

北沙参中香豆素类与聚炔类成分的 含量测定研究[△]

冯子晋^{1,2}, 卢小玲^{1*}, 张建鹏¹, 商晓慧^{1,2}, 刘小宇¹, 焦炳华¹, 郑珩²

(1. 第二军医大学 生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433;

2. 中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京, 210009)

摘要:目的 建立同时测定北沙参中香豆素及聚炔类成分含量的方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱 Agilent SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 A 相为水溶液, B 相为乙腈, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 紫外检测波长 250 nm, 进样量 20 μL。结果 香豆素及聚炔类成分的含量在不同产地的北沙参中具有明显的差异。结论 本方法快速、准确、重复性好, 可用于北沙参中香豆素及聚炔类成分的含量测定。

关键词:北沙参; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1002-3461(2014)03-020-07

DOI: 10.13400/j.cnki.cjmd.2014.03.004

The study of the contents of coumarin and polyacetylene in *Glehnia Littoralis*

FENG Zi-jin^{1,2}, LU Xiao-ling^{1*}, ZHANG Jian-peng¹, SHANG Xiao-hui^{1,2}, LIU Xiao-yu¹,
JIAO Bing-hua¹, ZHENG Heng²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of coumarin and polyacetylene in *Glehnia Littoralis*. **Methods** High performance liquid chromatography was performed on a Agilent SB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 30 °C. The mobile phase was acetonitrile-water with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 250 nm and the sample injection volume was 20 μL. **Results** The contents of coumarin and polyacetylene in *Glehnia Littoralis* which grows in different areas showed obvious difference. **Conclusion** The method is rapid, accurate and repeatable, which can be used for the determination of coumarin and polyacetylene in *Glehnia Littoralis*.

Key words: *Glehnia Littoralis*; high performance liquid chromatography; content determination

北沙参为中国传统中药材,《中国药典》2010 版收载为伞形科植物珊瑚菜 (*Glehnia Littoralis* Fr. Schmidtex Miq.) 的干燥根^[1], 别名莱阳沙参、莱阳参、辽沙参、珊瑚菜, 主要分布于山东、辽宁、

河北、江苏、浙江、广东、福建、台湾等地。其具有养阴清肺、益胃生津的功效, 主要用于治疗肺热燥咳、虚劳久咳、阴伤咽干、日苦口渴等症^[2]。近几年临床应用发现, 对益气养阴的作用比较强, 对气

[△]基金项目: 国家高技术研究发展计划项目子课题(SS2013AA093002)资助

作者简介: 冯子晋(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为海洋中药北沙参的质量标准控制研究。

* 通讯作者: 卢小玲(1980-), 女, 副教授, Tel: 021-81870970-8004 E-mail: luxiaoling80@126.com.

收稿日期: 2013-10-29

阴两虚患者常常能收到精神振作、气阴恢复的效果^[3-4]。研究表明香豆素(coumarin)及其聚炔类成分为其主要的活性成分。香豆素类化合物具有抗 HIV、降压、抗癌、抗心律失常、镇痛、平喘及抗菌等多种生物活性^[5],聚炔类成分具有抑菌、镇静、镇痛、降压、抗炎和神经保护等药理作用^[6]。本文首次建立了同时测定补骨脂素、花椒毒素、欧前胡素、异欧前胡素 4 种香豆素成分和(8E)-1,8-Hepta-decadiene-4,6-diyne-3,10-diol、法卡林二醇、人参炔醇 3 种聚炔类成分的方法,可为科学评价北沙参质量的优劣提供依据。

1 仪器与试药

仪器:Agilent1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);电子天平(Bel 公司)。

试药:HPLC 级乙腈(沃凯),纯净水,欧前胡素(批号:110826-201214)、异欧前胡素(批号:110827-201109)、补骨脂素(批号:110739-201115)均购于中国药品与生物制品检定所,花椒毒素、(8E)-1,8-Hepta-decadiene-4,6-diyne-3,10-diol、法卡林二醇、人参炔醇均由本实验室自制(含量>98%)。北沙参药材购自辽宁、山东、河北、赤峰等多个产地。经北京大学中医药现代研究中心屠鹏飞教授鉴定为伞形科珊瑚菜属珊瑚菜的干燥根。乙醇与其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(洗脱程序见表 1);体积流量为:1.0 mL/min;检测波长 250 nm;柱温 30 °C;进样量 20 μL。

表 1 色谱洗脱程序

时间 Time/min	乙腈 Acetonitrile/%	水 Water/%
0	15	85
25	53	47
45	53	47
55	70	30
85	80	20

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取一定量的补骨脂素、花椒毒素、欧前胡素、异欧前胡素、(8E)-1,8-Hepta-decadiene-4,6-diyne-3,10-diol、法卡林二醇、人参炔醇对照品,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成补骨脂素 0.0050 mg/mL、花椒毒素 0.0050 mg/mL、欧前胡素 0.0250 mg/mL、异欧前胡素 0.0050 mg/mL、(8E)-1,8-Hepta-decadiene-4,6-diyne-3,10-diol 0.1000 mg/mL、法卡林二醇 0.2000 mg/mL、人参炔醇 0.2500 mg/mL 的标准品溶液,备用。对照品的高效液相色谱图见图 1。

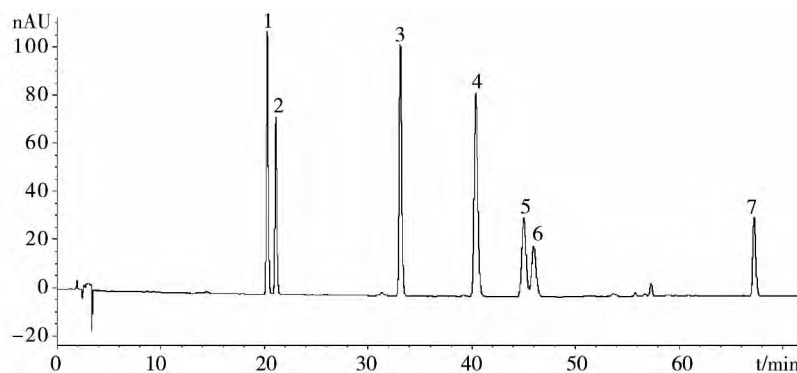


图 1 对照品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substances

- (1. 补骨脂素, 2. 花椒毒素, 3. 欧前胡素, 4. 异欧前胡素, 5. (8E)-1,8-Hepta-decadiene-4,6-diyne-3,10-diol, 6. 法卡林二醇, 7 为人参炔醇
1. Psoralen; 2. Xanthotoxin; 3. Imperatorin; 4. Isoimperatorin; 5. (8E)-1,8-Hepta-decadiene-4,6-diyne-3,10-diol; 6. Carlin diol;
7. Panaxynol).

2.2.2 供试品溶液的制备

取不同产地的北沙参药材粉末各 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 乙醇 15 mL, 密塞, 称定重量, 超声 (250 W, 40 KHz) 提

取 45 min, 放冷, 再称定重量, 用 75% 乙醇补足减失的重量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。供试品的高效液相色谱图见图 2。

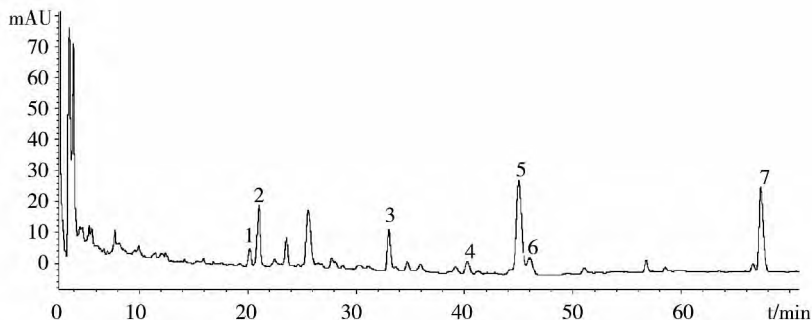


图 2 HPLC 测定提取液中香豆素及聚炔类成分的含量

Fig. 2 Determination of coumarin and carbene compounds extracted form radix glehniae soluble liquid by HPLC (1. 补骨脂素, 2. 花椒毒素, 3. 欧前胡素, 4. 异欧前胡素, 5. (8E)-1,8-Hepta-decadiene-4,6-diyne-3,10-diol, 6. 法卡林二醇, 7. 为人参炔醇
1. Psoralen; 2. Xanthotoxin; 3. Imperatorin; 4. Isoimperatorin; 5. (8E)-1,8-Hepta-decadiene-4,6-diyne-3,10-diol; 6. Carlin diol; 7. Panaxynol)

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系

精密吸取各对对照品溶液若干毫升, 配成一系列浓度的标准溶液。在上述色谱条件下分别进样

20 μL , 测定其峰面积 A , 以浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程见表 2。

表 2 标准曲线及线性范围

Table 2 Standard curve and linear range characteristics of different components

待测组分 Analytes	标准曲线 Standard curve	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ linear range	r 值 r values
补骨脂素 Psoralen	$A = 145668C + 4.1901$	0.000025 ~ 0.005000	0.9999
花椒毒素 Xanthotoxin	$A = 52049C + 2.2028$	0.000025 ~ 0.005000	0.9999
欧前胡素 Imperatorin	$A = 34968C + 4.7854$	0.000125 ~ 0.025000	0.9999
异欧前胡素 Isoimperatorin	$A = 110008C + 3.9896$	0.000025 ~ 0.005000	0.9998
(8E)-1,8-Hepta-decadiene-4,6-diyne-3,10-diol	$A = 5300.1C + 6.5861$	0.0025 ~ 0.1000	0.9999
法卡林二醇 Carlin diol	$A = 1030C - 1.1304$	0.0050 ~ 0.2000	0.9998
人参炔醇 Panaxynol	$A = 1440.2C + 0.4571$	0.0125 ~ 0.2500	0.9997

2.3.2 精密度试验

精密吸取供试品溶液 20 μL , 连续进样 6 次, 分别测定 7 个待测组分的峰面积, 供试品溶液中待

测组分的 RSD 见表 3。结果表明: 该方法精密度良好, 符合含量测定要求。

表 3 精密度试验结果

Table 3 Results of precision test of different components

	峰面积 Peak area/mAU · S						
	补骨脂素 Psoralen	花椒毒素 Xanthotoxin	欧前胡素 Imperatorin	异欧前胡素 Isoimperatorin	(8E)-1,8-Hepta- decadiene-4, 6-diyne-3,10-diol	法卡林二醇 Carlin diol	人参炔醇 Panaxynol
1	31.1	108.8	82.4	25.8	354.5	49.0	168.5
2	31.3	105.3	81.9	25.0	352.9	47.8	163.7
3	32.8	110.1	83.4	26.5	355.7	48.4	171.0
4	32.3	110.5	82.3	25.3	350.8	47.2	167.6
5	32.7	107.3	81.4	26.3	350.8	46.0	165.7
6	32.2	107.7	82.8	26.3	353.9	46.1	167.6
RSD/%	2.21	1.78	0.84	2.35	0.56	2.56	1.48

2.3.3 稳定性试验

RSD 见表 4。从表 4 可以看出,供试品溶液在 36 h

取供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、36 h 进
样,进样量为 20 μ L,测定峰面积 A,待测组分的

内稳定。

表 4 稳定性试验结果

Table 4 Results of stability test of different components

测定时间 Measurement time/h	峰面积 Peak area/mAU · S						
	补骨脂素 Psoralen	花椒毒素 Xanthotoxin	欧前胡素 Imperatorin	异欧前胡素 Isoimperatorin	(8E)-1,8-Hepta- decadiene-4, 6-diyne-3,10-diol	法卡林二醇 Carlin diol	人参炔醇 Panaxynol
0	29.4	106.4	74.1	28.4	343.9	48.7	167.3
2	30.1	105.1	73.6	28.6	345.3	47.9	167.3
4	29.2	104.8	72.8	28.0	346.6	48.9	167.8
8	28.9	103.4	70.9	27.8	342.2	50.4	162.5
12	29.8	105.9	73.9	27.9	349.6	48.2	169.3
36	29.6	105.6	70.8	27.1	344.5	46.7	166.3
RSD/%	1.45	0.99	2.07	1.87	0.73	2.52	1.38

2.3.4 重复性试验

RSD 见表 5。结果表明:该方法的重复性好,符合

取供试品 2 g,精密称定,共 6 份,分别按供试
品溶液制备方法制备,并测定含量,待测组分的

含量测定要求。

表 5 重复性试验结果

Table 5 Results of repeatability test of different components

	峰面积 Peak area/mAU · S						
	补骨脂素 Psoralen	花椒毒素 Xanthotoxin	欧前胡素 Imperatorin	异欧前胡素 Isoimperatorin	(8E)-1,8-Hepta- decadiene-4, 6-diyne-3,10-diol	法卡林二醇 Carlin diol	人参炔醇 Panaxynol
1	110.3	366.8	255.8	103.2	871.4	117.2	690.0
2	109.7	367.2	254.4	104.4	875.5	115.1	694.3
3	106.7	366.2	251.3	102.3	876.0	112.1	685.1
4	107.5	371.7	266.1	107.4	910.1	113.9	717.8
5	108.5	379.5	258.8	105.3	900.7	118.8	711.3
6	108.4	380.4	259.1	105.3	884.2	115.2	696.0
RSD/%	1.23	1.74	1.97	1.71	1.76	2.05	1.82

2.3.5 加样回收试验

取已知含量的供试品 9 份, 每份 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 按供试品溶液中待测组分含量的 80%、100%、120% 精密加入各对照品一定

量, 按上述供试品溶液制备方法制备, 分别测定, 计算回收率, 平均加样回收率见表 6。结果表明: 该方法的准确度良好, 符合含量测定要求。

表 6 加样回收试验结果

Table 6 Results of recovery test of different components

	回收率 Recovery						
	补骨脂素 Psoralen	花椒毒素 Xanthotoxin	欧前胡素 Imperatorin	异欧前胡素 Isoimperatorin	(8E)-1,8-Hepta- -decadiene-4, 6-diyne-3,10-diol	法卡林二醇 Carlin diol	人参炔醇 Panaxynol
80%	1.01	1.05	1.05	1.00	1.01	0.97	1.03
	1.04	1.05	1.01	1.01	1.03	0.99	1.02
	1.06	1.04	1.01	1.01	1.03	0.98	1.01
100%	1.04	1.06	1.03	0.98	1.01	0.99	1.02
	1.03	1.05	1.01	1.01	1.04	0.97	1.05
	1.02	1.06	1.05	0.99	1.00	1.00	1.02
120%	1.04	1.05	1.03	1.03	1.03	1.00	0.99
	1.01	1.03	1.05	1.03	1.06	1.02	1.02
	1.00	1.06	1.05	1.02	1.03	1.01	1.02
平均值	1.03	1.05	1.04	1.02	1.04	0.99	1.02
RSD/%	1.93	1.14	1.88	1.53	1.83	1.93	1.57

2.3.6 耐用性实验

取供试品 2 g, 精密称定, 按供试品溶液制备方法制备, 分别在 4 个不同柱温条件 25、28、30、33℃ 下测定含量, 同一温度下进样 2 次, 各待测组分的 RSD 结果见表 7; 取同样的供试品, 分别在 Agilent SB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、

CNW Athena C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、CNW Athena C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 3 种不同色谱柱条件下测定含量, RSD 结果见表 8, 结果表明: 该方法的耐用性良好, 符合含量测定要求。

表 7 不同柱温下的耐用性试验结果

Table 7 Results of durability test under different column temperatures

温度/℃ Temper- atures	峰面积 Peak area(mAU, S)						
	补骨脂素 Psoralen	花椒毒素 Xanthotoxin	欧前胡素 Imperatorin	异欧前胡素 Isoimperatorin	(8E)-1,8-Hepta- -decadiene-4, 6-diyne-3,10-diol	法卡林二醇 Carlin diol	人参炔醇 Panaxynol
25	32.4	107.1	71.9	31.39	347.2	47.3	167.4
	32.3	107.9	71.6	30.3	347.3	48.3	166.5
28	31.6	108.2	72.2	30.9	346.5	46.9	167.0
	30.6	107.4	72.0	29.9	344.1	47.7	162.7
30	30.5	107.5	70.8	30.1	345.0	47.9	169.2
	32.7	108.5	70.3	31.3	348.5	49.4	169.1
33	32.7	109.6	71.4	29.8	344.5	49.2	171.4
	31.5	110.2	69.7	29.4	344.9	48.1	168.2
RSD/%	2.78	1.01	1.25	2.40	0.46	1.79	1.51

表 8 不同色谱柱条件下的耐用性试验结果

Table 8 Results of durability test under different chromatographic conditions

色谱柱 Chromatographic	峰面积 Peak area(mAU, S)						
	补骨脂素 Psoralen	花椒毒素 Xanthotoxin	欧前胡素 Imperatorin	异欧前胡素 Isoimperatorin	(8E)-1,8-Hepta- -decadiene-4, 6-diyne-3,10-diol	法卡林二醇 Carlin diol	人参炔醇 Panaxynol
Agilent	31.7	108.3	71.2	30.4	346.0	48.1	167.7
SB-C ₁₈	30.8	108.5	70.9	31.1	345.5	48.3	166.9
CNW	30.9	107.5	70.5	29.8	349.5	47.6	164.8
(150mm)	30.6	107.9	71.1	30.0	347.2	48.0	165.4
CNW	30.5	108.1	70.6	30.8	348.1	47.9	167.1
(250mm)	30.4	107.5	70.4	31.0	347.8	48.2	166.8
RSD/%	1.63	0.38	0.48	1.76	0.42	0.52	0.66

2.4 样品的含量测定

取不同批次供试品约 2 g,各 3 份,精密称定,按供试品溶液制备方法制备,吸取供试品溶液 20 μ L,注入高效液相色谱仪,测定峰面积 A,计算各待测组分的含量,结果见表 9。从结果中可以看出香豆素的含量相对偏低,均小于万分之二。而

聚炔类成分的含量相对较高,尤其是人参炔醇;从产地来看,来源于赤峰的北沙参聚炔类成分的含量较高,山东的含量偏低。测定结果表明不同产地的北沙参药材在有效成分含量方面存在较大的差异。

表 9 不同产地北沙参中有效成分的含量测定结果

Table 9 Quantitative determinations of seven medicinal components of radix glehniaes from different areas

药材产地 Medicinal origin	待测物含量 Analyte content/mg \cdot g ⁻¹						
	补骨脂素 Psoralen	花椒毒素 Xanthotoxin	欧前胡素 Imperatorin	异欧前胡素 Isoimperatorin	(8E)-1,8-Hepta- -decadiene-4, 6-diyne-3,10-diol	法卡林二醇 Carlin diol	人参炔醇 Panaxynol
安国	0.00029	0.01531	0.00939	0.00187	0.35539	0.48784	0.87284
安国	0.00044	0.01139	0.00740	0.00201	0.40755	0.46769	0.80028
广东	0.00127	0.01999	0.00782	0.00138	0.35581	0.50774	0.79126
山东	0.00005	0.00095	0.00289	0.00011	0.20161	0.28007	0.41457
山东	0.00005	0.00206	0.00544	0.00079	0.03603	0.10835	0.17311
辽宁	0.00111	0.00749	0.00271	0.00081	0.25827	0.39318	0.69439
河北	0.00042	0.00389	0.01457	0.00197	0.07856	0.38105	0.59198
安国	0.00159	0.00698	0.00504	0.00090	0.06567	0.31114	0.27692
安徽	0.00256	0.01022	0.00907	0.00104	0.04978	0.30701	0.47099
菏泽	0.00066	0.00465	0.01453	0.00243	0.17827	0.39682	0.36961
辽宁	0.00403	0.01599	0.01165	0.00571	0.22657	0.52716	0.83639
莱阳	0.00175	0.00722	0.00243	0.00117	0.08110	0.15143	0.20158
赤峰	0.00068	0.00553	0.00323	0.00075	0.15529	0.44997	0.93655
赤峰	0.00056	0.01087	0.00522	0.00139	0.43312	0.79706	1.48005
赤峰	0.00196	0.02153	0.02079	0.00248	0.48825	0.56512	1.40804

注:表中所示的含量为每克北沙参中含有待测物质的含量(mg/g)。

Note: Contents shown in table mean the content of the substance to be measured in each gram of *Glehnia littoralis*.

3 讨论

(1) 本文采用 HPLC 检测方法,对北沙参中的

香豆素与聚炔类成分进行多组分定量。有效的确定了北沙参药材质量中药效成分的含量,为考察北沙参药材质量的优劣提供了方法依据。此外,本文

创新性的测定了不同产地来源的北沙参药材中药效成分的含量,通过比较得出不同产地的北沙参药材品质差异明显。

(2)参考文献中采用溶剂回流提取法和超声提取法提取香豆素和聚炔类成分,本实验采用超声提取法提取,方法简单快速。在实验过程中,曾采用60%乙醇、75%乙醇、90%乙醇作为提取溶剂进行提取测定。结果表明:75%乙醇提取杂质较少且含量较高,效果最好;提取时间分别选择在15、30、45 min提取。结果表明:45 min即可基本提取完全。此外,本实验还对对照品的稳定性进行了考察,分别在0、2、4、8、24、36 h考察7个对照品的稳定性,同时考察了在超声45 min情况下的稳定性。结果表明:对照品的稳定性良好,可以作为含量测定的指标。

(3)本试验中所使用的北沙参药材样品均采集于全国各地的药材市场,虽然可以客观的反应出市场上北沙参药材的品质优劣,但并不能直接体现出药材本身的有效成分含量。因此,有必要去北沙参的原产地去采集新鲜的药材样品来进行测定研究;此外,据文献记载,市场上流通的北沙参药材经过去皮、煮沸处理,其有效成分很可能遭到了一定程度的破坏。因此,选择没经过去皮、煮沸处理的北

沙参,测定其有效成分含量,并与市场上流通的药材进行比较,从而确定药材处理的最佳途径。

(4)作为北沙参药材的药效成分,对香豆素和聚炔类成分含量的考察日益成为科研工作者的研究重点。目前,中国药典(2010版)中关于北沙参的记录还很浅显,并没有含量测定部分。本试验着重研究了北沙参药材中香豆素和聚炔类成分的含量,为今后完善中国药典中北沙参的含量测定提供了充足的依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M], 2010版1部. 北京:北京医药科技出版社, 2010:92.
- [2] 廖华军, 彭国平. 北沙参挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(7): 104-106.
- [3] 于燕莉, 梁爱君, 黄贤荣. 北沙参产地加工方法与活性成分研究进展[J]. 实用医药杂志, 2013, 30(3): 267-269.
- [4] 李国荣, 章美琴, 张亚凤. 北沙参临床功效拓展[J]. 中医杂志, 2011, 52(2): 174-175.
- [5] 张韶瑜, 孟林, 高文远, 等. 香豆素类化合物生物学活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(6): 410-414.
- [6] 段贤春, 汪永忠, 居靖, 等. 人参炔醇研究进展[J]. 安徽医药, 2008, 12(1): 1-2.