

RP-HPLC法同时测定加味五子衍宗方汤剂中 3种活性成分的含量*

张泰¹, 窦桂芳², 王学美^{1*}, 刘桃云²

(1 北京大学第一医院 中西医结合研究室, 北京 100034 2 军事医学科学院 野战输血研究所, 北京 100850)

摘要 目的: 建立 RP-HPLC 法同时测定加味五子衍宗方汤剂中绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷的含量。方法: 采用 Hypersil GOLD-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 25 °C, 以 0.1% 甲酸溶液 (A) - 含 0.1% 甲酸的甲醇 (B) 为流动相, 线性梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 程序检测波长为 326 nm (0~17 min, 检测绿原酸) 和 350 nm (17.01~60 min, 检测金丝桃苷、淫羊藿苷)。结果: 在 58 min 内加味五子衍宗方汤剂中绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷分离良好; 依次在 1.75~112 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), 1.69~108 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), 2.5~160 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$) 浓度范围内呈良好的线性关系; 加样回收率 ($n=6$) 依次为 101.9%, 98.9%, 99.3%。结论: 本方法简便、可靠, 重复性好, 适用于测定加味五子衍宗方汤剂中绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷的含量。

关键词: 绿原酸; 金丝桃苷; 淫羊藿苷; 加味五子衍宗方; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0022-05

RP-HPLC simultaneous determination of 3 active components in the traditional Chinese medicinal preparation modified Wuzi Yanzong prescription decoction*

ZHANG Tai¹, DOU Gui-fang², WANG Xue-mei^{1*}, LIU Tao-yun²

(1. Department of Integrated Chinese and Western Medicine, First Hospital Peking University, Beijing 100034, China

2. Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, hyperin and icaritin in modified Wuzi Yanzong prescription decoction. **Methods** The samples were separated by a Hypersil GOLD-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with a linear gradient elution system using 0.1% (v/v) formic acid solution (A) and methanol [containing 0.1% (v/v) formic acid] (B) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹ and the eluate was detected by programmed wavelength (0~17 min, 326 nm for chlorogenic acid, 17.01~60 min, 350 nm for hyperin and icaritin). **Results** Chlorogenic acid, hyperin and icaritin were separated excellently in less than 58 min with the linear range of 1.75~112 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), 1.69~108 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), 2.5~160 μg · mL⁻¹ ($r=0.9999$), with the recoveries ($n=6$) of 101.9%, 98.9% and 99.3%, respectively. **Conclusion** The established method is simple and reliable with good reproducibility for the quantitative analysis of active components of chlorogenic acid, hyperin and icaritin in modified Wuzi Yanzong prescription decoction.

Key words chlorogenic acid, hyperin, icaritin, modified Wuzi Yanzong prescription, RP-HPLC

加味五子衍宗方是由补益名方“五子衍宗方”加淫羊藿而成的经验方, 由枸杞子、菟丝子、五味子、车前子、覆盆子以及淫羊藿组成。临床研究证实加味五子衍宗方能有效改善轻度认知障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 患者的记忆功能, 且能够防

治其向痴呆发展^[1]。该复方作用机理可能与降低胆碱酯酶活性, 改善自由基代谢, 减少线粒体 DNA 氧化损伤等有关^[2]。

绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷是加味五子衍宗方君药枸杞子、菟丝子、淫羊藿的重要活性成分^[3-6],

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30973813, 30672760)

** 通讯作者 Tel: (010) 83573053 E-mail: wangxuemebj@163.com

其中金丝桃苷和淫羊藿苷具有抗自由基产生, 抑制钙内流, 降低脑组织中胆碱酯酶活性等作用^[7-8]; 绿原酸是1种自由基捕捉剂及抗氧化剂^[9]。这3种成分与全方药效密切相关, 是全方主要有效成分, 测定其含量对于加味五子衍宗方的质量控制具有重要的意义。目前, 对五子衍宗方及其类方化学成分、质量标准的研究通常只对单个成分定量测定, 且多是针对方中臣药五味子所含的木脂素类成分^[10-11]。虽已有文献用HPLC法分别测定淫羊藿苷、金丝桃苷的含量^[12-13], 但至今未见对绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷同时测定的报道。

本文采用反相HPLC程序波长法同时测定了加味五子衍宗方汤剂中绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷的含量。

1 仪器与试剂

Agilent 1100高效液相色谱仪(Agilent USA), 由G1322A在线脱气机、G1311A四元泵、G1313A自动进样器、G1316A柱温箱、G1314A可变波长检测器(VWD)、Agilent ChemStation色谱工作站组成; Signa 3K15离心机(Signa Germany); FA 1104电子天平(上海天平仪器厂); ZDHW型调温电热套(北京中兴伟业仪器有限公司); XZ-7A旋转蒸发器(中科院生物物理所科龙仪器厂)。

枸杞子、菟丝子、五味子、车前子、覆盆子以及淫羊藿等饮片购自北京同仁堂药店, 经北京大学医学部药学院屠鹏飞教授鉴定。对照品绿原酸(110753-200413)、金丝桃苷(111521-200303)、淫羊藿苷(110737-200415)均购自中国药品生物制品检定所。甲醇(Fisher USA)、甲酸(Signa Germany)均为色谱纯, 水为三蒸水。

2 溶液制备

2.1 对照品储备液 分别精密称取对照品绿原酸5.6mg、金丝桃苷5.4mg、淫羊藿苷8.0mg置于同一棕色25mL量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 即得对照品储备液, 浓度依次为0.224、0.216、0.320 mg·mL⁻¹。所得对照品储备液4℃冰箱避光、密封保存, 备用。

2.2 供试品溶液 枸杞子、菟丝子、五味子、车前子、覆盆子、淫羊藿, 按照饮片比例8:8:1:2:4:8称取, 共15.5g用10倍量的水浸泡1h, 共煎煮提取3次, 每次1h, 水提液合并, 离心处理(5500 r·min⁻¹, 10min)后, 取上清液。上清液旋转蒸发浓缩(60℃水浴), 定容于50mL量瓶中, 得水煎浓缩液, 4℃冰箱避光、密封保存。精密量取水煎浓缩液1.00mL, 置于10mL量瓶中, 加入甲醇超声处理30min, 冷却至

室温, 以甲醇定容, 过0.22μm微孔滤膜, 取续滤液, 即得供试品溶液, 4℃冰箱避光、密封保存。

2.3 阴性样品溶液 由于绿原酸为枸杞子、菟丝子、淫羊藿的共有成分, 金丝桃苷为覆盆子、菟丝子、淫羊藿的共有成分, 故按处方比例, 制备了缺枸杞子、菟丝子、淫羊藿, 缺覆盆子、菟丝子、淫羊藿, 缺淫羊藿的阴性样品。按“2.2”项下方法制成相应的阴性样品溶液, 所得溶液4℃冰箱避光、密封保存。

3 色谱条件

采用Hypersil GOLD-C₁₈(250mm×4.6mm, 5μm)色谱柱, 流动相为0.1%甲酸溶液(A)-含0.1%甲酸的甲醇(B), 线性梯度洗脱(0~1min, 5%B→8%B; 1~7min, 8%B→21%B; 7~15min, 21%B→22.5%B; 15~17min, 22.5%B→32%B; 17~32min, 32%B→35%B; 32~37min, 35%B→55%B; 37~47min, 55%B→65%B; 47~50min, 65%B→100%B; 50~58min, 100%B→5%B; 58~73min, 5%B), 流速1.0mL·min⁻¹, 程序检测波长为326nm(0~17min, 检测绿原酸)和350nm(17.01~60min, 检测金丝桃苷、淫羊藿苷), 进样量10μL, 柱温25℃。

分别取对照品储备液稀释4倍的溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各10μL注入高效液相色谱仪, 在上述条件进样测定, 色谱图见图1。三待测组分绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷色谱峰与相邻峰的分离度均大于1.5, 样品中其他成分对绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷的测定无干扰。

4 方法与结果

4.1 线性关系考察 取对照品储备液适量, 用甲醇稀释1, 2, 4, 8, 16, 32, 64倍, 即得系列对照品溶液。在上述色谱条件下分别进样, 记录色谱图。以对照品X(μg·mL⁻¹)为横坐标, 色谱峰面积Y为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷的回归方程(n=7)分别为:

$$Y = 34.06X - 17.62 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 22.55X - 5.935 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 11.32X - 1.783 \quad r = 0.9999$$

结果表明, 绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷进样浓度分别在1.75~112.169、2.5~160 μg·mL⁻¹范围内呈良好线性关系。

4.2 精密度试验 取“4.1”项下稀释4倍的对照品溶液, 在上述色谱条件下连续进样测定6次, 以各色谱峰面积计算, 绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷RSD依次为1.7%、1.6%、1.7%。

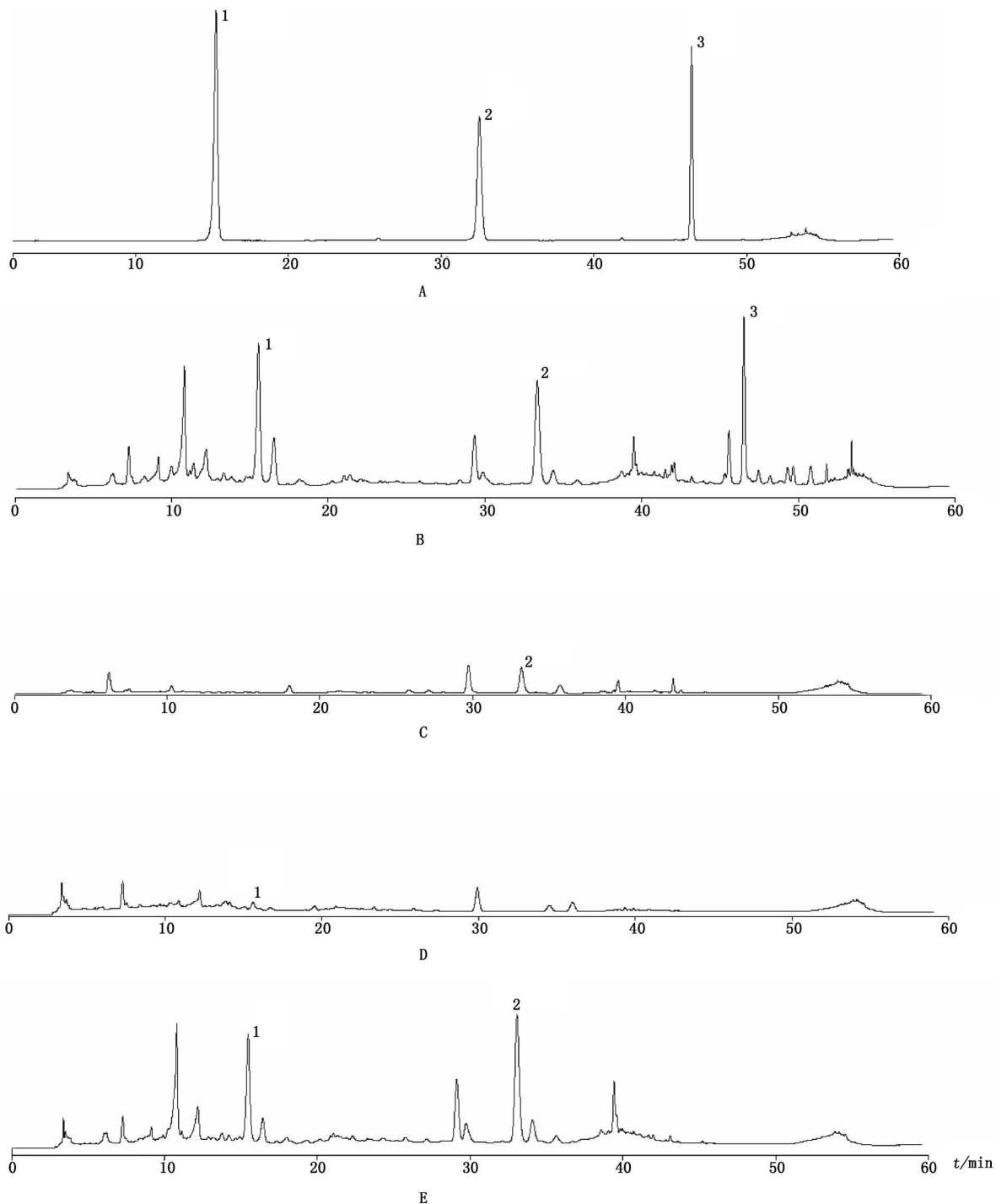


图 1 样品 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of the samples

A. 对照品 (reference substances) B. 加味五子衍宗方汤剂样品 (modified Wuzi Yanzong prescription decoction) C. 缺枸杞子、菟丝子、淫羊藿样品 (sample without Fructus Lycii Semen Cuscutae, Herba Epimedii) D. 缺覆盆子、菟丝子、淫羊藿阴性样品 (sample without Fructus Rubi Semen Cuscutae Herba Epimedii) E. 缺淫羊藿样品 (sample without Herba Epimedii)

1 绿原酸 (chlorogenic acid) 2 金丝桃苷 (hyperin) 3 淫羊藿苷 (icariin)

4.3 稳定性试验 取供试品溶液, 分别在制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 h 按上述色谱条件进样测定, 以各色谱峰面积计算, RSD 依次为 1.5%, 2.5%, 1.3%。

4.4 重复性试验 按“2.2”项下方法制备 5 份加味五子衍宗方供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷的 RSD 依次为 1.4%,

1. 6%, 1. 5%。

4 5 加样回收率试验 分别精密称取对照品绿原酸 20 mg 金丝桃苷 28 mg 淫羊藿苷 36 mg 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 即得加样对照品溶液, 浓度依次为 200, 280, 360 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 取已知绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷含量的加味五子衍宗方水煎浓缩液 6 份, 每份 1.00 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入上述加样对照品溶液 1.00 mL, 以“2.2”项下方法制备所需溶液, 按上述色谱条件进行测定。绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷加样回收率 ($n=6$) 依次为 101.9%, 98.9%, 99.3%; RSD 依次为 2.2%, 1.6%, 2.1%。

4 6 样品测定 按“2.2”项下方法, 制备 3 批供试品溶液, 按上述色谱条件测定。将色谱峰面积代入回归方程, 分别计算 3 批加味五子衍宗方汤剂中绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷含量, 结果见表 1。

表 1 加味五子衍宗方汤剂中绿原酸、金丝桃苷、淫羊藿苷的测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=6$)

Tab 1 The contents of chlorogenic acid, hyperin and icaritin in modified Wuziyanzong prescription decoction

批号 (Lot No.)	绿原酸 (chlorogenic acid)	金丝桃苷 (hyperin)	淫羊藿苷 (icaritin)
09120201	26.04	35.40	61.15
09120202	26.87	32.87	53.01
09120203	27.35	35.75	59.21

5 讨论

5.1 检测波长的选择 为了实现绿原酸、金丝桃苷与淫羊藿苷的同时测定, 分别对 3 个对照品的溶液在 200~600 nm 范围内扫描, 发现它们的最大吸收波长相差较远, 难以选择单一波长对这 3 个化合物进行紫外检测。其中绿原酸在 326 nm 有最大吸收; 金丝桃苷最大吸收波长在 232 nm, 但其与淫羊藿苷在 350 nm 处均有较大吸收, 峰形较好, 故变换检测波长进行测定, 效果满意。

5.2 流动相的选择 绿原酸属于有机酸类, 含有羧基, 金丝桃苷也由于受结构中酚羟基的影响, 都存在测定时易拖尾的现象, 流动相中加入适量酸可抑制其拖尾, 改善峰形对称性。3 种成分极性相差较大, 在等度洗脱条件下难以实现同时测定, 故采用梯度洗脱方法。本试验先后考察了甲醇-水(或甲酸)、乙腈-水(或甲酸)、甲醇-乙腈-甲酸等多种流动相体系, 经反复摸索, 结果表明以 0.1% 甲酸溶液-甲醇(含 0.1% 甲酸)梯度洗脱效果最好。

5.3 其他成分 加味五子衍宗方最初是以汤剂形

式应用, 本文亦针对汤剂进行了分析。但未检出槲皮素, 也未发现文献中五子衍宗方质量标准多次采用的木脂素类成分(来源于五味子)。可能是因为文献中所述剂型多为丸剂等, 加之两者水溶性较差, 难以用水提取出来。近期实验结果表明, 该方的总黄酮是其活性部位^[14]。金丝桃苷、淫羊藿苷均属黄酮类成分, 对本方其他黄酮类活性成分的研究有待深入。

5.4 结论 本文建立的方法能同时分离测定加味五子衍宗方的有机酸类成分绿原酸和黄酮类成分金丝桃苷、淫羊藿苷, 方法简便、可靠, 重复性好, 可用于加味五子衍宗方的质量控制。

参考文献

- FU Hong(富宏), WANG Xue-mei(王学美), LIU Geng-xin(刘庚信), *et al* Follow-up study on treatment of mild cognitive impairment by modified Wuziyanzong granule(加味五子衍宗颗粒治疗轻度认知障碍的随访研究). *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2008, 14(2): 67
- FU Hong(富宏), WANG Xue-mei(王学美), LIU Geng-xin(刘庚信), *et al* Clinical study on treatment of mild cognitive impairment by modified Wuziyanzong granule(加味五子衍宗颗粒治疗轻度认知障碍的临床研究). *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2004, 24(5): 392
- WANG Zhan(王展), HE Zhi-sheng(何直昇). Studies on the chemical constituents of the seed of Chinese Dodder (*Cuscuta chinensis*) (菟丝子化学成分的研究). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(9): 577
- LI Yu-bo(李遇伯), MENG Fan-hao(孟繁浩), LU Xi-mei(鹿秀梅), *et al* Chemical constituents from herb of *Epimedium brevicornum* (淫羊藿化学成分的研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(8): 586
- ZHANG Zi-ping(张自萍), LIAO Guo-ling(廖国玲), SHI Xiaowen(史晓文). Determination of chlorogenic acid and rutin in *Lycium barbarum* L. from different habitats by HPLC(高效液相色谱法测定不同产地宁夏枸杞中芦丁和绿原酸的含量). *Lishichen Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 18(7): 1586
- HU Run-huai(胡润淮). Determination of chlorogenic acid in compound Xianlingpi injection by HPLC(HPLC法测定复方仙灵脾注射液中绿原酸的含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(10): 770
- LIM In-fang(李敏芳), LI Hui(李慧), WANG Xue-mei(王学美). Progress of pharmacological research on hyperin(金丝桃苷药理作用研究进展). *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2008, 15(4): 102
- LI Li(李婵), WANG Xue-mei(王学美). Progress of pharmacological research on icaritin(淫羊藿苷药理作用研究进展). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33(23): 2727
- ZHANG An-ling(张鞍灵), MA Qiong(马琼), GAO Jin-ming(高锦明), *et al* Studies on bioactivities of chlorogenic acid and its

- analogues(绿原酸及其类似物与生物活性). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2001, 32(2): 173
- 10 JIANG Ping(蒋平), WEN Yong-sheng(文永盛), WU Yan-hui(吴艳辉), *et al* Determination the content of γ -schisandrin in WuziYanzong pills by HPLC(五子衍宗丸中五味子乙素的含量测定). *China Pharm*(中国药师), 2006, 9(1): 9
- 11 GUO Yi-biao(郭怡彪), HU Xiao-wei(胡晓炜), NIMei-wen(倪美文). Determination the content of deoxyschisandrin and γ -schisandrin in WuziYanzong pills by RP-HPLC(RP-HPLC法测定五子衍宗丸中五味子甲素、五味子乙素含量). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2002, 33(4): 317
- 12 LIM in-fang(李敏芳), LI Hui(李慧), WANG Xue-mei(王学美), *et al* Determination of icariin in JiaweiWuziYanzong pill by HPLC(高效液相色谱法测定加味五子衍宗丸中淫羊藿苷含量). *Chin J Inf Tradit Chin Med*(中国中医药信息杂志), 2008, 15(3): 51
- 13 LIM in-fang(李敏芳), LI Hui(李慧), WANG Xue-mei(王学美), *et al* Determination of hyperoside in the WuziYanzong pill by HPLC(高效液相色谱法测定五子衍宗丸中金丝桃苷的含量). *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2008, 14(2): 1
- 14 LILi(李婵), CAI Hao-ran(蔡浩然), LILin(李琳), *et al* Effect of total flavonoids of JiaweiWuziYanzong prescription on VGCCs induced by ankyrin- β_{25-35} peptide in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampal slice(加味五子衍宗方总黄酮对大鼠海马锥体细胞VGCC通道的影响). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2009, 34(15): 1975

(本文于 2010年 2月 6日收到)

欢迎订阅 2011年《药物分析杂志》

《药物分析杂志》是由中国科学技术协会主管, 中国药学会主办, 中国食品药品检定研究院(原中国药品生物制品检定所)药物分析杂志编辑部编辑出版的学术性期刊。主要栏目有研究论文、交流、综述等。报道化学药物、中药与天然药物、抗生素、蛋白质、多肽类药物、生物技术药物等的分析、质量标准研究、临床药物分析、药物分析基础理论与实践以及新方法、新技术的应用, 并及时报道国家重大研究课题的最新成果。

本刊获 2006年、2007年、2008年中国科协精品科技期刊工程项目 C类资助, 获 2009年中国科协精品科技期刊示范项目证书, 2010年再度获得中国科协精品科技期刊工程 C类项目资助。

本刊为我国自然科学核心期刊、中文核心期刊、全国统计源期刊, 被国内外主要检索系统收录。

本刊坚持质量第一、面向广大读者, 以其独特的深度与广度展示我国药物分析的现状与发展。

本刊为月刊, 大 16开本, 目前每期 192页, 国内外公开发行。每期定价 30元, 全年定价 360元, 国内邮发代号: 2-237, 国外读者请同中国国际图书贸易总公司(北京 399信箱)联系。欢迎广大读者到当地邮局订阅, 并欢迎有关专业人员集体订购, 价格从优。

本刊已将创刊以来的文章制成光盘, 需要者请与本刊联系。

希望为本刊推广发行者, 价格另议。

地址: 北京市天坛西里 2号(100050) 联系人: 刘小帅

电话: (010) 67058427 传真: (010) 67012819

编辑部网址: www.ywfxzz.cn 浏览网址: www.nicbbp.org.cn

E-mail: ywfk@nicbbp.org.cn

《药物分析杂志》编辑部