

黄芪白术配伍前后黄芪化学成分分析研究

张建伟 庞帼敏 麦国荣 黄 健 郑文红 霍燕娴

(广东省佛山市中医院制剂中心, 佛山, 528216)

摘要 目的: 基于 HPLC 分析黄芪白术配伍前后黄芪化学成分分析研究, 阐释中药合理配伍的科学内涵。方法: 采用高效液相(HPLC)指纹图谱分析进行线性关系分析以及加样回收率试验考察 HPLC 的严谨性。HPLC 指纹图谱: 取黄芪甲苷对照品溶液、缺黄芪阴性对照溶液、黄芪供试品溶液和黄芪白术配伍供试品溶液进行 HPLC 指纹图谱分析, 同时取 3 个产地黄芪白术分析黄芪化学成分含量。结果: 1) 在线性关系考察在 1.024 ~ 10.24 μg 范围内线性关系良好。2) 加样回收率试验结果中平均回收率为 99.60%, RSD 为 2.0%, 显示加样回收率试验良好, HPLC 严谨性高。3) HPLC 指纹图谱分析显示, 对照品溶液、黄芪供试品溶液、黄芪白术供试品溶液和缺黄芪阴性对照溶液中, 缺黄芪阴性对照溶液无干扰, 而黄芪甲苷与其他成分的基线分离良好。4) 3 个产地均显示黄芪白术配伍后黄芪的化学成分黄芪甲苷的含量有所增加, 其中以内蒙古产地的黄芪白术配伍中黄芪甲苷的含量最高。结论: 黄芪白术配伍前后黄芪的主要化学成分为黄芪甲苷, 其中以内蒙古提供的药材含量最高。

关键词 HPLC; 黄芪; 白术; 配伍; 化学成分

Study on Chemical Constituents of Radix Astragali seu Hedysari Before and After Compatibility of Radix Astragali seu Hedysari and Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

Zhang Jianwei, Pang Guomin, Mai Guorong, Huang Jian, Zheng Wenhong, Huo Yanxian

(Center for Preparations, Foshan Hospital of TCM, Foshan 528216, China)

Abstract Objective: To analyze and study the chemical constituents of Radix Astragali seu Hedysari before and after compatibility of Radix Astragali seu Hedysari and Rhizoma Atractylodis Macrocephalae based on HPLC, and to explain the scientific connotation of the rational compatibility of Chinese herbal medicine. **Methods:** The linear relationship analysis was conducted by HPLC and the sample recovery test was used to investigate the preciseness of HPLC. HPLC fingerprint: astragaloside reference solution, negative reference solution lack of Radix Astragali seu Hedysari, Radix Astragali seu Hedysari test solution and the compatibility of Radix Astragali seu Hedysari and Rhizoma Atractylodis Macrocephalae test solution for HPLC fingerprint analysis, and chemical constituents of Radix Astragali seu Hedysari and Rhizoma Atractylodis Macrocephalae from 3 areas were analyzed. **Results:** 1) The linear relationship was good in the range of 1.024 ~ 10.24 μg , and with 2.2 sample recovery test results. 2) The average recovery rate was 99.60%, and RSD was 2%, which showed that the sample recovery rate was good, and the preciseness of HPLC was high. 3) HPLC fingerprint analysis showed that in reference solution, negative reference solution lack of Radix Astragali seu Hedysari, Radix Astragali seu Hedysari test solution and the compatibility of Radix Astragali seu Hedysari and Rhizoma Atractylodis Macrocephalae test solution, no interference in negative reference solution lack of Radix Astragali seu Hedysari and the baseline separation of astragaloside and other components were good. 4) Analysis in 3 areas showed that the content of astragaloside increased with the compatibility of Radix Astragali seu Hedysari and Rhizoma Atractylodis Macrocephalae, among which that content was the highest from Inner Mongolia. **Conclusion:** The main chemical constituents of Radix Astragali seu Hedysari after the compatibility of Radix Astragali seu Hedysari and Rhizoma Atractylodis Macrocephalae, among which the content in Inner Mongolia is the highest.

Key Words HPLC, Radix Astragali seu Hedysari, Rhizoma Atractylodis Macrocephalae, Compatibility, Chemical constituents
中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.073

复方配伍是根据中医辨证论治理论的一种中医药用药特色,而药对配伍是临床上常用的相对固定的两味药或三味药的配伍形式。药对配伍组成多具有一定规律,研究药对配伍有助于揭示中医学流传

下来的方剂配伍的科学内涵,帮助临床医生和药师从具有引导价值和点面结合的科学的角度的意义^[1-4]。黄芪为豆科植物蒙古黄芪的干燥根,具有补气固表、利尿排毒、排脓、敛疮生肌等功效,其主要有效成分

基金项目: 佛山市医学类科技攻关项目(2014AB00330)——玉龙散中乌头碱的经皮给药安全性及药代动力学研究

作者简介: 张建伟(1960.04—),男,大专,主管中药师,研究方向: 中药鉴定保管, E-mail: 1328597812@qq.com

通信作者: 庞帼敏(1972.03—),女,本科,副主任中药师,研究方向: 中药鉴定验收, E-mail: Pgm13827771251@163.com

为皂苷、甲苷和黄酮类化合物^[5-6]。白术为菊科植物白术的干燥根茎,具有健脾益气、燥湿利水、止汗安胎功效。白术药用部分为是菊科苍术属植物的根茎入药,其根茎中主要含挥发油、倍半萜内酯化合物等^[7-8]。临床常用黄芪白术配伍,经典的方剂有白术黄芪汤、防己黄芪汤和玉屏风散等复方,均有黄芪白术配伍共奏补气健脾、固表止汗、利水消肿的药理作用,合用则可达到有汗能止,无汗能发的功效,临床常用于治疗自汗、盗汗、妇女术后大汗等症状^[9-10]。现代药理研究表明,黄芪白术配伍对类固醇性骨质疏松具有防治作用具有显著临床疗效^[11],同时能够促进再生障碍性贫血骨髓红系造血祖细胞的增殖作用^[12]。本实验以黄芪白术配伍比例(黄芪:白术=5:3)配伍,采用 HPLC-ELSD 法测定黄芪甲苷含量,探讨其变化规律,并考察黄芪白术配伍对黄芪甲苷的影响,为该方在临床上的合理应用及进一步开发奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 高效液相色谱仪(型号:1100 型,厂家:AGILENT 安捷伦科技有限公司)。

1.2 试剂 由 Fisher scientific 公司提供的甲醇(批号 LOT:111280)和乙腈(批号 LOT:096328);中国食品药品检定研究院提供的超纯水、黄芪甲苷对照品(21136-1364110)。

1.3 分析样品 黄芪药用部位为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的根,白术药用部分为是菊科苍术属植物的根茎入药。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 精密量取 10 μL 的样品进样量或对照品溶液,采用 250 mm×4.6 mm,4 μm 的色谱柱(Synergi Hydro-RP C18 柱),在乙腈和 0.1% 磷酸的流动相中,流速为 1 mL/min,柱温为 30 ℃,根据高效液相(HPLC)指纹图谱的梯度洗脱程序进行试验。见表 1。

表 1 HPLC 指纹图谱梯度洗脱程序(检测波长未 320 nm)

时间 (min)	流量 (mL/min)	流动相乙腈 (%)	流动相 0.2% (甲酸水(%)	曲线
0	1	30	70	
5	1	30	70	6
20	1	35	75	6
25	1	80	20	6
48	1	88	12	6
49	1	30	70	6
59	1	30	70	6

2.2 对照品溶液制备 精密称取黄芪甲苷对照品

2.5 mg,置于 5 mL 量瓶中,甲醇溶解,制成 0.5 mg/mL 对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 1)黄芪白术采用 5:3 配伍,采用回流法煎煮,于敞口药盆中称取 5 g 黄芪和 3 g 白术加 200 mL 水,浸泡 30 min,煮沸后文火 45 min,取 100 mL 药液,在 60 摄氏度下减压浓缩,定容至 50 mL,折合柴胡黄芩药汤水煎液浓度未 0.2 g/mL。取 5 mL 柴胡黄芩浓缩液用 100% 甲醇定容 10 mL,混合均匀,取 2 mL 离心取上清液在 0.45 μm 超微膜滤过即可制备黄芪白术配伍供试品溶液。2)单纯精密称取 5 g 黄芪,方法同 1)制备单纯黄芪供试品溶液。

2.4 专属性试验 根据 2.3 制备的 2 种供试品溶液分别取同一供试品溶液,采用薄层层析的方法对黄芪、白术进行专属性试验,结果显示如图 1,黄芪、白术各自的专属性均良好。

2.5 线性范围试验 根据 2.3 制备的对照品溶液,精密取 0、2、6、8、16、20 μL,分别编号 1-6 并连续进样,以峰面积为 Y 轴,5 μL 进样浓度为 X 轴,绘制标准曲线,并根据略对照品的回归方程计算各有效成分在各自浓度范围内的线性关系;在线性关系考察中以黄芪甲苷进样量的自然对数为横坐标(lgX),峰面积的自然对数为纵坐标(lnY)进行回归,得回归方程 lnY=1.5082lgX+13.918(r=0.9997),因此在 1.024~10.24 μg 范围内线性关系良好。

2.6 中间精密度试验 精密吸取 10 μL 同一供试品溶液,连续进样 5 次,结果显示相对标注偏差 RSD 是 0.84%,精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 精密吸取 10 μL 同一供试品溶液,配置后分别放置 0、2、4、8、16、24、48 h 后进样检测,结果显示 48 h 内供试品溶液基本稳定,RSD 是 0.95%。

2.8 重复性试验 精密吸取 10 μL 同一供试品溶液,在相同色谱条件,相同液相分析仪上检测 5 次,结果显示标准偏差 RSD 为 0.86%,重复性良好。

2.9 回收率试验 取 6 份同一供试品溶液,每份约 2.5 g 黄芪,根据 2.3 制备的供试品溶液,编号 A-F 并分别加入 2 mL 对照品溶液,计算供试品在 HPLC 中的加样回收率。由表 2 得,加样回收率试验结果中平均回收率为 99.60%,RSD 为 2.0%,显示加样回收率试验良好,HPLC 严谨性高。

2.10 样品测定结果

2.10.1 黄芪白术配伍前后指纹图谱 有图 1~4 可得,在对照品溶液、黄芪供试品溶液、黄芪白术供试品溶液和缺黄芪阴性对照溶液中,缺黄芪阴性对

照溶液无干扰,而黄芪甲苷与其他成分的基线分离良好。

表 2 加样回收率试验结果

编号	取样量 (g)	原有量 (g)	加入量 (g)	测得量 (g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
A	2.514	1.037	1.42	2.359	98.09	99.60	2.0
B	2.522	1.041	1.42	2.376	99.00		
C	2.515	1.038	1.42	2.408	99.47		
D	2.508	1.035	1.42	2.400	99.12		
E	2.517	1.038	1.42	2.431	100.09		
F	2.525	1.042	1.42	2.430	101.81		

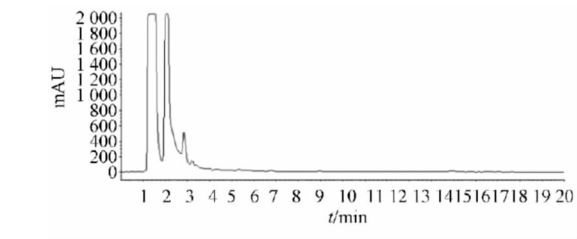


图 1 黄芪阴性对照溶液指纹图谱

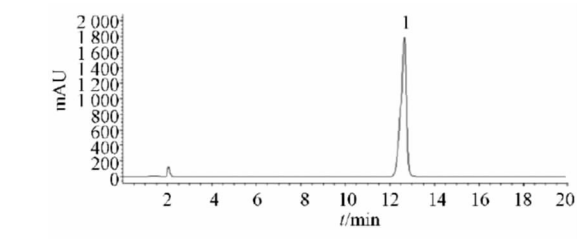


图 2 黄芪甲苷对照品溶液指纹图谱

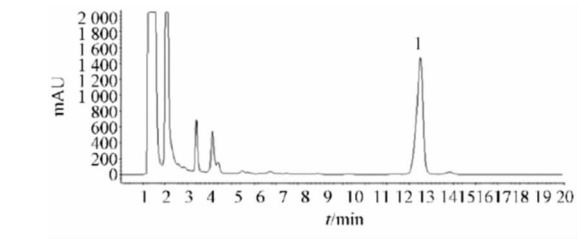


图 3 黄芪供试品溶液指纹图谱

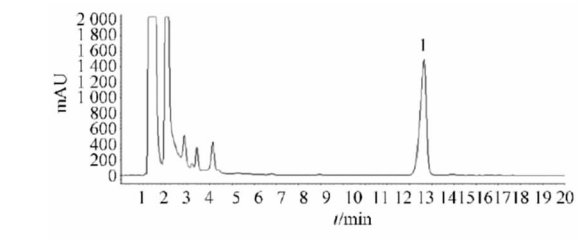


图 4 黄芪白术供试品溶液指纹图谱

表 2 黄芪含量测定结果

序号	样品	黄芪甲苷 (mg/g)	药材产地
1	黄芪	0.469	内蒙古
2	黄芪-白术	0.512	内蒙古
3	黄芪	0.377	山西
4	黄芪-白术	0.478	山西
5	黄芪	0.417	黑龙江
6	黄芪-白术	0.496	黑龙江

2.10.2 黄芪白术配伍前后黄芪化学成分分析 3个产地均显示黄芪白术配伍后黄芪的化学成分黄芪甲苷的含量有所增加,其中以内蒙古产地的黄芪白术配伍中黄芪甲苷的含量最高。

3 讨论

3.1 流动相的选择 本研究前期工作中通过对甲醇-水、四氢呋喃-水、乙腈-水的 HPLC 严谨性进行考察,筛选出了乙腈-水系统流动相的分离效果较好,但在以乙腈-水不同的比例条件下等度洗脱的摸索中,发现黄芪甲苷仍未能与基线分离,由于黄芪皂苷相对黄芪甲苷的分离更容易一些,因此本研究选取黄芪甲苷作为化学成分分析指标,根据查阅大量文献发现采用梯度洗脱后,发现黄芪皂苷Ⅱ,黄芪甲苷均可以与基线分离,再筛选梯度洗脱条件,结果以乙腈-水梯度洗脱,在 75 min 内将 2 种皂苷完全分离,但是将洗脱时间控制在 59 min 内,同时在水相中加入了少量甲酸后,黄芪甲苷峰形相对较好,基线噪声较低;为了进一步降低基线噪声,获得最好的黄芪甲苷峰形,本团队进一步对甲酸的浓度进行了考察,分别用 0.1%、0.2%、0.3% 的甲酸水溶液进行比较,发现乙腈-0.2% 甲酸水溶液为流动相的分离效果最好,能够分离出最低基线噪声且峰形最好的黄芪甲苷。

3.2 HPLC 严谨性考察意义 线性考查在某一个浓度或峰高(面积)情况下进行样品分析是否是准确的,而准确的概念就是要成线性,换句话说,在这个范围内,待测样品面积要与浓度成正比,即符合紫外检测器的朗伯比尔定律因为只有这样,在这个范围内浓度与面积成正比,分析结果才是准确的^[13]。而加样回收率包括绝对回收率和相对回收率,本研究涉及的是相对回收率。相对回收率严格来说有 2 种,一种是回收试验法,一种是加样回收试验法。而本研究的目的是为了考察 HPLC 的严谨性,因此选用加样回收试验法,也就是是在已知浓度样品中加入药物,来和标准曲线比,标准曲线也是在基质中加药物。

3.3 黄芪白术配伍研究意义 常见的测定黄芪甲苷含有量的方法有薄层扫描法(TLCS)、高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)和高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD);由于黄芪甲苷成分呈紫外末端吸收,HPLCUV 法检测时流动相溶剂干扰严重,基线较不稳定;ELSD 是一种通用型检测器,尤其适用于没有紫外吸收或末端吸收的成分,测定时不受流动相溶剂干扰,基线平稳,方法准确灵敏、重复

性好、操作简便^[14-16]。本实验建立 HPLC-ELSD 法测定黄芪白术配伍前后黄芪中黄芪甲苷含有量,结果准确可靠,适合黄芪及其制剂中黄芪甲苷含有量的测定。黄芪甲苷成分在含水正丁醇中溶解度较大,故本实验参照《中华人民共和国药典》,应用该溶剂从水煎液中萃取黄芪甲苷类成分,效果较好。另外,还将《中华人民共和国药典》中大孔吸附树脂分离纯化黄芪皂苷改为氧化铝,可减少前者反复洗涤纯化的不便,也取得了理想的效果,并与其他相关研究提供借鉴。本研究结果显示,黄芪白术配伍前后黄芪甲苷与其他成分的基线分离良好,且内蒙古产地的黄芪白术配伍中黄芪甲苷的含量最高。

参考文献

- [1]梁晓东,唐迎雪. HPLC 测定马钱子配伍苏木主要生物碱含量变化[J]. 中华中医药杂志,2014,34(4):1101-1104.
- [2]刘焕蓉,王虹,秦雪梅,等. HPLC 法测定玉屏风不同配伍中 4 种黄酮成分[J]. 中草药,2011,42(6):1122-1124.
- [3]张靖,徐文,吴钉红,等. HPLC-MS 法分析不同提取方法黄芪三七配伍的化学成分变化[J]. 药物分析杂志,2011,27(6):1131-1136.
- [4]张文娟,徐媛,王庆伟. HPLC 法分析川芎-香附配伍前后指标成分的变化[J]. 中国医药导报,2011,8(20):96-97,100.
- [5]贾贞超,陈锦瑶,张立实. 黄芪甲苷的药理作用与毒理学评价研究进展:低碳生活与健康损害论坛——中国环境诱变剂学会风险评价专业委员会全国第十三届学术会议暨第四届第 5 次委员会会议[C]. 内蒙古海拉尔,2011:132-136.

- [6]张林,林轶群,傅延龄. 历代黄芪临床用量分析[J]. 中医杂志,2015,56(6):518-521.
- [7]杨娥,钟艳梅,冯毅凡. 白术化学成分和药理作用的研究进展[J]. 广东药学院学报,2012,28(2):218-221.
- [8]尹华,王知青,王玲,等. HPLC-DAD 波长切换法同时测定白术中白术内酯 I、II、III 和苍术酮的含量[J]. 中华中医药杂志,2013,9(1):233-236.
- [9]罗兰,张素中,黄月纯,等. 玉屏风煎剂中氨基酸类成分 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):64-68.
- [10]周劲松,张洪坤,黄玉瑶,等. 多波长 HPLC 法测定玉屏风散中 10 种化学成分的含量[J]. 药物分析杂志,2016,31(6):1072-1081.
- [11]吴铁,谢华,崔燎,等. 黄芪、白术及其复方制剂对类固醇性骨质疏松的防治作用研究[J]. 中国中西医结合杂志,1998,9(1):284-286.
- [12]后盾,吴正翔. 黄芪、白术对再生障碍性贫血骨髓红系造血祖细胞促增殖作用的实验研究[J]. 江西中医学院学报,1999,11(1):28.
- [13]尹雪,黄月纯,魏刚. 黄芪、白术、防风单煎、合煎对玉屏风煎剂 HPLC 指纹图谱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(3):1-3.
- [14]刘晓芳,张淑蓉,郭爱玲,等. 不同配伍防己黄芪汤中黄芪甲苷含量变化[J]. 中成药,2017,39(3):642-644.
- [15]蒋红艳,杨元娟,何静,等. 黄芪及其制剂中黄芪甲苷定量分析方法研究进展[J]. 中国医药指南,2009,7(10):209-211.
- [16]王建核. 高效液相色谱法测定脑脉通口服液中的黄芪甲苷[J]. 药事实践杂志,2005,23(6):364-365.

(2017-07-06 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 3153 页)

- [4]李冀,邹大威,杜雅薇,等. 二神丸与四神丸对脾虚泄泻作用的配伍比较研究[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(6):728-730.
- [5]吕银娟,张智华,吴建红. 从四神丸探析脾阳根于肾阳[J]. 中医研究,2012,25(5):10-12.
- [6]周璐,徐婷婷,金若敏,等. 吴茱萸水煎液对大、小鼠肝药酶亚型影响的比较研究[J]. 中国药理学通报,2014,30(2):279-282.
- [7]高长玉,李冀,柴剑波,等. 四神丸止泻作用的实验研究[J]. 中医药学报,2005,33(2):40-41.
- [8]周枫,刘端勇,赵海梅. 四神丸治疗消化道疾病研究概述[J]. 江西中医药,2011,42(11):61-63.
- [9]张秋方,杨奕樱. 吴茱萸碱药理作用的研究近况[J]. 贵阳中医学院学报,2013,34(1):36-38.
- [10]龚慕辛,王智民,张启伟,等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(2):183-187.
- [11]史艳财,邹蓉,唐辉,等. 吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱提取工艺及含量测定[J]. 江苏农业科学,2011,39(3):419-421.
- [12]王晖,张丽艳,杨卫平,等. 正交实验法优化疏毛吴茱萸提取工

- 艺[J]. 中国民族民间医药,2010,19(23):52-53.
- [13]甄攀,白雪梅,王治宝. 四神丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 HPLC 分析[J]. 中草药,2004,35(11):1249-1251.
- [14]甄攀,张利民,王治宝,等. 四神丸质量标准研究[J]. 中成药,2004,26(9):713-716.
- [15]谭生建,胡文祥,杨成勇,等. 梯度洗脱变换波长 HPLC 测定四神丸中有效成分[J]. 中国药理学杂志,1999,40(12):47-49.
- [16]姚兰,王运军,刘晓英,等. RP-HPLC 法同时测定四神丸中补骨脂素、异补骨脂素、五味子醇甲和吴茱萸碱的含量[J]. 中国药房,2010,21(43):4095-4097.
- [17]李冬梅,袁浩,刘永利,等. 肉蔻四神丸定性定量方法研究[J]. 药物分析杂志,2012,29(11):2038-2042.
- [18]苏建,刘永利,郭毅,等. 多波长 HPLC 法同时测定四神丸中 7 个有效成分的含量[J]. 药物分析杂志,2013,34(9):1531-1537.
- [19]刘岩. 四神滴丸的开发研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2008.

(2017-06-20 收稿 责任编辑:王明)