

◇ 药物分析 ◇

高效液相色谱法同时测定 补阳还五汤灌胃大鼠血清中阿魏酸和芍药苷的含量

沈景芬, 金文明

(六安市食品药品检验中心, 安徽 六安 237000)

摘要:目的 建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定大鼠灌胃补阳还五汤后血清中阿魏酸和芍药苷的含量测定方法。方法 12只大鼠采用随机数字表法分为空白对照组和补阳还五汤组,每组各6只,制备含药血清,采用HPLC分析, Phenomasil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相为0.3%乙酸水和乙腈,紫外检测波长为230 nm,流速为1 mL·min⁻¹,柱温30℃,每次进样量为10 μL,梯度洗脱。结果 阿魏酸和芍药苷的线性回归方程分别为 $\hat{y}=1.5673X-7.3321$, $\hat{y}=1.3201X+2.0911$, r 值分别为0.9998、0.9997,线性范围分别为0.52~16.64 μg·L⁻¹、0.21~3.36 μg·L⁻¹;精密性、专属性、稳定性、基质效应和提取回收率考查均符合要求。结论 HPLC可以用于同时测定大鼠灌胃补阳还五汤后血清中阿魏酸和芍药苷的含量。

关键词: 色谱法, 高压液相; 补阳还五汤; 阿魏酸; 芍药苷; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.07.008

Determination of erulic acid and paeoniflorin in serum of rats after intragastric administration of Buyang Huanwu decoction by HPLC

SHEN Jingfen, JIN Wenming

(Food and drug inspection center of Lu'an, Lu'an, Anhui 237000, China)

Abstract: Objective To establish a method of determining of paeoniflorin and erulic acid in serum of rats after intragastric administra-

胰岛素血症^[14]。

另外,本实验中,锦灯笼宿萼乙醇提取物能够显著降低STZ所致模型大鼠血糖浓度,减少大鼠尿量排泄。有文献报道,STZ是一种导致DNA和线粒体破坏的细胞毒性物质,造成机体β细胞大量损伤,胰岛素合成和分泌减少,引起糖代谢紊乱,导致糖尿病^[15-16],而锦灯笼宿萼乙醇提取物能够降低STZ所致糖尿病模型大鼠的血糖水平,提示其可能与改善受损的胰岛β细胞的功能有关,通过促进胰岛细胞的功能恢复来增加胰岛素的分泌量,增加组织对糖的转化利用以及增加肝糖元合成,从而改善STZ所致糖尿病模型大鼠的高血糖症状,具体的作用机制,将进一步深入研究证实。

参考文献

- [1] 舒尊鹏,徐炳清,邢娜,等. 锦灯笼化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(21):99-102
- [2] 高品一,金梅,杜长亮,等. 中药锦灯笼的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2014,31(9):734
- [3] 刘雅丽,韩书影,赵后,等. 锦灯笼宿萼皂苷降血糖作用研究[J]. 东北师大学报(自然科学版),2010,42(2):105-109.
- [4] 侯云龙,方志伟,张明宇,等. 锦灯笼宿萼中总黄酮的提取、富集及含量测定[J]. 哈尔滨医科大学学报,2012,46(6):555

- [5] 曾位森,黄源坚,邵聪文,等. 高脂饮食诱导的2型糖尿病模型小鼠的生化及病理分析[J]. 基础研究,2014,34(8):1116
- [6] 章成昌,谢光荣,姜玉涛,等. 链脲佐菌素制备2型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 安徽医药,2012,16(9):1241
- [7] 郭凤霞,曾阳,马继雄. 沙棘粗多糖对正常和造模糖尿病小鼠血糖影响的研究[J]. 中国药物警戒,2012,9(11):648-651
- [8] 马继雄,马祥忠,曾阳. 美丽鳞毛蕨粗多糖对α-葡萄糖苷酶及小鼠耐糖量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):243-246.
- [9] 张丽芬,吕仁和,黄文政. 链脲佐菌素糖尿病肾病大鼠模型的建立及稳定性评价[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(4):8-12,18.
- [10] 王保伟,李颖,刘晓红,等. 高脂饲料喂养时间及链脲佐菌素剂量对实验型2型糖尿病大鼠造模的影响[J]. 卫生研究,2011,40(1):100-101
- [11] 杨芳,李敬林,依秋霞,等. 益气解毒活络方对早期糖尿病肾病大鼠的防治作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(11):165-169
- [12] 张楠,储小琴,蒋建勳. 锦灯笼醋酸乙酯部位化学成分的研究[J]. 中草药,2015,46(8):1120-1124.
- [13] 郭颖,刘静,聂黎行,等. 锦灯笼的研究进展[J]. 中药材,2012,35(12):2039-2045
- [14] 潘红艳,何凡,窦德强,等. 亚贡叶提取物对小鼠降血糖作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(5):58-59
- [15] 朱凡凡,陈喆. 锦灯笼药理作用及临床应用研究进展[J]. 甘肃中医学院学报,2015,32(2):66-69.
- [16] 胡曼丽,杜娟. 链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠尿AQP-2的改变及机制[J]. 中国医药指南,2016,14(17):36-37.

(收稿日期:2017-06-17,修回日期:2018-04-06)

tion of Buyang Huanwu decoction by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** 12 rats were randomly by random number table method divided into control group and Buyang Huanwu decoction group and 6 rats in each group. Preparation of Medicated serum were prepared and analyzed by HPLC, with C_{18} column (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m). The mobile phase were 0.3% acetic acid and acetonitrile. The wavelength of detection, flow rate, column temperature and sample size were 230 nm, 1 mL $\cdot$ min⁻¹, 30 $^{\circ}$ C and 10 μ L respectively. **Results** Linear regression equation, r value and linear range of erulic acid were $\hat{y} = 1.567\ 3X - 7.332\ 1$, 0.999 8 and 0.52 ~ 16.64 μ g $\cdot$ L⁻¹ respectively, meanwhile, Linear regression equation, r value and linear range of paeoniflorin were $\hat{y} = 1.320\ 1X + 2.091\ 1$, 0.999 7 and 0.21 ~ 3.36 μ g $\cdot$ L⁻¹ respectively. The investigation of precision, specificity, stability and recovery rate of extraction were all qualified. **Conclusions** HPLC can determine the levels of paeoniflorin and erulic acid in serum of rats after intragastric administration of Buyang Huanwu decoction.

Key words: Chromatography, high pressure liquid; Buyang huanwu decoction; Erulic acid; Paeoniflorin; Rat

补阳还五汤是出自于清代医家王清任所著的《医林错改》，该方由当归、红花、桃仁、川芎、地龙、黄芪和赤芍共7味中药组成，具有补气活血、祛瘀活络之功效^[1-2]。芍药苷和阿魏酸是补阳还五汤药理活性的主要有效成分^[3-4]。目前已有文献报道补阳还五汤中芍药苷和阿魏酸含量的高效液相色谱法(HPLC)的检测方法，这为补阳还五汤的质量标准的建立提供了科学依据^[5]，但未见文献报道补阳还五汤含药血清中芍药苷和阿魏酸含量测定的方法。因此本研究建立 HPLC 同时测定补阳还五汤灌胃大鼠含药血清中芍药苷和阿魏酸含量的测定方法，为补阳还五汤药代动力学、临床应用等进一步研究提供科学参考。

1 实验材料

1.1 实验动物 12 只 SPF 级大鼠，雌雄各半，220 ~ 260 g，动物购买自安徽省实验动物中心，动物合格证编号为 SCXK(皖):2005-001。所购的动物在实验室中适应性喂养 1 周。本研究中动物实验在安徽中医药大学完成，且该实验经过安徽中医药大学实验动物伦理委员会审核批准。本研究起止时间为 2016 年 5 ~ 9 月。

1.2 试剂与仪器 当归、红花、桃仁、川芎、地龙、黄芪和赤芍均购自安徽省中医院，所购的 7 味药材均由安徽中医药大学药学院周建理老师鉴定为真品。按照临床用药中各味药的配比：当归：红花：桃仁：川芎：地龙：黄芪：赤芍 = 6：3：3：3：3：120：4.5，用蒸馏水煎煮两次，合并两次煎煮液，浓缩至生药量为 1.0 kg $\cdot$ L⁻¹，冷藏备用。阿魏酸和芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院，批号 110773-200611、110736-201337)，磷酸(色谱纯，上海基准化学试剂有限公司，批号 20150311)，乙腈(色谱纯，天津彪骑士科技发展有限公司，批号 20150912)，色甲醇(色谱纯，北京京科达瑞科技有限公司，批号 20160155)。高效液相色谱仪(型号 2695，沃特斯科科技有限公司)，紫外检测器(型号 2489，沃特斯科

有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomasil C_{18} 柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)，流动相：0.3% 乙酸水(A)和乙腈(B)，紫外检测波长：230 nm，流速：1.0 mL $\cdot$ min⁻¹，柱温：30 $^{\circ}$ C，每次进样量：10 μ L。洗脱梯度：0 ~ 5 min，15% B；5 ~ 35 min，15% ~ 35% B；35 ~ 38 min，35% ~ 40% B；38 ~ 80 min，40% ~ 70% B；80 ~ 90 min，70% ~ 90% B。

2.2 动物分组及补阳还五汤含药血清制备 大鼠适应性喂养 1 周后，随机数字表法分为空白对照组和补阳还五汤组，每组 6 只大鼠，雌雄各半，补阳还五汤组分别于每日的 8：00 和 20：00 点灌胃补阳还五汤，空白对照组同时灌胃蒸馏水，2 组大鼠的灌胃体积均为 1.2 L $\cdot$ kg⁻¹，连续灌胃 7 d。于最后一次灌胃 1 h 后腹腔注射戊巴比妥，腹主动脉取血，静置，3 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 5 min，收集血清。血清保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

2.3 对照品溶液的制备和血清样品的处理 精密称取 2.1 mg 阿魏酸和 9.6 mg 芍药苷对照品，甲醇溶解后置于 100 mL 容量瓶中，定容，混匀，保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用，作为对照品母液。

分别精密吸取 1 000 μ L 空白对照组和补阳还五汤组血清滴于两个离心管中，加入 5 倍量的甲醇，旋涡 30 s，12 000 r $\cdot$ min⁻¹ 转速下离心 10 min，收集上清液，0.22 μ m 的微孔滤膜过滤。

2.4 方法专属性考察 分别吸取“2.3”项下处理的空白对照组和补阳还五汤组血清，在空白对照组血清加入适量的阿魏酸和芍药苷对照品母液混匀，按“2.1”项下的色谱条件下进样分析。结果显示空白血清加对照品母液后芍药苷和阿魏酸的保留时间分别 51.2 min 和 59.3 min，空白血清在 51.2 min 和 59.3 min 处没有吸收峰出现，补阳还五汤组血清在 51.2 min 和 59.3 min 保留时间处有吸收峰出现，并在 51.2 min 和 59.3 min 的周围能与其他吸收峰相

互分离。说明本方法同时检测血清中的阿魏酸和芍药苷具有较好的专属性。见图 1。

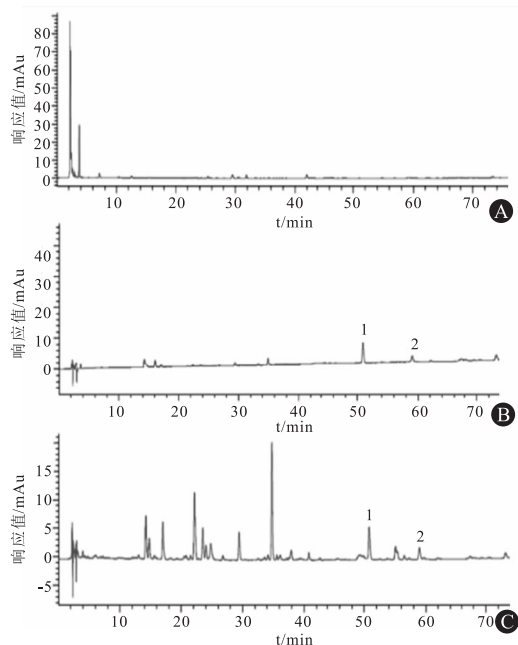


图 1 专属性考察色谱图: A 为空白对照组血清, B 为空白对照组血清 + 对照品母液, C 为补阳还五汤组血清

2.5 线性关系考察 精密吸取适量的阿魏酸和芍药苷母液, 置于离心管中, 氮气吹干, 加入适量的空白对照组大鼠血清, 旋涡 30 s, 制成阿魏酸和芍药苷浓度分别为 $0.52 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.21 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.04 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.42 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.08 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.84 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4.16 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.68 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $8.32 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.36 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $16.64 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $6.72 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的一系列标准混合对照品的血清溶液, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样检测。以阿魏酸和芍药苷峰面积为纵坐标, 以阿魏酸和芍药苷血清浓度为横坐标, 得到血清中阿魏酸和芍药苷的回归方程分别为 $\hat{y} = 1.5673X - 7.3321$ 、 $\hat{y} = 1.3201X + 2.0911$, r 值分别为 0.9998、0.9997, 线性范围分别为 $0.52 \sim 16.64 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.21 \sim 6.72 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 精密度考察 向空白对照组血清中加入适量阿魏酸和芍药苷对照品母液混匀。配制成阿魏酸和芍药苷浓度分别为 $4.20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.83 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的血清溶液, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样检测。先在 1 d 内重复测定 6 次, 再分别每天进样 1 次并连续进样 6 d, 计算阿魏酸和芍药苷的日内峰面积相对标准偏差 (RSD) 分别为 0.34% 和 0.41%, 阿魏酸和芍药苷的日间峰面积 RSD 分别为 0.44% 和 0.52%。表明仪器检测含药血清中阿魏酸和芍药苷的精密度良好。

2.7 基质效应考察 取空白血清, 按照“2.3”项下操作制备 15 份提取后的空白样品, 适量的阿魏酸和芍药苷, 制成阿魏酸和芍药苷浓度为 $0.60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $16.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低、中、高混合对照品血清溶液, 每个浓度 5 份, 进样分析, 记录色谱峰面积。用蒸馏水配制阿魏酸浓度为 $0.60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $16.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 芍药苷浓度为 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 低、中、高 3 个浓度的标准混合对照品溶液进样分析, 记录色谱峰面积。将空白血清中低、中、高浓度阿魏酸和芍药苷的色谱峰面积与标准混合溶液中的相对应浓度的阿魏酸和芍药苷的色谱峰面积进行对比, 以二者的峰面积比值计算基质效应。结果低、中、高浓度的阿魏酸基质效应分别为 $(101.19 \pm 4.15)\%$ 、 $(98.25 \pm 5.67)\%$ 、 $(96.15 \pm 6.21)\%$, 低、中、高浓度的芍药苷基质效应分别为 $(100.03 \pm 3.89)\%$ 、 $(99.52 \pm 4.42)\%$ 、 $(98.53 \pm 5.20)\%$, RSD 均小于 15%, 表明本方法可有效避免血清基质效应。

2.8 加样回收率考察 向空白对照组大鼠血清中分别精密加入阿魏酸和芍药苷对照品, 制成阿魏酸和芍药苷浓度分别为 $0.60 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $4.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $16.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低、中、高混合有阿魏酸和芍药苷对照品血清溶液, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样检测。结果显示阿魏酸低、中、高三种浓度的平均回收率分别为 99.43%、101.30%、100.30%, RSD 分别为 0.91%、1.85%、0.89%; 芍药苷低、中、高三种浓度的平均回收率分别为 99.67%、99.78%、100.42%, RSD 分别为 1.43%、0.95%、1.03%。结果表明加样回收率符合要求。

2.9 重复性考察 取补阳还五汤组大鼠的含药血清, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件进样检测。重复进样 6 次, 根据峰面积和“2.5”项下阿魏酸和芍药苷含量回归方程计算血清中阿魏酸和芍药苷的平均含量分别为 $4.21 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.44 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 阿魏酸和芍药苷的 RSD 分别为 1.0% 和 1.1%。结果表明测定含药血清中阿魏酸和芍药苷的重复性良好。

2.10 稳定性考察 取补阳还五汤组大鼠的含药血清, 按“2.3”项下方法处理, 按“2.1”项下色谱条件于 0、2、4、6、12、24 h 分别进样检测 1 次。根据峰面积和“2.5”项下阿魏酸和芍药苷含量回归方程计算含药血清中阿魏酸和芍药苷的 RSD 分别为 0.92%、1.01%。结果表明测定含药血清中阿魏酸和芍

药苷的稳定性良好。

2.11 含药血清中阿魏酸和芍药苷浓度检测 取补阳还五汤组大鼠的含药血清,按“2.3”项下方法处理,按“2.1”项下色谱条件进样检测,分别检测每只大鼠血清中阿魏酸和芍药苷的峰面积,根据峰面积和“2.5”项下阿魏酸和芍药苷含量回归方程计算每只大鼠血清中的阿魏酸和芍药苷的浓度。见表1。

表1 补阳还五汤组大鼠血清中的阿魏酸和芍药苷含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

鼠号	阿魏酸	芍药苷
1	4.11	1.53
2	4.21	1.44
3	4.02	1.52
4	4.52	1.43
5	4.10	1.50
6	4.34	1.49

3 讨论

补阳还五汤具有补气养血、活血通络之功效,在临床中主要应用于心脑血管疾病的治疗。现代药理学研究表明,补阳还五汤具有抗血栓、抗动脉粥样硬化、改善血液流变学异常、抗脑缺血再灌注损伤等^[6-7]。中药现代化近些年来成为研究热点,特别是通过检测含药血清中代表性的有效成分来研究复方的药代动力学逐渐被学者所关注^[8-9]。现有文献报道阿魏酸和芍药苷为补阳还五汤中的主要有效成分^[10]。HPLC 具有分析速度快、结果准确、特异性强、检测限小、可以定量研究等特点。已经有文献报道使用 HPLC 检测补阳还五汤中的有效成分。故本研究中选择使用 HPLC 检测补阳还五汤含药血清中的阿魏酸和芍药苷的含量。

3.1 检测波长的选择 使用二极管阵列检测器在 200~400 nm 的范围内进行扫描,结果表明阿魏酸和四物汤分别在 320 nm 和 230 nm 的波长处有最大吸收,而使用 230 nm 作为检测波长时阿魏酸同样有很好的响应信号。

3.2 流动相的选择 在预实验的过程中选择了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-0.5%冰醋酸、乙腈-0.1%磷酸为流动相,对比结果表明选择乙腈-0.1%磷酸

为流动相时色谱分析效果最好。

3.3 方法学考察 空白血清在 51.2 min 和 59.3 min 保留时间处没有吸收峰存在,而在空白血清中加入芍药苷和阿魏酸后在 51.2 min 和 59.3 min 保留时间处均出现吸收峰,含药血清在在 51.2 min 和 59.3 min 保留时间处也均出现吸收峰,这说明本研究中的检测条件可以检测含药血清中的芍药苷和阿魏酸。经考察,阿魏酸和芍药苷线性范围分别为 0.52~16.64 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、0.21~6.72 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,补阳还五汤含药血清中的阿魏酸和芍药苷的含量均在此检测线以内,可以使用阿魏酸和芍药苷的回归方程。阿魏酸和芍药苷 3 个浓度的日内精密度和日间精密度的均符合要求,说明阿魏酸和芍药苷在本研究期间的精密度的符合要求。说明采用本研究中的检查方法可以准确检测大鼠灌胃补阳还五汤后血清中的阿魏酸和芍药苷的含量。

参考文献

[1] 曲铁兵,俞天虹,刘志婷,等. 补阳还五汤及其拆方对大鼠脑缺血后神经发生的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2014,34(3):342-347.

[2] 丁凡,张倩茹,胡元佳,等. 基于网络分析的补阳还五汤防治气虚血瘀型疾病机制研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(22):4418-4425.

[3] 徐泽红,吴英辉. 补阳还五汤近十年的研究进展[J]. 中医药导报,2006,12(5):97-100.

[4] 刘俊娥,张继平. 补阳还五汤药效物质基础的研究进展[J]. 中医药信息,2012,29(5):117-119.

[5] 王玓,王利胜,巴文强,等. HPLC 同时测定补阳还五汤提取液中 4 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):46-49.

[6] 费洪新,姜波,张英博,等. 补阳还五汤对脑组织作用机制的研究进展[J]. 中医药信息,2015,32(1):125-126.

[7] 梅晓云,吴颖昕,周岚. 补阳还五汤对大鼠失神经肌萎缩的影响与机制研究[J]. 中国药理学杂志,2014,49(9):726-730.

[8] 王卉,史亚军,邓辉,等. 红花中羟基红花黄色素 A 的提取动力学研究[J]. 安徽医药,2015,19(10):1853-1856.

[9] 苏汉中,张善堂,陈卫东,等. 群体药动学及其应用研究进展[J]. 安徽医药,2015,19(2):205-209.

[10] 黄海艳,祝赫,韩彬,等. 补阳还五汤血浆指纹图谱的建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(15):96-99.

(收稿日期:2016-11-17,修回日期:2018-04-25)