

HPLC 同时测定玄参中 5 种成分的含量

张雪梅, 王瑞, 安睿, 吴喜民, 王新宏, 李医明*

(上海中医药大学 中药学院, 上海 201203)

[摘要] 目的: 建立同时测定玄参药材中哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 含量的高效液相色谱方法。方法: 采用 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.03% 磷酸水溶液, 梯度洗脱; 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 210, 280, 330 nm; 柱温 30 ℃。结果: 哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 的线性范围分别为 50~400, 1~40, 1~20, 0.5~4.5, 1~60 mg·L⁻¹; 哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 的回收率分别为 101% (RSD 0.62%), 102% (RSD 0.32%), 98.8% (RSD 0.48%), 99.9% (RSD 1.4%), 99.2% (RSD 1.1%)。结论: 该方法简便快速, 分离效果好, 灵敏度高, 重现性好, 可为全面控制玄参质量提供参考。

[关键词] 玄参; 含量测定; HPLC; 哈巴苷; 肉桂酸; 哈巴俄苷; 麦角甾苷; 安格洛苷 C

玄参为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根, 具有凉血滋阴, 泻火解毒的功效, 为传统常用中药^[1]。玄参中含有多种环烯醚萜和苯丙素类成分, 如哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 等^[2-3], 药理研究表明这些成分具有镇痛、抗炎、抗菌、保肝、抗氧化、增强免疫等作用^[4-5]。

本课题组前期药理学研究表明, 玄参中环烯醚萜和苯丙素类成分对心血管系统的作用比较突出, 有扩张冠状动脉、降血压、抗血小板聚集、促进纤溶、改善血液流变性等作用, 对于充血性心力衰竭有较好的疗效, 属于活性有效部位^[6-8], 因而有必要对玄参中环烯醚萜和苯丙素类化合物进行质量控制。

玄参中哈巴苷和哈巴俄苷的高效液相色谱测定法已有报道。但同时测定哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷和安格洛苷 C 5 种成分的含量未见报道。本文用高效液相色谱法, 采用梯度洗脱测定了不同产地玄参药材中 5 种成分的含量, 为全面控制其质量奠定基础。

1 材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 化学工作站 (Agilent 公司), XS205DU 电子天平 (梅特勒-托利多仪

器有限公司), SK5200H 超声波清洗器 (上海科导超声仪器有限公司)。

哈巴苷 (批号 111729-200602) 和哈巴俄苷 (批号 111730-200605) 对照品购于中国药品生物制品检定所, 肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 对照品均为自行分离精制, 并经¹H-NMR, ¹³C-NMR 鉴定结构, HPLC 检测, 面积归一化法计算纯度均大于 98%。乙腈和磷酸为色谱纯, 水为去离子水, 其余试剂均为分析纯。

实验所用玄参药材来源于不同产地。由上海中医药大学中药学院李医明教授鉴定为玄参科植物玄参 *S. ningpoensis* 的干燥根。样品存于上海中医药大学中药学院中药化学教研室。待测药材均于 55 ℃ 烘干, 粉碎, 过 3 号筛, 备用。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 对照品适量, 加 30% 甲醇配制成质量浓度分别为 1, 0.1, 0.1, 0.01, 1 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取玄参粉末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定, 浸泡 1 h, 超声处理 45 min, 放冷, 50% 甲醇补足失重, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A)-0.03% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 0~10 min, 3%~10% A; 10~30 min, 10%~30% A; 30~35 min, 30%~50% A; 35~37 min, 50%~3% A; 37~42 min, 3% A。流速

[稿件编号] 20110218009

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09103-398, 2009ZX09308-003)

[通信作者] * 李医明, 主要从事中药活性成分与新药研究, Tel: (021) 51322191, E-mail: ymlius@163.com

1 mL · min⁻¹; 检测波长 210, 280, 330 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。色谱图见图 1。

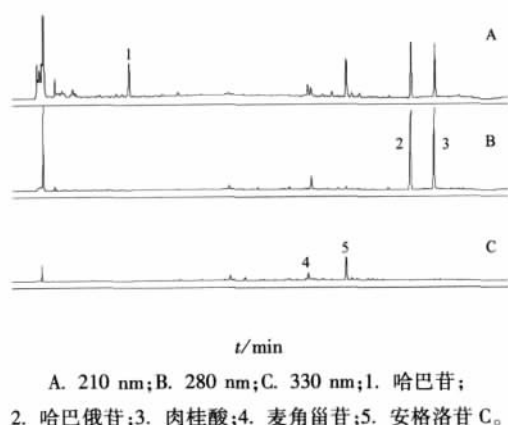


图1 玄参中5种成分在不同波长下的HPLC图

2.4 线性关系的考察 精密量取哈巴苷对照品溶液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 30% 甲醇定容至 10 mL, 摇匀。精密量取哈巴俄苷对照品溶液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 30% 甲醇定容至 10 mL, 摇匀。精密量取肉桂酸对照品溶液 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 30% 甲醇定容至 10 mL, 摇匀。精密量取麦角甾苷对照品溶液 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 30% 甲醇定容至 10 mL, 摇匀。精密量取安格洛苷 C 对照品溶液 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 30% 甲醇定容至 10 mL, 摇匀。按上述色谱条件, 分别进样 20 μL, 记录色谱峰面积, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 质量浓度 $X(g \cdot L^{-1})$ 为横坐标, 进行线性回归, 得哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 的回归方程分别为 $Y = 3.288 \times 10^3 X + 2.692 \times 10^2, r = 0.9998$; $Y = 5.111 \times 10^4 X + 7.618, r = 0.9995$; $Y = 1.850 \times 10^5 X + 7.607, r = 0.9995$; $Y = 2.857 \times 10^4 X - 4.945, r = 0.9997$; $Y = 1.720 \times 10^4 X + 7.996, r = 0.9995$ 。线性范围分别为 50 ~ 400, 1 ~ 40, 1 ~ 20, 0.5 ~ 4.5, 1 ~ 60 mg · L⁻¹。

2.5 精密度试验 取对照品溶液, 按上述色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱峰面积, 哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 0.74%, 0.43%, 1.8%, 1.0%。

2.6 重复性试验 精密称取同一批上海养和堂购买的玄参样品 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 各取 20 μL 进样, 测定峰面积, 计算得哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 含量的 RSD 分别为 1.0%, 0.15%, 0.66%, 1.8%, 1.8%。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于配制后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进样 20 μL, 测定峰面积, 计算得哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 含量的 RSD 分别为 2.0%, 0.44%, 0.50%, 0.43%, 0.50%。

2.8 加样回收率 取已知含量的上海养和堂购买的玄参样品约 0.25 g, 共 6 份, 精密称定, 分别加入一定量对照品, 按 2.2 项下制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件进样分析, 计算回收率。哈巴苷、哈巴俄苷、肉桂酸、麦角甾苷、安格洛苷 C 的平均回收率分别为 101%, 102%, 98.8%, 99.9%, 99.2%; RSD 分别为 0.62%, 0.32%, 0.48%, 1.4%, 1.1%。

2.9 样品含量测定 取不同产地玄参样品约 0.5 g, 精密称定, 按供试品溶液处理方法制备样品, 分别吸取对照品和供试品溶液各 20 μL 进样分析, 外标两点法计算含量, 见表 1。

表1 不同产地玄参中5种检测成分的质量分数 %

No.	来源	批号	哈巴 苷	哈巴 俄苷	肉桂 酸	麦角 甾苷	安格 洛苷 C
1	上海养和堂	20091016	0.509	0.070	0.034	0.021	0.105
2	河南南阳	20100119	0.090	0.262	0.079	0.063	0.267
3	陕西镇坪	20100129	0.285	0.216	0.016	0.027	0.349
4	湖南怀化	20100124	0.252	0.100	0.034	0.027	0.159
5	山东沂水	20100209	0.163	0.034	0.022	0.011	0.042
6	浙江东阳	20100201	0.655	0.162	0.042	0.018	0.146
7	浙江磐安	20100210	0.831	0.226	0.088	0.033	0.289
8	四川雅安	20091225	0.234	0.269	0.13	0.031	0.199
9	四川北川	20091216	0.422	0.137	0.048	0.035	0.141
10	贵州道真	20100208	0.718	0.114	0.046	0.006	0.125
11	贵州黔西	20100204	0.518	0.109	0.028	0.027	0.158

3 讨论

3.1 检测波长的确定 哈巴俄苷、肉桂酸在 280 nm 有最大吸收, 麦角甾苷、安格洛苷 C 在 330 nm 有最大吸收, 哈巴苷只有末端吸收, 采用 DAD 检测器, 选用 210, 280, 330 nm 作为检测波长检测 5 种成分, 效果满意。

3.2 流动相的选择 本实验先后试用了甲醇-

0.3% 乙酸水溶液, 甲醇-0.03% 磷酸水溶液, 乙腈-0.3% 乙酸水溶液, 乙腈-0.03% 磷酸水溶液, 从分离情况和出峰时间等综合分析, 选择乙腈-0.03% 磷酸水溶液梯度洗脱。

3.3 含量测定结果分析 浙江产玄参药材中5种成分的含量均较高, 而河南、山东产玄参药材中5种成分的含量则较低。各产地气候、土壤等环境条件可能是影响含量的重要因素。

4 结论

本实验采用 HPLC 三波长法同时测定了玄参中5种主要成分的含量, 结果显示该方法灵敏度高, 重复性好, 样品处理方法简单, 可作为玄参质量控制的方法。

2010 年版《中国药典》对玄参的含量测定项只测定哈巴苷和哈巴俄苷的含量, 但肉桂酸、麦角甾苷、安格洛昔 C 的含量同样很高, 故上述5种成分对玄参药材的质量控制均有重要意义。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1997: 769.
- [2] 张雯洁, 刘玉青, 李兴从, 等. 中药玄参的化学成分[J]. 云南植物研究, 1994, 16(4): 407.
- [3] Li Y, Jiang S, Gao W, et al. Iridoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis* [J]. Phytochemistry, 1999, 50(1): 101.
- [4] 胡瑛瑛, 黄真. 玄参的化学成分及药理作用研究进展[J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(2): 268.
- [5] 夏聪华, 石森林, 葛卫红, 等. 玄参药理活性研究进展[J]. 中国药师, 2008, 11(8): 911.
- [6] 曾华武, 李医明, 贺祥, 等. 玄参提取物的抗炎和抗氧化活性[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(9): 614.
- [7] 黄才国, 李医明, 贺祥, 等. 玄参中苯丙素苷 XS-8 对兔血小板 cAMP 和兔血浆中 PGI₂/TXA₂ 的影响[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(8): 920.
- [8] 李医明, 曾华武, 贺祥, 等. 玄参中环烯醚萜甙和苯丙素甙对 LTB₄ 产生及血小板聚集的影响[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(5): 301.

Simultaneous determination of five constituents in *Scrophularia ningpoensis* by HPLC

ZHANG Xuemei, WANG Rui, AN Rui, WU Ximin, WANG Xinhong, LI Yiming*
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the simultaneous quantitation of five constituents in *Scrophularia ningpoensis*. **Method:** Samples were analyzed on an Agilent SB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) eluted with acetonitrile and water containing 0.03% phosphate acid as mobile phases in a linear gradient mode. The flow rate was kept at 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was set to 30 °C. The DAD detector wavelengths were 210, 280, 330 nm. **Result:** The linear ranges were 50-400 mg·L⁻¹ for harpagide, 1-40 mg·L⁻¹ for harpagoside, 1-20 mg·L⁻¹ for cinnamic acid, 0.5-4.5 mg·L⁻¹ for acteoside, 1-60 mg·L⁻¹ for angoroside C, respectively. The average recoveries of the five constituents were 100.8% (RSD 0.62%), 101.7% (RSD 0.32%), 98.8% (RSD 0.48%), 99.9% (RSD 1.4%), 99.2% (RSD 1.1%), respectively. **Conclusion:** Through the validation, the method was proved to be sensitive, accurate, repeatable, and can be used for quality control of the roots of *S. ningpoensis*.

[Key Words] *Scrophularia ningpoensis*; assay; HPLC; harpagide; cinnamic acid; harpagoside; acteoside; angoroside C

doi: 10.4268/cjcm20110612

[责任编辑 马超一]