

RP-HPLC法同时测定加味补阳还五汤剂中4种成分的含量^Δ

王忠成^{1*}, 顾尔莉^{1#}, 王身艳², 王芳芳¹, 俞冲¹, 朱敏¹ (1.南通市第三人民医院, 江苏南通 226000; 2.南京中医药大学药学院, 南京 210023)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)27-3849-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.27.29

摘要 目的: 建立同时测定加味补阳还五汤剂中芍药苷、苦杏仁苷、阿魏酸、川芎嗪含量的方法。方法: 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 YMC C₁₈, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 320 nm(阿魏酸)、230 nm(芍药苷)、207 nm(苦杏仁苷)、280 nm(川芎嗪), 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果: 芍药苷、苦杏仁苷、阿魏酸和川芎嗪检测质量浓度线性范围分别为 0.191 2~1.912 μg/mL ($r=0.999\ 6$)、0.117 4~1.174 μg/mL ($r=0.999\ 6$)、0.011 5~0.115 μg/mL ($r=0.999\ 8$) 和 0.001 66~0.016 6 μg/mL ($r=0.999\ 7$); 定量限分别为 1.912、1.174、0.115、0.016 6 μg/mL, 检测限分别为 0.25、0.40、0.05、0.008 5 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD < 2.0%; 加样回收率分别为 96.9%~100.3% (RSD=1.3%, $n=6$)、95.1%~100.3% (RSD=2.2%, $n=6$)、95.3%~100.2% (RSD=2.0%, $n=6$)、97.0%~100.0% (RSD=1.3%, $n=6$)。结论: 该方法可靠、简便、准确, 适用于同时测定加味补阳还五汤剂中芍药苷、苦杏仁苷、阿魏酸、川芎嗪的含量。

关键词 反相高效液相色谱法; 加味补阳还五汤; 芍药苷; 苦杏仁苷; 阿魏酸; 川芎嗪; 含量测定

Simultaneous Determination of 4 Components in Modified Buyang Huanwu Decoction by RP-HPLC

WANG Zhongcheng¹, GU Erli¹, WANG Shenyan², WANG Fangfang¹, YU Chong¹, ZHU Min¹ (1. Nantong Third People's Hospital, Jiangsu Nantong 226000, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the method for simultaneous determination of paeoniflorin, amygdalin, ferulic acid and ligustrazine in Modified buyang huanwu decoction. **METHODS:** RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on YMC C₁₈ column with the mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 320 nm (ferulic acid), 230 nm (paeoniflorin), 207 nm (amygdalin), 280 nm (ligustrazine). The column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μL. **RESULTS:** The linear ranges of paeoniflorin, amygdalin, ferulic acid and ligustrazine were 0.191 2-1.912 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 0.117 4-1.174 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 0.011 5-0.115 μg/mL ($r=0.999\ 8$) and 0.001 66-0.016 6 μg/mL ($r=0.999\ 7$), respectively. The limits of quantitation were 1.912, 1.174, 0.115, 0.016 6 μg/mL, and the limits of detection were 0.25, 0.40, 0.05, 0.008 5 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducible tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 96.9%-100.3% (RSD=1.3%, $n=6$), 95.1%-100.3% (RSD=2.2%, $n=6$), 95.3%-100.2% (RSD=2.0%, $n=6$) and 97.0%-100.0% (RSD=1.3%, $n=6$). **CONCLUSIONS:** The method is reliable, simple and accurate, and is suitable for simultaneous determination of paeoniflorin, amygdalin, ferulic acid and ligustrazine in Modified buyang huanwu decoction.

KEYWORDS RP-HPLC; Modified buyang huanwu decoction; Paeoniflorin; Amygdalin; Ferulic acid; Ligustrazine; Content determination

补阳还五汤剂出自清代王清任著《医林改错》, 全方由黄芪、当归、赤芍、地龙、川芎、桃仁、红花等七味中药组成, 是目前治疗中风等血栓性疾病应用频率最高的方剂, 方中重用黄芪补气, 与活血化瘀药配伍, 功在补气、活血、通络, 主治气虚血瘀之中风^[1]。现代药理学研究表明, 补阳还五汤剂能抑制血小板活化、降低血液黏度, 具有抗血栓、抗脑缺血及再灌注损伤, 改善血液流变学等

作用^[1-5]。近年来, 国内对补阳还五汤剂的药效物质基础及拆方进行了深入研究^[6-10], 但是现有研究多以补阳还五汤剂经典方组成及药物剂量作为研究出发点, 方中黄芪使用剂量较大, 笔者在临床应用过程中观察到, 方中君药黄芪的用量需适宜, 若连续超剂量使用, 则可因患者病后无力运化而导致气机壅滞, 轻者影响食欲, 重者痰浊壅滞。因此, 本课题组在上述经典方的基础上加以化裁, 减少黄芪用量, 同时加用炒白术、仙鹤草等健脾补气、消积中药以拟定加味补阳还五汤剂, 并参考相关文献^[11-12], 采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立了同时测定加味补阳还五汤剂中芍药苷、苦杏仁苷、阿魏酸和川芎嗪含量的方法, 以期为该方剂的质量控制提供

Δ 基金项目: 江苏省中医药局科技项目(No. LZ13167); 南通市科技计划项目(No. HS2013047)

* 主治医师, 硕士。研究方向: 中医药基础及临床。E-mail: doctorwzc@126.com

通信作者: 主任医师。研究方向: 中医药临床。E-mail: 740336946@qq.com

参考。

1 材料

1.1 仪器

E2695型HPLC仪,包括四元泵、柱温箱、自动进样器、二极管阵列检测器、Empower色谱工作站(美国Waters公司);FA1004型电子分析天平(宁波舜宇仪器有限公司);RE-52A型旋转蒸发器(上海研承仪器有限公司);SHZ-DⅢ型循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限公司)。

1.2 试剂

芍药苷对照品(批号:S-061-150921)、苦杏仁苷对照品(批号:K-008-150518)、阿魏酸对照品(批号:A-100-151209)、川芎嗪对照品(批号:C-075-150629)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$;乙腈和磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

1.3 药材

药材均购自南京益丰大药房,经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定,黄芪为豆科黄芪属蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根;当归为伞形科当归 *Angelica sinensis* 的干燥根;赤芍为毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* 的干燥根;地龙为钜引科参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* 的干燥体;川芎为伞形科川芎 *Ligusticum chuanxiong* 的干燥根茎;桃仁为蔷薇科桃 *Prunus persica* 的干燥成熟种子;红花为菊科红花 *Carthamus tinctorius* 的干燥花;仙鹤草为蔷薇科植物龙芽草 *Agrimonia pilosa* 的干燥地上部分;白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:YMC C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 8.0%→9.5% A; 20~30 min, 9.5%→10.0% A; 30~35 min, 10.0%→15.0% A; 35~40 min, 15.0%→16.0% A; 40~60 min, 16.0%→18.0% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:320 nm(阿魏酸)、230 nm(芍药苷)、207 nm(苦杏仁苷)、280 nm(川芎嗪);柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 样品及溶液的制备

2.2.1 样品的制备 按加味补阳还五汤剂的处方比例取黄芪30 g、当归30 g、赤芍15 g、地龙10 g、川芎9 g、红花30 g、桃仁10 g、仙鹤草15 g、炒白术15 g,置于同一2 000 mL圆底烧瓶中,加入相当于上述药材8倍体积的水,浸泡30 min,回流提取2次,每次1 h,合并提取液,纱布过滤,浓缩至100 mL,加无水乙醇至含醇体积分数达85%,静置24 h,抽滤,滤液回收乙醇至无醇味,加水定容至200 mL,即得。共制备3批样品,编号为1、2、3。

2.2.2 混合对照品溶液 精密称取芍药苷对照品19.12 mg、苦杏仁苷对照品11.74 mg、阿魏酸对照品1.15 mg、川芎嗪对照品0.166 mg,分别置于2 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得单一对照品贮备液。精密吸取上述各单一对照品贮备液10 μL,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液 取“2.2.1”项下样品5 mL,加水定容至10 mL,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液 按加味补阳还五汤剂的制备工艺和处方比例,取除赤芍、桃仁、当归、川芎以外的药材适量,按“2.2.1”项下方法制备阴性样品,再按“2.2.3”项下方法制备,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度 > 1.5 ;理论板数以苦杏仁苷峰计为5 000,保留时间为24.17 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液40、120、200、280、400 μL,分别置于2 mL量瓶中,加甲醇定容,即得系列混合对照品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度($x, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD,结果见表2。

2.6 精密度试验

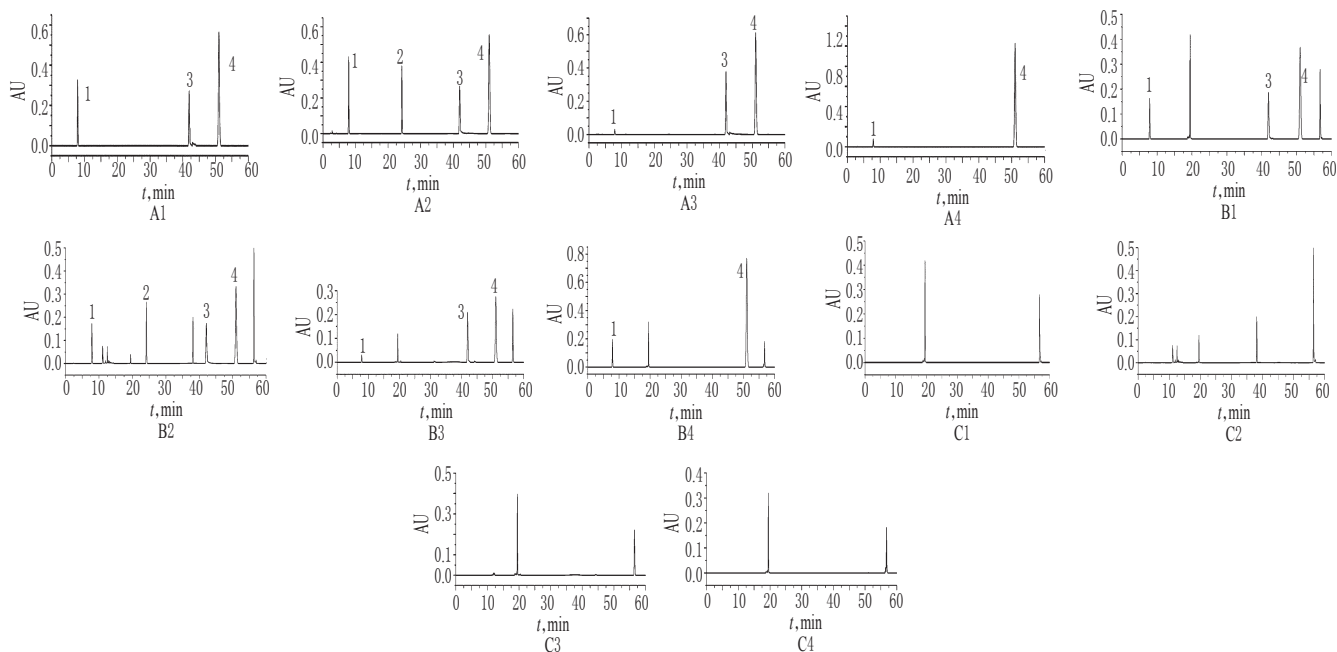
精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,芍药苷、苦杏仁苷、阿魏酸、川芎嗪峰面积的RSD分别为0.4%、0.6%、1.2%、1.7% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(编号:1)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,芍药苷、苦杏仁苷、阿魏酸、川芎嗪峰面积的RSD分别为0.4%、0.5%、1.0%、1.6% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(编号:1)适量,按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记



A1.混合对照品(280 nm);A2.混合对照品(207 nm);A3.混合对照品(230 nm);A4.混合对照品(320 nm);B1.供试品(280 nm);B2.供试品(207 nm);B3.供试品(230 nm);B4.供试品(320 nm);C1.阴性对照(280 nm);C2.阴性对照(207 nm);C3.阴性对照(230 nm);C4.阴性对照(320 nm);1.川芎嗪;2.苦杏仁苷;3.芍药苷;4.阿魏酸

A1. mixed control (280 nm); A2. mixed control (207 nm); A3. mixed control (230 nm); A4. mixed control (320 nm); B1. test sample (280 nm); B2. test sample (207 nm); B3. test sample (230 nm); B4. test sample (320 nm); C1. negative control (280 nm); C2. negative control (207 nm); C3. negative control (230 nm); C4. negative control (320 nm); 1. ligustrazine; 2. amygdalin; 3. paeoniflorin; 4. ferulic acid

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
芍药苷	$y=99.198x+12.374$	0.999 6	0.191 2~1.912
苦杏仁苷	$y=75.339x+9.571$	0.999 6	0.117 4~1.174
阿魏酸	$y=28.812x+1.529$	0.999 8	0.011 5~0.115
川芎嗪	$y=8.671x+0.382$	0.999 7	0.001 66~0.016 6

表2 LOQ与LOD测定结果($\mu\text{g/mL}$)

Tab 2 Results of LOQ and LOD($\mu\text{g/mL}$)

待测成分	LOQ	LOD
芍药苷	1.912	0.25
苦杏仁苷	1.174	0.40
阿魏酸	0.115	0.05
川芎嗪	0.016 6	0.008 5

录峰面积。结果,芍药苷、苦杏仁苷、阿魏酸、川芎嗪峰面积的RSD分别为0.6%、0.8%、1.0%、1.3%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(编号:1)0.5 mL,共6份,分别精密加入一定质量的待测成分对照品,按“2.2.3”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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.3”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,记录峰面积并计样品含量,结果见表4。

表3 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 3 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
芍药苷	809	764.8	1560.0	98.2	98.1	1.3			
	809	764.8	1564.0	98.7					
	809	764.8	1551.0	97.0					
	809	764.8	1556.0	97.7					
	809	764.8	1576.0	100.3					
	809	764.8	1550.0	96.9					
	苦杏仁苷	461	469.6	910.7			95.8	97.6	2.2
		461	469.6	920.3			97.8		
		461	469.6	929.9			99.9		
		461	469.6	916.1			96.9		
461		469.6	907.7	95.1					
461		469.6	932.3	100.3					
阿魏酸		54	46.0	100.1	100.2	98.1	2.0		
		54	46.0	98.3	96.3				
		54	46.0	99.3	98.5				
		54	46.0	97.8	95.3				
	54	46.0	99.4	98.7					
	54	46.0	99.8	99.6					
	川芎嗪	3.6	6.6	10.0	97.0			98.0	1.3
		3.6	6.6	10.2	100.0				
		3.6	6.6	10.0	97.0				
		3.6	6.6	10.1	98.5				
3.6		6.6	10.0	97.0					
3.6		6.6	10.1	98.5					

3 讨论

表4 样品含量测定结果($n=3, \text{mg/g}$)

Tab 4 Results of content determination of samples ($n=3, \text{mg/g}$)

样品编号	芍药苷	苦杏仁苷	阿魏酸	川芎嗪
1	1.973	1.125	0.131	8.615
2	1.971	1.129	0.133	8.712
3	1.973	1.124	0.131	8.649

3.1 色谱柱的考察

本试验曾考察了 Chromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Benetnatch TMC₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 以及 YMC C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 等为本试验色谱柱时样品的分离效果。结果表明, YMC C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为本试验的色谱柱时样品的分离度及峰形较好, 因此选择上述色谱柱进行试验。

3.2 流动相的考察

本试验还考察了不同体积分数的甲醇-水、乙腈-磷酸、甲醇-冰乙酸、甲醇-磷酸、乙腈-水、乙腈-冰乙酸溶液作为流动相的结果。结果, 以乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时, 各待测成分的分离度均较好, 因此选择上述溶液为本试验流动相。

3.3 检测波长的选择

加味补阳还五汤剂含有多味中药, 成分复杂, 本试验对 4 种待测成分的单一对照品贮备液进行了 200~400 nm 全波长扫描, 在保证各成分含量测定准确的前提下, 选择了最大吸收波长作为检测波长, 即阿魏酸在 320 nm 波长处、芍药苷在 230 nm 波长、苦杏仁苷在 207 nm 波长处、川芎嗪在 280 nm 波长处, 对方剂中的样品含量进行测定。

综上所述, 本方法可靠、简便、准确, 适用于同时测定加味补阳还五汤剂中芍药苷、苦杏仁苷、阿魏酸、川芎嗪的含量。

参考文献

[1] 王日生, 蔡俊, 张继平. 补阳还五汤对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(5): 725-727.

[2] Wang WR, Lin R, Zhang H, et al. The effects of Buyang huanwu decoction on hemorheological disorders and energy metabolism in rats with coronary heart disease[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(1): 214-220.

[3] Zhao LD, Wang JH, Jin GR, et al. Neuroprotective effect of Buyang huanwu decoction against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: time window and mechanism[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 140(2): 339-344.

[4] 祝赫, 黄海艳, 张继平, 等. 补阳还五汤抗脑缺血作用实验研究进展[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(2): 282-284.

[5] 饶晓玲, 谢虹虹, 廖卫国, 等. HPLC 同时测定补阳还五汤中的川芎嗪、阿魏酸含量[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(1): 21-22.

[6] 杨珍, 周惠芬, 周鹏, 等. 川芎、黄芪有效成分配伍对缺氧脑微血管内皮细胞的影响[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1326-1332.

[7] 蔡咏, 林金丽, 布林白乙拉, 等. 补阳还五汤生物碱有效部位对人脐血干细胞体外增殖的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(19): 3533-3535.

[8] 常蕴青, 赵中夫, 杨柳絮, 等. 芍药苷对 LPS 诱导的脐静脉内皮细胞 HMGB1 及 ICAM-1 表达的影响[J]. 长治医学院学报, 2009, 23(1): 4-7.

[9] 刘夕琳, 闫晓慧, 郭蓉, 等. 基于生物分子网络的阿魏酸生物效应机制研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2015, 49(3): 200-203.

[10] Jiagang D, Li C, Wang H, et al. Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(3): 523-529.

[11] 刘海涛, 雷鹏, 唐涛, 等. RP-HPLC 法同时测定补阳还五汤中 3 种指标成分的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(3): 232-234.

[12] 张星, 陆兔林, 毛春芹, 等. 补阳还五汤质量标准研究[J]. 中成药, 2013, 35(3): 529-533.

(收稿日期: 2016-10-28 修回日期: 2017-03-28)

(编辑: 刘柳)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅