

高效液相色谱法测定黄芪赤风汤提取物中萜类和色酮类成分的含量

谷雨龙 刘斌 姜艳艳

【摘要】 目的 建立 HPLC 法测定黄芪赤风汤提取物中萜类和色酮类成分的含量。**方法** 采用 Venusil MP-C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm) 色谱柱;以乙腈(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱(0~45 min, 10%→18% A; 45~100 min, 18%→45% A);检测波长:220 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:35℃;LCMS-IT-TOF 法指认萜类和色酮类成分,分别以芍药苷和毛蕊异黄酮苷为参比计算两类成分含量。**结果** 芍药苷和毛蕊异黄酮苷的线性范围分别为 0.279~6.696 μg 和 0.192~4.608 μg ($r=0.999\ 8$);平均回收率($n=6$)分别为 98.83% 和 98.21%, RSD 分别为 3.06% 和 3.24%;经 LCMS-IT-TOF 法指认萜类成分 4 个,色酮类成分 12 个。**结论** 所建立的方法快速、简单、准确、专属性强,精密度好,可用于黄芪赤风汤提取物的质量控制。

【关键词】 高效液相色谱法; 黄芪赤风汤提取物; 芍药苷; 毛蕊异黄酮苷

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.03.009

RP-HPLC analysis of terpenoids and chromones in the extractive of *Huangqi Chifeng* decoction

GU Yulong, LIU Bin, JIANG Yanyan. Key Laboratory of Chinese Minority Traditional Medicine (Minzu University of China), State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Beijing 100081, China
Corresponding author: GU Yulong, E-mail: guylong@muc.edu.cn

【Abstract】 Objective To develop an HPLC method for determination of terpenoids and chromones in the extractive of *Huangqi chifeng* decoction. **Methods** Venusil MP-C₁₈(4.6×250 mm, 5 μm) was used to detect. The mobile phase was composed of acetonitrile(A) and water(B) with gradient elution (0~45 min, 10%→18% A; 45~100 min, 18%→45% A) and the flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 220 nm. The column temperature was 35℃. Terpenoids and chromones were identified by LCMS-IT-TOF method, paeoniflorin and calycosin-7-glucoside was regarded as reference to calculate. **Results** The linear ranges of paeoniflorin and calycosin-7-glucoside were 0.279~6.696 μg and 0.192~4.608 μg ($r=0.999\ 8$) respectively. The average recovery was 98.83% and 98.21% (RSD<3.24%, $n=6$) respectively. Four terpenoids and twelve chromones were identified by LCMS-IT-TOF. **Conclusion** The method is simple, accurate, repeatable and can be used to control the quality of the extractive of *Huangqi chifeng* decoction.

【Key words】 HPLC; Extractive of *Huangqi chifeng* decoction; Paeoniflorin; Calycosin-7-glucoside

经典方剂黄芪赤风汤源自清代王清任的《医林

改错》,由黄芪、赤芍和防风组成。其中,黄芪补气活血、宣通营卫,为君药;赤芍清热凉血、活血祛瘀,助黄芪使气足血行,周流全身,为臣药;佐以防风祛风解表、胜湿解痉止痛。“如治诸疮、诸病,或因病虚弱,服之皆效。无病服之,不生疾病。此方治诸病皆效者,能使周身之气通而不滞,血活而不瘀,气通血活,何患疾病不除。”现代研究表明,黄芪皂苷及黄酮部位可以抑制滑膜成纤维细胞的增殖,发挥保护关节损伤的作用,黄芪黄酮具有免疫调节作

基金项目:国家自然科学基金(81603278);教育部“长江学者和创新团队发展计划”(IRT_13R63);中央民族大学青年教师科研专项(2016KYQN51)

作者单位:100081 北京,中央民族大学中国少数民族传统医学国家民委-教育部重点实验室(谷雨龙);北京中医药大学中药学院(刘斌、姜艳艳)

作者简介:谷雨龙(1982-),博士,实验师。研究方向:传统药物分析。E-mail:guylong@muc.edu.cn

用^[1-3];赤芍单萜苷具有消炎镇痛、改善血液流变学和免疫调节的作用^[4,5];防风色原酮有显著的镇痛、抗炎和降低血浆黏度活性^[6,7],上述四类成分系该方的主要有效部位或组分。为此,采用大孔吸附树脂分离纯化技术,分离富集了黄芪皂苷与黄酮部位、赤芍单萜苷部位、防风色原酮部位,制得黄芪赤风汤提取物,先期采用不同方法对该方提取物中主要成分含量进行了测定^[8-9]。为全面控制该方提取物质量,采用 LCMS-IT-TOF 对其化学成分进行分析(另文发表),同时以芍药苷作为萜类(黄芪皂苷、赤芍单萜苷)的指标性成分,以毛蕊异黄酮苷作为色酮类(黄芪黄酮、防风色原酮)的指标性成分,建立 HPLC 方法同时测定两类成分的相对含量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LCMS-IT-TOF 仪(日本岛津公司),SIL-20AC 自动进样器,SPD-20A 检测器,LabSolutions 工作站;FC104 型十万分之一电子分析天平(上海恒平科学仪器有限公司),KQ-500E 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),Milli-Q 超纯水仪(密理博公司)。

黄芪赤风汤提取物(自制)。色谱级乙腈(Fisher Scientific),超纯水,其他试剂均为分析纯。

芍药苷(批号 BBT0148-20111122)和毛蕊异黄酮苷(批号 20121334)对照品购自天津一方科技有限公司。黄芪(批号 120505)产地为内蒙古,购自北京亚威中药饮片有限公司,赤芍(批号 120201)、防风(批号 120301)产地分别为内蒙古和黑龙江,购自湖北金贵中药饮片有限公司,经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定,分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus*(Fisch.) Bge. var. *mongholicus*(Bge.) Hsiao 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata*(Turcz.) Schischk. 未抽花茎的干燥根。

1.2 溶液制备

1.2.1 对照品溶液制备 称取芍药苷和毛蕊异黄酮苷对照品适量,加甲醇分别制成质量浓度为 490 $\mu\text{g/mL}$ 和 558 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。分别吸取对照品储备液 2 mL 和 2.5 mL,用甲醇定容至 5 mL,配制成质量浓度分别为 196 $\mu\text{g/mL}$ 、279 $\mu\text{g/mL}$ 的芍药苷、毛蕊异黄酮苷混合对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液 取黄芪赤风汤提取物干燥粉末约 20 mg,精密称定,加入 70% 乙醇(v/v)5 mL,称

定质量,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)60 分钟,放冷,再称定质量,用 70% 乙醇(v/v)补足减失的质量,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

1.3 色谱条件

Venusil MP-C₁₈(4.6×250 mm,5 μm) 色谱柱;以乙腈(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱(0~45 min,10%→18% A;45~100 min,18%→45% A);检测波长:220 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;进样量:5 μL 。在上述色谱条件下,分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液进样。在混合对照品溶液和供试品溶液色谱图相应位置上,有相同保留时间的色谱峰,且各成分分离良好(见图 1)。

1.4 方法学考察

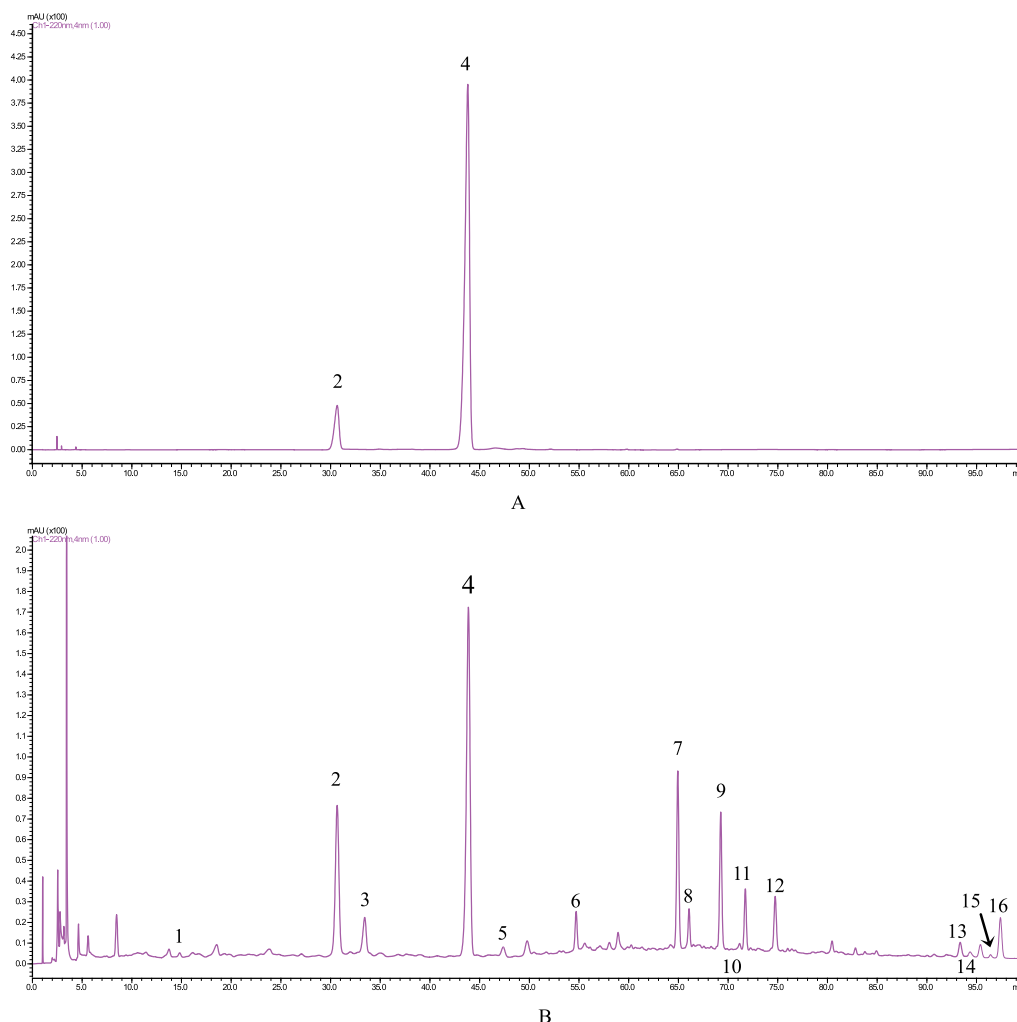
1.4.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1、2、4、8、12、16、24 μL 进样,分别以芍药苷和毛蕊异黄酮苷的含量为横坐标,以其峰面积积分为纵坐标绘制标准曲线,并进行线性回归,计算回归方程。芍药苷的回归方程为: $Y=347\ 900X+3\ 526.7$, $r=0.999\ 8$;毛蕊异黄酮苷的回归方程为: $Y=1\ 997\ 543X-58\ 026$, $r=0.999\ 8$ 。结果表明:芍药苷在 0.279~6.696 μg 质量范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系;毛蕊异黄酮苷在 0.192~4.608 μg 质量范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

1.4.2 精密度实验 取同一份黄芪赤风汤提取物供试品溶液,在“1.3”项色谱条件连续进样 6 次,测定峰面积,计算芍药苷和毛蕊异黄酮苷峰面积的 RSD($n=6$)分别为 0.54% 和 1.32%。

1.4.3 稳定性实验 取同一份黄芪赤风汤提取物供试品溶液,分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 小时注入液相色谱仪,计算芍药苷和毛蕊异黄酮苷峰面积的 RSD($n=6$)分别为 3.18% 和 1.95%。

1.4.4 重复性实验 取同一批黄芪赤风汤提取物干燥粉末 6 份,每份约 20 mg,精密称定,按照“1.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“1.3”项色谱条件分别进样测定。计算芍药苷和毛蕊异黄酮苷平均含量($n=6$)分别为 97.22 mg/g 和 40.26 mg/g, RSD 分别为 2.83% 和 3.39%。

1.4.5 加样回收率实验 取同一批黄芪赤风汤提取物干燥粉末 6 份,每份约 10 mg,精密称定,分别精密加入一定量的芍药苷(490 $\mu\text{g/mL}$)和毛蕊异黄酮苷(558 $\mu\text{g/mL}$)对照品溶液,按照“1.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“1.3”项色谱条件进样测



注:1. 氧化芍药苷;2. 芍药苷;3. 升麻素苷;4. 毛蕊异黄酮苷;5. 升麻素;6. 5-O-甲基维斯阿米醇苷;7. 芒柄花苷;
8. 毛蕊异黄酮-7-O- β -D-(6"-乙酰基)-葡萄糖苷;9. 9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -葡萄糖苷;10. 亥茅酚苷;11. 异槲皮苷;
12. 毛蕊异黄酮;13. 芒柄花素;14. 黄芪皂苷乙;15. 珊瑚菜素;16. 黄芪皂苷 II (或异黄芪皂苷 II)

图 1 黄芪赤风汤提取物中对照品(A)和供试品(B)高效液相色谱图

定,分别计算回收率。结果芍药苷和毛蕊异黄酮苷平均回收率($n=6$)分别为 98.83% 和 98.21%,RSD 分别为 3.06% 和 3.24%。

1.5 测定方法

采用 LCMS-IT-TOF 法指认萜类和色酮类成分,分别以芍药苷和毛蕊异黄酮苷为参比计算两类成分含量。

2 结果

2.1 LCMS-IT-TOF 法指认萜类和色酮类部位主要色谱峰

精密吸取黄芪赤风汤提取物供试品溶液注入 LCMS-IT-TOF,按照“1.3”项色谱条件进行检测,根据黄芪赤风汤提取物总离子流图各色谱峰的保留时间,结合各色谱峰的一级、二级质谱信息及紫外

光谱信息,确定主要色谱峰结构。同时通过对照品质谱比对和文献查阅^[10-12],指认出 16 个色谱峰,其中萜类成分 4 个,分别为氧化芍药苷(1 号峰)、芍药苷(2 号峰)、黄芪皂苷乙(14 号峰)和黄芪皂苷 II (或异黄芪皂苷 II)(16 号峰);色酮类成分 12 个,分别为升麻素苷(3 号峰)、毛蕊异黄酮苷(4 号峰)、升麻素(5 号峰)、5-O-甲基维斯阿米醇苷(6 号峰)、芒柄花苷(7 号峰)、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-(6"-乙酰基)-葡萄糖苷(8 号峰)、9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -葡萄糖苷(9 号峰)、亥茅酚苷(10 号峰)、异槲皮苷(11 号峰)、毛蕊异黄酮(12 号峰)、芒柄花素(13 号峰)和珊瑚菜素(15 号峰)。

2.2 萜类和色酮类成分含量测定

经 LCMS-IT-TOF 法指认的萜类和色酮类成分,分别以芍药苷和毛蕊异黄酮苷的含量为参比计算

表 1 黄芪赤风汤提取物中色酮类成分相对含量测定结果($n=3$)

批次	各色谱峰相对含量(%)												可测色酮含量(%)
	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11	峰 12	峰 13	峰 15	
1	0.72	3.94	0.16	0.55	1.29	0.30	1.00	0.11	0.39	0.43	0.16	0.02	9.24
2	0.65	3.83	0.18	0.54	1.29	0.31	1.00	0.09	0.41	0.46	0.15	0.02	9.10
3	0.71	4.21	0.18	0.61	1.32	0.34	1.03	0.11	0.44	0.45	0.17	0.02	9.77

出相对含量,并计算出黄芪赤风汤提取物中可测总色酮类和可测总萜类成分的相对含量。结果见表 1 和表 2。

表 2 黄芪赤风汤提取物中萜类成分相对含量测定结果($n=3$)

批次	各色谱峰相对含量(%)				可测萜类含量(%)
	峰 1	峰 2	峰 14	峰 16	
1	0.46	9.43	0.46	2.11	12.5
2	0.46	9.58	0.40	1.98	12.4
3	0.45	9.77	0.42	2.24	12.9

2.3 芍药苷和毛蕊异黄酮苷含量测定结果

取 3 批黄芪赤风汤提取物样品,按照“1.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“1.3”项色谱条件进样,测定峰面积,计算芍药苷和毛蕊异黄酮苷的含量。结果见表 3。

表 3 黄芪赤风汤提取物样品含量测定结果($n=3$)

批次	芍药苷含量(mg/g)	毛蕊异黄酮苷含量(mg/g)
1	94.32	39.42
2	95.84	38.28
3	97.67	42.10

3 讨论

本实验采用 SPD 检测器,分别在 203、220、254、280、330 nm 波长下考察黄芪赤风汤提取物样品 HPLC 图谱,经对比发现样品在 220 nm 下的吸收峰最全、最多,故选择 220 nm 下检测样品的萜类和色酮类成分。

经 LCMS-IT-TOF 法指认的 16 个成分中,来源于黄芪的成分 9 个,分别是毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮-7-O- β -D-(6"-乙酰基)-葡萄糖苷、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- β -葡萄糖苷、异槲皮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪皂苷乙和黄芪皂苷 II(或异黄芪皂苷 II);来源于赤芍的成分 2 个,分别是氧化芍药苷和芍药苷;来源于防风的成分 5 个,分别是升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷和珊瑚素。

本实验采用 HPLC-SPD 法同时测定黄芪赤风汤提取物中芍药苷和毛蕊异黄酮苷的含量,并以二者为参比,分别计算样品中 16 个萜类和色酮类成分的相对含量,可基本全面反映复方提取物质量,方法简单,结果准确,专属性强,可用于黄芪赤风汤提取物的质量控制。

参 考 文 献

- [1] 杨晓航,史传道,叶峥嵘,等. 黄芪总黄酮对佐剂性关节炎模型大鼠 IL-4、IFN- γ mRNA 表达影响的研究[J]. 陕西医学杂志,2010,39(8):944-946,949.
- [2] 姚余有,周爱武,陈敏珠. 黄芪总苷对兔关节软骨和滑膜作用的体外实验[J]. 中国新药杂志,2004,13(4):315-316.
- [3] 徐建华,徐胜前,帅宗文,等. 黄芪总甙治疗类风湿关节炎临床研究[J]. 中国药物与临床,2002,2(3):157-160.
- [4] 刘超,王静,杨军. 赤芍总甙活血化瘀作用的研究[J]. 中药材,2000,23(9):557-560.
- [5] 冀兰鑫,黄浩,李长志,等. 赤芍药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究,2010,33(3):233-236.
- [6] 李文,李丽,是元艳,等. 防风有效部位的药理作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(6):29-31.
- [7] 薛宝云,李文,李丽,等. 防风色原酮甙类成分的药理活性研究[J]. 中国中药杂志,2000,25(5):297-299.
- [8] Yulong Gu, Bin Liu, Yanyan Jiang, et al. Simultaneous determination of 5 major constituents in the effective fractions of Huangqichifeng Medicinal Broth, By UPLC-MS/MS [J]. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol, 2014, (37):1404-1415.
- [9] 姜艳艳,朱颖超,刘斌. 高效液相色谱法同时测定黄芪赤风胶囊中芍药苷、升麻素苷等 9 种成分的含量[J]. 中国药理学杂志,2012,47(15):1246-1249.
- [10] 中国科学院上海有机化学研究所. 中药与化学成分数据库 [EB/OL]. [2016-05-25]. <http://www.orgchem.csdb.cn/scdb>.
- [11] 卞云云,管佳,毕志明,等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 中国药理学杂志,2006,41(16):1217-1221.
- [12] Li-Jie Zhang, Hui-Kang Liu, Ping-Chun Hsiao, et al. New Isoflavonoid Glycosides and Related Constituents from Astragalus Radix (Astragalus membranaceus) and Their Inhibitory Activity on Nitric Oxide Production [J]. J. Agric. Food Chem, 2011, (59):1131-1137.

(收稿日期:2016-09-20)

(本文编辑:董历华)