

RP-HPLC法同时测定补阳还五汤中3种指标成分的含量^Δ

刘海涛^{1,2*}, 雷鹏^{1,2#}, 唐涛³, 刘英慧^{1,2}, 黄琪^{1,2} (1.中南大学湘雅医院药剂科, 长沙 410008; 2.中南大学药学院, 长沙 410013; 3.中南大学湘雅医院中西医结合研究所, 长沙 410008)

中图分类号 R283.661; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0232-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.14

摘要 目的: 建立同时测定补阳还五汤中芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸含量的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Odyssey C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水-0.1%磷酸(16:64:20, V/V/V), 检测波长为230 nm(芍药苷)、260 nm(毛蕊异黄酮苷)、328 nm(阿魏酸), 流速为1.0 ml/min, 柱温为30 ℃。结果: 芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸的进样量分别在0.096 4~0.964 0 μg ($r=0.999 2$)、0.099 0~0.990 0 μg ($r=0.999 6$)、0.008 36~0.083 6 μg ($r=0.999 4$) 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系; 三者的平均加样回收率分别为99.72%、99.14%和97.96%, RSD分别为0.5%、1.1%和1.4% (n 均为6)。结论: 本方法简便、快速、灵敏度高、重复性好, 适用于补阳还五汤的质量控制。

关键词 反相高效液相色谱法; 补阳还五汤; 芍药苷; 毛蕊异黄酮苷; 阿魏酸; 含量测定

Simultaneous Determination of 3 Index Components in Buyang Huanwu Decoction by RP-HPLC

LIU Hai-tao^{1,2}, LEI Peng^{1,2}, TANG Tao³, LIU Ying-hui^{1,2}, HUANG Qi^{1,2} (1. Dept. of Pharmacy, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China; 2. College of Pharmacy, Central South University, Changsha 410013, China; 3. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of paeoniflorin, calycosin and ferulic acid in Buyang huanwu decoction. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Odyssey C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water-0.1% phosphate acid (16:64:20, V/V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 230 nm (paeoniflorin), 260 nm (calycosin) and 328 nm (ferulic acid). The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges were 0.096 4-0.964 0 μg ($r=0.999 2$) for paeoniflorin, 0.099 0-0.990 0 μg for calycosin ($r=0.999 6$) and 0.008 36-0.083 6 μg for ferulic acid ($r=0.999 4$), respectively. The average recoveries were 99.72% for paeoniflorin (RSD=0.5%, $n=6$), 99.14% for calycosin (RSD=1.1%, $n=6$) and 97.96% for ferulic acid (RSD=1.4%, $n=6$). CONCLUSION: The method is simple, quick, sensitive and reproducible for the quality control of Buyang huanwu decoction.

KEY WORDS RP-HPLC; Buyang huanwu decoction; Paeoniflorin; Calycosin; Ferulic acid; Content determination

补阳还五汤出自清代王清任《医林改错》, 全方由黄芪、当归尾、赤芍、川芎、红花、桃仁、地龙组成, 主要用于治疗气虚血瘀、中风后遗症, 为益气活血法之代表方剂^[1]。现代药理学研究表明, 处方中赤芍的活性成分芍药苷以及当归尾和川芎中共有成分阿魏酸是抑制血小板凝集的主要有效成分, 具有明确的抗凝血及抗血小板聚集作用^[2-4]; 毛蕊异黄酮苷为本方中黄酮类代表性成分, 具有良好的清除氧自由基、减少细胞脂质过氧化物及血浆中的总胆固醇、升高细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性及维持细胞正常代谢功能的作用^[5-6]。目前对补阳还五汤多指标成分的质量控制方法研究较少^[7-9], 故笔者以芍

药苷、毛蕊异黄酮苷和阿魏酸为补阳还五汤的定量指标, 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时对其测定, 为该方剂的质量控制及新药开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1100 HPLC 仪, 包括G1311A 四元梯度泵、G1313A 自动进样器、G1315A 二极管阵列检测器(美国安捷伦科技有限公司); AG285 分析天平(瑞士Mettler Toledo公司); KS-600D 超声清洗仪(宁波科生仪器厂); R-1001N 旋转蒸发器、SHB-B95A 真空泵(郑州长城科工贸有限公司); 98-1-B 电子调温电热套(天津泰斯特仪器有限公司)。

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.30873221、No.81173175); 湖南省自然科学基金项目(No.10JJ2023)

* 硕士研究生。研究方向: 中药质量标准及制剂研发。E-mail: sdhwllht@126.com

通信作者: 副教授, 硕士研究生导师。研究方向: 中药质量标准及制剂研发。电话: 0731-84327584。E-mail: lp7222003@163.com

本栏目协办

江阴天江药业有限公司

地址: 江苏省江阴市经济开发区秦望山路8号 电话: 400 066 9211
传真: 0510-86409611 网址: <http://www.tianjiang.com>

1.2 试剂

芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$,批号分别为20633674、23180576、1135246);乙腈(色谱纯,美国天地有限公司);水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

黄芪、赤芍、川芎、当归尾、桃仁、红花、地龙均购于中南大学湘雅医院中药房,经中南大学湘雅医院药剂科刘韶副教授鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Odyssil C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水-0.1%磷酸(16:64:20, V/V/V);柱温:30 $^{\circ}$ C;检测波长:230 nm(芍药苷)、260 nm(毛蕊异黄酮苷)、328 nm(阿魏酸);流速:1.0 ml/min;进样量:10 μ l。

2.2 系统适用性试验

在“2.1”项下色谱条件下,样品中芍药苷、毛蕊异黄酮苷和阿魏酸与相邻色谱峰均可达到基线分离。理论板数均不低于5 000。色谱见图1。

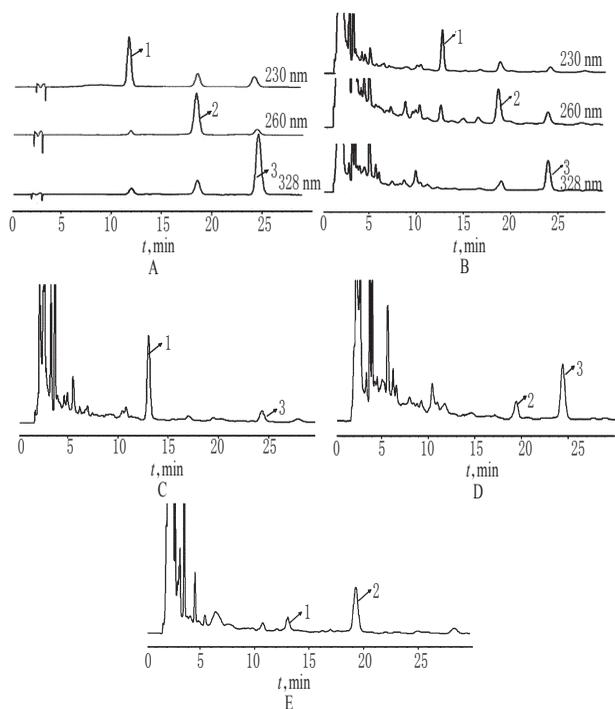


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.缺黄芪阴性对照;D.缺赤芍阴性对照;E.缺川芎和当归尾阴性对照;1.芍药苷;2.毛蕊异黄酮苷;3.阿魏酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed control; B. test samples; C. negative control without Astragalus Radix; D. negative control without Paeonia Radix Rubra; E. negative control without Ligusticum Chuanxiong and Angelica sinensis; 1. peoniflorin; 2. calycosin; 3. ferulic acid

2.3 对照品溶液的制备

精密称取对照品芍药苷4.82 mg、毛蕊异黄酮苷4.95 mg,分别置50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,得芍药苷和毛蕊异

黄酮苷的对照品溶液。精密称取阿魏酸对照品10.45 mg,置50 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,得阿魏酸对照品贮备液;再精密移取阿魏酸对照品贮备液2.0 ml,置50 ml量瓶中,加甲醇定容,得阿魏酸对照品溶液。将上述3种对照品溶液按1:1:1(V/V/V)混合,即得混合对照品溶液。

2.4 补阳还五汤的制备

称取生黄芪20 g、当归尾3 g、赤芍3 g、川芎2 g、桃仁3 g、红花3 g、地龙3 g,加水回流提取2次(10倍量、8倍量),每次45 min。趁热滤过,合并提取液,减压浓缩至100 ml,即得补阳还五汤浓缩液。

2.5 供试品溶液的制备

精密量取“2.4”项下补阳还五汤浓缩液2.0 ml,置25 ml量瓶中,加70%甲醇约20 ml,超声(功率:300 W,频率:40 kHz)处理30 min。取出,放冷,以70%甲醇定容,微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.6 阴性对照溶液的制备

照处方量分别制备缺黄芪、缺赤芍、缺当归尾和川芎的阴性样品,按“2.5”项下方法制备阴性对照溶液。

2.7 线性关系考察

分别精密吸取芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸对照品溶液1、2、4、6、8、10 μ l,按“2.1”项下色谱条件依次进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(Y)对进样量(X)进行线性回归,得芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸的回归方程分别为 $Y=104.90X+11.736$ ($r=0.9992$, $n=6$)、 $Y=140.17X+5.128$ ($r=0.9996$, $n=6$)、 $Y=37.247X+4.76$ ($r=0.9994$, $n=6$)。结果表明,芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸的进样量分别在0.096 4~0.964 0、0.099 0~0.990 0、0.008 36~0.083 6 μ g范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.8 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液10 μ l,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸峰面积的RSD分别为0.7%、0.6%和0.5%(n 均为6),表明仪器精密度良好。

2.9 稳定性试验

取同一供试品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件分别于0、2、4、8、10、12 h进样,记录峰面积。结果,芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸平均含量的RSD分别为0.7%、1.7%和1.2%(n 均为6),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.10 重复性试验

取同一批样品适量,按“2.5”项下方法平行制备6份供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积,计算样品含量。结果,芍药苷、毛蕊异黄酮苷、阿魏酸平均含量的RSD分别为0.9%、2.2%和1.8%(n 均为6),表明本方法重复性良好。

2.11 加样回收率试验

精密量取已知含量的同一批补阳还五汤浓缩液1.0 ml,共6份,分别精密加入适量对照品溶液,按“2.5”项下方法制成供试品溶液,照上述色谱条件测定,计算加样回收率,结果见

表1。

表1 加样回收率试验结果(n=6)
Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

指标成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %			
芍药苷	327.62	327.76	652.66	99.17	99.72	0.5			
	327.62	327.76	655.02	99.89					
	327.62	327.76	654.79	99.82					
	327.62	327.76	652.50	99.12					
	327.62	327.76	654.56	99.75					
	327.62	327.76	657.32	100.59					
	毛蕊异黄酮苷	82.62	89.10	170.08			98.16	99.14	1.1
		82.62	89.10	172.66			101.06		
		82.62	89.10	171.01			99.20		
		82.62	89.10	170.01			98.08		
82.62		89.10	171.37	99.61					
阿魏酸	20.60	20.90	41.16	98.36	97.96	1.4			
	20.60	20.90	40.94	97.28					
	20.60	20.90	41.54	100.16					
	20.60	20.90	40.99	97.56					
	20.60	20.90	40.70	96.17					
	20.60	20.90	41.13	98.23					

2.12 样品含量测定

按处方比例称取各药材,照“2.5”项下方法制备补阳还五汤浓缩液,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积计算样品中芍药苷、毛蕊异黄酮苷和阿魏酸的含量。同一样品进行3次平行试验,以3次测得的平均值计,结果见表2。

表2 样品中指标成分的含量测定结果(n=3)

表2 Content determination of index components in samples(n=3)

样品号	芍药苷		毛蕊异黄酮苷		阿魏酸	
	含量,mg/剂	RSD, %	含量,mg/剂	RSD, %	含量,mg/剂	RSD, %
1	35.33	0.8	8.91	1.3	4.44	1.5
2	42.04	0.9	9.89	1.2	3.22	1.7
3	53.09	1.9	8.88	1.6	3.83	0.8
4	45.88	1.2	11.27	0.9	3.02	1.1

3 讨论

3.1 指标成分的选择

补阳还五汤中化学成分众多,本试验首次以芍药苷、毛蕊异黄酮苷和阿魏酸分别作为本方中萜类、黄酮类、有机酸类3类成分的定量指标,建立了RP-HPLC法用于同时测定其含量,方法简便、可靠。

3.2 流动相的选择

本试验考察了水-甲醇、水-乙腈以不同比例作流动相的结果,并参考了相关文献^[7-9]进行操作。结果,3种指标成分峰形差,分离效能相对较低。在添加磷酸盐缓冲液后,峰形和柱效

均有明显改善,故最终确定流动相为乙腈-水-0.1%磷酸(16:64:20, V/V/V)等度洗脱。在此条件下,3种指标成分均保持了较高的分离效能。

3.3 提取溶剂的选择

试验中对比了60%、70%、80%、100%甲醇及乙醇作为提取溶剂,超声提取30 min对浓缩液中指标成分的提取率。结果,不同浓度的甲醇对3种指标成分的提取率明显高于同浓度的乙醇。再对比不同浓度的甲醇,发现70%甲醇的提取率相对高于其他浓度的甲醇,故最终采用70%甲醇作为提取溶剂。

3.4 检测波长的选择

设定单波长测定时,仅能保证一种指标成分的峰面积最大,其他两种指标成分无法达到最大紫外吸收。因此,为了能真实、准确地反映补阳还五汤中芍药苷、毛蕊异黄酮苷和阿魏酸的含量,本试验中设定检测波长为230 nm、260 nm及328 nm,以保证3种指标成分的紫外吸收均在最大处,从而保证了本试验方法的准确性。

参考文献

- [1] 徐泽红,吴英辉.补阳还五汤近十年的研究进展[J].中医药导报,2006,12(5):97.
- [2] 李文,殷小杰,廖福龙,等.六种产地赤芍对大鼠抗凝血及抗血小板聚集作用的比较[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(6):30.
- [3] 朱传武,彭康,佟丽.补阳还五汤水煎剂中黄芪甲苷、阿魏酸、多糖的含量测定[J].中华中医药学刊,2007,25(3):476.
- [4] 王芳,李东.当归的化学及药理研究进展[J].中国药房,2003,14(10):630.
- [5] 汪德清,丁保国, Torts GN,等.黄芪总黄酮对动脉粥样硬化早期形成的影响[J].中国药理学通报,2003,19(6):637.
- [6] 梁连生,余静.黄芪中黄酮化合物的药理作用[J].中西医结合心脑血管病杂志,2005,3(12):1 085.
- [7] 张军,陈汀波,陈军,等.HPLC法同时测定补阳还五汤中毛蕊异黄酮苷、芍药苷、羟基红花黄色素A的含量[J].中药新药与临床药理,2009,20(4):373.
- [8] 朱伟,王学美.黄芪剂量对补阳还五汤中芍药苷、阿魏酸含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(3):11.
- [9] 刘元媛,卢静华,郭伟英,等.RP-HPLC法测定抗感颗粒中芍药苷和绿原酸的含量[J].中国药房,2011,22(40):3 820.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-03-27)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅