

高效液相色谱法同时测定开心散提取物中 3 种主要成分的含量

张静^{1,2}, 穆丽华², 赵润清^{2,3}, 李牧函^{2,4}, 王东晓^{2*}, 刘屏^{2*}

(1. 山西中医学院 中药学院, 太原 030024; 2. 中国人民解放军总医院, 北京 100853;
3. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 4. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:建立 HPLC-ELSD 同时测定开心散提取物中主要抗抑郁类成分 tenuifoliside A, 1-*O*-(*E*)-benzoyl-[3-*O*-(*E*)-alphanatolluyl]- β -*D*-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β -*D*-glucop-yranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -*D*-glucopyranoside 和人参皂苷 Rb₁ 含量的方法。方法:采用 HPLC-ELSD 分析方法, Agilent HC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 柱温 25 $^{\circ}$ C, 流动相乙腈-0.65% 乙酸铵水溶液进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 漂移管温度 115 $^{\circ}$ C, 载气流量 3.2 L \cdot min⁻¹, 气体空气。结果:tenuifoliside A, 1-*O*-(*E*)-benzoyl-[3-*O*-(*E*)-alphanatolluyl]- β -*D*-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β -*D*-glucop-yranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -*D*-glucopyranoside 和人参皂苷 Rb₁ 分别在 1.113 ~ 10.980, 1.581 ~ 15.726, 0.712 ~ 7.128 μ g 呈现良好的线性关系;精密性、稳定性和重复性均符合定量分析要求;三者的平均回收率分别为 98.36%, 99.58% 和 98.97%;百分含量分别为 0.999%, 1.670% 和 0.579%。结论:该分析方法简便、可靠,可用于开心散提取物中 tenuifoliside A, 1-*O*-(*E*)-benzoyl-[3-*O*-(*E*)-alphanatolluyl]- β -*D*-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β -*D*-glucop-yranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -*D*-glucopyranoside 和人参皂苷 Rb₁ 的含量测定,且可以作为开心散质量控制方法之一。

[关键词] 开心散; 寡糖酯类; 人参皂苷 Rb₁; 高效液相色谱-蒸发光散射; 抗抑郁

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0065-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040065

Determination of Three Major Components in Kaixin San by HPLC

ZHANG Jing^{1,2}, MU Li-hua², ZHAO Run-qing^{2,3}, LI Mu-han^{2,4}, WANG Dong-xiao^{2*}, LIU Ping^{2*}

(1. Department of Chinese Medicine, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China;
2. General Hospital of PLA, Beijing 100853, China;
3. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;
4. Department of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To found a quantitative HPLC-ELSD method for determining tenuifoliside A, 1-*O*-(*E*)-benzoyl-[3-*O*-(*E*)-alphanatolluyl]- β -*D*-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β -*D*-glucop-yranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -*D*-glucopyranoside and ginsenoside Rb₁ from Kaixin San, which are used for anti-tumor. **Method:** The procedure of HPLC-ELSD was performed on the chromatographi column of Agilent HC C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) at 25 $^{\circ}$ C, and the mobile phase was acetonitrile-0.65% ammonium acetate solution in gradient elution. The flow velocity was 1.0 mL \cdot min⁻¹. The temperature of driti tube was 115 $^{\circ}$ C and the gas was air, flow rate was 3.2 L \cdot min⁻¹. **Result:** Tenuifoliside A showed a good linear relationship at a range from 1.113 μ g to 10.980 μ g, 1-*O*-(*E*)-benzoyl-[3-*O*-(*E*)-alphanatolluyl]- β -*D*-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β -*D*-glucop-yranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -*D*-glucopyranoside, from 1.581 μ g to 15.726 μ g, and ginsenoside Rb₁, from 0.712 μ g to 7.128 μ g;

[收稿日期] 20150919(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274180)

[第一作者] 张静,在读硕士,从事中药化学研究, Tel:010-66936678, E-mail:wuyulunbizj@126.com

[通讯作者] *王东晓,副研究员,从事临床药理学研究, Tel:010-66936678, E-mail:wuyulunbi502@163.com;

*刘屏,研究员,博士生导师,从事神经药理及临床药理研究, Tel:010-66936676, E-mail:epi301@163.com

Precision, stability and repeatability are comply with the requirement of quantitative analysis. The average recovery was respectively 98.36%, 99.58% and 98.97%. The percentage composition was respectively 0.999%, 1.670% and 0.579%. **Conclusion:** The method was simple and reliable, which can be used for the assaying of tenuifoliside A, 1-*O*-(*E*)-benzoyl-[3-*O*-(*E*)-alphanatolluyl]- β -*D*-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β -*D*-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -*D*-glucopyranoside and ginsenoside Rb₁ as well as quantity control of Kaixin San.

[Key words] Kaixin San; oligosaccharide esters; ginsenoside Rb₁; HPLC-ELSD; anti-depression

开心散是一首治疗中医情志病的基本方,由人参、远志、茯苓、石菖蒲组成,始载于唐·孙思邈之《备急千金要方》。在后世的《古今录验》、《太平惠民和剂局方》中均有记载,其组成药物完全相同而配伍比例不同^[1]。有研究显示,开心散可以通过多成分、多途径和多靶点的作用发挥抗抑郁作用^[2-5],且其发挥作用的物质基础主要涉及人参皂苷、远志皂苷、远志酮和茯苓多糖等^[6]。随着高效液相色谱的普及,以其灵敏、快捷、可分离大多数液体样品等优点,该方法已经广泛应用于中药有效成分含量测定、组分分析和指纹图谱等方面^[7]。本课题组前期在开心散提取物抗抑郁类药物有效成分活性筛选试验中,发现除人参皂苷类具有明显抗抑郁作用外,远志寡糖酯类成分也占有相当的比例^[8-9]。因此,本文建立了通过 HPLC-ELSD 同时测定开心散提取物中 tenuifoliside A, 1-*O*-(*E*)-benzoyl-[3-*O*-(*E*)-alphanatolluyl]- β -*D*-fructofuranosyl-(2 \rightarrow 1)-[β -*D*-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -*D*-glucopyranoside (以下简称寡糖酯 2) 和人参皂苷 Rb₁ 3 种有效成分含量的定量分析方法,从而为开心散提取物及其抗抑郁有效组分的质量控制方法研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 L2200 型高效液相色谱仪(日本 Hitachi), 包括 ELSD-2000ES 型检测器(美国 Altech); RE-3000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), FDU-1200 型冷冻干燥机(上海爱朗仪器有限公司), ABJ220-4M 型电子天平(德国 Kern & Sohn GmbH), KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药 人参、茯苓、远志、石菖蒲均购自北京同仁堂药材有限责任公司,经解放军总医院中药房刘萍主任药师鉴定,产地分别为吉林、河南、山西、湖南。人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根,茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核,石菖蒲为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* 的干燥根茎,远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* 的干燥根。tenuifoliside A、寡糖酯 2 对照

品均自制(纯度 > 97%); 人参皂苷 Rb₁ 对照品购自中国食品药品检定研究院(批号 110703-200726)。乙腈色谱纯,甲醇分析纯,娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

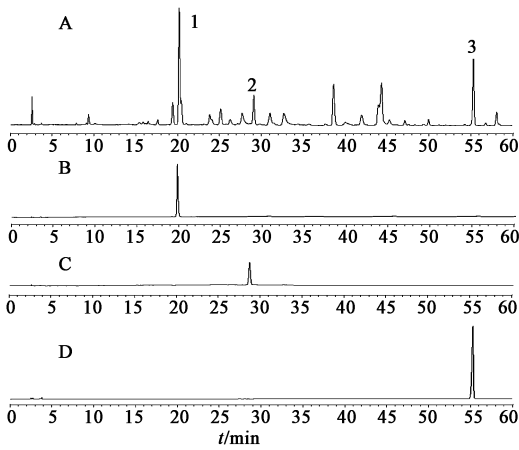
2.1 对照品溶液的制备 取 tenuifoliside A, 寡糖酯 2 和人参皂苷 Rb₁ 对照品适量,精密称定,分别加甲醇制成质量浓度为 0.549 6, 0.786 4, 0.356 5 g·L⁻¹ 的对照品储备液,4℃ 保存,备用。

2.2 供试品溶液的制备 分别称取人参 1.5 kg, 茯苓 1.5 kg, 远志 1 kg, 石菖蒲 1 kg, 将 4 种药材浸泡于 50 L 水中,加热回流提取,过滤,滤渣继续用相同量的水回流提取 2 次,合并各次滤液,减压浓缩后冷冻干燥得开心散总提取物干粉(1 g 干粉相当于 7.14 g 总药材),4℃ 保存,备用。精密称取开心散提取物约 140 mg,置于 5 mL 量瓶中,甲醇溶解,定容至刻度线处,摇匀,过滤,取续滤液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得开心散提取物的供试品溶液。

2.3 色谱条件及系统适应性试验 Agilent HC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),柱温 25℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,流动相乙腈(A)-0.65% 乙酸铵水溶液(B)梯度洗脱(0~8 min, 5%~15% A; 8~35 min, 15%~20% A; 35~60 min, 20%~28% A; 60~70 min, 28%~35% A; 70~74 min, 35%~100% A; 74~75 min; 100%~5% A),漂移管温度 115℃,气体空气,载气流量 3.2 L·min⁻¹。

按照上述色谱条件,分别精密吸取 tenuifoliside A, 寡糖酯 2, 人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液和开心散提取物供试品溶液各 20 μL 分别进样,在对照品溶液和供试品溶液色谱图相应位置上,有相同保留时间的色谱峰,且与其他成分分离良好。见图 1。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取 tenuifoliside A, 寡糖酯 2 和人参皂苷 Rb₁ 对照品储备液 2, 5, 10, 15, 20 μL 注入色谱仪中,按上述色谱条件测定。以峰面积的常用对数为纵坐标,以进样量的常用对数为横坐标,绘制标准曲线,得 tenuifoliside A, 寡糖酯 2 和人参皂苷 Rb₁ 回归方程分别为 $Y = 0.915X +$



A. 开心散提取物; B. tenuifolioside A; C. 寡糖酯 2; D. 人参皂苷 Rb₁;
1. tenuifolioside A; 2. 寡糖酯 2; 3. 人参皂苷 Rb₁

图 1 开心散提取物 HPLC

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Kaixin San

5.427 6 ($R^2 = 0.999 4$), $Y = 1.010 5X + 5.306 7$ ($R^2 = 0.999 7$), $Y = 0.993 7X + 5.575 4$ ($R^2 = 0.999 0$)。结果表明 tenuifolioside A, 寡糖酯 2 和人参皂苷 Rb₁ 分别在 1.113 ~ 10.980, 1.581 ~ 15.726, 0.712 ~ 7.128 μg 呈现良好的线性关系。

2.5 精密度考察 精密吸取开心散提取物供试品溶液 20 μL , 注入液相色谱仪中, 连续测定 6 次。测得 tenuifolioside A, 寡糖酯 2 和人参皂苷 Rb₁ 峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 1.8%, 1.2%。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 配制开心散提取物供试品溶液, 分别放置 0, 2, 4, 6, 10, 16, 24 h 后, 精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪中测定。结果 tenuifolioside A, 寡糖酯 2 和人参皂苷 Rb₁ 峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 1.8% 和 1.3%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 重复性考察 精密称取同一批开心散提取物 6 份, 制备供试品溶液。精密吸取各供试品溶液 20 μL , 按 2.3 项下色谱条件测定, 得 tenuifolioside A, 寡糖酯 2 和人参皂苷 Rb₁ 含量的 RSD 分别为 0.9%, 2.1% 和 1.8%, 表明该方法的重现性良好。

2.8 回收率试验 精密称取同一批开心散提取物样品 9 份, 每份约 70 mg, 置于 5 mL 的量瓶中, 精密加入不同质量浓度的各对照品溶液适量, 按照上述方法制备供试品溶液, 计算回收率。结果 3 者的平均加样回收率分别为 98.36%, 99.58% 和 98.97%, 表明此方法的加样回收率合格, 符合定量分析的要求。结果见表 1 ~ 3。

表 1 Tenuifolioside A 加样回收率试验

Table 1 Recovery test result of tenuifolioside A

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD)/%
70.00	0.699 3	0.347 5	1.032 1	95.77	
70.24	0.701 7	0.347 5	1.032 8	95.28	
70.08	0.700 1	0.347 5	1.032 8	95.74	
69.64	0.695 7	0.700 0	1.396 2	100.07	98.36
70.00	0.699 3	0.700 0	1.392 1	98.97	(2.2)
70.25	0.701 8	0.700 0	1.386 7	97.84	
70.04	0.699 7	1.048 5	1.748 1	99.99	
69.60	0.695 3	1.048 5	1.757 5	101.31	
69.92	0.698 6	1.048 5	1.749 8	100.26	

表 2 寡糖酯 2 加样回收率试验

Table 2 Recovery test result of oligosaccharide esters 2

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD)/%
70.00	1.169 0	0.594 2	1.764 4	100.2	
70.24	1.174 6	0.594 2	1.758 6	98.55	
70.08	1.170 3	0.594 2	1.768 7	100.71	
69.64	1.163 0	1.161 2	2.323 5	99.94	99.58
70.00	1.169 0	1.161 2	2.315 2	98.71	(0.8)
70.25	1.173 2	1.161 2	2.320 1	98.77	
70.04	1.169 7	1.752 1	2.921 1	99.96	
69.60	1.162 3	1.752 1	2.902 8	99.34	
69.92	1.167 7	1.752 1	2.923 0	100.18	

表 3 人参皂苷 Rb₁ 加样回收率试验

Table 3 Recovery test result of ginsenoside Rb₁

称样量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 (RSD)/%
70.00	0.405 3	0.202 9	0.607 8	99.80	
70.24	0.406 7	0.202 9	0.602 3	96.40	
70.08	0.405 8	0.202 9	0.605 0	98.18	
69.64	0.403 2	0.405 1	0.808 4	100.02	98.97
70.00	0.405 3	0.405 1	0.805 2	98.72	(1.2)
70.25	0.406 7	0.405 1	0.805 4	98.41	
70.04	0.405 5	0.604 8	1.010 1	99.97	
69.60	0.403 0	0.604 8	1.007 4	99.93	
69.92	0.404 8	0.604 8	1.005 5	99.32	

2.9 样品测定 称取开心散总药材 40 g [(人参-茯苓-远志-石菖蒲 (3:3:2:2))], 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 平行制备 3 批开心散提取物供试品溶

液,按 2.3 项下色谱条件测定,计算 3 种成分含量,结果见表 4。

表 4 开心散提取物中 3 种成分含量测定 (n=3)

Table 4 Contents of three compounds in Kaixin San (n=3)

成分	出膏量/g	百分含量/%	提取量/mg
tenuifoliside A		0.999	55.984
寡糖酯 2	5.604	1.670	93.587
人参皂苷 Rb ₁		0.579	32.447

3 讨论

高效液相色谱检测器一般包括紫外检测器、荧光检测器、示差折光检测器、蒸发光散射检测器和质谱检测器等,其中紫外检测器以其高灵敏度和稳定性,在 HPLC 中应用最为广泛,但它的局限性就在于被检测物质必须具有可以吸收紫外光的生色团。ELSD 做为一种通用检测器,已成功用于皂苷、生物碱、萜类内酯、氨基酸和糖类中药成分的分析,它是分析无紫外吸收及紫外吸收弱成分的有力工具;并且由于 ELSD 仅对不挥发的被分析物质产生响应,所以即使是在梯度洗脱时也能提供较平衡的基线^[10]。因此,本试验建立了采用 HPLC-ELSD 同时测定开心散中两种寡糖酯类成分和人参皂苷 Rb₁ 3 种主要抗抑郁类活性成分含量的方法,该方法操作简便、易行,且精密度、稳定性和重复性良好,可用于开心散中主要活性成分的含量测定,并为开心散的质量综合评价提供一定的参考。中药复方化学成分复杂,且在配伍过程中容易产生变化,因此建立适合中药复方质量控制的方法对于保证复方临床疗效的安全、稳定、均一以及中药的现代化实现具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 刘屏,汪进良,王燕,等. 开心散类方配伍及抗抑郁作用研究[J]. 中华中医药杂志,2005,20(5):279-281.
- [2] 蔡川,钱国强,赵国平,等. 开心散对大鼠抑郁症模型内源性褪黑素生物合成的调控研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(11):1638-1641.
- [3] Hu Y, Liu P, Guo D H, et al. Behavioral and biochemical effects of Kaixin San, a traditional Chinese medicinal empirical formula[J]. Drug Develop Res, 2008, 69(5): 267-271.
- [4] Hu Y, Liao H B, Guo D H, et al. Antidepressant-like effects of 3, 6'-disinapoyl sucrose on hippocampal neuronal plasticity and neurotrophic signal pathway in chronically mild stressed rats[J]. Neurochem Int, 2009, 56(3):461-465.
- [5] Liu P, Hu Y, Guo D H, et al. Potential antidepressant properties of Radix Polygalae (Yuan Zhi) [J]. Phytomedicine, 2010, 17(10):794-799.
- [6] 温智林,王真真,贺文彬,等. 开心散及其有效成分抗抑郁作用的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(3):420-423.
- [7] 陈俊,黄玉凤,王彬. HPLC-ELSD 在中药分析及指纹图谱中的应用[J]. 药学实践杂志, 2009, 27(4): 251-253.
- [8] 谢婷婷. 远志活性部位 YZ50 抗抑郁的物质基础及作用机制研究[D]. 北京:解放军军医进修学院, 2006.
- [9] 黄晓舞,谢婷婷,王东晓,等. 远志醇提物的抗抑郁作用[J]. 中国药物应用与监测, 2007, 4(4):22-25.
- [10] 谭雄斯. HPLC-UV-ELSD 法测定益肝乐颗粒中槲皮素、山柰素、柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d[J]. 中成药, 2014, 36(3):531-535.

[责任编辑 顾雪竹]