

同时分析少腹逐瘀汤拮抗离体子宫收缩活性 部位中多类型化学组成

鲍邢杰^{1,2}, 宿树兰^{1,2}, 段金廛^{2*}, 华永庆², 唐于平², 尚尔鑫²

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013;

2. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的: 建立少腹逐瘀汤拮抗离体子宫收缩的有效部位中有机酸类(香草酸、咖啡酸、阿魏酸)、萜苷类(芍药苷、芍药内酯苷)、黄酮苷类(异鼠李素芸香糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷)3种类型7个化合物的含量测定方法, 为少腹逐瘀汤及有效部位的复杂效应物质的阐明及质量控制提供依据。方法: 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱 Waters SunFire-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.05% 磷酸(B)-甲醇(C) 梯度洗脱(0 min: 8: 87: 5, 30 min: 13: 82: 5, 35 min: 13: 82: 5, 55 min: 14: 81: 5, 60 min: 14: 81: 5, 80 min: 15: 80: 5); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 测定波长: 260, 230, 254, 320 nm; 柱温: 30 ℃。结果: 3种类型化学成分的7个化合物在分析测定范围内具有良好的线性关系, 加样回收率在 97.8% ~ 100.2% 之间。结论: 分析测定了少腹逐瘀汤拮抗离体子宫收缩活性部位中7个化合物的含量, 方法准确可靠, 重复性良好, 为方剂中多类型复杂效应物质的分析评价提供了参考。

[关键词] 反相高效液相色谱法; 少腹逐瘀汤; 有效部位; 组分分析

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)04-0038-04

Simultaneous Analyze Chemical Components of Inhibiting Mice Uterine Contraction in Active Fraction of Shaofu Zhuyu Decoction

BAO Xingjie^{1,2}, SU Shu-lan^{1,2}, DUAN Jin-ao^{2*}, HUA Yong-qing², TANG Yu-ping², SHANG Er-xin²

(1. Department of Medical, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Key Laboratory for Modern Research of Traditional Chinese Medical, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an analytical method of RP-HPLC-DAD to determinate simultaneously the chemical components of vanillic acid, caffeic acid, albiflorin, peoniflorin, ferulaic acid, isorhamnetin-3-O-rutinoside, isorhamnetin-3-O-neohesperidoside in Shaofu Zhuyu Decoction and to provide evidence for the control and elucidate the bioactive components of Shaofu Zhuyu Decoction. **Methods:** The method of RP-HPLC-DAD was adapted to determinate the seven compounds in the sample simultaneously. A Waters SunFire-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with the mobile phase consisting of acetonitrile(A), 0.05% phosphoric acid(B) and methanol(C) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ in gradient elution(0 min: 8: 87: 5, 30 min: 13: 82: 5, 35 min: 13: 82: 5, 55 min: 14: 81: 5, 60 min: 14: 81: 5, 80 min: 15: 80: 5). The detected wave were 260, 230, 254, and 320 nm respectively and the temperature of column was 30 ℃. **Results** The linearity of the 7 compounds was good, and the average recovery was range of 97.8% ~ 100.2%.

[收稿日期] 2007-10-11

[基金项目] 江苏省高校自然科学重大基础研究项目(06KJA36022); 江苏省“青蓝工程”科技创新团队建设项目资助(2006)

[通讯作者] * 段金廛, Tel/Fax: (025) 86798011; E-mail: dja@njtcm.edu.cn

Conclusions: The method of HPLC-DAD is accurate and sensitive with good repeatability for the determination of 7 compounds simultaneously in Shaofu Zhuyu Decoction. The results provide references to analyze the complicated components of TCMs.

[**Key words**] RP-HPLC; Shaofu Zhuyu Decoction; active fraction; components analysis

本课题组在四物汤类方治疗妇科血瘀证痛经的研究过程中, 采用大孔吸附树脂分离技术对四物汤及其衍化方各方进行化学物质的分离富集, 发现少腹逐瘀汤中拮抗小鼠离体子宫收缩的活性部位(SF-11) 对子宫平滑肌收缩频率、收缩幅度、平均肌张力均表现出显著活性($P < 0.05$)。为阐明该活性部位的效应物质, 本文采用反相高效液相色谱法-二级管阵列检测器(RP-HPLC-DAD) 对其中含有的香草酸、咖啡酸、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、异鼠李素芸香糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷等 7 个化学成分进行含量分析, 为该活性部位以及少腹逐瘀汤治疗妇科血瘀证痛经的复杂效应物质的阐明及配伍规律研究奠定基础并提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱系统: Waters 2695 四元泵, Waters 2996 二极管阵列检测器; 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); KQ-250E 型超声波清洗器; 乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 冰醋酸(分析纯, 上海化学试剂有限公司); 超纯水(自制)。

1.2 药品与药材 香草酸、咖啡酸、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、异鼠李素-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷对照品均购自中国药品生物制品检定所; 当归为伞形科植物当归(*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels) 的干燥根, 来源于甘肃岷县当归 GAP 种植基地; 川芎为伞形科植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 的干燥根茎, 来源于四川彭州川芎 GAP 种植基地; 赤芍为毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.) 的干燥根; 肉桂为樟科植物肉桂(*Cinnamomum cassia* Presl) 的干燥树皮; 小茴香为伞形科植物小茴香(*Foeniculum vulgare* Mill.) 的干燥成熟果实; 蒲黄为香蒲科植物水烛香蒲(*Typha angustifolia* L.) 的花粉; 五灵脂为鼯鼠科动物复齿鼯鼠(*Trogopterus xanthipes* Milne Edwards) 的干燥粪便; 没药为橄榄科植物没药树(*Commiphora myrrha* Engl.) 或其它同属植物茎干皮部渗出的油胶树脂; 延胡索为罂粟科植物延胡索(*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 的块茎; 干姜为姜科植物姜(*Zingiber officinale* L.) 的干燥根茎。未注明

产地者均购自于南京市药材公司, 经本文作者江苏省方剂研究重点实验室段金廛教授鉴定。

大孔吸附树脂: 型号 D101(购于天津南开大学)。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 少腹逐瘀汤有效部位的制备 称取少腹逐瘀汤组方药材(5.58 kg), 按照当归: 川芎: 赤芍: 肉桂: 小茴香: 五灵脂: 没药: 蒲黄: 延胡索: 干姜(3: 1: 2: 1: 0.5: 2: 1: 3: 1: 1) 比例配比, 经粉碎至粒径为 40 目, 水煎煮提取 2 次, 第一次加 10 倍量水煎煮 2h, 第二次加 8 倍量水煎煮 2 h, 合并两次煎出液, 浓缩至 5 kg 左右, 用 95% 乙醇调至醇浓度为 80%, 放置 12 h, 过滤沉淀, 上清液浓缩至 6 kg 左右, 缓缓加入到大孔吸附树脂柱中, 静置 12 h 后, 分别用纯水、10% ~ 95% 的乙醇进行梯度洗脱, 洗脱部位进行浓缩干燥, 得干浸膏, 备用。其中 40% 乙醇洗脱部位(SF-11) 即为本实验分析测定的拮抗离体子宫平滑肌收缩的活性部位。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取活性部位干浸膏(SF-11) 0.0224 g, 置 5 mL 容量瓶中, 加入 50% 甲醇水溶液约 5 mL, 超声 15 min 待全部溶解后定容, 即得浓度为 $4.475 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液, 以 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备 HPLC 用。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别精密称取香草酸、咖啡酸、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、异鼠李素芸香糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷对照品适量, 加甲醇溶解, 配制成浓度分别为 5.21, 18, 11, 120, 16, 5, 23 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, 备 HPLC 用。

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

时间	A	B	C
0.00	8.0	87.0	5.0
30.00	13.0	82.0	5.0
35.00	13.0	82.0	5.0
55.00	14.0	81.0	5.0
60.00	14.0	81.0	5.0
80.00	15.0	80.0	5.0
85.00	15.0	80.0	5.0

2.2 色谱条件 Waters SunFire-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃; 流动相: 乙腈(A)-0.05% 磷酸(B)-甲醇(C) 梯度洗脱, 流速 1.00 mL·min⁻¹, 洗脱程序见表 1。

2.3 线性相关性考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 注入液相色谱仪, 按“2.2”项下的色谱条件测定峰面积, 以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归计算, 得 ①香草酸; ②咖啡酸; ③芍药内酯苷; ④芍药苷; ⑤阿魏酸; ⑥异鼠李素芸香糖苷; ⑦异鼠李素-3-O-新橙皮苷的回归方程依次为:

① $Y = 4.80 \times 10^6 X - 6.60 \times 10^2$, $r = 0.9999$; ② $Y = 5.24 \times 10^6 X - 2.27 \times 10^4$, $r = 0.9999$; ③ $Y = 1.18 \times 10^6 X + 5.72 \times 10^4$, $r = 0.9995$; ④ $Y = 6.31 \times 10^6 X + 1.01 \times 10^4$, $r = 0.9996$; ⑤ $Y = 6.77 \times 10^6 X - 7.74 \times 10^3$, $r = 1.0000$; ⑥ $Y = 3.46 \times 10^6 X - 6.78 \times 10^3$, $r = 1.0000$; ⑦ $Y = 1.94 \times 10^6 X - 3.48 \times 10^3$, $r = 0.9999$ 。线性范围分别为: 0.01~0.05, 0.04~0.18, 0.02~0.11, 0.24~1.20, 0.03~0.16, 0.01~0.05, 0.05~0.23 μg。

2.4 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 在“2.2”项色谱条件下重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算得香草酸、咖啡酸、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、异鼠李素芸香糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷的 RSD 值分别为 0.38%, 0.90%, 1.0%, 0.64%, 0.66%, 0.14%, 0.40%, 表明精密度良好。

2.5 稳定性试验 按“2.1.2”项下的供试品制备方法制备样品溶液, 室温下放置, 并分别于 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 测定峰面积, 结果计算得香草酸、咖啡酸、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、异鼠李素芸香糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷的 RSD 值分别为 0.6%, 1.0%, 3.7%, 0.95%, 1.1%, 2.2%, 0.2%。

2.6 重复性试验 精密称取活性部位(SF-11)样品 5 份, 按“2.1.2”项下的供试品制备方法制备样品溶液, 并按“2.2”项下色谱条件进样 10 μL, 测定峰面积, 结果经计算得香草酸、咖啡酸、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、异鼠李素芸香糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷含量的 RSD 值分别为 1.1%, 1.7%, 4.2%, 2.0%, 2.1%, 3.0%, 2.6%。

2.7 加样回收试验 精密称取 9 份已知含量的 SF-11 样品各约 0.1 g, 配制成与样品相当浓度, 平均分成 3 组, 每组按低、中、高(相当于样品含量的 80%, 100%, 120%) 分别加入香草酸(1.251 7 mg·mL⁻¹)、

咖啡酸(0.233 3 mg·mL⁻¹)、芍药内酯苷(0.226 5 mg·mL⁻¹)、芍药苷(5.918 4 mg·mL⁻¹)、阿魏酸(0.692 1 mg·mL⁻¹)、异鼠李素芸香糖苷(1.952 7 mg·mL⁻¹)、异鼠李素-3-O-新橙皮苷(2.913 8 mg·mL⁻¹) 对照品溶液, 按照“2.1.2”项下的供试品制备方法操作。结果见表 2。

表 2 少腹逐瘀汤活性部位中 7 个化学成分的加样回收率试验结果

组分	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)
香草酸	1.277 0	1.001 4	2.273 8	99.8	1.5	
	1.277 3	1.251 7	2.491 1	98.5	1.8	98.9
	1.276 8	1.502 1	2.731 7	98.3	1.9	
咖啡酸	0.238 0	0.186 6	0.416 5	98.1	1.0	
	0.238 0	0.233 3	0.474 1	100.6	1.2	99.1
	0.237 9	0.279 9	0.511 0	98.7	0.9	
芍药内酯苷	0.231 0	0.181 2	0.408 5	99.1	1.9	
	0.231 1	0.226 5	0.452 6	98.9	2.6	100.2
	0.231 0	0.271 8	0.516 4	102.7	2.7	
芍药苷	6.037 9	4.734 7	10.481 7	97.3	1.7	
	6.039 1	5.918 4	11.706 3	97.9	1.5	97.8
	6.036 7	7.102 0	12.889 0	98.1	1.9	
阿魏酸	0.706 1	0.553 7	1.271 1	100.9	2.0	
	0.706 2	0.692 1	1.395 5	99.8	1.7	100.9
	0.705 9	0.830 5	1.565 6	101.9	1.4	
异鼠李素芸香糖苷	2.972 6	1.562 1	4.457 6	98.3	2.0	
	2.973 2	1.952 7	4.822 4	97.9	2.2	98.3
	2.972 0	2.343 2	5.246 1	98.7	1.9	
异鼠李素-3-O-新橙皮苷	1.277 0	2.331 0	3.597 2	99.7	1.7	
	1.277 2	2.913 8	4.157 4	99.2	0.9	99.3
	1.276 8	3.496 5	4.720 8	98.9	1.1	

2.8 样品测定 精密称取活性部位(SF-11)样品 3 份, 按“2.1.2”项下的供试品制备方法制备样品溶液, 按照“2.2”项色谱条件下, 香草酸、咖啡酸、阿魏酸、芍药苷、芍药内酯苷、异鼠李素-3-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷 7 个化学成分分别在 260, 320, 320, 230, 230, 254, 254 nm 下测定峰面积。对照品及样品色谱图见图 1。根据相应的线性方程计算含量, 结果 3 份样品的平均含量: 香草酸为 1.279%, 咖啡酸 0.238%, 阿魏酸 0.707%, 芍药内酯苷为 0.231%, 芍药苷为 6.046%, 异鼠李素-3-O-芸香糖苷为 1.995%, 异鼠李素-3-O-新橙皮苷为 2.977%。

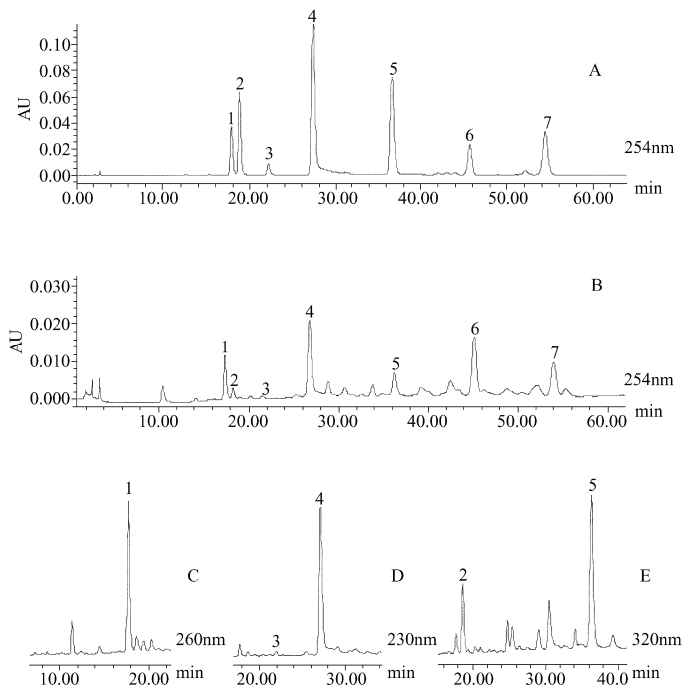


图 1 7 种混合对照品(A)及样品不同波长下(B、C、D、E)色谱图

1. 香草酸
2. 咖啡酸
3. 芍药内酯苷
4. 芍药苷
5. 阿魏酸
6. 异鼠李素芸香糖苷
7. 异鼠李素-3-O-新橙皮苷

3 讨论

由于方剂化学成分的复杂性,对其效应物质的阐明带来了较大困难,现代色谱技术及多种检测器联用技术的快速发展,尤其是 HPLC-DAD 技术发展及快速分析能力提高为方剂复杂效应物质基础研究,特别是为同时测定活性部位中多类型化学成分提供了有效的分离分析方法。本文报道了少腹逐瘀方水煎液,经大孔吸附树脂吸附后 40% 乙醇洗脱

部位拮抗小鼠离体子宫平滑肌收缩的活性部位中 3 种类型 7 个化合物的同时分析测定,为方剂活性部位多类型效应物质的分离分析提供借鉴和参考。

测定波长的选择 为了使 7 个化合物测定的含量准确、灵敏、可靠,且干扰小,本文利用二极管阵列检测器的优势,进行全波长扫描(210~ 800) nm,并结合文献报道^[1,2] 确定各化合物的检测波长分别为:香草酸(260 nm),咖啡酸、阿魏酸(320 nm),芍药苷、芍药内酯苷(230 nm),异鼠李素-3-O-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-新橙皮苷(254 nm)。

流动相的选择 分别考察了甲醇-水(含乙酸)、乙腈-水(含乙酸)、甲醇-水(含磷酸)、乙腈-水(含磷酸)等二元洗脱体系及乙腈-水(含 0.05% 磷酸)-甲醇三元洗脱系统,结果表明以乙腈-水(含 0.05% 磷酸)-甲醇三元洗脱系统进行梯度洗脱得到基线分离的色谱峰峰形较好,干扰小,稳定性较好。

稳定性试验 分析测定的 7 个化学成分中芍药内酯苷的稳定性较差,室温下样品在稀醇溶液中放置 10 h 后其含量快速衰减,因此芍药内酯苷及其原料药的测定应在 10 h 内完成为宜。

[参考文献]

- [1] 刘晓星,索志荣,郑建斌,等. RP-HPLC 法同时测定复方石韦胶囊中 5 种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(12): 1547-1549.
- [2] 张克荣,白丽,徐赞美,等. RP-HPLC 法同时测定白芍中芍药苷和芍药内酯苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(3): 222-224.