

黄芪剂量对补阳还五汤中芍药苷、阿魏酸含量的影响

朱伟*, 王学美

(北京大学第一医院中西医结合研究所, 北京 100034)

[摘要] 目的: 比较黄芪在不同剂量情况下对补阳还五汤中芍药苷和阿魏酸含量的影响。方法: 采用高效液相色谱法测定了不同黄芪剂量(0~120g)情况下补阳还五汤中芍药苷、阿魏酸的含量, 并对测定结果进行了统计检验。结果: 黄芪剂量对补阳还五汤中的芍药苷、阿魏酸含量影响很大($P < 0.05$)。结论: 该研究为探讨方剂的组方理论提供了科学依据。

[关键词] 补阳还五汤; 黄芪; 配伍; 芍药苷; 阿魏酸; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)03-0011-04

Effects of Dosage of *Astragalus Membranaceas* on Contents of Ferulic Acid and Paeoniflorin in Buyanghuanwu Decoction

ZHU Wei, WANG Xue-mei

(Institute of Integration of Traditional and Western Medicine of Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the concentrations of ferulic acid and paeoniflorin in Buyanghuanwu decoction with different dosage of *Astragalus membranaceas*. **Methods:** The concentrations of ferulic acid and paeoniflorin in Buyanghuanwu decoction with different dosage (0~120g) of *Astragalus membranaceas* were determined by HPLC respectively. The data from the experiments were treated statistically. **Results:** It was showed concentrations of ferulic acid and paeoniflorin in Buyanghuanwu decoction were influenced significantly by the dosage of chief ingredient *Astragalus membranaceas*. ($P < 0.05$) **Conclusion:** This study provided a scientific basis to study the compatibility of formula.

[Key words] Buyanghuanwu decoction; *Astragalus membranaceas*; Compatibility; ferulic acid; paeoniflorin; HPLC

补阳还五汤出自清代著名医家王清任的《医林改错》, 功能补气活血, 祛瘀通脉^[1]。它在临床上应用十分广泛, 现代医学研究发现补阳还五汤具有抑制血小板聚集及血栓形成, 扩张脑血管, 增加脑血流, 增加冠脉流量, 降压, 强心, 抗炎, 抗凝, 增加免疫功能, 降血脂等作用^[2]。补阳还五汤在临床上使用时黄芪的用量不统一, 在10~120克之间。古人云: “中医不传之秘在用量”, 为初步阐明方中黄芪用量的科学含义以及为临床合理用药提供现代科学依据, 本研究考察了君药黄芪的不同剂量对补阳还五汤中芍药苷、阿魏酸含量的影响。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 美国 Waters 公司 HPLC 仪, 包括 600 泵、996 光电二极管阵列检测器、柱温箱、Rheodyne 7725i 手动进样器以及 Millennium32 色谱工作站; TG332A 型十万分之一双盘机械分析天平(上海天平仪器厂); 320-S 型 PH 计(上海梅特勒-托利多公司); KQ-50 型超声波清洗器(昆山超声波仪器厂); MO-2 型调温型电热套(河北省黄骅市新兴电器厂); TDGC-1 型接触调压器(中国人民电器集团公司); KSHB-3 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂)。

1.2 供试药材 中药饮片黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceas* var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 赤芍为毛茛植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 当归为伞形科植物

[收稿日期] 2005-04-12

[通讯作者] 朱伟, Tel: (010) 66551122-3053; E-mail: zwwbx@163.

com

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的干燥根, 红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的干燥虫体, 桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥种子。以上中药饮片均于 2004 年 4 月 5 日统一购自宁波市医药公司, 经浙江医药高等专科学校中药鉴定教研室杨雄志副教授鉴定符合《中国药典》2000 年版标准, 样品凭证标本存于我校中药标本室。

芍药苷和阿魏酸对照品购自中国药品生物制品检定所, 面积归一化法测定纯度均 > 99%。甲醇为进口色谱纯 (Fisher 公司), 冰醋酸为分析纯; Millipore 超纯水。

2 实验方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 将组成补阳还五汤各单味药供试饮片粉碎, 45℃ 恒温干燥 2h, 置干燥器中存放 5d。然后除黄芪外 6 种药材依照《医林改错》古方按方剂比例称重, 当归 6g、地龙 3g、赤芍 4.5g、川芎 3g、桃仁 3g、红花 3g。根据黄芪的剂量不同分成 6 组: A 组黄芪 120g; B 组黄芪 90g; C 组黄芪 60g; D 组黄芪 30g; E 组黄芪 10g; F 组黄芪 0g。上述 6 组药材充分混合, 分别置于 1000mL 烧杯中, 加 500mL 水浸泡 30min, 武火煎煮沸腾后, 文火再煎 30min, 共煎 2 次, 每次 30min, 合并提取液, 静置 24h。将煎好的补阳还五汤用重蒸馏水定容至 1000mL, 摇匀, 1500g·min⁻¹ 离心 10min, 上清液用 0.22μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液备用。

2.2 空白对照溶液的制备 分别取缺赤芍的空白

样品和缺川芎、当归的空白样品, 照供试品溶液制备方法制备芍药苷阴性对照品和阿魏酸阴性对照品。

2.3 高效液相色谱条件 色谱柱 Symmetry C₁₈ 柱 (4.6mm × 150mm, 粒径 5μm); 流动相 1% (体积分数) 乙酸: 甲醇 = 70: 30, v/v, pH 值 3.15; 流速 1.0mL·min⁻¹; 柱温 30℃; 检测波长: 芍药苷 230nm; 阿魏酸 320nm; 进样量: 20μL, 理论塔板数按阿魏酸色谱峰计算大于 4000, 灵敏度 0.01AUFS。

2.4 色谱峰的定性 在此条件下芍药苷和阿魏酸都能达到理想的分离结果 (见图 1、图 2)。本实验在相同的色谱条件下, 将样品色谱图与芍药苷、阿魏酸的标准色谱图进行对照, 根据保留时间和及光谱图对补阳还五汤中的芍药苷和阿魏酸定性, 图中峰号 a、b 的物质分别为阿魏酸 ($t_R = 5.98\text{min}$) 和芍药苷 ($t_R = 11.45\text{min}$)。各色谱峰的峰形和分离度好, 可以准确测定其峰面积, 并以峰面积进行定量分析。

2.5 标准曲线的绘制 精密称取芍药苷 4.46mg 和阿魏酸 0.22mg, 甲醇定容至 10mL, 摇匀, 得 446μg·mL⁻¹ 芍药苷溶液和 22μg·mL⁻¹ 阿魏酸溶液。精密吸取芍药苷、阿魏酸标准溶液适量于 6 个 10mL 棕色容量瓶中, 加甲醇定容, 得到系列浓度标准品溶液。分别进样 20μL 测定, 以芍药苷、阿魏酸对照品的浓度 (μg·mL⁻¹) 为横坐标, 以其峰面积积分为纵坐标绘制标准曲线, 各成分的线性范围、回归方程、相关系数如表 1。

2.6 最低检测限 取对照品储备液, 加甲醇稀释成不同浓度的对照品溶液, 按上述条件, 纪录色谱图, 以相当于基线噪音的 3 倍信号相应的浓度为最低检

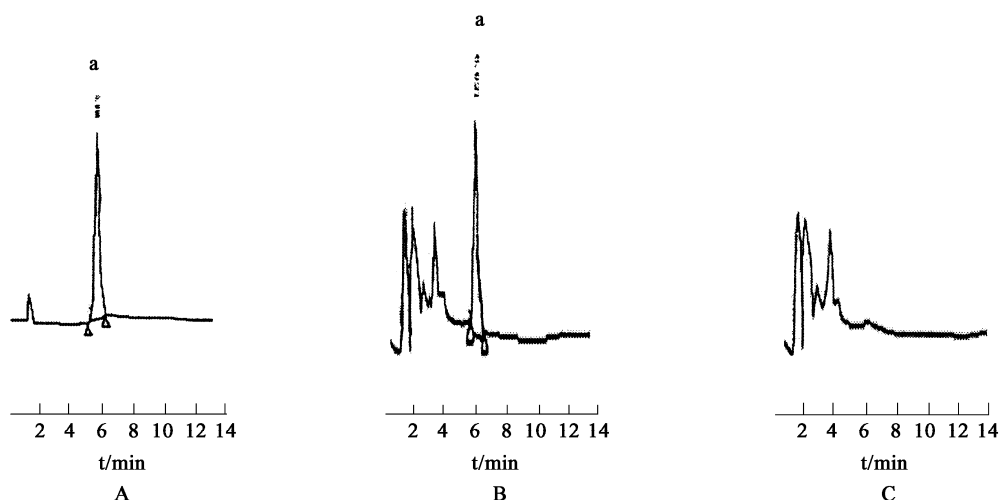


图 1 阿魏酸高效液相色谱图

A. 阿魏酸对照品 B. 供试品 C. 阴性对照

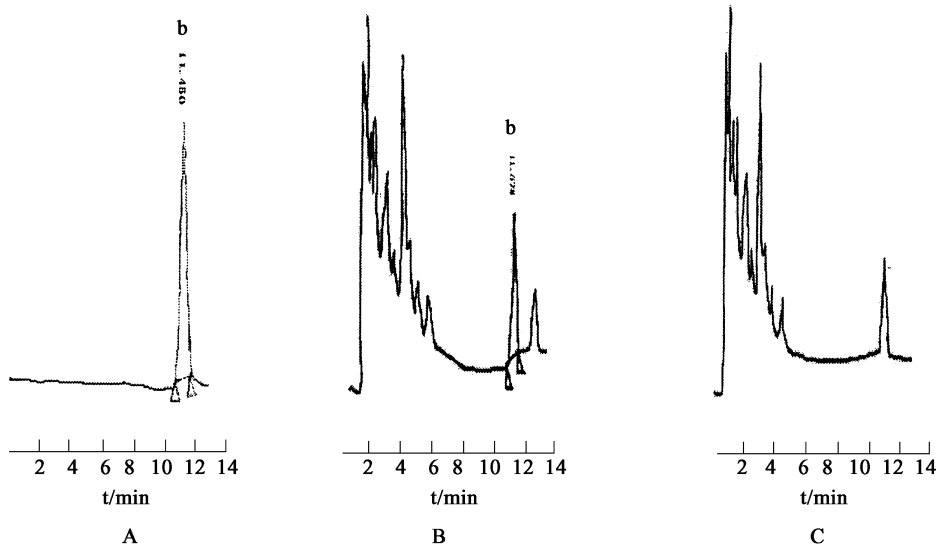


图 2 芍药苷高效液相色谱图
A. 芍药苷对照品 B. 供试品 C. 阴性对照

测浓度, 结果见表 1。

表 1 芍药苷、阿魏酸的线性范围、回归方程、
相关系数和最低检测限

样品名称	线性范围 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回归方程	相关系数 (r)	最低检测浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
芍药苷	4~24	$Y=87.705X-4.934$	0.9999	0.1
阿魏酸	0.1~2	$Y=120.799X+91.816$	0.9998	0.02

2.7 样品稳定性考察 将配制好的供试液在室温(20℃)下放置, 分别在 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48h 进样 20 μL 测定, 计算峰面积的变异系数。结果显示芍药苷和阿魏酸峰面积积分值基本一致, RSD 分别为 2.98% 和 4.14%。证明待测液中芍药苷和阿魏酸在 48h 内是稳定的。

2.8 精密度的考察 日内精密度: 精密吸取芍药苷、阿魏酸对照品混合液 20 μL , 重复进样($n=6$)。测定峰面积, 计算日内变异系数, RSD 分别为 3.10% 和 2.31%。日间精密度: 取上述对照品混合液, 按不同天数测定($n=6$), 计算日间变异系数, RSD 分别为 5.18% 和 2.94%。这表明仪器精密度良好。

2.9 供试溶液制备重复性考察 将“供试溶液的制备”过程重复 5 次后, 计算峰面积的变异系数, HPLC 测定结果显示芍药苷和阿魏酸 RSD 分别为 3.57% 和 1.09%。

2.10 统计学处理 结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理, 两两比较采用 student's t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著

意义, $P < 0.001$ 为差异有显著意义。

2.11 不同配伍组芍药苷和阿魏酸的含量测定 上述制备的各配伍组样品进行 HPLC 测定, 结果见表 2。结果显示除 C 组和 D 组中芍药苷的含量差异无显著性外, 其余各组之间的差异均为极显著性。阿魏酸除在 A 组和 D 组、B 组和 C 组、E 组和 F 组中的含量差异无显著性外, 其余各组之间的差异也均为极显著性。

表 2 补阳还五汤中芍药苷、阿魏酸的含量($\bar{x}\pm s, n=3$)

黄芪	剂量(g)	芍药苷($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	阿魏酸($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
A	120	42.17 ± 1.54	$2.02\pm 0.10^{2)}$
B	90	24.87 ± 0.32	$1.62\pm 0.13^{3)}$
C	60	$30.17\pm 0.43^{1)}$	$1.68\pm 0.03^{3)}$
D	30	$32.07\pm 1.47^{1)}$	$1.97\pm 0.03^{2)}$
E	10	76.77 ± 1.51	$2.83\pm 0.06^{4)}$
F	0	55.78 ± 1.57	$2.88\pm 0.01^{4)}$

芍药苷组¹⁾ $P > 0.05$; 阿魏酸组²⁾ $P > 0.05$, ³⁾ $P > 0.05$, ⁴⁾ $P > 0.05$; 其余各组两两比较均 $P < 0.001$ 。

3 讨论

同时测定中药复方中芍药苷和阿魏酸含量的方法已有报道^[3], 但同时测定补阳还五汤中芍药苷和阿魏酸的方法未见报道。为进行方剂配伍规律的研究, 我们建立了同时测定补阳还五汤中芍药苷和阿魏酸的方法。从实验结果可以看出: 在本实验条件下, 可排除干扰, 在 15min 内一次进样分离测定补阳还五汤中 2 个活性成分: 芍药苷和阿魏酸, 方法简便、快速, 分析精度好, 结果可靠, 成本低廉, 具有良好的灵敏度和重复性。

君药是针对主病或主证起治疗作用的药物^[4],补阳还五汤中重用黄芪为君药,取其补气以行血通络之意。现代研究发现黄芪甲苷是黄芪中含量较高和专属性较强的成分,它可以降低血脑屏障的通透性,保护脑组织^[5]。但同时我们应该注意到自古以来中医就有“药有个性之长,方有合群之妙”的说法。现代学者也普遍认为中药复方的疗效与方中的各个成分有关,单个活性成分的药理作用并不能完全代表整个方剂的生物活性^[6]。阿魏酸和芍药苷分别是补阳还五汤中川芎、当归及赤芍的主要成分,由本实验结果可知在 0~120g 的范围里,君药黄芪剂量对补阳还五汤中的芍药苷、阿魏酸含量影响很大。芍药苷的含量在补阳还五汤中由高往低依次为黄芪 10g> 0g> 120g> 30g> 60g> 90g,阿魏酸的含量则由高往低则依次为黄芪 0g> 10g> 120g> 30g> 60g> 90g。这说明黄芪作为君药,其用量在补阳还五汤全方中发挥重要作用,这符合传统的中医理论。此外汤剂中药化学成分含量的变化必然会影响药效,本

实验结果提示在临床上使用补阳还五汤如需使用小剂量黄芪,以 10g 为宜,但当黄芪的剂量需要加大时,用量最好达到 120g。

【参考文献】

- [1] 清.王清任.医林改错[M].天津:天津科学技术出版社,1999.16.
- [2] 陈可冀,史载祥.实用血瘀证学[M].北京:人民卫生出版社,1999.192-193.
- [3] 李顺意,蔡敏,韩凤梅,等.高效液相色谱法测定八珍益母颗粒中芍药苷和阿魏酸的含量[J].中国中药杂志,2001,26(9):631-632.
- [4] 段富津.方剂学[M].上海:上海科学技术出版社,1995.8.
- [5] 罗玉敏,秦震.黄芪甲苷对大鼠局灶脑缺血血脑屏障破坏的影响[J].中国临床神经科学,2000,8(4):280-281.
- [6] Xue T, Roy R. Studying traditional Chinese medicine [J]. Science, 300: 740-741.