

RP-HPLC法同时测定升阳散火汤浸膏粉中葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素的含量

李晶, 金艺, 崔玉琴, 门金玉, 赵怀清*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

摘要 目的: 建立同时测定升阳散火汤中葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素 5 种活性成分含量的 RP-HPLC 法。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-4% 醋酸水溶液, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 紫外检测波长 310 nm; 柱温 35 °C。结果: 葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素线性范围分别为 15.6~156 μg·mL⁻¹ ($r=0.9995$), 0.660~6.60 μg·mL⁻¹ ($r=0.9997$), 8.96~89.6 μg·mL⁻¹ ($r=0.9995$), 6.30~63.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9993$), 1.32~13.2 μg·mL⁻¹ ($r=0.9996$); 方法平均回收率 ($n=9$) 分别为 99.7%, 100.6%, 100.2%, 100.6%, 99.8%。结论: 本法简便、准确, 重复性好, 可为升阳散火汤质量评价提供依据。

关键词: 升阳散火汤; 葛根素; 阿魏酸; 异阿魏酸; 蛇床子素; 异欧前胡素; RP-HPLC

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1415-05

RP-HPLC simultaneous determination of puerarin, ferulic acid, isoferulic acid, osthol and isoperimperatorin in Shengyang Sanhuo powdered extract

LI Jing, JIN Yi, CUI Yu-qin, MEN Jin-yu, ZHAO Huai-qing*

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract **Objective** To develop an RP-HPLC method for the simultaneous determination of 5 components (puerarin, ferulic acid, isoferulic acid, osthol and isoperimperatorin) in Shengyang Sanhuo powdered extract. **Methods** An RP-HPLC method was applied with Diamonsil C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) by gradient elution using methanol-4% acetic acid water solution as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The UV detection wavelength was set at 310 nm and the column temperature was 35 °C. **Results** The linear ranges of puerarin, ferulic acid, isoferulic acid, osthol and isoperimperatorin were 15.6~156 μg·mL⁻¹ ($r=0.9995$), 0.660~6.60 μg·mL⁻¹ ($r=0.9997$), 8.96~89.6 μg·mL⁻¹ ($r=0.9995$), 6.30~63.0 μg·mL⁻¹ ($r=0.9993$), 1.32~13.2 μg·mL⁻¹ ($r=0.9996$), respectively. The average recoveries ($n=9$) of puerarin, ferulic acid, isoferulic acid, osthol and isoperimperatorin were 99.7%, 100.6%, 100.2%, 100.6%, 99.8%, respectively. **Conclusion** This method is suitable to control the quality of Shengyang Sanhuo powdered extract which provides the advantages of simplicity, accuracy and reproduction.

Key words Shengyang Sanhuo powdered extract; puerarin; ferulic acid; isoferulic acid; osthol; isoperimperatorin; RP-HPLC

升阳散火汤是李东垣《脾胃论》中收载的名方, 本方由柴胡、升麻、葛根、羌活、防风、独活、炙甘草、甘草、人参、白芍共 10 味药材组成, 具有升脾胃阳气、散中焦郁火的作用^[1], 现代医家经加减用于牙痛、眼睛充血^[2]、慢性咽炎、慢性口腔溃疡^[3]、慢性

扁桃体炎^[4]等症的治疗。处方中葛根、升麻、羌活、独活同为臣药^[1]。据研究表明^[5], 葛根具有调节心脏功能、扩管降压的作用, 升麻具有解热镇痛、抗炎镇静的作用, 羌活具有解热镇痛、抗炎的作用, 独活具有抗炎镇痛、抗血栓、抗凝血的作用。其中葛根的

* 通讯作者 Tel: 13066787576 E-mail: zhaohq1955@126.com

活性成分为葛根素,羌活的活性成分为阿魏酸、异欧前胡素,升麻的活性成分为阿魏酸和异阿魏酸,独活的活性成分为蛇床子素。为全面控制升阳散火汤的质量,本文建立了同时测定升阳散火汤中葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素 5 种活性成分含量的 RP-HPLC 法。

1 仪器与试剂

LC-10AT 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司),SPD-10A 型紫外检测器(日本 Shimadzu 公司),Anastar 色谱工作站(美国 Suntek Science 公司),BS-124S 电子分析天平(北京 Sartorius 仪器系统有限公司),RE52CS-1 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),TN-100B 型托盘式扭力天平(上海第二天平仪器厂),KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品葛根素(批号 110752-200511)、异阿魏酸(批号 111698-200602)、蛇床子素(批号 110822-200406)、异欧前胡素(批号 110827-200407)均由中国药品生物制品检定所提供,阿魏酸(批号 357835/1,纯度 99.0%)购自 Sigma Aldrich 试剂公司;饮片柴胡、升麻、葛根、羌活、防风、独活、炙甘草、甘草、人参、白芍购自沈阳成大方圆大药房,经沈阳药科大学生药教研室孙启时教授鉴定为正品;升阳散火汤浸膏粉(本实验室自制);甲醇为色谱纯;水为二次重蒸水,自制;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别称取对照品葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素适量,精密称定,置 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得浓度分别为 120.0, 66.0, 70.0, 35.0, 22.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液 I, II, III, IV, V。精密量取上述对照品储备液 I 3.20 mL, II 0.25 mL, III 3.20 mL, IV 4.50 mL, V 1.50 mL, 置 25 mL 量瓶中,以甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品储备液(每 1 mL 含葛根素 156 μg , 阿魏酸 6.60 μg , 异阿魏酸 89.6 μg , 蛇床子素 63.0 μg 和异欧前胡素 13.2 μg)。精密量取对照品储备液 II 1.3 mL 置 10 mL 量瓶中,以甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 85.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿魏酸对照品溶液。精密量取对照品储备液 V 4.5 mL 置 10 mL 量瓶中,以甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 99 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 异欧前胡素对照品溶液。以上溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存,备用。

2.1.2 升阳散火汤浸膏粉 按处方比例精密称取

饮片(柴胡 48 g, 升麻 3 g, 葛根 3 g, 羌活 3 g, 防风 1.5 g, 独活 3 g, 炙甘草 1.8 g, 甘草 1.2 g, 人参 3 g, 白芍 3 g), 置圆底烧瓶中,加入 14 倍水煎煮 160 min, 煎煮液加入乙醇调醇浓度至 75%, 醇沉 24 h, 过滤, 滤液减压回收溶剂, 45 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重, 得到升阳散火汤浸膏粉, 自制 3 批样品, 编号 1, 2, 3 避光保存。

2.1.3 供试品溶液 取升阳散火汤浸膏粉约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇溶液 30 mL, 超声(400 W, 32 kHz) 30 min, 过滤, 残渣用适量的 50% 甲醇洗涤 3 次, 合并滤液与洗液, 旋转蒸干, 残渣加蒸馏水 20 mL 使溶解, 水溶液用乙醚萃取 3 次, 每次 60 mL, 合并乙醚液, 减压回收溶剂至干, 残渣用甲醇溶解, 转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。所得溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存, 备用。

2.1.4 阴性样品溶液 由于阿魏酸为羌活和升麻的共有成分, 异欧前胡素为羌活和独活的共有成分, 故在实验过程中又制备了羌活、升麻和羌活、独活 2 个双阴性样品。按处方比例分别称取缺葛根, 缺升麻, 缺独活, 缺羌活、升麻, 缺羌活、独活的其余药味, 按制备工艺制成相应的阴性样品, 按“2.1.3”项下方法操作, 分别制成阴性样品溶液, 所得阴性样品溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存, 备用。

2.2 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A) - 4% 醋酸水溶液(B), 二元线性梯度洗脱 [0 ~ 10 min A - B(14:86) $\rightarrow$ A - B(28:72); 10 ~ 20 min A - B(28:72) $\rightarrow$ A - B(22:78); 20 ~ 28 min A - B(22:78) $\rightarrow$ A - B(30:70); 28 ~ 30 min A - B(30:70) $\rightarrow$ A - B(80:20); 30 ~ 34.2 min A - B(80:20); 34.2 ~ 36 min A - B(80:20) $\rightarrow$ A - B(50:50); 36 ~ 42 min A - B(50:50) $\rightarrow$ A - B(58:42)], 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长 310 nm; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

2.3 系统适用性 在上述色谱条件下葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素色谱峰与相邻峰的分离度均大于 1.5, 理论塔板数按葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素峰计算均不低于 8000, 五组分色谱峰对称因子均在 0.95 ~ 1.05 之间, 样品中其他成分对葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素的测定无干扰。结果见图 1。

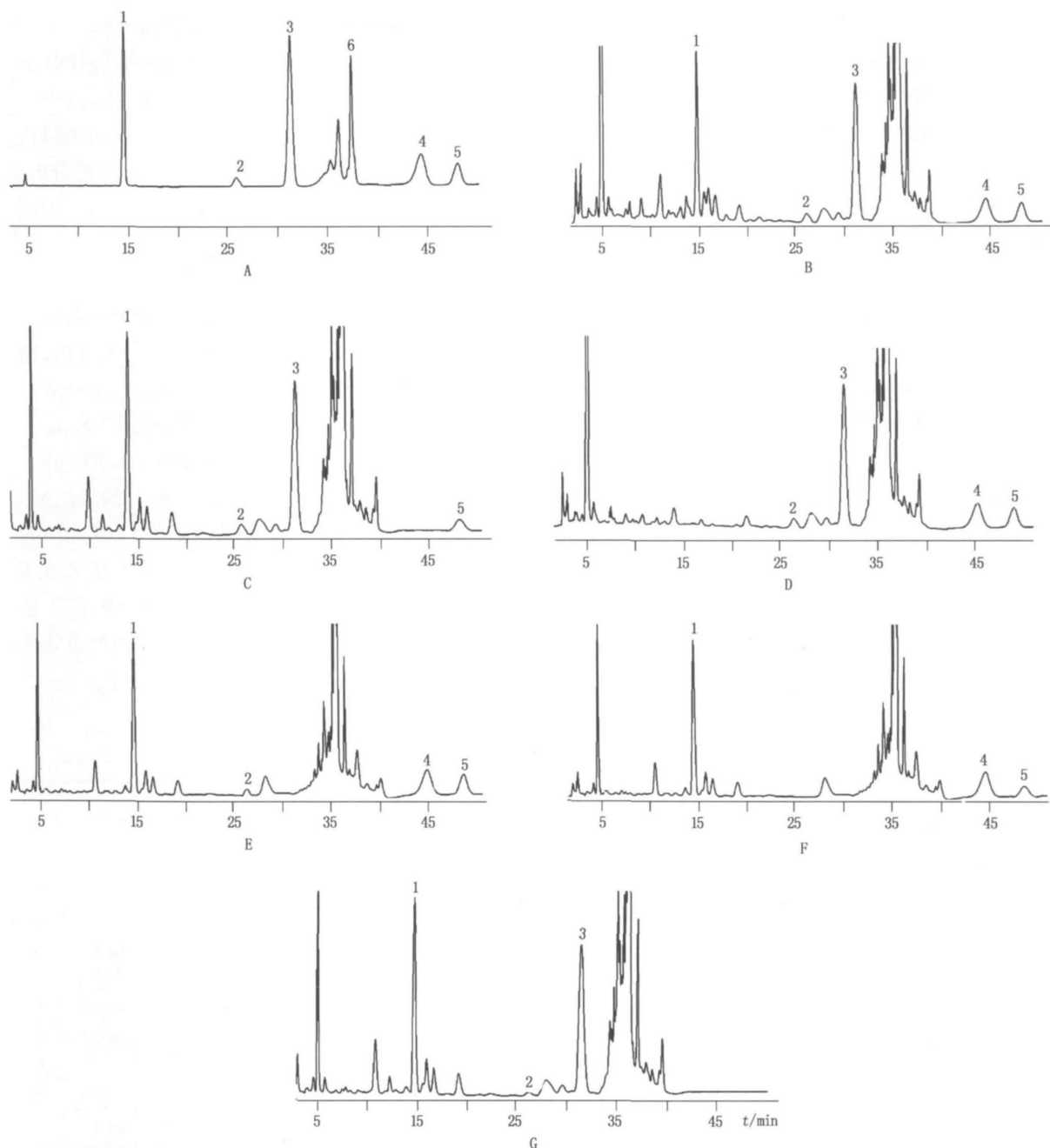


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 对照品 (reference substances) B. 样品 (sample) C. 缺独活样品 (negative sample without Radix Angelicae Pubescentis) D. 缺葛根样品 (negative sample without Radix Puerariae Lobatae) E. 缺升麻样品 (negative sample without Rhizoma Cimicifugae) F. 缺羌活、升麻样品 (negative sample without Rhizoma Cimicifugae and Rhizoma et Radix Notopterygii) G. 缺羌活、独活样品 (negative sample without Rhizoma et Radix Notopterygii and Radix Angelicae Pubescentis)

1 葛根素 (puerarin) 2 阿魏酸 (ferulic acid) 3 异阿魏酸 (isoferulic acid) 4 蛇床子素 (oshon) 5 异欧前胡素 (isoperatorin) 6 溶剂 (solvent)

2.4 线性关系 精密量取混合对照品储备液 1, 2, 4, 6, 8 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成系列浓度的混合对照品溶液, 于 4℃ 冰箱避光保存, 备用。分别精密吸取上述混合对照品溶液及混合对照品储备液各 20 μL, 按上述色谱

条件进样分析, 记录色谱峰面积。以对照品浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 色谱峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归计算。求得葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素、异欧前胡素回归方程 ($n = 6$) 分别为:

$$Y = 1.000 \times 10^7 X - 7.546 \times 10^3 \quad r = 0.9995$$
$$Y = 4.000 \times 10^7 X - 4.493 \times 10^3 \quad r = 0.9997$$
$$Y = 4.000 \times 10^7 X + 9.229 \times 10^3 \quad r = 0.9995$$
$$Y = 3.000 \times 10^7 X - 9.124 \times 10^3 \quad r = 0.9993$$
$$Y = 2.000 \times 10^7 X + 3.294 \times 10^3 \quad r = 0.9996$$

结果表明葛根素浓度在 15.6~156 μg·mL⁻¹, 阿魏酸浓度在 0.66~6.60 μg·mL⁻¹, 异阿魏酸浓度在 8.96~89.6 μg·mL⁻¹, 蛇床子素浓度在 6.30~63.0 μg·mL⁻¹, 异欧前胡素浓度在 1.32~13.2 μg·mL⁻¹ 范围内与峰面积具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取“2.4”项下制备的混合对照品溶液(葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素的浓度分别为 62.4, 2.64, 35.8, 25.2, 5.28 μg·mL⁻¹), 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 计算葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素峰面积的 RSD (*n* = 6) 分别为 1.0%, 1.3%, 0.92%, 1.1%, 0.49%。

2.6 重复性试验 取编号 1 的样品, 按“2.1.3”项下方法操作, 平行制备供试品溶液 6 份, 在上述色谱条件下进行分析。结果葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、

蛇床子素和异欧前胡素的平均含量 (*n* = 6) 分别为 2.92, 0.0696, 1.16, 0.286, 0.0792 mg·g⁻¹; RSD 分别为 0.3%, 1.4%, 0.4%, 0.3%, 0.8%。

2.7 稳定性试验 取同一份样品(编号 1)的供试品溶液, 避光放置, 分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样分析。结果葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 0.9%, 0.8%, 1.5%, 1.0%。表明供试品溶液避光放置 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验 称取已测知含量的升阳散火汤浸膏粉(编号 1)9 份, 每份 0.5 g 平均分为 3 组, 精密称定, 置锥形瓶中, 每组分别加入 1220 μg·mL⁻¹ 葛根素对照品溶液 0.6, 1.2, 1.8 mL; 85.8 μg·mL⁻¹ 阿魏酸对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6 mL; 700 μg·mL⁻¹ 异阿魏酸对照品溶液 0.42, 0.85, 1.24 mL; 350 μg·mL⁻¹ 蛇床子素对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6 mL; 99 μg·mL⁻¹ 异欧前胡素对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6 mL。照“2.1.3”项下方法操作, 制备低、中、高 3 种浓度的供试溶液, 每一浓度 3 份。在上述色谱条件下进样分析。结果见表 1。

表 1 加样回收率测定结果
Tab 1 Results of the recoveries

化合物 (component)	样品量 (original) / μg	加入量 (add) / μg	测得量 (found) / μg	回收率 (recovery) (<i>n</i> = 3)		平均值 (average) % (<i>n</i> = 9)
				平均值 (mean) %	RSD %	
葛根素 (puerarin)	146.7	732.0	2191	98.9	0.6	99.7
	146.5	146.4	2918	99.2	0.5	
	146.8	219.6	3683	100.9	1.2	
阿魏酸 (ferulic acid)	34.95	17.16	52.22	100.6	0.6	100.6
	34.89	34.32	69.20	100.0	1.3	
	34.98	51.48	87.10	101.2	0.6	
异阿魏酸 (isomer ferulic acid)	582.9	294.0	878.4	100.5	0.8	100.2
	582.0	595.0	1182	100.8	1.1	
	583.4	868.0	1446	99.3	1.1	
蛇床子素 (osthole)	143.8	70.00	214.4	100.9	0.8	100.6
	143.6	140.0	283.8	100.2	0.7	
	143.9	210.0	355.1	100.6	0.6	
异欧前胡素 (isomer imperatorin)	39.74	19.80	59.50	99.8	0.8	99.8
	39.68	39.60	79.32	100.1	0.9	
	39.78	59.40	98.89	99.5	0.7	

2.9 样品含量测定 取 3 批样品, 每批取 3 份, 按“2.1.3”项方法制备供试品溶液, 精密吸取 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱峰面积, 外标一点法计算含量。结果见表 2。

3 讨论

3.1 由于本方为一古代名方, 目前为止并无成方制剂。本研究在传统水煎提取基础上, 应用星点设计效应面法, 以加水量、水煮时间、醇沉浓度为自变量,

以葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素、异欧前胡素 5 种成分各自含量, 及干膏得率为因变量, 采用 H as-san 方法计算总评“归一值”, 并用多元线性回归及二项式拟合, 建立总评归一值与自变量之间的数学关系, 经效应面法预测最佳工艺条件。优化其提取工艺后, 以最优工艺制备了 3 批样品, 进行含量测定。具体工艺优化研究尚待发表。

表 2 含量测定结果 ($n=3$)

Tab 2 Determination results

化合物 (component)	样品 (sample) 1		样品 (sample) 2		样品 (sample) 3	
	含量 (content)	RSD	含量 (content)	RSD	含量 (content)	RSD
	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	%	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	%	$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	%
葛根素 (puerarin)	2.92	1.3	2.92	1.1	2.92	1.3
阿魏酸 (ferulic acid)	0.0693	1.1	0.0692	1.1	0.0693	1.3
异阿魏酸 (isoferulic acid)	1.16	1.3	1.17	0.9	1.16	1.1
蛇床子素 (oshol)	0.286	0.9	0.286	1.5	0.284	1.2
异欧前胡素 (isoperatorin)	0.0793	1.2	0.0792	1.5	0.0792	0.8

3.2 分别考察了甲醇、50% 甲醇分别回流 1 h 和甲醇、50% 甲醇分别超声 30 min 的溶液, 结果发现, 回流得到的溶液比超声提取得到的溶液杂质多, 且得到的阿魏酸和异欧前胡素的量较少。故选用超声提取法。又分别考察了以 20、30、40 倍体积的甲醇、50% 甲醇、无水乙醇为提取溶剂, 分别超声提取 20、30、60 min, 结果发现 30 倍体积 50% 甲醇溶液超声提取 30 min 就能提取完全。但是超声提取杂质仍较多, 难以分离; 故又考察了 30 倍体积 50% 甲醇溶液超声提取 30 min 后, 分别以 3 倍量和 4 倍量乙酸乙酯、乙醚和氯仿为萃取剂, 分别萃取 2 次、3 次、4 次, 取有机层进行分析, 结果表明, 采用 50% 甲醇超声, 用 3 倍量乙醚萃取 3 次后得到的样品杂质少, 易于分离, 且提取完全。根据理化性质, 阿魏酸、异阿魏酸皆易溶于乙醚, 文献报道^[6], 蛇床子素和异欧前胡素适于用乙醚提取, 故本实验最终选用乙醚作为萃取溶剂。

3.3 以甲醇配制一定浓度的葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素对照品溶液, 在 190~400 nm 波长处进行紫外扫描, 结果葛根素、阿魏酸、异阿魏酸、蛇床子素和异欧前胡素分别在 250、320、316、322、310 nm 附近有较大吸收。由于 5 种成分中异欧前胡素的含量相对较小, 且 5 种成分在 310 nm 附近均有较大吸收, 为保证定量的准确性, 本实验选择 310 nm 为检测波长。

3.4 在预实验中考察了分别以甲醇、乙腈为有机相的流动相系统, 结果表明, 以乙腈为有机相时蛇床子素和异欧前胡素的柱效要略高于甲醇体系, 但是微调乙腈比例葛根素分离度便达不到 1.5, 故最终确定有机相为甲醇。又分别考察了以 0.05% 磷酸水溶液、1% 和 4% 醋酸水溶液为水相的流动相系统,

结果表明, 以 1% 醋酸水溶液为水相时, 阿魏酸、异阿魏酸的柱效偏低; 分别以 0.05% 磷酸水溶液为水相和以 4% 醋酸水溶液作为水相时, 被测组分峰柱效几乎相当, 均不低于 8000, 但考虑到 0.05% 磷酸水溶液中磷酸量的微量变化都会明显影响流动相系统, 条件难于重复, 故最终选择以 4% 醋酸水溶液为水相。在预实验设定梯度程序时, 曾以文献为基础设定了 0~10 min $A-B(20:80) \rightarrow A-B(30:70)$; 10~30 min $A-B(30:70) \rightarrow A-B(50:50)$ 及 0~10 min $A-B(30:70) \rightarrow A-B(40:60)$; 10~30 min $A-B(40:60) \rightarrow A-B(50:50)$ 等梯度程序, 但是由于本方药味多, 所测定的成分极性相差大, 得到的分离效果都不理想, 且分析时间长 (大于 65 min)。在不断摸索调整梯度程序后, 得到文中梯度程序可以使本方中 5 种有效成分完全分离, 有效缩短分离时间使分离时间小于 50 min。

3.5 根据相关文献报道^[7], 本方中有效成分阿魏酸、异阿魏酸不稳定, 容易分解, 故有必要将相关溶液避光保存。

参考文献

- 1 JIANG Ke-ming(江克明). Concise Dictionary of Prescription(简明方剂辞典). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Publishers(上海科学技术出版社), 2002: 234
- 2 LIU Shao-bing(刘哨兵). Examples of Shengyangsanhuo soft-extract's clinical application(升阳散火汤临床应用举隅). *JHubei Inst Nat Med Ed* (湖北民族学院学报 医学版), 1999, 16(2): 27
- 3 WANG Su-qin(王素琴). Changed Shengyangsanhuo soft-extract treating sixty patients with chronic pharyngitis(升阳散火汤加减治疗慢性咽炎 60 例). *China Naturopathy* (中国民间疗法), 2000, 8(6): 31
- 4 ZHANG De-guang(张德光). Shengyangsanhuo soft-extract treating sixty-five patients with chronic tonsillitis(升阳散火汤治疗慢性扁桃腺炎 65 例). *J Pract Tradit Chin Med* (实用中医药杂志), 2003, 19(8): 409
- 5 WANG Ben-xiang(王本祥). Modern Pharmacology Clinic of Chinese Traditional Medicine(现代中药药理与临床). Tianjin(天津): Tianjin Science and Technology Translation and Publishing Corporation(天津科技翻译出版公司), 2004: 336, 780, 1134, 1503
- 6 SHI Yue(石钺), WANG Wei-hua(王卫华), DU Li-jun(杜力军). Determination of isoperatorin and oshol in Gammaoy Xiaoshi capsule by RP-HPLC(高效液相色谱法测定感冒一小时胶囊中异欧前胡素和蛇床子素的含量). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(10): 950
- 7 PAN Rui-le(潘瑞乐), CHEN Di-hua(陈迪华), ZHU Chao-de(朱朝德). Determination of ferulic acid and isoferulic acid in Rhizoma Cinnicifugae by HPLC(高效液相色谱法测定中药升麻中阿魏酸和异阿魏酸的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20(6): 396

(本文于 2008 年 10 月 16 日收到)