

HPLC 测定黄芪桂枝五物汤及方中药对的黄芪甲苷含量

施旭光^{*}, 许晓峰, 朱 伟, 黄兆胜
(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

[摘要] 目的: 测定黄芪桂枝五物汤不同配伍情况下黄芪甲苷的溶出量。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱条件: 色谱柱: Hypersil ODSC₁₈ 柱(4.6mm × 250mm, 5μm), 流动相: 甲醇-水(20: 80)为流动相; 检测波长: 201nm; 流速: 1.0mL/min。结果: 不同配伍组黄芪甲苷的溶出量也不同, 全方组为 0.079%, 黄桂组、黄姜组、黄白组、黄枣组、黄芪组分别为 0.079%、0.069%、0.061%、0.055%、0.062%。结论: 方中不同药味与黄芪配伍后, 对黄芪甲苷的煎出量有不同程度的影响。

[关键词] 黄芪桂枝五物汤; 高效液相色谱法; 黄芪甲苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)02-0020-03

Determination of Astragaloside in Huangqi Guizhi Wuwu Tang and its Compatible recipes by HPLC

SHI Xu-guang, Xu Xiao-feng, ZHU Wei, HUANG Zhao-sheng

(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of dissolved astragaloside in Huangqi Guizhi Wuwu Tang (HQGZWWT) and its compatible recipes. **Methods:** The contents of Astragaloside was determined by HPLC, the analysis was carried on an Hypersil C₁₈ (4.6 × 250mm, 5μm) column eluted with methanol-water (20: 80) as mobile phase and detected at 201nm, with flow rate 1.0mL/min. **Results:** The contents of dissolved astragaloside were different in the different combinations of the herbal drags dissimilar team. It was 0.076% in HQGZWWT and in Huang-Gui, Huang-Jiang, Huang-Bai, Huang-Zao and Huangqi teams, the contents of astragaloside were 0.079%、0.069%、0.061%、0.055% and 0.062% respectively. **Conclusion:** Radix Astrageli combined with dissimilar Chinese drugs in HQGZWWT would evidently affect the contents of dissolved Astragaloside.

[Key words] Huangqi Guizhi Wuwu Tang; HPLC; Astragaloside

黄芪桂枝五物汤是《金匱要略》中治疗痹症的一首名方,由黄芪、桂枝、白芍、生姜、大枣五味中药组成,具有益气温阳、温经散寒、通痹止痛的功效,可用于治疗类风湿性关节炎等疾病。本文从黄芪桂枝五物汤君臣佐使配伍关系出发,以君药黄芪为核心,进行药物配对研究,采用高效液相色谱法^[1-2]测定全方及各药对中黄芪甲苷的含量,以考察不同配伍情况对黄芪甲苷煎出量的影响。

1 材料

1.1 仪器和试剂 SUMMIT™ P680 型高效液相色谱仪(美国 DIONEX), ASF-100 型自动进样器, PDA-100 型二极管阵列检测器, STH585 柱温控制器。电热恒温水浴锅(上海医疗器械厂), BS110S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), 黄芪甲苷对照品(中国药品生物制品鉴定所提供, 0781-200109); 甲醇(色谱纯), 实验中所用其它试剂均为分析纯, 包括: 正丁醇(上海三浦化工有限公司, 批号: 20010828)、甲醇(广州化学试剂厂, 批号: 20011106-2)、无水乙醇(广州化学试剂厂, 批号: 20020301-2)、氢氧化钠(汕头市光华化学厂, 批号: 20021013)。

1.2 药材 黄芪: 膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fich.) Bge., 桂枝: *Cinnamomum cassia* Presl, 白芍: *Paeonia lactiflora* Pall., 生姜: *Zingiber officinale* Rose., 大枣: *Ziziphus jujuba* Mill., 所有中药均经过本校中药鉴定教研室李薇教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODSC₁₈ 柱(4.6mm × 250mm, 5μm), 大连依利特科学仪器有限公司; 流动相: 甲醇-水(20:80); 检测波长: 201nm; 柱温: 20℃; 流速: 1.0mL/min。

2.2 标准曲线的绘制 精密称取黄芪甲苷对照品 10.0mg, 以甲醇溶解并定容于 10mL 容量瓶中, 分别吸取对照品溶液 2.4.6.8.10μL, 按上述色谱条件进行测定。以峰面积的积分值为纵坐标(Y), 黄芪甲苷含量(mg)为横坐标(X), 绘制标准曲线, 求得回归方程: $Y = 0.3413 \times 10^3 X - 0.318$, $r = 0.9997$ 。表明黄芪甲苷在 2~10μg 范围内线性关系良好。

2.3 精密度实验 精密称取黄芪甲苷对照品 3.87mg, 以甲醇溶解并定容于 2mL 容量瓶中, 吸取对照品溶液 10μL 重复进样 5 次, 测定峰面积, 计算黄芪甲苷峰面积积分值的相对标准偏差, 其 RSD 为 1.48%。

2.4 稳定性实验 取 2.3 项下标准溶液, 每隔 30min 进样一次, 共 5 次, 每次进样量为 10μL, 测定峰面积, 计算黄芪甲苷峰面积积分值的相对标准差, 其 RSD 为 1.35%, 说明黄芪甲苷在 2.5h 内稳定性较好, 符合要求。

2.5 重复性试验 按 2.8.2 项下方法, 取同一批供试品进行 5 次测定。结果 RSD = 1.28% (n = 5), 表明重现性符合要求。

2.6 回收率实验 精密取 5 份已知黄芪甲苷含量的样品, 分别准确加入黄芪甲苷标准对照品溶液(0.46mg/mL) 2.0mL, 按供试液同法处理, 上样测定黄芪甲苷的回收率。其平均回收率为 99.8%, RSD 为 1.81%, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

n	测定黄芪甲苷量(mg)	制剂中黄芪甲苷量(mg)	添加黄芪甲苷量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	2.158	1.280	0.92	95.7		
2	2.240	1.280	0.92	104.6		
3	2.229	1.280	0.92	103.4	99.8	1.806
4	2.238	1.280	0.92	98.0		
5	2.173	1.280	0.92	97.3		

2.7 空白试验 取已提取纯化的阴性组(组成见表 2), 按样品测定项下的色谱条件测试。

2.8 样品组成及溶液的制备

2.8.1 药对组合 分为黄芪桂枝五物汤组, 黄芪-桂枝组, 黄芪-白芍组, 黄芪-生姜组, 黄芪-大枣组, 黄芪组共 6 组。各组药物组成及剂量见表 2。

2.8.2 样品溶液的制备 将以上 7 组中药按表 2 所示剂量, 分别按常法煎二次, 纱布过滤, 合并二次滤液, 并用水洗涤纱布, 水浴浓缩并定容到 100mL, 备用。

分别精密吸取不同组方的水煎剂 20mL, 用水饱和的正丁醇萃取 4 次(20, 15, 15, 10mL), 合并正丁醇液, 以 0.5% 氢氧化钠洗涤 3 次(10, 10, 5mL), 再用蒸馏水洗涤 2 次(10mL, 10mL), 弃去水层, 取正丁醇溶液置水浴上蒸干, 残渣用蒸馏水 5mL 溶解, 水溶液加至 D₁₀₁ 型大孔吸附树脂柱(1.5 × 12cm)内, 用蒸馏水 50mL 洗脱, 弃去水液, 再用 30% 乙醇 30mL 洗脱, 弃去 30% 乙醇洗脱液, 继续用 70% 乙醇 50mL 洗脱, 收集洗脱液, 置水浴上蒸干, 残渣加甲醇溶解, 移入 2mL 容量瓶中, 以甲醇稀释至刻度, 作为供试品溶液。

2.9 样品的测定 各供试品溶液进样 10 μ L, 按上述色谱条件进行测定, 按各药对取样量求出相应百分浓度, 并计算其含量, 结果见表 2 及图 1。

3 方差分析

采用 SPSS10.0 统计软件分析。根据方差齐性检验结果, 分别采用 LSD 或 Tamhane's T2 法进行分析。

表 2 黄芪桂枝五物汤及各药剂量及黄芪甲苷含量(n = 3)

配伍分组	药味及药量	每 100mL 汤剂 平均含量(%)	RSD(%)
五物汤组	黄芪 12g, 桂枝 12g, 白芍 12g 生姜 24g, 大枣 6 枚(约 18g)	0.076	2.18
黄-桂组	黄芪 12g, 桂枝 12g	0.079	1.62
黄-白组	黄芪 12g, 白芍 12g	0.061 ¹⁾	2.56
黄-姜组	黄芪 12g, 生姜 12g	0.069 ^{1,2)}	2.21
黄-枣组	黄芪 12g, 大枣 6 枚(约 18g)	0.055 ^{1,2)}	1.97
黄芪组	黄芪 12g	0.062 ¹⁾	2.26
阴性组	桂枝 12g, 白芍 12g 生姜 24g, 大枣 6 枚(约 18g)	—	—

注: 1) 表示与五物汤组、黄-桂组比较, $P < 0.01$; 2) 表示与黄-白、黄芪组比较, $P < 0.01$ 。

单因素方差分析 以黄芪桂枝五物汤不同配伍作为因素变量, 黄芪甲苷含量作为因变量, 以探讨不同配伍是否对黄芪甲苷溶出率有显著影响, 方差分析结果有显著性差异。

多重比较分析 由方差分析结果显示, 配伍使得供试液间黄芪甲苷含量存在显著差异。为进一步了解两两水煎液中黄芪甲苷含量是否存在显著差异, 作多重比较检验, 结果见表 2。

4 讨论

中药汤剂多为复方, 每种生药又含有多种化学成分, 临床共煎过程中可能产生挥发、水解、中和、沉淀等一系列十分复杂的化学物理变化, 这些变化直接影响到制剂的疗效和毒副作用。本实验采用 HPLC 考察黄芪桂枝五物汤不同配伍情况是否会影响到黄芪中黄芪甲苷的煎出量, 实验结果表明: 桂枝、生姜与黄芪配伍后能显著增加黄芪甲苷的煎出量; 白芍与黄芪配伍后, 黄芪甲苷的煎出量基本无影响; 而大枣与黄芪配伍后, 黄芪甲苷的煎出量显著下降; 五物汤全方中黄芪甲苷的煎出量显著上升, 这是方中几种药物综合作用的结果。方中黄芪与桂枝配伍后黄芪甲苷的溶出率最高, 这也从一方面说明桂枝

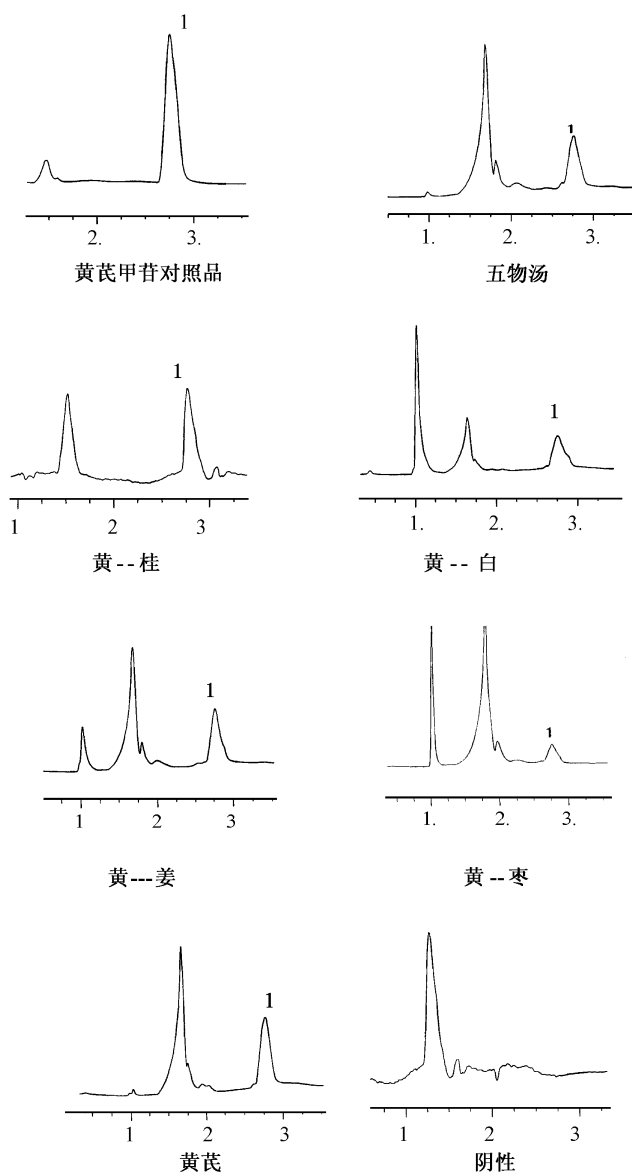


图 1 黄芪桂枝五物汤及方中药对黄芪甲苷含量色谱图

注: 各图谱中 1 表示黄芪甲苷。

作为臣药, 确实有加强君药功效的作用。

从实验中我们发现, 具有发散风寒的桂枝、生姜能显著提高黄芪甲苷的溶出量, 而具有补益作用的白芍、大枣却降低黄芪甲苷的溶出量, 具体的原因目前还不清楚, 但却提醒我们在以后的研究中是否可以考虑把该方拆成发散风寒组与补益组, 再进行药效学、化学等方面的比较研究, 进一步探讨该方的配伍规律。

[参考文献]

- [1] 王炜. 高效液相色谱法测定益气活血饮中黄芪甲苷的含量[J]. 湖南中医药导报, 1997, 3(5): 28-29.
- [2] 阎汝南, 王静竹, 刘舒平, 等. HPLC 法测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(7): 389-399.