

· 化学与分析 ·

HPLC 测定半夏白术天麻汤中天麻素和鸟苷的含量

王勋, 陆家凤, 罗珊珊, 王现珍, 蒋嘉烨, 可燕*
(上海中医药大学教学试验中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 建立同时测定半夏白术天麻汤中天麻素和鸟苷含量测定的方法。方法: 使用 Platisil ODS 色谱柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm) 柱; 流动相 A(水)-B(乙腈); 梯度洗脱 0~30 min(2%~5% B); 流速 0.65 mL·min⁻¹; 柱温 25℃; 检测波长 260 nm。结果: 天麻素和鸟苷分别在 0.007~0.35 g·L⁻¹ ($r=0.9999$) 和 0.00032~0.016 g·L⁻¹ ($r=0.9999$) 内线性关系良好, 平均回收率分别为 99.7% 和 100.6%, RSD 分别为 1.9% 和 2.0% ($n=9$)。结论: 所建立的方法准确快速, 可用于半夏白术天麻汤复方的质量控制。

[关键词] 复方半夏白术天麻汤; 天麻素; 鸟苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0044-04

Simultaneous Determination of Gastrodine and Guanosine in Banxia Baizhu Tianmatang

WANG Xun, LU Jia-feng, LUO Shan-shan, WANG Xian-zhen, JIANG Jia-ye, KE Yan*
(Experiment Center For Teaching And Learning, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To establish an HPLC method for the content determination of gastrodine and guanosine in Banxia Baizhu Tianmatang. **Method:** The Platisil ODS-C₁₈ column was used. The mobile phases consisted of water and acetonitrile with gradient elution. The flow rate was 0.65 mL·min⁻¹ and column temperature was at 25℃. The detection wavelength was at 260 nm. **Result:** Gastrodine and guanosine were linear in the range of 0.007-0.35 g·L⁻¹ ($r=0.9999$) and 0.00032-0.016 g·L⁻¹ ($r=0.9999$) respectively. The average recoveries were 99.7% and 100.6% with the RSD 1.9% and 2.0% ($n=9$) respectively. **Conclusion:** The method was accurate and quick, and can be used for quality control of Compound Pinelliae and Atractylodis Macrocephalae and Gastrodiae Decoction.

[Key words] Banxia Baizhu Tianmatang; gastrodine; guanosine; HPLC

半夏白术天麻汤来源于《医学心悟》, 基本方由半夏、天麻、白术、茯苓、橘红、甘草组成。半夏白术天麻汤具有行气健脾、化痰熄风等功效, 治疗头晕、

头部不适、头痛、肢体麻木的作用。现代医学主要用来治疗高血压, 冠心病, 心绞痛高血脂症和改善脑缺血状态等, 临床效果良好^[1-3]。本试验建立了同时测定复方中天麻素和鸟苷含量的 HPLC 方法, 为此复方的质量控制提供了依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent1200 高效液相色谱仪(G1322A 在线脱气机, G1311A 四元泵, G1313A 柱温箱, G1314B VWD 检测器); GR-202 电子分析天平; GREST 超声波清洗仪。

[收稿日期] 20100513(009)

[基金项目] 国家科技部十一五支撑计划(2006BAI B08-03)

[作者简介] 王勋, 硕士, 研究方向: 中药活性成分筛选

[通讯作者] * 可燕, 副研究员, 研究方向: 中药活性成分筛选,
Tel: 021-53122539, Fax: 021-51322337, E-mail:
keyan11@ yahoo.com.cn

1.2 试药 天麻素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110807-200205),鸟苷对照品(上海中药标准化中心,批号 26-2006),乙腈(色谱纯,Merck 公司),水(娃哈哈纯净水)。本试验所用复方半夏白术天麻汤由上海中医药大学附属龙华医院提供,该复方由半夏、白术、天麻、茯苓、橘红、甘草 6 味药按复方比例加 8 倍量水分 2 次煎煮,每次煎煮 30 min 制成,批号分别为 091104,091105,091106。阴性对照样品由本实验室自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Platisil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A(水)-B(乙腈);梯度洗脱 0 ~ 30 min(2% ~ 5%);流速 0.65 mL·min⁻¹;检测波长 260 nm;进样量 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别取天麻素和鸟苷对照品适量,精密称定,置 25 mL 量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。每 1 mL 溶液含天麻素 0.7 mg,鸟苷 0.032 mg。

2.2.2 供试品溶液 精密量取半夏白术天麻汤剂 1 mL,置具塞锥形瓶中,精密加入 2% 乙腈 30 mL,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用 2% 乙腈补足,摇匀,滤过,收集滤液。浓缩滤液至 5 mL,过 PEP-SPE 固相萃取小柱(500 mg/6 mL),以 1 柱体积(6 mL) 甲醇和 1 柱体积水(6 mL) 活化,流出液弃去,25% 甲醇水溶液(6 mL) 淋洗,流出液弃去,最后以 5% 甲醇(6 mL) 洗脱,收集洗脱液,10 mL 量瓶定容,2% 乙腈稀释至刻度,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照 按处方比例称取除天麻和半夏外的其他味药,按 2.2.2 工艺制备不含天麻和半夏的阴性供试品。

2.3 系统适应性试验 取供试品溶液,在 2.1 色谱条件下进样分析,理论塔板数分别按天麻素和鸟苷计算均不低于 4 000;2 种成分与相邻峰之间分离度均大于 1.5,阴性对照对供试品测定无干扰。色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察 分别取对照品天麻素和鸟苷适量,精密称定,至 25 mL 量瓶中,流动相溶解并稀释至刻度,制成质量浓度分别为 0.7,0.032 g·L⁻¹ 的对照品储备液,摇匀,备用。精密量取对照品储备液 0.1,0.25,0.5,1,2,5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,流

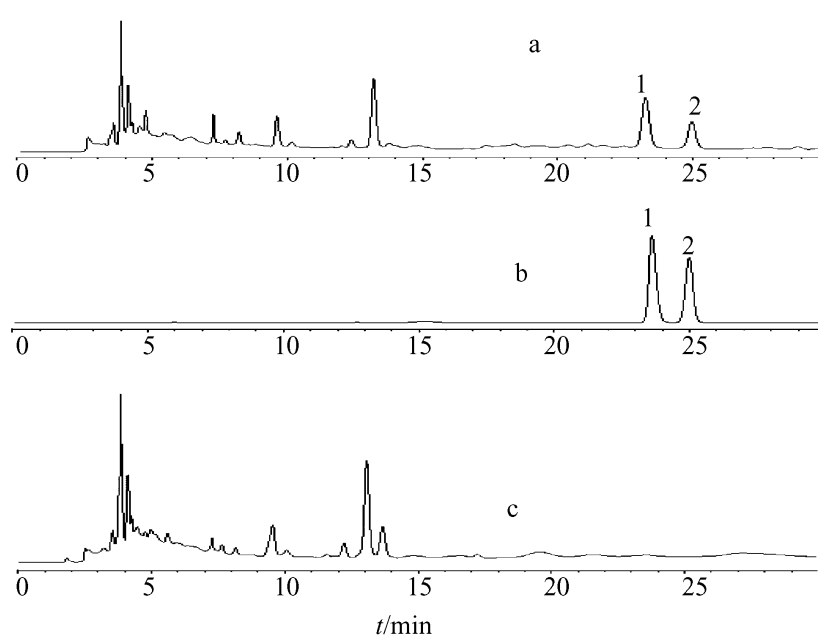


图 1 供试品溶液(a),对照品溶液(b),
阴性对照溶液(c)的 HPLC
1. 天麻素;2. 鸟苷

动相稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。在 2.1 色谱条件下进样 20 μL 测定,记录色谱图。以对照品质量浓度()为横坐标,对照品峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,推算天麻素和鸟苷的回归方程。天麻素和鸟苷的回归方程分别为 $A = 3.42 \times 10^3 - 2.05$, $r = 0.9999$ 和 $A = 5.73 \times 10^4 - 0.44$, $r = 0.9999$ 。结果表明,天麻素在 0.007 ~ 0.35 g·L⁻¹,鸟苷在 0.00032 ~ 0.016 g·L⁻¹ 与峰面积成良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液连续进样 5 次,测定,记录峰面积,计算 RSD。结果显示天麻素,鸟苷的 RSD 分别为 0.17%,0.33%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同批的供试品(批号 091104) 6 份,按 2.2.2 条件制成供试品溶液,按 2.1 色谱条件测定,记录峰面积。结果显示天麻素,鸟苷的平均含量分别为 0.490 g·L⁻¹ 和 0.0156 g·L⁻¹,RSD 分别为 1.2% 和 1.6%,表明方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液,分别在 0,2,4,8,10,12 h,按 2.1 色谱条件测定,结果显示天麻素,鸟苷的 RSD 分别为 0.9% 和 2.0%。表明天麻素和鸟苷在 12 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 量称取已知含量的供试品 9 份,各 1 mL,每 3 份为 1 组,每组分别加入混合对照品溶液 0.5 mL,0.75 mL 和 1 mL(含天麻素 0.66 g·L⁻¹,鸟苷 0.03 g·L⁻¹),按 2.2.2 方法制备,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,精密量取 20 μL 进样,结果见表 1。

表 1 半夏白术天麻汤中天麻素和鸟苷的回收率

| 化合物 | No. | 样品中含量 /mg | 加入量 /mg | 检出量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD /% |
|-----|-----|--------------|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 天麻素 | 1 | 0.490 | 0.33 | 0.825 | 100.6 | 99.7 | 1.9 |
| | 2 | 0.490 | 0.33 | 0.826 | 100.7 | | |
| | 3 | 0.490 | 0.33 | 0.840 | 102.4 | | |
| | 4 | 0.490 | 0.495 | 0.954 | 96.8 | | |
| | 5 | 0.490 | 0.495 | 0.957 | 97.1 | | |
| | 6 | 0.490 | 0.495 | 0.967 | 98.1 | | |
| | 7 | 0.490 | 0.66 | 1.152 | 100.1 | | |
| | 8 | 0.490 | 0.66 | 1.166 | 101.3 | | |
| | 9 | 0.490 | 0.66 | 1.154 | 100.3 | | |
| 鸟苷 | 1 | 0.015 6 | 0.015 | 0.031 | 101.3 | 100.6 | 2.0 |
| | 2 | 0.015 6 | 0.015 | 0.032 | 104.0 | | |
| | 3 | 0.015 6 | 0.015 | 0.031 | 101.3 | | |
| | 4 | 0.015 6 | 0.022 5 | 0.037 | 97.1 | | |
| | 5 | 0.015 6 | 0.022 5 | 0.038 | 99.7 | | |
| | 6 | 0.015 6 | 0.022 5 | 0.038 | 99.7 | | |
| | 7 | 0.015 6 | 0.03 | 0.047 | 103.1 | | |
| | 8 | 0.015 6 | 0.03 | 0.046 | 100.8 | | |
| | 9 | 0.015 6 | 0.03 | 0.047 | 103.1 | | |

注:取样量均为 1 mL。

2.9 供试品含量测定 取 3 批供试品,按 2.2.2 方法制备,测定,计算天麻素和鸟苷的含量,见表 2。

表 2 半夏白术天麻汤中天麻素和鸟苷的质量浓度 $g \cdot L^{-1}$

| No. | 天麻素 | 鸟苷 |
|--------|-------|---------|
| 091104 | 0.493 | 0.016 1 |
| 091105 | 0.493 | 0.015 5 |
| 091106 | 0.488 | 0.015 6 |

3 讨论

半夏白术天麻汤是用于治疗高血压等心血管疾病的常用名方,现代临床应用和试验研究表明,该方具有降压,改善血流量,保护心肌,镇静,抗惊厥,镇痛等多重功效。但关于其质量控制却一直未见文献报道。本试验选用复方中君药半夏和天麻作为质量控制指标,天麻中天麻素具有降血压和改善微循环等作用^[4],鸟苷等核苷类成分能够改善心脑血管血液循环,防止心率失常,常常是中药药理的活性成分^[5]而且鸟苷本身性质稳定,一般条件不易破坏,已经被选用作半夏水溶性成分的检测指标。本试验选用的两种指标成分可以为今后该方的质量控制提供依据。

由于复方样品由多味单方组成,成分含量极为复杂,对色谱图影响很大,因此样品的前处理过程尤为重要。本试验样品前处理曾采用 D101 大孔吸附树脂提取方法,但该方法操作繁琐,误差较大,回收率难以保证,最终确定采用 PEP-SPE 固相萃取小柱的除杂方法,步骤简单,容易操作,试验误差小,更能真实反应所测成分的真实含量。一般情况下,HPLC 测定天麻素多采用乙腈-水-磷酸系统^[6],甲醇-水-磷酸系统^[7-8],本次试验涉及到同时测定鸟苷的含量^[9],为避免鸟苷-磷酸反应,故改用乙腈-水梯度洗脱。常规流速下指标成分保留时间较短,与前面的非指标成分杂糅,难以达到分离度,经多次试验最终确定流速为 $0.65 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。天麻素在 220 nm 和 260 nm 处有最大吸收波长,鸟苷在 260 nm 出有最大吸收波长,故选 260 nm 为检测波长,使 2 组分达到检测的最佳效果。

本试验用同一样品处理方法,在同一色谱检测条件下实现了天麻素,鸟苷双指标成分的测定,从而控制了复方中君药天麻中天麻素和半夏中鸟苷的成分含量,为半夏白术天麻汤的全面质量评价和控制

方法提供依据。

[参考文献]

- [1] 陈立群, 于海峰. 半夏白术天麻汤加味治疗原发性高血压 40 例临床观察[J]. 河南中医, 2004, 24(11): 29.
- [2] 阳晓. 半夏白术天麻汤加减治疗冠心病心绞痛疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(2): 181, 456.
- [3] 冷英. 半夏白术天麻汤临床用体会[J]. 辽宁中医学院学报, 2001, 3(3): 201.
- [4] 朴香兰, 李相伍, 金范学. 半夏白术天麻汤水提物对大鼠离体胸主动脉环的舒张作用及机制[J]. 四川中医, 2009, 27(6): 23.
- [5] 赵杨, 靳凤云, 伍庆, 等. 高效液相色谱法测定不同产

地半夏药材中鸟苷和腺苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 23.

- [6] 容蓉, 陈明强, 李洪晓, 等. 复方天麻颗粒质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 456.
- [7] 李尔伟, 张超. 天龙熄风颗粒中天麻素的含量测定[J]. 中药材, 2003, 26(6): 434.
- [8] 王书梅, 周燕, 刘建芳. HPLC 测定天麻头风灵软胶囊中天麻素的含量[J]. 华西药学杂志, 2006, 21(5): 479.
- [9] 肖慧, 刘清飞, 王义明, 等. 高效液相法测定板蓝根药材中 3 种核苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1654.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2011 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管, 中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物, 已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”; “中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊; 并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月, 本着提高为主, 提高与普及相结合的办刊方针, 主要设置: 工艺与制剂、化学与分析、药理、临床、综述、经验交流、基层园地、消息等栏目, 交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药, 尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者, 以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊, 16 开本, 224 页, 标准刊号: ISSN1005 - 9903; CN11 - 3495/R。2011 年每期定价 25 元, 全年 24 期定价为 600 元。国内外公开发售, 国内由北京市报刊发行局办理总发行, 邮发代号: 2 - 417; 国外由中国国际图书贸易总公司办理发行, 代号: BM4655. 欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 《中国实验方剂学杂志》编辑部, 邮编: 100700, 联系电话: (010) 84076882, 电子邮件: czd@vip.sina.com, 网址: www.syfjxzz.com