

高效液相色谱法测定补阳还五汤及总苷部位中 黄芪甲苷的含量

贺庆平¹, 贺福元^{1*}, 邓凯文², 刘文龙¹

(1. 湖南中医学院药学院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医学院附一医院, 湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的: 建立补阳还五汤及总苷中黄芪甲苷 HPLC 测定法。方法: 色谱柱 C_{18} 4.6 × 250mm, 5 μ m, 检测波长: 203nm, 流动相: 乙腈: 水 (33: 67), 流速: $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱压: $15.17 \pm 0.4137\text{MPa}$, 温度: 45℃。结果: 黄芪甲苷在 2~ 10 μ g 内浓度与色谱峰面积呈良好的线性关系, $r = 0.9997$, 加样回收率为 100.3%, RSD 为 1.038%, 补阳还五汤、总苷中黄芪甲苷的 6 批不同产地的药材所得制剂的平均含量分别为 $0.9395\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $11.44\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论: 该法简便、准确, 所测结果稳定、重现性好, 可以用于补阳还五汤总苷的质量控制。补阳还五汤及总苷因药材产地不同, 其黄芪甲苷含量有较大差异。

[关键词] 补阳还五汤; 总苷; 黄芪甲苷; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)07-0003-03

补阳还五汤 (Buyanghuiwu Decoction, BYHWD) 系清代王清任《医林改错》首载, 该方由黄芪、当归、芍药、川芎、桃仁、红花、地龙组成, 具有补气、通络的功能。在抗血栓、抗脑血栓、抗衰老、抗血脂及免疫功能方面都有广泛的作用^[1]。我们发现其总苷类成分部位具有显著的抗血栓活性。其主要有效成分为黄

芪甲苷。为了对其提取工艺及补阳还五汤、总苷有效部位进行质量控制, 本文作者对其含量测定方法进行了方法学研究, 并对补阳还五汤及总苷中黄芪甲苷进行了含量测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Water 公司的高效液相色谱仪 (Breeze system, 1500pump, Waters 2487 Dual Absorbance Detector)。黄芪甲苷对照品 (批号 110736-200424) 购于国家药品生物制品检定所, 甲醇、乙腈为色谱纯, 蒸馏水为二次重蒸馏水, 其它试剂均为分析纯。其

[收稿日期] 2005-08-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (30472199)。

[通讯作者] 贺福元, Tel: (0731) 5381372; E-mail: phamsharking@tom.com

复方药材为: 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao 干燥根; 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels 的干燥根; 川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort 的干燥根; 赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall 的干燥根茎; 桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (Linn) Batsch 的干燥成熟种子; 红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花; 地龙为环节动物门钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (perrier) 的干燥虫体。处方: 黄芪 60g, 当归 9g, 川芎 6g, 赤芍 9g, 桃仁 9g, 红花 9g, 地龙 9g。总苷部位采用水提醇沉法提取, 阳离子树脂吸附除去碱性物质, 再用氯仿萃取亲脂性成分, 余下亲水性物质用大孔树脂精制而成。由本药剂教研室制备。

1.2 方法与条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱, 4.6 × 250mm, 5μm, 检测波长: 203nm, 流动相: 乙腈: 水 (33: 67), 流速: 1mL·min, 45℃。

1.2.2 样品处理及制样 全方供试品溶液制备: 取全方处方量药材 111.0g, 称定, 用 8 倍量蒸馏水回流提取 2 次, 每次 1h, 过滤、浓缩、定容至 100mL, 精密吸取水液 2mL, 加入甲醇 8mL, 微孔滤膜滤过沉淀, 滤液水浴上蒸干, 再加 1mL 甲醇溶解并定容制得供试品溶液。

总苷供试品溶液制备 取总苷部位 0.2g, 精密称定, 加入乙醇 50mL, 滤过, 弃去初滤液 10mL, 收集续滤液 20mL, 水浴上蒸干, 残渣再加甲醇, 微孔滤膜滤过, 定容至 1mL 制得总苷供试品溶液。

阴性对照溶液 取全方不含黄芪药材, 按相同工艺制得的阴性对照样品, 按全方供试品溶液项下方法操作制备, 即得。

黄芪甲苷对照品溶液 精密称取黄芪甲苷对照品 8.0mg, 用甲醇定容至 10mL, 制得每 mL 含黄芪甲苷 0.8mg 的对照品液。

1.2.3 样品测定 精密吸取黄芪甲苷对照品液、供试品溶液各 10μL, 进样测定黄芪甲苷的含量。

2 结果

2.1 系统适应性研究 黄芪甲苷对照品液、全方样品、阴性样品、甲醇, 在上述色谱条件下进样测定, 得色谱图 (图 1)。由图 1 可知, 样品液中黄芪甲苷峰在保留时间为 25min 左右可完全分离。

2.2 标准曲线制备及线性关系考察 取黄芪甲苷

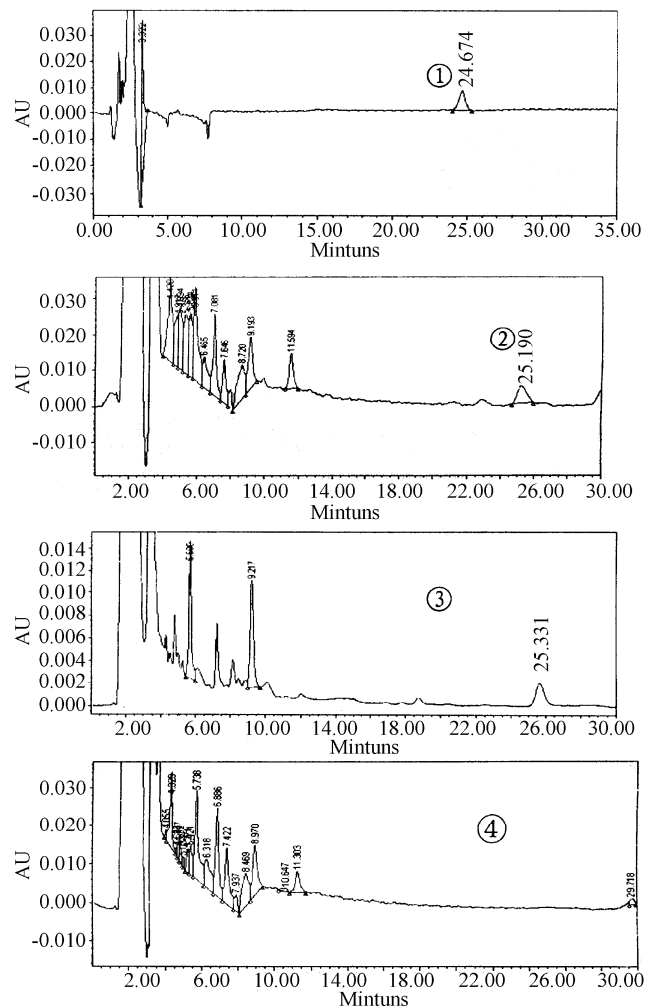


图 1 色谱图

①黄芪甲苷对照品; ②补阳还五汤样品液;
③总苷样品液; ④阴性样品液

对照品, 制得 $0.4801\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄芪甲苷甲醇对照品液, 分别加入 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 2.5μL, 在上述色谱条件下进行测定, 以黄芪甲苷面积为纵坐标, 黄芪甲苷进样量为横坐标进行线性回归处理, 得回归方程为: $C = 2.424 \times 10^{-5}A - 1.069$, 结果表明黄芪甲苷在 2.4~12μg 范围内呈良好线性 ($r = 0.9997$)。在本实验条件下, 黄芪甲苷的最低检测浓度为 $12\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N > 3$)

2.3 稳定性试验 取同一供试品溶液 (批号: 040725), 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 32, 48h 进样分析, 记录峰面积, 结果当时间为 16h, 得 RSD 为 3.28%, 表明供试品溶液在 10h 内稳定。

2.4 精密度试验 吸取黄芪甲苷对照品溶液, 连续进样 5 次, 记录峰面积, RSD 为 1.74%, 表明方法精密度良好。

2.5 重复性试验 取补阳还五汤药材 5 份, 煎提 5 份样品液, 按供试品溶液的制备方法 5 份供试品溶液, 进样测定峰面积, 计算各份黄芪甲苷含量为,

RSD 值为 1.05%, 结果表明方法重复性良好。

2.6 回收率试验 精密吸取已知含量的供试品溶液(批号: 040725) 1mL, 分别加入对照品溶液制成高、中、低 3 个浓度, 按上述色谱方法进行测定, 平均回收率为 100.3%, RSD 为 1.038%, 如表 1。

表 1 补阳还五汤中黄芪甲苷的加样回收率

| 黄芪甲苷 样品 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 所加入的 黄芪甲苷 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 所测出的 黄芪甲苷 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 加样回 收率 (%) | 平均 回收率 (%) | RSD (%) |
|--|--|--|------------------|------------------|------------|
| 490.2 | 240.0 | 735.7 | 102.2 | | |
| 490.2 | 240.0 | 730.6 | 100.1 | | |
| 490.2 | 480.1 | 965.0 | 98.9 | 100.3 | 1.038 |
| 490.2 | 480.1 | 972.3 | 100.4 | | |
| 490.2 | 960.2 | 1449.0 | 99.9 | | |
| 490.2 | 960.2 | 1451.3 | 100.1 | | |

2.7 样品测定 取不同批号的补阳还五汤、总苷样品液, 对照品溶液, 进样 10 μL , 测定峰面积, 用外标法计算黄芪甲苷的含量, 结果见表 2。

表 2 不同批次补阳还五汤及总苷中黄芪甲苷的含量

| 批号 | 黄芪甲苷含量 | |
|--------|---|-------------------------------------|
| | 补阳还五汤($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 总苷($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) |
| 040505 | 1.0040 | 16.390 |
| 040612 | 1.9450 | 22.040 |
| 040725 | 0.8108 | 8.737 |
| 040823 | 0.7689 | 8.128 |
| 041027 | 0.5946 | 6.947 |
| 041134 | 0.5135 | 6.404 |

3 讨论

黄芪甲苷为四环三萜皂苷类成分, 紫外吸收较差, 在 200nm 处产生一个肩峰, 易受溶剂干扰, 笔者尝试用过改用蒸发光散射检测(ELSD)^[2], 但发现其灵敏度受中药复方其它成分的干扰, 易于降低。所以仍然选用紫外检测器, 波长定在 203nm。流动相以乙腈: 水为 33: 67 较适宜, 在此条件下, 补阳还五汤中黄芪甲苷的保留时间为 25min 左右, 黄芪甲苷峰与其他干扰峰分离完全, 阴性样品图谱无干扰, 该条件可用于黄芪甲苷的含量测定。

由表 2 可知, 6 批药材补阳还五汤中黄芪甲苷含量平均为 $0.9395\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 总苷中黄芪苷含量平均为 $11.44\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 不同产地的黄芪所制成的补阳还五汤和总苷其黄芪甲苷的含量相差较大, 但补阳还五汤与总苷中的黄芪甲苷含量呈相关性, 这说明有效成分部位的分离工艺对黄芪甲苷的分离是稳定的。药材配伍对其溶解性影响不大。

[参考文献]

- [1] 王敏, 邓常青, 贺福元. 补阳还五汤抗脑缺血作用的研究概况与展望[J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(4): 71.
- [2] 迪马公司. 蒸发光散射检测器应用文献和技术参考[M]. 北京: 迪马公司出版, 2002. 6.
- [3] 万日义, 刘锡钧. 黄芪及其制剂中有效成分鉴别和含量测定研究概述[J]. 海峡药学, 1998, 10(1): 7.