波长测定模式。

11.3 流动相及其梯度的选择 考察了甲醇-水、甲醇-0.1% 醋酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1% 醋酸水溶液等不同的流动相系统。结果发现采用乙腈-水系统,基线平稳,峰形及分离都较好。

11.4 小结 本试验建立了道地牛膝药材、硫磺熏制过的牛膝药材中的 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮含量的高效液相色谱同时测定方法。实验表明,硫磺熏制后 5-羟甲基糠醛的含量显著增加,而蜕皮甾酮则差别不大。这可能由于硫磺熏制过程中会导致牛膝中葡萄糖等单糖化合物在高温与熏制条件下脱水形成醛类化合物。5-羟甲基糠醛大量存在会对人的横纹肌造成一定的伤害,中国药典对部分药材中的 5-羟甲基糠醛有含量限度规定,因此在怀牛膝质量标准中增加 5-羟甲基糠醛的含量测定项目,对于保证该药材的安全性有重要意义,同时可用于鉴别该药材炮制方法的依据。另外比较了不同的土壤环境对熏制过的

牛膝中 5-羟甲基糠醛和蜕皮甾酮的影响,发现 5-羟甲基糠醛的含量砂土中种植的最高,混合土次之,炉土最低,而蜕皮甾酮则差别不大。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I(一部): 67, 35
- 2 WEI Xiu-lai(卫修来), GAO Chang-kun(高昌琨), GAO Jian(高建) *et al.* Determination of total saponins in *Achyranthes bidentata* (怀牛膝总皂苷含量测定). *Anhui Med Pharm J(安徽医药)*, 2007, 11(5): 424
- 3 Chen Xing(陈幸), Li Wan-shou(黎万寿), Zhu Jiu-wu(朱久武) *et al.* RP-HPLC Determination of cyasterone in Radix Cyathulae (RP-HPLC 法测定川牛膝中杯苋甾酮的含量). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)* 2000, 20(4): 234
- 4 MENG Da-li(孟大利), HOU Bai-ling(侯柏玲), WANG Yi(汪毅) *et al.* Phytosterone constituents from *Achyranthes bidentata* Bl. (中药牛膝中的植物甾酮类成分). *J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报)* 2006, 23(9): 562, 564, 567
- 5 SHI Chun-juan(时春娟), ZHOU Yong-da(周永达), ZHANG Jian-bo(张剑波) *et al.* Researches of Polysaccharides from *Achyranthes bidentata* (牛膝多糖研究进展). *Chin J New Drugs(中国新药杂志)* 2006, 15(16): 1330
- 6 Michael D, Courreur T, Lenaerts V. *et al.* Effects of ecdysterone on the differentiation of normal human keratinocytes in vitro. *Eur J Dermatol*, 1994, 4(7): 558
- 7 LIU Zhen-li(刘振丽), SONG Zhi-qian(宋志前), WANG Chun(王淳) *et al.* Determination of 5-hydroxymethyl-furfural in root of *Achyranthes bidentata* expressing different degree of floating sugar (泛糖程度不同的牛膝中 5-羟甲基糠醛含量测定). *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)* 2009, 34(3): 298
- 8 LIANG Sheng-wang(梁生旺), WANG Jing(王静), WANG Shu-mei(王淑美) *et al.* Studies on "floating sugar" mechanism in root of *Achyranthes bidentata* (牛膝“泛糖”机制研究). *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)* 2003, 34(11): 993
- 9 LIN Da-zhuan(林大专), WANG Guang-shu(王广树), YANG Xiao-hong(杨晓红) *et al.* Studies on steroid constituents of *Achyranthes bidentata* Bl. (牛膝中新蜕皮甾酮类成分的研究). *Chin Pharm J(中国药理学杂志)* 2006, 41(17): 1295

(本文于 2010 年 10 月 23 日收到)

金少鸿主编关于《药物分析杂志》刊庆计划说明(摘要)

《药物分析杂志》是我国药检领域首批学科带头人创办的学术期刊。她的前身是 1951 年开始编印的《药检通讯》,后来也用过《药检工作通讯》的刊名,1981 年正式注册为《药物分析杂志》。

早在 20 世纪 50 年代初,涂国士先生等一大批留学海外的学子,怀着对祖国的热爱,为推动科学进步的爱国热情,回到祖国,投身于新中国的建设。他们是新中国药检事业的首批专业人员,是参与了当时国家药检所的首批人才。早在 1950 年刚刚建立国家药检机构时,他们就担负起了引领全国药物分析技术不断进步的责任和义务。当时新中国刚刚建立,在药物检测、科研、教学、培训等工作中,他们面临缺教材、缺资料、缺标准资料的困难,而且也发现工作中时时取得的研究成果、检测经验,才是培养药检科学技术工作者最好的知识信息,是当时教材中缺乏和不可多得的内容。

为及时收集领域内的最新研究成果,共享药物检测分析经验,为国家尽快培养检验人才。1951 年就开始编印《药检工作通讯》,不定期在系统内发行,为促进本系统学术发展发挥了重要的作用。

随着学科技术发展向更广泛的领域渗透,和国家对科技期刊管理的不断完善。1981 年在原《药检工作通讯》的基础上,正式注册创办了《药物分析杂志》,在国内外公开发行,为引领药物检测学科发展发挥了更广泛的作用。

从中国药检办刊历史看,我们的学术期刊已是 60 年,仅以中国药学会《药物分析杂志》冠名发行也有 30 年。几十年来,《药物分析杂志》秉承“百花齐放、百家争鸣、追求前沿、促进推广”的办刊理念,以科学技术研究成果惠及药物分析领域为主线,为药物分析学科发展搭建着学术平台。

时值刊庆之际,我们感谢老一代办刊人为我们创建了平台,打下了坚实的基础;感谢广大作者专家多年来的为我刊送来了凝聚您辛勤汗水的科研杰作;感谢广大读者朋友多年来对本刊的鼎力支持热心关注;感谢各届编委专家多年来付出的智慧劳动。是你们成就我们在追求特色中铸造精品。有你们的支持与关心,我们有信心传承药物分析学术作风,攀登学科发展高峰,为科学发展再立新功。

2011 年 1 月 26 日