

· 中药工业 ·

四妙勇安汤活性部位配伍方薄层色谱鉴别及绿原酸和哈巴俄苷的含量测定[△]

杨会^{1,2}, 宋珂², 李慧^{1,2}, 白云绮², 王淑琪^{1,2}, 吴圣贤², 陈立新¹, 聂波^{1,2*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029;

2. 北京中医药大学东直门医院/中医内科学教育部重点实验室和北京市重点实验室, 北京 100700

[摘要] 目的: 构建四妙勇安汤活性部位配伍方薄层色谱鉴别方法和 HPLC 测定绿原酸和哈巴俄苷的含量测定方法。方法: 采用薄层色谱法对配伍方中玄参、甘草进行鉴别, 采用 HPLC 对配伍方中绿原酸和哈巴俄苷含量进行检测。结果: 薄层色谱鉴别中配伍方中在与对照品哈巴俄苷、甘草酸铵相应位置上均显相同颜色的荧光斑点, 斑点清晰, 阴性对照无干扰。绿原酸和哈巴俄苷分别在 0.195 ~ 1.560 ($r=0.999\ 9$)、0.019 2 ~ 0.384 0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ($r=1.000\ 0$) 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 96.5%、97.8%, RSD 分别为 0.9%、1.1% ($n=9$)。结论: 薄层鉴别及绿原酸和哈巴俄苷的含量测定方法专属性强, 准确稳定、重复性好, 能够有效控制该配伍方的质量。

[关键词] 四妙勇安汤; 绿原酸; 哈巴俄苷; 薄层鉴别; 高效液相色谱

[中图分类号] R286; R944.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)05-0668-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190128006

TLC Identification and Determination of Chlorogenic Acid and Habaroside in Active Part of Simiao Yongan Decoction

YANG Hui^{1,2}, SONG Ke², LI Hui^{1,2}, BAI Yun-qi², WANG Shu-qi^{1,2}, WU Sheng-xian², CHEN Li-xin¹, NIE Bo^{1,2*}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education and Beijing, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective:** To establish a TLC method for identification of active part and an HPLC method for determination of chlorogenic acid and habaroside in Si-Miao-Yong-An decoction by TLC. **Methods:** TLC was used to identify Radix Scrophulariae and Radix Glycyrrhizae, and HPLC was used to detect the content of chlorogenic acid and habaroside in decoction. **Results:** The fluorescence spots with decoction in the corresponding positions of Habaroside and ammonium glycyrrhizate were identified in TLC, and the spots were clear and the negative controls were not disturbed. Chlorogenic acid and habaroside had good linear relationship in the range of 0.195–1.560 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ($r=0.999\ 9$) and 0.019 2–0.384 0 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ($r=1.000\ 0$) respectively, and the average recovery rate was 96.5% ($n=9$) and 97.8% ($n=9$), RSD was 0.9% and 1.1%, respectively. **Conclusion:** The TLC identification and determination of chlorogenic acid and habaroside are strong in specificity, accurate, stable and reproducible, and can effectively control the quality of the active part of Si Miao Yong An decoction.

[Keywords] Simiao Yongan decoction; Chlorogenic acid; Habaroside; TLC identification; HPLC

四妙勇安汤由金银花、玄参、当归、甘草四味药组成, 最早见于华佗《神医秘传》, 后载于《验方新编》, 具有清热解毒、活血通脉之功^[1-4]。

课题组前期实验发现, 四妙勇安汤可以通过抑制炎症反应, 减轻动脉粥样硬化进展^[5-7]。根据四妙勇安汤处方所含化学成分的理化性质, 课题组采用不同

[△] [基金项目] 国家科技重大专项课题(2017ZX09304019, 2009ZX09103-318)

* [通信作者] 聂波, 研究员, 研究方向: 中药活性成分体内代谢研究; Tel: (010)84013190, E-mail: nieboww_1977@163.com

浓度乙醇提取,大孔吸收树脂分离纯化,结合细胞药效学筛选,得到CS03、CS04、CS05 3个活性部位,通过体外药效学和动物实验筛选,确定CS03:CS04:CS05 = 345:270:258为最佳活性配比,组成该配伍方,已获得专利授权^[8]。

中药成分的定性鉴别与定量测定是保证其安全、有效、质量可控的基础和前提^[9],是现代化中药产业的重点内容。目前还没有该配伍方定性鉴别和含量测定的相关研究,薄层色谱法因能够同时对多个样品进行分离、样品预处理简单、经济高效、简便直观的优势在中药的分析及鉴别中被广泛应用;HPLC由于分离效率高、选择性好、检测灵敏度高、操作自动化、应用范围广等特点,目前广泛应用于中成药质量控制^[10-11],为了更好地控制该配伍方的质量,本实验采用薄层色谱建立了该配伍方中玄参、甘草的定性鉴别方法,并采用HPLC技术,以绿原酸和哈巴俄苷为检测指标建立了配伍方中金银花、玄参两味药材的含量测定方法,为该配伍方的新药研发提供简单、快速、有效的质量控制方法。

1 材料

1.1 仪器

高效液相系统为Agilent1100 HPLC系统,包含DAD检测器、二元泵、在线脱气机、自动进样器;AEG-40SM型电子天平(日本岛津公司);SSW-420-2S型电热恒温水槽(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);ZF-20D暗箱式紫外分析仪(上海宝山顾村电光仪器厂);202-2AB型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);双槽玻璃层析缸(规格:10 cm × 10 cm);玻璃点样毛细管(华西医科大学仪器厂,内径为0.5 mm,管长为100 mm,硬质中性玻璃);显色喷雾瓶(华西医科大学仪器厂);硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂分厂,规格为10 cm × 20 cm,厚度为0.20~0.25 mm)。

1.2 试药

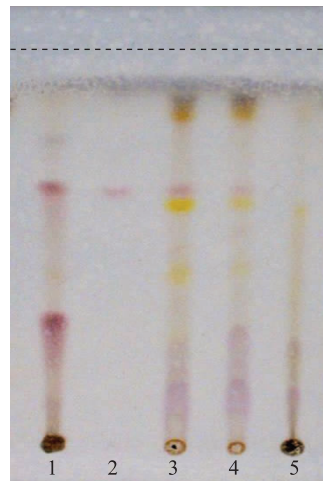
对照药材金银花、玄参、甘草(中国食品药品检定研究院,供薄层色谱用,批号分别为:121060-200906、121008-200906、120904-200512);乙腈为色谱纯(德国Merck公司);对照品绿原酸、哈巴俄苷(中国食品药品检定研究院,供含量测定用,批号分别为110753-200413、111730-200605);

Milli-Q超纯水;其他试剂均为分析纯(北京化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 玄参薄层色谱鉴别

取配伍方4 mg,加甲醇5 mL,振摇,使溶解,作为供试品溶液。另取玄参对照药材粉末1 g,加甲醇10 mL,浸泡1 h,超声处理30 min,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加25 mL水溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取2次,每次20 mL,合并正丁醇,蒸干,残渣加2 mL甲醇溶解,作为对照药材溶液。哈巴俄苷配制成质量浓度为0.5 mg·mL⁻¹的溶液。制备不含玄参的样品,按前法同样操作,作为阴性对照样品溶液。鉴别方法参考2015版《中华人民共和国药典》^[12]。为保证实验结果的准确性和重复性,样品两次重复点样,供试品色谱中,与对照品、对照药材相应的位置上,供试品溶液显相同的斑点,见图1。

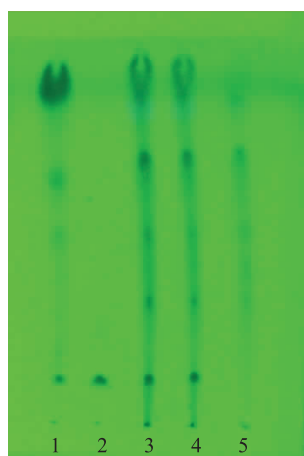


注:1. 玄参对照药材;2. 哈巴俄苷;3. 样品;4. 样品;5. 阴性。

图1 玄参薄层鉴别色谱图

2.2 甘草薄层鉴别

取甘草酸铵对照品加甲醇制成质量浓度为2 mg·mL⁻¹的溶液,作为对照品溶液。参考2015版《中华人民共和国药典》^[13]制备甘草对照药材溶液、样品溶液和阴性对照样品溶液并进行鉴别。为保证实验结果的准确性和重复性,样品两次重复点样,供试品色谱中,在与对照品、对照药材相应的位置上,显相同的斑点,见图2。



注: 1. 甘草对照药材; 2. 甘草酸铵; 3. 样品; 4. 样品; 5. 阴性。

图2 甘草薄层鉴别色谱图

2.3 绿原酸、哈巴俄苷含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱: ZorbaxSB-C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A: 0.1%甲酸水, B: 乙腈, 梯度洗脱(0 ~ 15 min, 5% ~ 10% B; 15 ~ 18 min, 10% ~ 14% B; 18 ~ 25 min, 17% ~ 81% B; 25 ~ 40 min, 81% ~ 65% B; 70 ~ 80 min, 65% ~ 20% B); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; DAD 检测器; 检测波长: 365 nm; 柱温: 30 °C; 进样量 5 μL。

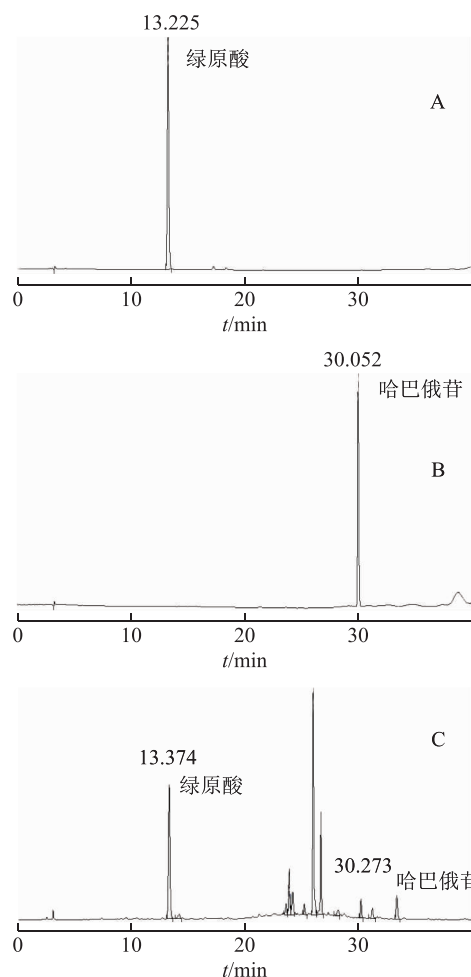
2.3.2 样品制备 对照品溶液制备: 精密称取绿原酸、哈巴俄苷对照品, 加甲醇制成每 mL 含绿原酸、哈巴俄苷分别为 0.2、0.02 mg 的溶液, 即得。

供试品溶液制备: 取配伍方 100 mg, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容, 超声 30 min, 补足减失质量, 摇匀, 过微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.3.3 方法学考察

2.3.3.1 系统适应性与专属性 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 乙腈-0.1%甲酸水(32:68)为流动相; 柱温: 30 °C。理论塔板数按绿原酸、哈巴俄苷峰计算应不低于 1000、5000。取供试品溶液连续进 6 针, 进样后 HPLC 图, 对照品和供试品中绿原酸、哈巴俄苷的保留时间一致, 见图 3。

2.3.3.2 线性关系 精密称取干燥的绿原酸、哈巴俄苷对照品, 加甲醇分别制成质量浓度为 0.195、0.019 2 mg·mL⁻¹ 的溶液, 分别进样 1、2、4、6、8 μL 和 1、2、5、10、20 μL, 按上述色谱条件测定峰面积。以绿原酸、哈巴俄苷对照品进样量(μg)对数



注: A. 对照品绿原酸; B. 对照品哈巴俄苷; C. 供试品。

图3 四妙勇安汤活性配伍方专属性考察图谱

值为横坐标, 峰面积对数值为纵坐标绘制标准曲线, 其回归方程分别为 $Y = 0.000\ 8\ X + 0.002\ 2$, $r = 0.999\ 9$; $Y = 0.000\ 4\ X + 0.000\ 3$, $r = 1.000\ 0$, 绿原酸和哈巴俄苷分别在 0.195 ~ 1.560、0.019 2 ~ 0.384 0 μg·μL⁻¹ 线性关系良好。

2.3.3.3 供试品溶液制备 取配伍方 40 mg, 精密称定, 置于 10 mL 容量瓶中, 加 50% 的乙腈定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3.3.4 精密度试验 分别取质量浓度为 39.0 μg·μL⁻¹ 的绿原酸对照品溶液和质量浓度为 19.2 μg·mL⁻¹ 的哈巴俄苷对照品溶液重复进样 6 次, 峰面积 RSD 分别为 0.2%、0.2%。

2.3.3.5 重复性试验 取同一批号的配伍方, 精密称取 40 mg, 共 6 份, 依法提取测定, 供试品绿原酸及哈巴俄苷含量 RSD 分别为 0.60%、0.25%。

2.3.3.6 稳定性试验 取供试品溶液分别在 0、3、6、12、24 h 进样测定, 绿原酸峰面积分别为

1 233.6、1 231.6、1 235.3、1 225.8、1 240.7、1 233.4, RSD 为 0.4%, 哈巴俄昔峰面积分别为 128.5、129.2、129.1、124.4、125.8, RSD = 1.5%, 结果表明供试品溶液中绿原酸、哈巴俄昔 24 h 内基本稳定。

2.3.3.7 回收率试验 精密称取配伍方 20、100 mg (其中绿原酸及哈巴俄昔质量分数分别为 5.3%、0.25%), 各 9 份, 置于 10 mL 容量瓶中, 分别精密加含有绿原酸 0.90、1.13、1.37 mg 的对照品溶液, 含有哈巴俄昔 0.20、0.25、0.30 mg 的对照品溶液, 加 50% 乙腈定容, 定容后摇匀, 依法提取测定, 结果见表 1。

表 1 绿原酸和哈巴俄昔加样回收率试验结果(n=9)

对照品	样品中 含量/mg	对照品加 入量/mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
绿原酸	1.117	0.90	1.976	95.5	96.5	0.9
	1.130	0.90	1.995	96.1		
	1.131	0.90	1.993	95.8		
	1.100	1.13	2.178	95.4		
	1.163	1.13	2.272	98.1		
	1.125	1.13	2.221	97.0		
	1.114	1.37	2.430	96.1		
	1.132	1.37	2.472	97.8		
	1.163	1.37	2.487	96.7		
哈巴俄昔	0.248	0.20	0.444	98.0	97.8	1.1
	0.249	0.20	0.447	99.0		
	0.250	0.20	0.447	98.7		
	0.246	0.25	0.491	97.8		
	0.248	0.25	0.495	98.6		
	0.248	0.25	0.494	98.6		
	0.243	0.30	0.530	95.7		
	0.245	0.30	0.535	96.6		
	0.244	0.30	0.536	97.4		

2.3.4 配伍方中绿原酸、哈巴俄昔的含量测定 取配伍方 40 mg, 精密称定, 依法提取制成供试品溶液, 进样二次测定, 以外标两点法对方程计算, 即得, 结果见表 2。

表 2 配伍方中绿原酸、哈巴俄昔含量测定

对照品	峰面积	含量/mg	质量分数/%
绿原酸	1 330.2	2.133 0	5.32
	1 342.3	2.152 0	
哈巴俄昔	123.7	0.099 6	0.25
	125.0	0.100 6	

3 讨论

3.1 定量药效成分的确定

已有数据表明, 四妙勇安汤水煎液主要含有环烯醚萜类、黄酮类、苯丙素类、有机酸类等多种成分^[14-15]。在该配伍方中, 金银花和玄参为君药, 金银花主要含有奎宁酸类和黄酮类成分, 玄参中主要成分为环烯醚萜类成分, 《中华人民共和国药典》2015 版规定, 金银花药材中主要检测绿原酸和木犀草苷两个成分; 玄参药材中主要检测哈巴昔和哈巴俄昔两个成分, 因配伍方是采用提取并经大孔树脂富集获得洗脱部位, 经活性筛选配伍而获得, 前期质谱鉴定中发现木犀草苷含量较低, 哈巴昔未能检测到, 不作为该配伍方的含量测定的指标性成分, 因此选择绿原酸和哈巴俄昔作为配伍方的含量测定成分。文献报道, 绿原酸和哈巴俄昔均可通过激活 PPAR- γ 受体, 对动脉粥样硬化炎症反应具有较好的抑制作用, 从而发挥抗动脉粥样硬化的活性, 因此选择绿原酸和哈巴俄昔作为配伍方的药效成分进行含量测定^[16-18]。

3.2 样品处理、色谱条件的优化

在本实验中供试品溶液制备方法, 参照《中华人民共和国药典》金银花、玄参含量测定供试品溶液制备方法设计, 考虑到本品为 55% 乙醇提取后大孔树脂富集得到的配伍方, 结合流动相采用的乙腈-甲酸水系统洗脱, 所以笔者选择用 50% 的乙腈水溶液来溶解样品, 溶解效果很好。对本品的含量测定, 笔者采用乙腈和 0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱, 考察了色谱条件, 结果配伍方中绿原酸、哈巴俄昔分离度好, 灵敏度高, 方法合理可靠。

“鉴别”是鉴定中药真假的检测项目, “含量测定”是对中药材中主要药效成分或指标性成分的定量控制, 是保障中药材有效性的最重要的指标, 也是评价中药材质量优劣的重要指标。本研究基于药效导向筛选四妙勇安汤活性部位, 根据体外药效和动物实验确定疗效最佳的配伍方, 首次同时对该配伍方中玄参和甘草的化学成分进行薄层鉴别, 采用 HPLC 的方法对配伍方中绿原酸和哈巴俄昔进行含量测定, 为其配伍方的质量评价研究提供参考。

4 结论

本实验所建立的四妙勇安汤活性部位配伍方以

哈巴俄苷和甘草酸铵为指标的薄层色谱鉴别方法专属性强,准确度高,以绿原酸和哈巴俄苷为指标的HPLC含量测定方法具有较好的精密度、重复性和稳定性,操作简便,标准可行,为有效控制该配伍方的质量提供准确、可靠的检测方法,也为配伍方作为新药的质量标准制定提供参考。

参考文献

- [1] 李冀. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社,2017:81.
- [2] 高慧,孟云辉,李永新,等. 四妙勇安汤异病同治的临床研究概况[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(22):2504-2506.
- [3] 谢连娣,陈立新,吴圣贤,等. 四妙勇安汤治疗冠心病的临床和基础研究概述[J]. 环球中医药,2012,5(8):629-633.
- [4] 郑亮,王梦月,陈钟,等. 四妙勇安汤研究进展[J/OL]. 中成药[2018-11-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20180830.1409.004.html>.
- [5] 聂波,徐冰,陈立新,等. 四妙勇安汤活性部位灌胃给药的急性毒性试验研究[J]. 河北中医,2017,39(1):100-103.
- [6] 刘蓓,陈立新,郭鹏,等. 四妙勇安汤活性部位对ApoE基因敲除小鼠动脉粥样硬化的药效学研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2013,11(4):450-451.
- [7] 朱海燕,聂波,徐冰,等. 四妙勇安汤配伍方抑制巨噬细胞NF- κ B活化和MMP-9分泌的初步研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2013,11(1):52-54.
- [8] 陈立新,吴圣贤,聂波. 对炎症因子表达具有抑制作用的药物组合物:ZL201210096533.5[P]. 2015-06-10.
- [9] 赵小艳,朱广伟. 传统中药的定性和定量分析浅议[J]. 中国民间疗法,2013,21(5):68-69.
- [10] 刘爱香. 中药及中成药薄层色谱鉴别检验中的问题分析[J]. 光明中医,2018,33(22):3437-3439.
- [11] 许世伟,姜雪敏,王云龙. 高效液相色谱法在中药质量检测中的应用[J]. 北方药学,2013,10(6):13.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:86-87,117.
- [13] 刘鹏,张恩惠,张薇,等. 四妙勇安汤水煎液化学成分研究[J]. 中草药,2018,49(14):3232-3239.
- [14] 迟森森,王卫华,刘斌. 四妙勇安汤水提物大鼠吸收入血成分研究[J]. 北京中医药大学学报,2016,39(11):933-940.
- [15] 徐英辉,申茹,刘彦彦. 绿原酸对佐剂性关节炎模型大鼠抗炎作用及机制研究[J]. 药学研究,2014,33(9):505-507.
- [16] 崔忠生,邸科前,马焕云. 哈巴俄苷及哈巴俄苷对同型半胱氨酸损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. 山东医药,2009,49(49):52-53.
- [17] 王韶,孟静岩. 四妙勇安汤的药物成分及抗动脉粥样硬化作用机制概述[J]. 中医学,2018,7(1):7-12.
- [18] 屠鹏飞,黄璐琦,陈万生,等. 《中华人民共和国药典》(2020年版)中药材和中药饮片质量标准增修订工作思路[J]. 中国现代中药,2018,20(12):1459-1464.

(收稿日期:2019-01-28 编辑:王笑辉)

(上接第648页)

- [24] KAUSS H, JEBlick W. Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H_2O_2 [J]. Plant Physiology, 1995, 96(108):1171-1178.
- [25] NEILL S J, DESIKAN R, CLARKE A et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells[J]. Plant Physiol, 2002, 128(1):13-16.
- [26] CLARK D, DERNER J, NAVARRE D A et al. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase[J]. Mol Plant Microbe In, 2000, 13(12):1380-1384.
- [27] CAMP W V, MONTAGU M V. H_2O_2 and NO: redox signals in disease resistance[J]. Trends in Plant Science. 1998, 3(9):330-334.
- [28] DELLEDONNE M, XAI Y J, DIXON R A, et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance[J]. Nature. 1998, 394(6693):585-588.
- [29] DURNER J, WENFEHENNE D, Klessig D F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP ribose[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(17):10328-10333.
- [30] LESLIE C A, ROMANI R J. Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis[J]. Plant Cell Rep. 1986, 5(2):144-146.

(收稿日期:2019-02-11 编辑:姚霞)