

HPLC 同时测定补阳还五汤提取液中 4 种成分的含量

王玓, 王利胜*, 巴文强, 吴俊洪, 卢映, 黄雨威
(广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] **目的:**建立 HPLC 同时测定补阳还五汤提取液中苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸含量的方法。**方法:**采用反相高效液相法,依利特 Hyperil ODS2 色谱柱,流动相乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长分别为 210(苦杏仁苷),230(芍药苷),250(毛蕊异黄酮葡萄糖苷),315 nm(阿魏酸)。**结果:**苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸线性范围分别为 1.080~10.80,1.735~17.35,0.242~2.42,0.106~1.06 μg,相关系数分别为 0.999 8,0.999 8,0.999 5,0.999 6;平均加样回收率分别为 98.39%,98.89%,97.25%,95.39%,RSD 分别为 1.9%,2.0%,3.3%,2.6%。**结论:**该建立的高效液相色谱法方便、简便、准确,适用于同时对补阳还五汤提取液中苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷及阿魏酸的含量测定。

[关键词] 补阳还五汤提取液;苦杏仁苷;芍药苷;毛蕊异黄酮葡萄糖苷;阿魏酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)09-0046-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015090046

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150317.1054.014.html>

[网络出版时间] 2015-03-17 10:54

Simultaneous Determination of Four Components in Buyang Huanwu Tang Extract by HPLC

WANG Ding, WANG Li-sheng*, BA Wen-qiang, WU Jun-hong, LU Ying, HUANG Yu-wei (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** An HPLC method for simultaneous determination of four components in Buyang Huanwu Tang extract was established. **Method:** The Buyang Huanwu Tang extract was separated on an Hyperil ODS2 column by gradient elution using acetonitrile (A)-0.1% phosphate (B) as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelengths were 210 (amygdalin), 230 (paeoniflorin), 250 (campanulin), 315 nm (ferulic acid). **Result:** The linear ranges of amygdalin, paeoniflorin, campanulin and ferulic acid were 1.080-10.80 ($r=0.999\ 8$), 1.735-17.35 ($r=0.999\ 8$), 0.242-2.42 ($r=0.999\ 5$), 0.106-1.06 ($r=0.999\ 6$) μg, respectively; the average recovery was 98.39% (RSD 1.9%), 98.89% (RSD 2.0%), 97.25% (RSD 3.3%), 95.39% (RSD 2.6%). **Conclusion:** The method is rapid and accurate for simultaneous determination of amygdalin, paeoniflorin, campanulin and ferulic acid in Buyang Huanwu Tang extract.

[Key words] Buyang Huanwu Tang extract; amygdalin; paeoniflorin; campanulin; ferulic acid

补阳还五汤系清代王清任《医林改错·卷下·瘫痿论》首载,处方组成为黄芪 60 g,当归 9 g,赤芍 9 g,地龙 9 g,川芎 6 g,桃仁 9 g,红花 9 g,是临床上常用于治疗缺血性脑中风的良方。现代药理研究^[1-3]发现,补阳还五汤可预防大鼠脑缺血再灌注

引起的神经细胞谷氨酸受体 2 表达的减少,且在缺血再灌注的不同时期,可通过降低 L 型 Ca²⁺ 通道开放概率或缩短其开放时间,以减少 Ca²⁺ 内流,从而预防和保护脑缺血神经元。目前,有研究者^[4-9]对黄芪甲苷、芒柄花素、芍药苷等成分分别进行了含量

[收稿日期] 20140904(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373973);广东省社会发展领域科技计划项目(2013B032500015)

[第一作者] 王玓,在读硕士,从事药物制剂新剂型与新技术研究,Tel:13929541248,E-mail:wangxding@126.com

[通讯作者] *王利胜,教授,博士生导师,从事药物制剂新剂型与新技术研究,E-mail:wli68@126.com

测定,并对苦杏仁苷在补阳还五汤中的存在形式进行了研究,张星等^[10]建立了补阳还五汤质量标准。但同时测定苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷及阿魏酸含量的研究尚未见报道,本文建立了同时测定上述几种成分含量的液相方法,为更全面的补阳还五汤质量控制提供试验依据。

1 材料

SKM型数显恒温电热套(山东鄞城光明仪器有限公司),RE-52B型旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂),戴安液相色谱仪(包括P680型二元泵,ASI-100型自动进样器,DAD-3000型检测器,变色龙色谱工作站,美国戴安公司),AUW120D型1/10万电子天平(日本岛津公司),移液枪(赛默飞世尔科技有限公司)。

芍药苷、阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110736-201337,110773-200611),苦杏仁苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号分别为121028,130226),乙腈(迪马科技有限公司,色谱纯),纯水为广州中医药大学自制,其余试剂均为分析纯;药材均购于广州致信中药饮片有限公司,经由广州中医药大学中药学院张丹雁教授鉴定为正品,黄芪为豆科黄芪属蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根;当归为伞形科当归 *Angelica sinensis* 的干燥根;赤芍为毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根;地龙为钜引科参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* 的干燥体;川芎为伞形科川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎;桃仁为蔷薇科桃 *Prunus persica* 的干燥成熟种子;红花为菊科红花 *Carthamus tinctorius* 的干燥花。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用依利特 Hyperil ODS2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈(A)-0.1%磷酸水(B)溶液为流动相,洗脱梯度(0 ~ 20 min, 8% ~ 9.5% A; 20 ~ 30 min, 9.5% ~ 10% A; 30 ~ 35 min, 10% ~ 15% A; 35 ~ 40 min, 15% ~ 16% A; 40 ~ 60 min, 16% ~ 18% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长苦杏仁苷 210 nm,芍药苷 230 nm,毛蕊异黄酮葡萄糖苷 250 nm,阿魏酸 315 nm,柱温室温,进样量 10 μL,检测时间 60 min。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取苦杏仁苷 10.80 mg,芍药苷 17.35 mg,毛蕊异黄酮葡萄糖苷 2.42 mg 及阿魏酸 1.06 mg 于 2 mL 量瓶中,甲醇定容,即得混合对照品母液,备用。

2.3 供试品溶液的制备 称取补阳还五汤处方药材(黄芪 60 g,当归 9 g,赤芍 9 g,地龙 9 g,川芎 6 g,桃仁 9 g,红花 9 g)于 1 000 mL 圆底烧瓶中,加入 8 倍量纯水,浸泡 30 min,回流提取 2 次,每次 1 h,合并提取液,纱布过滤,浓缩至 75 mL,加无水乙醇至含醇体积分数达 85%,静置 24 h,抽滤,滤液回收乙醇至无醇味,浓缩液用纯水定容至 100 mL,即得补阳还五汤提取原液。吸取补阳还五汤提取原液 5 mL,纯水稀释定容至 10 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

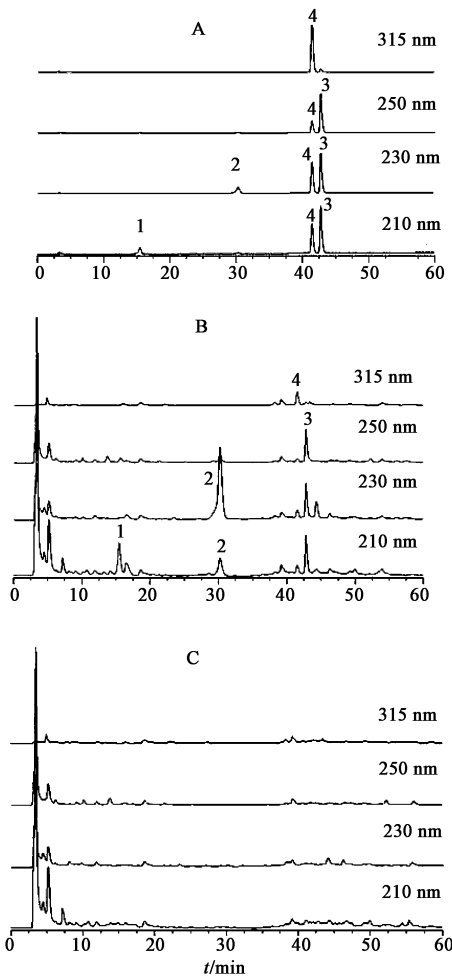
2.4 阴性样品溶液的制备 按照处方量称取除黄芪、赤芍、桃仁、当归、川芎之外的药材,按照 2.3 项下方法制备,即得。

2.5 专属性试验 取混合对照品溶液,供试品溶液以及阴性对照溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,对照品及样品中苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸的色谱峰分离良好,阴性样品中指标成分相应保留时间均无吸收峰,表明该方法专属性良好。见图 1。

2.6 线性关系考察 分别精密吸取 2.2 项下混合对照品母液 40, 120, 240, 320, 400 μL,用甲醇定容至 2 mL,得到系列浓度的混合对照品溶液,进样 10 μL 分析,记录峰面积。以峰面积 Y 对进样量 X (μg) 进行线性回归,得苦杏仁苷的回归方程为 $Y = 9.1887X + 0.9182$ ($r = 0.9998$),线性范围 1.080 ~ 10.80 μg;芍药苷 $Y = 19.8839X + 2.4768$ ($r = 0.9998$),线性范围 1.735 ~ 17.35 μg;毛蕊异黄酮葡萄糖苷 $Y = 42.9810X + 1.1349$ ($r = 0.9995$),线性范围 0.242 ~ 2.42 μg;阿魏酸 $Y = 38.1553X + 3.6043$ ($r = 0.9996$),线性范围 0.106 ~ 1.06 μg。表明苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸在一定范围内线性良好。

2.7 精密度试验 精密吸取苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸(质量浓度分别为 0.648, 1.041, 0.1452, 0.0636 g·L⁻¹)对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果,苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.8%, 1.2%, 0.5%,表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液 10 μL,按 2.1 项下色谱条件下分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 进样,记录峰面积。结果,苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 0.5%, 0.9%, 1.6%, 1.4%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 苦杏仁苷; 2. 芍药苷; 3. 毛蕊异黄酮苷; 4. 阿魏酸

图 1 补阳还五汤提取液的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Buyang Huanwu Tang extract

2.9 重复性试验 按照 2.3 项下方法制备 6 个供试品溶液, 分别进样 10 μL , 记录峰面积, 结果苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.9%, 1.0%, 1.6%, 表明该方法的重复性良好。

2.10 加样回收率试验 取 2.3 项下补阳还五汤提取原液 0.5 mL, 共 6 份, 分别加入 120 μL 已知浓度的混合对照品母液(含有苦杏仁苷 5.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 芍药苷 8.675 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 1.21 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 阿魏酸 0.53 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 加纯水定容至 2 mL, 进样分析, 结果苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸平均回收率分别为 98.39%, 98.89%, 97.25%, 95.39%, RSD 分别为 1.9%, 2.0%, 3.3%, 2.6%, 见表 1。

2.11 样品含量测定 按 2.3 项下方法制备补阳还五汤供试品试液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记

表 1 补阳还五汤中 4 种成分的加样回收率试验

Table 1 Results of recovery test of four components of Buyang Huanwu Tang

成分	样品 中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	
苦杏仁苷	603	648	1 253.3	100.35	98.39	1.9	
	603	648	1 251.8	100.12			
	603	648	1 248.3	99.58			
	603	648	1 229.3	96.65			
	603	648	1 235.9	97.67			
	603	648	1 224.7	95.94			
芍药苷	1 159	1 041	2 207.5	100.72	98.89	2.0	
	1 159	1 041	2 208.5	100.82			
	1 159	1 041	2 186.3	98.68			
	1 159	1 041	2 154.5	95.63			
	1 159	1 041	2 175.3	97.63			
	1 159	1 041	2 198.5	99.86			
毛蕊异	118	145.2	264.9	101.17	97.25	3.3	
黄酮葡	118	145.2	265.0	101.24			
葡萄糖苷	118	145.2	257.3	95.94			
	118	145.2	254.2	93.80			
	118	145.2	258.1	96.49			
	118	145.2	255.7	94.83			
	阿魏酸	50	63.6	112.3	97.96	95.39	2.6
	50	63.6	110.9	95.75			
50	63.6	112.3	97.96				
50	63.6	109.4	93.36				
50	63.6	108.3	91.65				
50	63.6	110.8	95.66				

录峰面积, 3 批样品中苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷及阿魏酸的含量见表 2。

表 2 补阳还五汤样品中 4 种指标成分的含量

Table 2 Contents of four ingredients of Buyang Huanwu Tang extract

样品	苦杏仁苷	芍药苷	毛蕊异黄酮 葡萄糖苷	阿魏酸
1	1.087	2.088	0.212 2	0.090 06
2	1.081	2.090	0.216 6	0.091 44
3	1.095	2.100	0.210 8	0.086 72

3 讨论

对色谱柱、流速、流动相及检测波长分别进行了考察。采用迪马 Platisil ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Phenomenex Luna C₁₈ 100A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 依利特 Hyperil ODS2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3 种色谱柱对样品进行了分析, 结果表明, 依利特 Hyperil ODS2 色谱柱对样品的分离度及峰形较好。在样品分析中, 比较了 0.8, 1.0, 1.2 mL·min⁻¹ 3 种流速对峰形、分离度的影响, 结果并无明显差异, 基于对色谱柱的保护及分析时间的考虑, 确定流速为 1.0 mL·min⁻¹。比较了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水、甲醇-水流动相, 结果发现, 使用甲醇-水时, 杂峰较多, 分离较差, 使用乙腈-0.1% 磷酸水后, 对峰形有改善, 杂峰减少, 故选择乙腈-0.1% 磷酸水作为本实验的流动相。补阳还五汤含有 7 味药材, 成分较为复杂, 在对 4 种指标成分的对照品进行全波长扫描并保证各成分含量测定的准确性的前提下, 选择了各自的最大吸收波长, 即苦杏仁苷 210 nm, 芍药苷 230 nm, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 250 nm, 阿魏酸 315 nm 作为检测波长, 对样品含量进行测定。

本实验供试品制备采用水提醇沉法, 相对直接水煎液进样杂峰干扰明显减小, 操作相对过大孔树脂简单, 更有利于样品的含量测定。本文选择的指标成分, 苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷及阿魏酸分别为桃仁、赤芍、黄芪、当归及川芎的标志性物质, 包含了方中君药以及大部分的活血化瘀类药物, 较之前研究更能体现补阳还五汤的全貌, 更全面地提供了补阳还五汤质量控制标准基础。

[参考文献]

- [1] 关莉, 闫福曼, 张晓东, 等. 全脑缺血模型大鼠再灌注不同时间点皮层神经元内 Ca²⁺ 浓度的动态改变[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(11): 188-190.
- [2] 关莉, 闫福曼, 张晓东, 等. 补阳还五汤对全脑缺血模型大鼠恢复脑血流灌注后的皮层神经元钙信号的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(3): 226-230.
- [3] 关莉, 刘微, 闫福曼, 等. 补阳还五汤对全脑缺血再灌注不同时间点大鼠皮质神经细胞谷氨酸受体 2 表达的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(4): 61-64.
- [4] 邹龙, 刘辉, 李仲秋, 等. HPLC 测定补阳还五汤总苷中黄芪甲苷和芍药苷的含量[J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(5): 39-42.
- [5] 刘海涛, 雷鹏, 唐涛, 等. RP-HPLC 法同时测定补阳还五汤中 3 种指标成分的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(3): 232-234.
- [6] 张星, 陆兔林, 毛春芹, 等. 不同器具煎煮补阳还五汤的 4 种成分含量比较[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(7): 533-536.
- [7] 张军, 陈汀波, 陈军. HPLC 法同时测定补阳还五汤中毛蕊异黄酮苷、芍药苷、羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(4): 373-376.
- [8] 朱伟, 王学美. 反相高效液相色谱法同时测定补阳还五汤中芍药苷和阿魏酸的含量[J]. 医药导报, 2006, 25(1): 60-62.
- [9] 段晓鹏, 贺福元, 周晋, 等. 补阳还五汤指纹图谱总量统计矩加合性的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3247-3252.
- [10] 张星, 陆兔林, 毛春芹, 等. 补阳还五汤质量标准研究[J]. 中成药, 2013, 35(3): 529-533.

[责任编辑 顾雪竹]