

蛇床子药材特征成分谱的 RP-HPLC 分析

陈丹霞^{1,2}, 周婷婷^{1,2}, 王佳静^{1,2}, 张巧艳¹, 范国荣^{1,2} (1 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2 上海市药物代谢重点实验室, 上海 200433)

摘要 目的: 采用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 法对 10 批不同来源蛇床子药材活性成分进行分离分析, 建立评价其质量的特征成分谱。方法: 采用十八烷基硅烷键合硅胶柱 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-10 mM 醋酸铵水溶液 (用醋酸调节 pH 至 4.0 体积比为 50:50); 紫外检测波长 320 nm。结果: 以安定为内标, 佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的回归方程分别为 $Y = 0.0685X - 0.0522$, $Y = 0.0204X + 0.0232$, $Y = 0.0579X - 0.1058$ 线性范围分别是 4~100 μg/mL, 4~100 μg/mL, 10~200 μg/mL; 平均回收率和 RSD 分别为 98.1%、92.5%、98.4% 和 4.58%、5.73%、4.51%。结论: 本方法简便快速, 回收率及重现性良好, 适用于蛇床子药材中香豆素类化合物的优化分离及佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素的定量分析, 并为蛇床子药材的质量控制与道地性研究提供了简便的方法。

关键词 蛇床子; 佛手柑内酯; 欧前胡素; 蛇床子素; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)06-0430-04

Analysis of characteristic constituents in *Fructus Cnidii* extracts by RP-HPLC

CHEN Dan-xia^{1,2}, ZHOU Ting-ting^{1,2}, WANG Jia-jing^{1,2}, ZHANG Qiao-yan¹, FAN Guo-rong^{1,2} (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective To establish a RP-HPLC method for separation and determination of active constituents in *Fructus Cnidii* from 10 different regions and evaluate the quality of the *Fructus Cnidii*. **Methods** Diamonsil™ C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of ammonium acetate buffer (pH 4.0) / acetonitrile (50/50, v/v) and a flow rate of 1.0 mL/min at the detection wavelength of 320 nm. **Results** The calibration curves were linear in the range of 4~100 μg/mL for bergapten ($r = 0.9998$), 4~100 μg/mL for imperatorin ($r = 0.9996$), 10~200 μg/mL for osthole ($r = 0.9997$), respectively. The average recoveries were 98.1%, 92.5%, 98.4%, with the RSD of 4.58%, 5.73%, 4.51%, respectively. **Conclusion** The method is rapid, simple and accurate, and it can be suitable for the separation and determination of bergapten, imperatorin and osthole in *Fructus Cnidii*, quality control and geobalistic research of *Fructus Cnidii*.

KEY WORDS *Fructus Cnidii*; bergapten; imperatorin; osthole; RP-HPLC

蛇床子为伞形科蛇床属植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cusson 的果实, 具有湿肾壮阳, 燥湿, 杀虫之功效。用于阳痿, 宫冷, 寒湿带下, 湿痹腰痛, 外治外阴湿疹, 妇人阴痒, 滴虫性阴道炎^[1]。蛇床子药材中主要含有三类香豆素成分, 即简单香豆素类, 如蛇床子素; 线型呋喃香豆素类, 如欧前胡素、佛手柑内酯等; 角型呋喃香豆素类, 如哥伦比亚内酯、欧山芹素等^[2]; 其中蛇床子素、佛手柑内酯和欧前胡素是主要的香豆素类成分^[3,4]。

目前文献报道用于评价蛇床子药材质量的分析方法包括薄层色谱法 (TLC)^[5]、高效液相色谱法

(RP-HPLC)^[6,7]、高效液相色谱质谱法 (HPLC-MS)^[8]、气相色谱法 (GC)^[9] 和毛细管电泳法 (CE)^[10] 等。中国药典 2005 版中只是测定了蛇床子药材单一成分蛇床子素的含量, 而文献对于多个香豆素成分含量测定的 RP-HPLC 法常采用梯度洗脱法^[7] 或高效液相色谱-质谱法 (HPLC-MS)^[8], 一般分析时间较长且对仪器要求较高。为了准确评价蛇床子药材的质量, 本文建立了简单、快速的 RP-HPLC 法, 考察了 10 批不同来源蛇床子药材的特征成分谱, 并对其中的活性香豆素类成分佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素进行了定量分析, 为蛇床子药材的质量控制与道地性研究提供了简便的方法。实验结果表明, 本法简便易行, 重现性好。

基金项目: 上海市药物 (中药) 代谢产物研究重点实验室 (20081226)

作者简介: 陈丹霞 (1983-), 女, 硕士研究生。

通讯作者: 范国荣. Tel: (021) 81871260 E-mail: guofan@yahoo.com.cn

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Varian 1200L 高效液相色谱仪 (美国瓦里安公司), 包括 ProStar410 自动进样器, ProStar1210 高压泵, PDA330 二极管阵列检测器, Varian Star 6.42 工作站。SK5200H 超声清洗器 (上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 10 批蛇床子药材均购于当地药材市场或药店, 经第二军医大学药学院张巧艳博士鉴定为正品。佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素、安定购自中国药品生物制品检定所。乙醇、醋酸、醋酸铵 (分析纯) 购自中国医药集团上海化学试剂公司; 乙腈 (色谱纯) 购自德国默克公司; 水为自制去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-10 mM 醋酸铵水溶液 (用醋酸调节 pH 至 4.0) (体积比为 50:50); 流速 1.0 mL/min; 紫外检测波长 320 nm; 进样量为 20 μL。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素标准品各 10 mg 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为蛇床子对照品溶液。

精密称取安定对照品 20 mg 置 10 mL 量瓶中用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀得内标溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取蛇床子药材粉末约 1 g 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 95% 乙醇 20 mL, 密塞, 摇匀, 超声处理 1 h 避光放置 24 h 精密吸取上清液 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 加内标溶液 1 mL, 加流动相定容至刻度, 摇匀, 样品溶液经 0.45 μm 滤膜滤过后, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 系统适用性考察 在“2.1”项的色谱条件下, 精密吸取对照品混合溶液、不添加内标的供试品溶液和添加内标的供试品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图 (图 1), 并根据色谱参数计算系统适用性。佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素的色谱峰与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5 理论塔板数以佛手柑内酯计算不低于 12 000, 以欧前胡素计算不低于 11 000, 以蛇床子素计算不低于 17 000 且拖尾因子均在 0.95~1.05 之间。

2.4 线性关系考察 按“2.2.1”项下操作依次配制 6 个浓度的对照品混合溶液, 在上述色谱条件下进样测定, 以佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的峰面积与安定的峰面积比为纵坐标 (Y), 以相应对照品溶液的浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 得回归方程: 佛

手柑内酯 $Y = 0.0685X - 0.0522$ $r = 0.9997$, 线性范围 4~100 μg/mL; 欧前胡素 $Y = 0.0204X + 0.0232$ $r = 0.9998$, 线性范围 4~100 μg/mL; 蛇床子素 $Y = 0.0579X - 0.1058$ $r = 0.9997$, 线性范围 10~200 μg/mL。

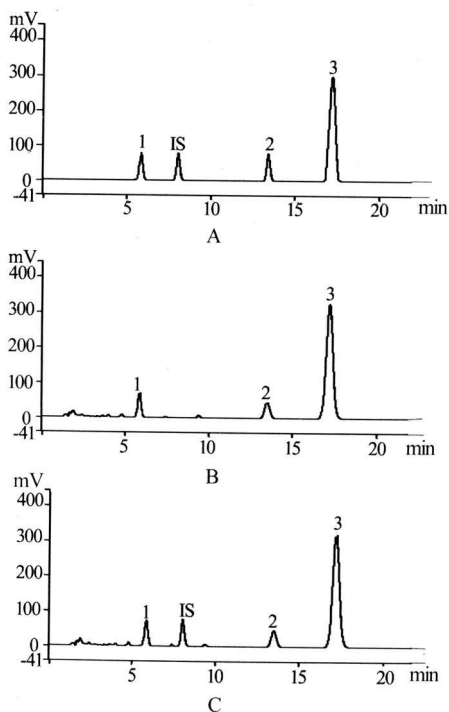


图 1 蛇床子标准对照品及供试品溶液色谱图

A-对照品谱图; B-不添加内标的供试品溶液 (产地: 浙江临安);

C-添加内标的供试品溶液 (产地: 浙江临安)

1-佛手柑内酯; 2-欧前胡素; 3-蛇床子素; IS-安定

2.5 精密度实验 精密量取“2.2.1”项下的对照品溶液和内标溶液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释, 定容后摇匀, 分别制成含佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素浓度为 100、100 和 200 μg/mL (高浓度), 40、40 和 80 μg/mL (中浓度) 及 8 和 20 μg/mL (低浓度) 的溶液, 于同一日内和不同日间 (6 d 内每日一次) 连续进样 6 次, 每次进样 20 μL。按佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素与内标物的峰面积比的相对标准偏差 (RSD) 考察日内精密度和日间精密度, 结果 3 种活性香豆素类成分的日内精密度 RSD 分别为 3.82%、2.43% 和 1.25%, 日间精密度 RSD 分别为 4.50%、3.78% 和 1.89%, 表明分析方法的日内及日间精密度均达到要求。

2.6 重复性实验 精密称取蛇床子药材 (产地: 浙江临安) 6 份, 每份 1 g 按“2.2.2”项下操作, 在上述色谱条件下进行分离分析, 测定其中佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的含量。蛇床子药材分别测定 6

次,结果佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素含量的RSD分别为2.96%、4.53%、3.81%,表明分析方法的重现性良好。

2.7 稳定性实验 取“2.2.2”项下供试品溶液(产地:浙江临安),于室温避光放置,分别于0.2、6、12、24 h后在上述色谱条件下进样分析,测定其中佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素与内标物的峰面积比,进行稳定性考察,结果3种香豆素类成分的RSD依次为2.54%、2.56%、1.98%,表明蛇床子药材中香豆素类成分在24 h内供试品溶液稳定性良好。

2.8 加样回收率实验 取已知含量的临安产蛇床子药材样品1 g,精密加入适量对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下测定,计算加样回收率。结果见表1,其中佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素的加样回收率分别为98.1%、92.5%、98.4%,RSD依次为4.58%、5.73%、4.51%。

表1 浙江临安产的蛇床子药材加样回收率测定结果(n=6)

香豆素	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	RSD(%)
佛手柑内酯	3.15	3.22	6.25±0.25	98.12	4.58
欧前胡素	5.33	5.51	10.03±0.51	92.52	5.73
蛇床子素	14.91	14.51	28.95±0.87	98.41	4.51

2.9 样品测定 按照上述方法建立了评价蛇床子药材的特征成分谱(图2),并分别对10批不同来源的蛇床子药材中的蛇床子素、欧前胡素、佛手柑内酯进行定量分析,结果见表2。

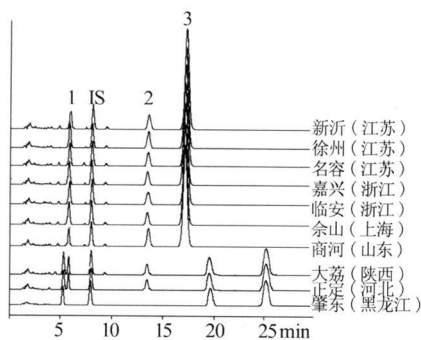


图2 10批蛇床子药材特征成分色谱图
1-佛手柑内酯; 2-欧前胡素; 3-蛇床子素; IS-安定

3 讨论

蛇床子广泛分布于我国大部分地区,陶弘景在《名医别录》里首次提到了蛇床子的产地——临淄。唐《本草图经》记载:蛇床子生临淄川谷及田野,今

处处有之,而扬州、襄州者胜。古人认为产于江苏扬州和湖北襄州一带的蛇床子质量好,并以之为道地药材^[11]。从表2中可以看出,不同来源蛇床子药材中线型呋喃香豆素类化学成分佛手柑内酯、欧前胡素和简单香豆素类化学成分蛇床子素的含量不同,来源为浙江、上海、江苏及山东等批次蛇床子药材中这三种活性香豆素类成分含量较高,特别是蛇床子素的含量最高;来源陕西、河北、辽宁等批次的蛇床子药材中这三种活性香豆素类成分含量较低;来源于黑龙江的蛇床子药材中则不含这三种活性香豆素类成分。

表2 不同来源蛇床子药材含量测定结果(n=3)

产地	香豆素成分含量(mg/g)		
	佛手柑内酯	欧前胡素	蛇床子素
新沂(江苏)	2.35±0.12	6.38±0.25	11.48±0.24
徐州(江苏)	3.78±0.25	7.45±0.22	16.77±0.78
句容(江苏)	2.98±0.14	6.12±0.24	17.23±0.85
嘉兴(浙江)	3.12±0.15	5.84±0.51	16.59±0.76
临安(浙江)	3.15±0.14	5.33±0.20	14.91±0.62
余山(上海)	3.25±0.10	5.32±0.32	16.92±0.48
商河(山东)	2.58±0.23	7.46±0.61	15.33±0.68
大荔(陕西)	1.77±0.08	3.45±0.45	ND
正定(河北)	1.49±0.10	4.13±0.13	ND
肇东(黑龙江)	ND	ND	ND

ND(not detected),未检测。

因地理位置和生态环境的不同,目前蛇床子药材种内的化学成分发生了较大的变异,药理作用也存在差异。而中国药典2005版收载的蛇床子药材没有明确的产地来源,所以需要对不同产地的蛇床子药材进行质量控制。本研究建立了简单、快速的RPHPLC法,从蛇床子药材特征成分谱的定性定量分析角度佐证了药材来源的道地性。同时,从中药材产地、成分与药效的相关性考虑,建议新编中国药典2010版在深入研究的基础上,对收载的蛇床子药材的来源与质量标准作出相应的修正。

参考文献:

- [1] 中国药典.一部[S].2005:219.
- [2] 蔡金娜,张亮,王峥涛,等.蛇床果实中香豆素类成分的变异及其规律[J].药学学报,1999,34(10):767.
- [3] Zhang Q, Qin L, He W, et al. Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity [J]. *Planta Med*, 2007, 73(1): 13.
- [4] Liu R, Feng L, Sun A, Kong L. Preparative isolation and purification of coumarins from *Cnidium monnieri* (L.) Cusson by high-speed counter current chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1055(1-2): 71.
- [5] 孙文基,沙振方.蛇床子中蛇床子素和欧前胡素的荧光薄层

扫描法测定 [J]. 药学学报, 1990 25 (7): 530.

[6] 吴 波, 马长清, 张寒俊. 反相高效液相色谱法测定蛇床子中蛇床子素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005 25 (7): 843.

[7] 翁德新, 李天傲. 蛇床子中 5 种成分的 HPLC 测定法 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (8): 1883.

[8] 杨 宪, 杨水平, 张 雪. 蛇床子药材的高效液相色谱指纹图谱 [J]. 药学学报, 2007, 42 (8): 877

[9] 蔡金娜, 徐国钧, 金蓉鸾, 等. 中药蛇床子中香豆素类成分的

毛细管气相色谱分析 [J]. 中国药科大学学报, 1991 22 (6): 345.

[10] 岳美娥, 牛 翔, 张书圣. 蛇床子及其制剂中香豆素类活性成分的胶束电动毛细管色谱含量测定 [J]. 分析测试技术与仪器, 2007, 13 (4): 272

[11] 秦路平, 张卫东, 张汉明. 蛇床子生物学及其应用 [M]. 成都: 成都科技大学出版社, 1996 4

收稿日期: 2009-02-26

(上接第 413 页)

的决策则依靠于数据的连续分析和对信息及信息背后知识的获取。数据挖掘是认知背后的科学和隐藏的模式, 关联和顺序的发现。相比商业等其他领域, 数据挖掘技术在卫生领域, 如药物利用合理性方面的应用还不普遍。医学研究的数字化增强了卫生人员获取卫生信息的能力, 伴随着数据仓库技术和挖掘技术的发展, 数据挖掘这一融合了数据库、人工智能、及其学习和传统统计学的方法, 在以患者为中心的医学信息发展过程中, 必将显现出巨大的应用潜力。

参考文献:

[1] 汤 韧, 易 涛, 张 宜. 信息技术在合理用药中的应用 [J]. 医药导报, 2005 24 (9): 853.

[2] Villmann T. Neural maps for faithful data modelling in medicine: state-of-the-art and exemplary applications [J]. Neurocomputing 2002 48 (1-4), 229.

[3] 于长春, 贺 佳, 范思昌, 等. 数据挖掘技术在医学领域中的应用 [J]. 第二军医大学学报, 2003 24 (11): 1250.

[4] 卢启程, 邹 平. 数据挖掘的研究与应用进展 [J]. 昆明理工大学学报, 2002 27 (5): 62.

[5] Fayyad UM, Piatetsky-Shapiro G, Smyth P. From data mining to knowledge discovery in databases [J]. AI Magazine 1996, 17 (3): 37.

[6] Han J, Kamber M. Data mining concepts and techniques [M]. Morgan Kaufman, 2001. Zuru ck.

[7] 张承江主编. 医学数据仓库与数据挖掘 [M]. 北京: 中国中医药出版社 (第一版), 2008 北京.

[8] 屈 建. 医院药学中的合理用药 [J]. 药学服务与研究, 2004, 4 (1): 5.

[9] 靳淑敏, 张翠肖, 孙珊珊. 决策树技术及其在药物治疗中的应用 [J]. 科技情报开发与经济, 2008 18 (22): 164.

[10] Chou HC, Cheng CH, Chang JR. Extracting drug utilization knowledge using self organizing map and rough set theory [J]. Expert Systems with Applications 2007 33: 499.

[11] Patricia BC. Choice of antibiotic in open heart surgery [J]. Intelligent Decision Technologies 2007, 1: 63.

[12] Fang PC, Yen YK, Yu CC, et al. Frequency and pattern of Chinese herbal medicine prescriptions for chronic hepatitis in Taiwan [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2008, 117: 84.

[13] Shu CH, Jung NL, Chuan FL, et al. The prescribing of Chinese herbal products in Taiwan: a cross-sectional analysis of the national health insurance reimbursement database [J]. Pharmacoeconomics and Drug Safety, 2008 17: 609.

[14] Emanuel R, Elisabetta P, Chlavra Z, et al. Exposure to antibacterial agents with QT liability in 14 European countries: trends over an 8-year period [J]. British Journal of Clinical Pharmacology 2008, 1: 88.

[15] Monnet DL, Lopez JM, Campillos P, et al. Making sense of antimicrobial use and resistance surveillance data: application of ARFMA and transfer function models [J]. Clin Microbiol Infect 2001; 7 (Suppl 5): 29.

[16] Fridkin SK, Lavton R, Edwards JR, et al. Monitoring antimicrobial use and resistance: comparison with a national benchmark on reducing vancomycin use and vancomycin resistant enterococci [J]. Emerg Infect Dis 2002, 8 (7): 702.

[17] Gordon D, Davila K, Josh P, et al. Linking laboratory and pharmacy: opportunities for reducing errors and improving care [J]. Arch Intern Med 2003 163: 893.

[18] Manfred H, David M, Charles M, et al. The role of data mining in pharmacovigilance [J]. Expert Opinion On Drug Safety 2005, 4 (5): 929.

[19] 傅 翔, 栾智鹏, 陈盛新. 用药安全 [J]. 药学实践杂志, 2009 27 (3): 236.

[20] Hemant MP, Paul SC, Cathy A, et al. Retrospective detection of potential medication errors involving drugs with similar names [J]. J Am Pharm Assoc 2005 45: 616.

[21] Benjamin H, David WB. Computerized data mining for adverse drug events in an outpatient setting [EB/OL]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2232160/?page=1>.

[22] Martin S. Reducing therapeutic duplication: successful at the dispensing level [EB/OL]. <http://www.managedcaremag.com/archives/0808/0808medmgmt.html>

[23] 沈小庆, 盛炳义, 方 曙, 等. 数据挖掘技术在医院药学中的应用 [J]. 中华医院管理杂志, 2006, 22 (8): 549.

[24] Michael S, Taiki S, Hua CS, et al. Case study: how to apply data mining techniques in a health care data warehouse [J]. Journal of Health Care Information Management 2001, 15 (2): 155.

[25] Last M, Carel R, Barak D. Utilization of data mining techniques for evaluation of patterns of ambulatory patients in a large health maintenance organization [EB/OL]. <http://portal.am.org/citation.cfm?id=1336075>

收稿日期: 2009-11-13