

黄芪桂枝五物汤物质基准质量标准研究

程东岩¹ 王隶书¹ 高军¹ 陈昕² 王超楠²

1. 吉林省中医药科学院 吉林 长春 130012

2. 长春中医药大学 吉林 长春 130117

【摘要】目的: 建立黄芪桂枝五物汤物质基准的质量标准。方法: 采用薄层色谱法对组方中 4 味中药进行定性鉴别; 采用 HPLC 法对制剂中黄芪甲苷进行含量测定; 并进行指纹图谱研究。结果: 薄层鉴别方法专属性好, 斑点清晰; 15 批基准样品指纹图谱共确定共有峰 10 个, 且与对照指纹图谱的相似度均大于 0.95; 建立了黄芪甲苷的 HPLC-ELSD 含量测定方法, 并制订其限度。结论: 所建立的方法简便准确, 可为后续其复方制剂的研发提供有力的技术支持。

【关键词】黄芪桂枝五物汤; 物质基准; 质量标准; TLC; 指纹图谱; 含量测定

Study on quality standard of Huangqi Guizhi Wuwu decoction

Cheng Dongyan¹ Wang Lishu¹ Gao Jun¹ Chen Xin² Wang Chaonan²

(1. Jilin Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130012;

2. Changchun University of Traditional Chinese Medicine Changchun 130117)

Objective: To establish the quality standard of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction. Methods: Four traditional Chinese medicines in the prescription were identified by TLC. The content of astragaloside IV in the preparation was determined by HPLC. And study the fingerprint. Results: TLC identification method has good specificity and clear spots. There are 10 peaks in the fingerprints of 15 batches of reference samples, and the similarity with the control fingerprints is greater than 0.95. A HPLC-ELSD method for the determination of astragaloside IV was established and its limit was established. Conclusion: The established method is simple and accurate, which can provide strong technical support for the subsequent research and development of its compound preparation.

Keywords: Huangqi Guizhi Wuwu Decoction; Material benchmark; Quality standards; TLC; Fingerprint; Content determination

黄芪桂枝五物汤出自东汉张仲景所著的《金匱要略》^[1], 系治疗血痹证的经典名方。该方由黄芪三两、芍药三两、桂枝三两、生姜六两、大枣十二枚组成, 主要用于治疗血痹证。按照国家中药经典名方复方制剂的申报资料要求, 需先完成物质基准研究, 才能进行制剂研究。通过查阅文献可知, 现阶段虽有少量黄芪桂枝五物汤物质基准的相关研究报道^[2-3], 但研究不够全面。本研究将首次从多角度建立黄芪桂枝五物汤物质基准的质量标准, 从而为后续其复方制剂研发奠定基础。现将试验过程及结果报道如下:

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-10ATVP 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); ELS-D2000ES 蒸发光散射检测

器 (美国奥泰公司); SECURA125-1CN 电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司);

KQ-5200DE 液晶超声波清洗器 (昆山洁力美超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与试药

对照品及对照药材购自中国食品药品检定研究院、上海源叶生物科技有限公司及成都德思特生物技术有限公司。

硅胶 G 铝箔板、硅胶 GF₂₅₄ 铝箔板由德国 Merck 公司生产; 乙腈、甲酸均为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 物质基准制备方法

取黄芪 124.2g、白芍 124.2g、桂枝 124.2g、生姜 248.4g、大枣 108g, 置于煎药壶中, 加水 3600ml, 煎至 1200ml, 滤过, 滤液冷冻干燥, 粉碎, 即得。

2.2 TLC 鉴别

2.2.1 黄芪

取本品 3g, 置具塞锥形瓶中, 加含 4% 浓氨试液的 80% 甲醇溶液 40ml, 加热回流 1 小时, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 30ml 微热使溶解, 用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 30ml, 弃去乙酸乙酯液, 水层用水饱和正丁醇振摇提取 2 次, 每次 30ml, 合并正丁醇液, 用 2% 氢氧化钠溶液洗涤 2 次, 每次 30ml, 弃去氢氧化钠溶液, 正丁醇液用正丁醇饱和的水洗涤 2 次, 每次 30ml, 弃去水液, 正丁醇液蒸干, 残渣加甲醇 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取缺黄芪阴性样品, 同法制得黄芪阴性液。再取黄芪甲苷对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 0.8mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述三种溶液各 6 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水 (65:35:10) 10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 热风吹至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 显相同颜色的斑点, 且阴性无干扰, 结果见图 1。

2.2.2 白芍

取本品 3g, 置烧杯中, 加水 20ml 超声使溶解, 在搅

拌下加入甲醇 60ml, 静置 10 分钟, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水 20ml 使溶解, 移置分液漏斗中, 用三氯甲烷振摇提取 2 次, 每次 20ml, 合并三氯甲烷液, 备用, 水层继续用水饱和正丁醇振摇提取 2 次, 每次 20ml, 合并正丁醇液, 蒸干, 残渣加甲醇 5ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取缺白芍阴性样品, 同法制得白芍阴性液。再取芍药苷对照品, 加甲醇制成每 1ml 含 2mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取供试品溶液、白芍阴性液各 3 μ l、对照品溶液 6 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯 - 甲醇 - 甲酸 - 水 (12:1:1:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以含 5% 香草醛的 10% 硫酸乙醇试液, 热风吹至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 显相同颜色的斑点, 且阴性无干扰, 结果见图 1。

2.2.3 桂枝

取本品 3g, 置烧杯中, 加水 40ml 超声使溶解, 移置分液漏斗中, 用乙醚振摇提取 2 次, 每次 40ml, 合并乙醚液, 挥干溶剂, 残渣加乙酸乙酯 1ml 使溶解, 作为供试品溶液。另取缺桂枝阴性样品, 同法制得桂枝阴性液。再取桂皮醛对照品, 加乙酸乙酯制成每 1ml 含 1 μ l 的溶液, 作

为对照品溶液。吸取上述三种溶液各 4 μ l, 分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C) - 乙酸乙酯 (17:3) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 显相同颜色的荧光斑点; 喷以二硝基苯胍乙醇试液。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 显相同颜色的斑点, 结果见图 1。

2.2.4 生姜

取 2.2.2 项下的备用三氯甲烷液, 用 5% 碳酸钠溶液洗涤 2 次, 每次 30ml, 分取三氯甲烷液, 蒸干, 残渣加乙酸乙酯溶解使成 0.5ml, 作为供试品溶液。另取缺生姜阴性样品, 同法制得生姜阴性液。再取 6-姜辣素对照品, 加乙酸乙酯制成每 1ml 含 1mg 的溶液, 作为对照品溶液。吸取供试品溶液、生姜阴性液各 10 μ l、对照品溶液 3 μ l, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯 - 乙酸乙酯 - 甲酸 (7:2:0.5) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以含 5% 香草醛的 10% 硫酸乙醇试液, 热风吹至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应位置上, 显相同颜色的斑点, 结果见图 1。

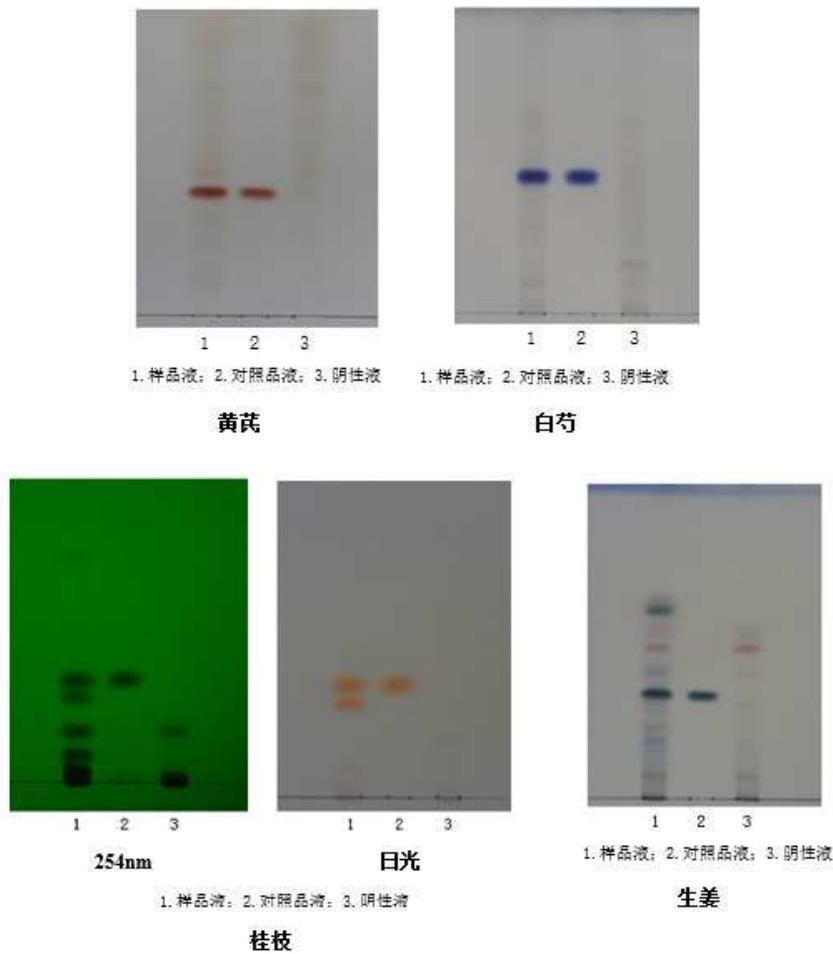


图 1 黄芪桂枝五物汤物质基准 TLC 图谱

2.3 指纹图谱

2.3.1 色谱条件

色谱柱: VisionHTC₁₈HL (250mm \times 4.6mm, 5 μ m, Grace); 以乙腈为流动相 A, 0.2% 甲酸溶液为流动

相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 5min, 93%~90%B; 5 ~ 30min, 90%~81%B; 30 ~ 50min, 81%~70%B; 50 ~ 65min, 70%~35%B; 65 ~ 70min, 35%B); 检测波长转换 (0 ~ 24min, 250nm; 24 ~ 70min, 280nm); 流速为每分钟 1.0ml;

柱温 30°C; 进样量: 10 μ l。理论板数按芍药苷峰计算应不低于 20000。

2.3.2 溶液的制备

1. 参照物溶液制备取芍药苷对照品适量, 精密称定, 加 50% 甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液, 即得。

2. 供试品溶液的制备取本品约 0.25g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 10ml, 称重, 超声处理 (功率 200W, 频率 40kHz) 20 分钟, 放冷, 称重, 加 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 离心 (每分钟 3000 转) 10 分钟, 取上清液, 滤过, 取续滤液, 即得。

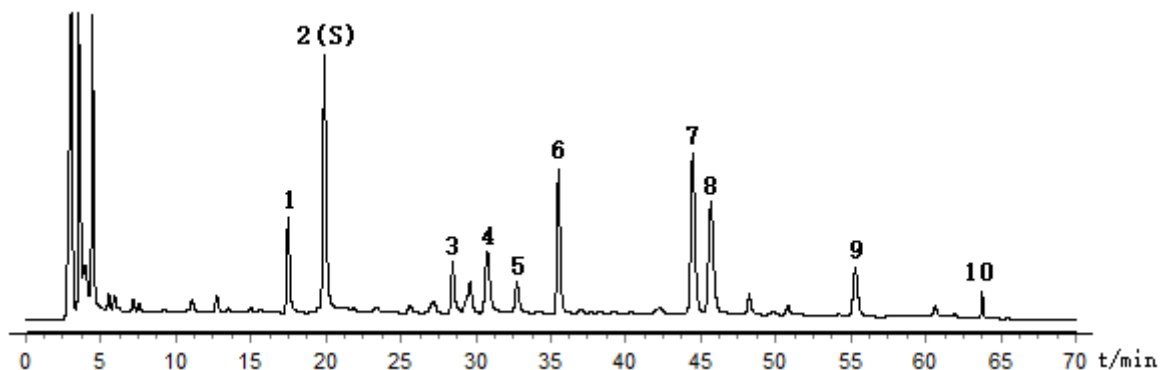


图 2 黄芪桂枝五物汤物质基准 HPLC 对照指纹图谱

峰 1: 芍药内酯苷; 峰 2(S): 芍药苷; 峰 3: 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 峰 4: 香豆素; 峰 6: 1,2,3,4,6-O- 五没食子酰葡萄糖; 峰 7: 肉桂酸; 峰 8: 桂皮醛; 峰 9: 桂枝药材; 峰 10: 6-姜辣素。

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX 300SB C₁₈ 柱 (4.6mm \times 250mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水 (36:64); 流速: 0.8ml \cdot min⁻¹; 柱温: 30°C; 蒸发光散射检测器检测。

2.4.2 溶液的制备

1. 对照品溶液的制备

取黄芪甲苷对照品适量, 精密称定, 加 80% 甲醇制成每 1ml 含 0.14mg 的溶液, 即得。

2. 供试品溶液的制备

本品约 1.5g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入含 4% 浓氨试液的 80% 甲醇溶液 50ml, 密塞, 称定重量, 加热回流 1 小时, 放冷, 再称定重量, 用含 4% 浓氨试液的 80% 甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25ml, 蒸干, 残渣用 80% 甲醇溶解, 转移至 5ml 量瓶中, 加 80% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

3. 阴性样品溶液的制备

取不含黄芪的阴性制剂, 按 2.4.2.2 项下方法制成黄芪阴性样品溶液。

2.4.3 专属性实验

分别精密吸取阴性样品液、供试品溶液、对照品液各 10 μ l, 按 2.4.1 项下条件进样测定, 结果在黄芪甲苷对照品色谱峰相应的保留时间处, 阴性样品无色谱峰出现, 说明阴性样品不干扰检出。

2.3.3 方法学考察分别进行了精密度、稳定性及重复性研究, 结果各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值均小于 3%, 说明所建立方法可行。

2.3.4 样品测定分别取 15 批物质基准粉末各约 0.25g, 按选定方法制成供试品溶液, 按选定色谱条件注入液相色谱仪进行分析。根据测定结果可知, 15 批样品有 10 个共有峰, 通过与对照品及对照药材比对, 指出各色谱峰归属。将所得的 15 个色谱图分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”进行数据分析, 生成对照指纹图谱, 结果见图 2。进行相似度评价, 结果相似度均在 0.95 以上。

2.4.4 方法学考察

分别进行了线性关系的考察、精密度、稳定性、重复性及加样回收率试验, 结果测定结果均符合相关规定, 说明所建立方法可行。

2.4.5 样品含量测定

依选定方法, 对十五批样品中的黄芪甲苷含量进行测定, 结果含量分别为 0.683、0.656、0.583、0.648、0.647、0.627、0.607、0.600、0.705、0.693、0.685、0.648、0.653、0.638、0.649 mg/g。根据实测结果并结合相关规定, 拟将物质基准中黄芪甲苷含量限度暂定为每 1g 含黄芪以黄芪甲苷计应为 0.454mg~0.843mg。

3 讨论

曾采用二极管阵列检测器对物质基准样品进行指纹图谱检测, 根据结果选取了几个波长的图谱, 根据特征峰的灵敏度选择以波长转换方法进行检测, 以保证各个共有峰的吸收灵敏。

参考文献:

- [1] 范永升. 金匱要略 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016:1-445.
- [2] 陈明, 黎柳冰, 詹家辉, 等. HPLC 法测定黄芪桂枝五物汤物质基准 6 种成分含量 [J]. 今日药学, 2023, 33(1):35-39.
- [3] 韩迪, 王姗姗, 唐嵩媛, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的黄芪桂枝五物汤基准样品化学成分分析及表征 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9):141-149.

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (项目编号: 20210401074YY)