

HPLC同时测定增液汤中多种指标性成分的含量

杜中英, 戚进, 余伯阳*

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

[摘要] **目的:** 建立同时测定增液汤中5-羟糠醛、毛蕊花糖苷、安格洛昔C、哈帕俄昔、肉桂酸、甲基麦冬黄烷酮A和甲基麦冬黄烷酮B 7种不同类型成分含量的方法。**方法:** 按照传统经方制备增液汤, 采用HPLC方法, 色谱柱为Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动乙腈-0.02% 甲酸水梯度洗脱, 流速1.0 mL·min⁻¹, 柱温30℃, 检测波长296 nm。**结果:** 5-羟糠醛、毛蕊花糖苷、安格洛昔C、哈帕俄昔、肉桂酸、甲基麦冬黄烷酮A、甲基麦冬黄烷酮B线性范围分别为4.12~165.00, 3.98~159.20, 6.97~278.80, 7.25~290.00, 4.29~171.60, 0.07~2.80, 0.12~5.00 mg·L⁻¹, 相关系数(*r*)均>0.999 6; 平均加样回收率分别为97.42%, 96.97%, 97.58%, 96.94%, 99.16%, 99.46%, 100.33%。**结论:** 该方法操作简便、结果准确可靠, 具有较好的重复性和稳定性, 为提高当前增液汤的质控标准提供了研究方法和数据参考。

[关键词] 增液汤; 5-羟糠醛; 毛蕊花糖苷; 安格洛昔C; 哈帕俄昔; 肉桂酸; 甲基麦冬黄烷酮A; 甲基麦冬黄烷酮B

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0076-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100076

Simultaneous Determination of Seven Components in Zengye Decoction by HPLC

DU Zhong-ying, QI Jin, YU Bo-ying*

(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine,
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, china)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of 5-HMF, harpagoside, acteoside, angoroside C, cinnamic acid, methylophiopogonanone A and methylophiopogonanone B in Zengye Decoction. **Method:** A Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used; The mobile phase was acetonitrile-0.02% formic acid in gradient elution at flow rate 1.0 mL·min⁻¹ detected at 296 nm; The column temperature was maintained at 30℃. **Result:** The linear range (mg·L) of 5-HMF, acteoside, angoroside C, harpagoside, cinnamic acid, methylophiopogonanone A and methylophiopogonanone B was 4.12-165.00, 3.98-

[收稿日期] 20131125(018)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(30901956)

[第一作者] 杜中英, 硕士生, 从事中药质量标准研究, Tel: 15051867885, E-mail: duzhongying1017@126.com

[通讯作者] * 余伯阳, 教授, 博士生导师, 从事生药质量控制研究 Tel: 25-86185157, E-mail: boyangyu59@163.com

- [9] 李莉, 刘志华, 秦民坚. HPLC法同时测定千斤拔属植物7种黄酮的含量[J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(5): 54.
- [10] 杨启明, 张春风, 杨中林. HPLC测定不同产地蔓性千斤拔中染料木苷和染料木素的含量[J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(8): 744.
- [11] 刘军民, 安冉, 翟明. 鸡血藤商品药材质量评析[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(5): 573.
- [12] 张火旺. HPLC测定鸡血藤片中原儿茶酸的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(2): 273.
- [13] 边宝林, 王宏洁, 司南. 鸡血藤药材中表儿茶素的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(6): 31.
- [责任编辑 顾雪竹]

159.20, 6.97-278.80, 7.25-290.00, 4.29-171.60, 0.07-2.80, 0.12-5.00. The average recoveries were 97.42%, 96.97%, 97.58%, 96.94%, 99.16%, 99.46% and 100.33% respectively. **Conclusion:** The developed method is convenient, reliable and accurate for the quality control of Zengye Decoction.

[**Key words**] Zengye decoction; 5-HMF; harpagoside; acteoside; angoroside C; cinnamic acid; methylophiopogonanone A; methylophiopogonanone B

增液汤出自清代著名温病学家吴鞠通《温病条辨》,由玄参、麦冬、地黄3味药组成,药味精炼,配伍严谨,后世诸多方剂都由其化裁而来,故被认为是温病养阴法的基本方^[1]。现代药理研究结果表明,增液汤具有促进肠蠕动及排便^[2]、降血糖^[3]、缓解干燥综合征^[4]、抗心室重构^[5]、抗炎^[6]等作用。方中玄参为君药,具有凉血滋阴、泻火解毒之功效,其中哈帕俄苷、安格洛苷C、肉桂酸、5-羟糠醛为其主要的活性成分^[7];麦冬为臣药,具有养阴润肺,益胃生津之功,其主要化学成分有高异黄酮和甾体皂苷等,高异黄酮是其中一类主要有效成分,而甲基麦冬黄烷酮A和甲基麦冬黄烷酮B是麦冬中含量相对较高的高异黄酮类成分^[8];地黄清热凉血,养阴生津,以毛蕊花糖苷为代表的苯乙醇苷类化合物是其主要的活性成分^[9]。

中药汤剂是中药临床的主要剂型,然而由于中药材来源广泛、多变,化学成分复杂等因素,对于中药汤剂的质量控制仍然面临众多挑战,这也阻碍了其市场的推广。当前,由单指标成分到多指标成分转变的质控模式在一定程度上可以更加全面地把握中药汤剂的质量。然而,目前对增液汤的质量控制仅在于对哈帕俄苷进行含量测定^[10],而未有对其多指标成分含量测定方法的报道。因此,本研究拟建立新的HPLC测定法,可以同时实现增液汤中5-羟糠醛、毛蕊花糖苷、安格洛苷C、哈帕俄苷、肉桂酸、甲基麦冬黄烷酮A和甲基麦冬黄烷酮B7种不同类型成分的含量测定^[9-14],为提高增液汤相关产品的质量评价提供一定的科学数据和方法参考。

1 材料

Shimadzu LC-2010C型HPLC色谱仪(包括Shimadzu四元泵,自动进样器、二极管阵列检测器DAD以及LC solution数据工作站),AE240型1/10万电子天平(METTLER)。

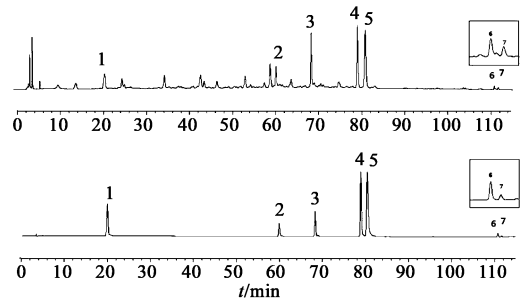
色谱纯乙腈(Tedia),纯净水(Millipore),甲醇(江苏汉邦科技有限公司),其他试剂均为国产分析纯。5-羟甲基糠醛、哈帕俄苷、毛蕊花糖苷、安格洛苷C、肉桂酸、甲基麦冬黄烷酮A、甲基麦冬黄烷酮B均由实验室分离制备,经核磁和质谱鉴定,HPLC

面积归一法测定,纯度均>98%。

玄参(南京同仁堂)、地黄(南京同仁堂)、麦冬(南京先声药店),经中国药科大学戚进副教授鉴定分别为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl 的干燥根,玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的干燥块根,百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicas* (Thunb.) Ker-Gawl 的干燥的块根。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.02%甲酸水(B),梯度洗脱(0~10 min, 2% A; 10~20 min, 2%~7% A; 20~45 min, 7%~16% A; 45~60 min, 16%~22% A; 60~85 min, 22%~34% A; 85~115 min, 34%~80% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 296 nm,进样量 20 μL。理论塔板数均不低于 3 000,见图 1。



A. 对照品; B. 供试品;

1. 5-羟糠醛; 2. 毛蕊花糖苷; 3. 安格洛苷 C; 4. 哈帕俄苷; 5. 肉桂酸; 6. 甲基麦冬黄烷酮 A; 7. 甲基麦冬黄烷酮 B

图 1 增液汤 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取 5-羟糠醛、毛蕊花糖苷、安格洛苷 C、哈帕俄苷、肉桂酸、甲基麦冬黄烷酮 A 和甲基麦冬黄烷酮 B 适量,加甲醇配制成每 1 mL 分别含 165.00, 159.20, 278.80, 290.00, 171.60, 2.80, 5.00 μg 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 按照传统处方比例称取各味药材(玄参 30 g,地黄 24 g,麦冬 24 g),分别加入 10 倍,8 倍,6 倍量的水,先浸泡 1 h,煎煮 3 次,每次 1 h,趁热过滤,合并滤液,浓缩至 150 mL,作为复

方水煎液。精密吸取复方水煎液 1 mL,用 4 倍量水饱和和正丁醇萃取 4 次,合并萃取液,蒸干,残渣用甲醇溶解并定容至 2 mL 量瓶中,0.45 μm 滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 线性关系的考察 分别精密吸取 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mL 混合对照品储备溶液(见 2.2 项),分置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制成系列混合对照品溶液。依 2.1 项色谱条件测定,记录峰面积,以对照品的质量浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)为横坐标,峰面积积分为纵坐标,进行线性回归。如表 1 所示,增液汤中 7 种不同类型的化合物在各自的检测浓度范围内均呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 20 μL,按 2.1 项下色谱条件测定,连续进样 6 次,计算各成分峰面积的 RSD 作为日内精密度;每日重复测定 2 次,连续 3 日,计算 RSD 作为日间精密度。结果见

表 2,表明仪器精密度较好。

2.6 重复性试验 按 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算 7 种成分峰面积的 RSD,结果见表 2,表明此法具有较好的重复性。

2.7 稳定性试验 按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 24 h,按 2.1 项下色谱条件测定,计算各成分峰面积的 RSD。见表 2。

2.8 加样回收率试验 精密吸取已知含量的复方水煎液 1 mL,共 9 份,按样品含量的 80%, 100%, 120% 加入对照品溶液,按 2.3 项下供试品溶液制备方法平行操作 3 份,按 2.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率。见表 2。

2.9 样品含量测定 按 2.3 项下方法平行制备 3 批供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,采用外标两点法计算各成分含量,测定结果见表 3。

表 1 增液汤中 7 种不同类型成分线性关系

对照品	回归方程	相关系数 ($n = 6$)	线性范围 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	定量限 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	检测限 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
5-HMF	$Y = 69\ 204.56X + 19\ 464.09$	0.999 6	4.12 ~ 165.00	0.056	0.001
毛蕊花糖苷	$Y = 21\ 314.31X - 31\ 953.44$	0.999 9	3.98 ~ 159.20	0.185	1.525
安格洛昔 C	$Y = 18\ 235.88X - 14\ 270.70$	1.000 0	6.97 ~ 278.80	0.420	0.813
哈帕俄昔	$Y = 31\ 091.16X - 8\ 293.15$	1.000 0	7.25 ~ 290.00	0.305	0.284
肉桂酸	$Y = 87\ 567.93X - 5\ 419.67$	0.999 8	4.29 ~ 171.60	0.151	0.068
甲基麦冬黄烷酮 A	$Y = 117\ 549.29X - 1\ 090.45$	0.999 9	0.07 ~ 2.80	0.004	0.014
甲基麦冬黄烷酮 B	$Y = 126\ 382.26X - 418.02$	0.999 6	0.12 ~ 5.00	0.002	0.008

表 2 增液汤中各成分的精密度、稳定性、重复性和回收率试验

组分	精密度		重复性($n = 6$)	稳定性	回收率($n = 9$)	
	日内($n = 6$)	日间($n = 3$)			平均回收率	RSD
	RSD	RSD	RSD	RSD		
5-HMF	0.05	0.41	4.77	3.96	97.42	1.32
毛蕊花糖苷	1.31	1.48	4.48	4.25	96.97	1.81
安格洛昔 C	0.11	0.27	2.20	1.10	97.58	1.70
哈帕俄昔	0.21	0.45	5.12	1.06	96.94	3.19
肉桂酸	3.24	1.83	3.48	1.95	99.16	1.37
甲基麦冬黄烷酮 A	0.12	1.06	5.46	3.36	99.46	1.90
甲基麦冬黄烷酮 B	1.31	2.79	5.35	2.72	100.33	2.86

3 讨论

本研究分别采用不同比例的乙腈-水、乙腈-0.02% 甲酸水及乙腈-0.03 磷酸水作为流动相对增液汤提取物进行梯度洗脱,结果表明,当选择乙腈-

0.02% 甲酸水时,各色谱峰分离度较好。实验采用 PDA 检测器进行全扫描,比较不同波长的吸收情况发现 296 nm 波长处各化合物的吸收峰型良好,基质背景较低,因此选择 296 nm 作为检测波长定量分析

表3 增液汤中多种主要成分的含量测定($n=3$)mg·g⁻¹

组分	5-HMF	毛蕊花糖苷	安格洛昔 C	哈帕俄昔	肉桂酸	甲基麦冬黄烷酮 A	甲基麦冬黄烷酮 B
1	0.056 7	0.172 4	0.417 1	0.292 4	0.147 9	0.003 8	0.002 2
2	0.056 4	0.185 4	0.420 5	0.305 2	0.151 1	0.003 4	0.001 7
3	0.056 4	0.178 6	0.418 5	0.297 3	0.149 2	0.004 1	0.002 1
平均值	0.056 5	0.178 8	0.418 7	0.298 3	0.149 4	0.003 8	0.002 0

7种不同类型组分。

本研究按照传统方法制备增液汤水煎液,但由于增液汤水提物中含有大量的糖类成分,若不经过处理直接进样,会导致降低柱效。为此本实验考察了甲醇沉淀法、固相萃取法和水饱和正丁醇萃取法,结果显示甲醇沉淀法不能有效的除去糖的干扰;固相萃取法虽然能除去糖的干扰,但成分有一定损失;水饱和正丁醇可以除去杂质干扰,且成分损失最少。因此本实验选用水饱和正丁醇对水煎液进行处理。

本研究首次实现在同一色谱条件下对增液汤中环烯醚萜苷、苯乙醇苷、有机酸、高异黄酮、醛类等5类化合物的定量分析,涵盖了增液汤中各种主要有效成分,能够全面代表增液汤质量;实现了增液汤的质控模式由单一成分鉴别向多指标成分分析的转变,为提高增液汤的质量控制水平提供了数据参考和研究方法。

[参考文献]

- [1] 王礼凤,彭玉兰,汪红兵. 增液汤在《温病条例》方中的配伍运用特点探讨[J]. 江西中医药, 2005, 36(265):55.
- [2] 马伯艳,李冀,肖洪彬. 《温病条辨》增液汤治疗津亏液竭便秘的实验研究[J]. 江苏中医药, 2007, 39(5):57.
- [3] 杨帆,戚进,朱丹妮. 增液汤降糖作用实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8):98.
- [4] 周洪伟,孙丽英,吴晓丹,等. 增液汤对干燥综合征模型鼠治疗作用的观察[J]. 中医药信息, 2008, 25(2):66.

- [5] 王樱,陈长勋,杜军,等. 增液汤和四逆汤抗心室重构的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5):58.
- [6] 苏简单,王梦,钱红美. 增液汤药理作用研究[J]. 中医药研究, 1995, 4, 49.
- [7] 谢小艳,夏春森. 中药玄参的化学成分及药理研究进展[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(5):121.
- [8] 肖培根. 新编中药志. 第1卷[M]. 北京:化学工业出版社, 2002:482.
- [9] 余进,谢媛媛,王义明,等. 反相高效液相色谱法同时测定地黄中5种成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(1):73.
- [10] 王震,王岳钧,袁淑斐,等. RP-HPLC法测定增液颗粒中哈帕俄昔的含量[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(4):72.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010.
- [12] Cao G, Cong X D, Cai H, et. al. Simultaneous quantitation of eight active components in crude and processed Radix Scrophulariae extracts by high performance liquid chromatography with diode array detector[J]. Chin J Nat Med, 2012, 10(3):213.
- [13] 杨宪,杨水平,张雪,等. HPLC-UV-ELSD同时测定玄参中5种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(1):68.
- [14] 曾品涛,周慧,郑一敏,等. HPLC同时测定麦冬中3种高异黄酮含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(1):71.

[责任编辑 顾雪竹]