

ISC-HPLC 法同时测定桃红四物汤中酚类物质

杨 辉, 张 季, 刘丰熙, 杨建明, 郭春燕*

河北北方学院 药学系, 河北 张家口 075000

摘 要: **目的** 建立离子抑制高效液相色谱 (ISC-HPLC) 法测定桃红四物汤中酚类物质的方法。**方法** 采用 ISC-HPLC 法测定桃红四物汤中羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸的量, 分光光度法测定桃红四物汤中总酚酸的量。**结果** 桃红四物汤中羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸分别在 5.00~80.00、1.25~20.00、0.60~9.60、0.90~14.40、1.00~16.00 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系; 平均回收率分别为 98.50%、97.17%、97.17%、98.45%、97.16% ($n=9$)。**结论** ISC-HPLC 方法简便、准确、快速、重复性好, 可用于桃红四物汤中酚类物质的质量控制。

关键词: 桃红四物汤; 离子抑制高效液相色谱法; 羟基红花黄色素 A; 阿魏酸; 没食子酸; 原儿茶酸; 绿原酸; 总酚酸

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)24-3565-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.012

Simultaneous determination of phenols in Taohong Siwu Decoction by ISC-HPLC

YANG Hui, ZHANG Ji, LIU Feng-xi, YANG Jian-ming, GUO Chun-yan

Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Abstract: **Objective** To determine the contents of phenols in Taohong Siwu Decoction (TSD) by ISC-HPLC. **Methods** The ISC-HPLC was used to determine the contents of hydroxysafflor yellow A, ferulic acid, gallic acid, protocatechuic acid, and chlorogenic acid. Spectrophotometric method was used to determine the contents of total phenolic acids. **Results** The contents of hydroxysafflor yellow A, ferulic acid, gallic acid, protocatechuic acid, and chlorogenic acid in TSD had good linear relationships with the peak area in the ranges of 5.00—80.00, 1.25—20.00, 0.60—9.60, 0.90—14.40, and 1.00—16.00 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and the average recoveries ($n=9$) were 95.82%, 94.98%, 96.52%, 97.16%, and 98.14%, respectively. **Conclusion** ISC-HPLC method is simple, rapid, accurate, and reproducible, and can be used for the quality control of TSD.

Key words: Taohong Siwu Decoction; ISC-HPLC; hydroxysafflor yellow A; ferulic acid; gallic acid; protocatechuic acid; chlorogenic acid; total phenolic acids

桃红四物汤出自《医宗金鉴》,由四物汤加桃仁、红花组成,是活血化瘀代表方之一,具有养血活血双重功效^[1]。临床用于妇科疾病、冠心病、动脉粥样硬化、糖尿病并发症、肝肾疾病和骨科疾病的治疗。现代药理实验证实,桃红四物汤具有镇痛、抗炎、扩张血管、改善微循环、调节免疫功能,其药理活性涉及的多个领域均与清除自由基有关^[2-5]。有研究表明,桃红四物汤的抗氧化作用与其所含酚酸及苷类成分有一定关系^[6-7]。本实验应用离子抑制色谱法 (ion suppression chromatography, ISC) 检测

桃红四物汤中羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸的量,通过在流动相中加入酸性添加剂,改变 pH 值,抑制溶质电离。ISC-HPLC 法用于易水解和电离的多酚化合物的分析具有简便、准确、快速、重复性好的特点。羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸具有多种药理活性^[8-12],通过本研究为桃红四物汤中酚类物质的检测提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配置 G1311A

收稿日期: 2014-07-28

基金项目: 河北省教育厅重大项目 (ZD2014075); 河北省卫生厅医学科学研究重点课题 (20090588)

作者简介: 杨 辉 (1972—), 男, 副教授, 研究方向为天然药物化学。Tel: (0313)4029286 E-mail: yangkcer@163.com

*通信作者 郭春燕, 女, 教授, 博士, 硕士生导师。E-mail: guochy0311@163.com

QuatDump 四元梯度泵、G1322A Degasser 在线脱气机、G1314 VWD 检测器,美国 Agilent 公司;ME235S Sartorius 十万分之一分析天平,德国赛多利斯公司;SAFIRE2 多功能酶标仪 (TECAN Austria GmbH)。

羟基红花黄色素 A (批号 111637-201308)、没食子酸 (批号 110831-201204)、原儿茶酸 (批号 110809-201205)、绿原酸 (批号 110753-201314) 和阿魏酸 (批号 110773-201313) 对照品购自中国食品药品检定研究院,供定量测定用。甲醇为色谱纯,水为超纯水。红花 (批号 20140101、20140201)、桃仁 (批号 20140107、20140203)、当归 (批号 130709、140106)、川芎 (批号 20140101、20140220)、熟地 (批号 140101、140211)、白芍 (批号 20140101、20140217),购自张垣中药饮片有限公司,均由河北北方学院中医学院赵恒成教授鉴定,红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥成熟种子,当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,熟地为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的干燥块根,白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,均为正品。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液的制备 分别精密称取羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸对照品适量,分别加 10% 甲醇配成各单一对照品储备溶液。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密吸取单一对照品储备液适量,置同一量瓶中,加 10% 甲醇制成混合对照品储备液,羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸的质量浓度分别为 80.00、20.00、9.60、14.40、16.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.3 供试品溶液的制备 取桃仁、红花、当归、川芎、熟地黄、白芍饮片,粉碎,过 60 目筛后,按照 15:15:15:10:10:10 比例混合均匀,精密称定桃红四物汤饮片粉末 500.0 mg,加水 25 mL,回流提取 2 次,合并滤液,定容至 50.00 mL,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得桃红四物汤供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Thermo ODS-2 Hypersil (250 mm $\times$

4.6 mm, 5 μm); 检测波长 286 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL ; 流动相为甲醇-0.1% 乙酸水溶液,梯度洗脱条件: 0~5 min, 5% 甲醇; 5~14 min, 5%~32% 甲醇; 14~20 min, 32% 甲醇; 20~25 min, 39% 甲醇,维持 5 min。

2.3 专属性试验

在“2.2”项色谱条件下,羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸混合对照品溶液及桃红四物汤供试品溶液中 5 种酚类成分达到基线分离。羟基红花黄色素 A 来源于红花,阿魏酸来源于桃仁、当归、川芎,没食子酸来源于白芍,原儿茶酸来源于川芎,绿原酸来源于桃仁和当归。羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸混合对照品、桃红四物汤供试品及阴性对照品 HPLC 色谱图见图 1。

2.4 线性范围的考察

将上述混合对照品溶液倍比稀释,得混合标准系列溶液,其中含羟基红花黄色素 A 系列质量浓度分别为 5.00、10.00、20.00、40.00、80.00 $\mu\text{g/mL}$; 阿魏酸系列质量浓度分别为 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 $\mu\text{g/mL}$; 没食子酸系列质量浓度分别为 0.60、1.20、2.40、4.80、9.60 $\mu\text{g/mL}$; 原儿茶酸系列质量浓度分别为 0.90、1.80、3.60、7.20、14.40 $\mu\text{g/mL}$; 绿原酸系列质量浓度分别为 1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 $\mu\text{g/mL}$ 。在上述色谱条件下分别进样 20 μL 进行测定。以混合对照品质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y),绘制标准曲线,计算回归方程,没食子酸: $Y=40.22 X+3.111$, $r=0.9997$; 原儿茶酸: $Y=30.07 X+12.660$, $r=0.9996$; 羟基红花黄色素 A: $Y=22.69 X+9.210$, $r=0.9990$; 绿原酸: $Y=22.15 X+8.340$, $r=0.9978$; 阿魏酸: $Y=54.34 X+9.920$, $r=0.9995$ 。羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸的线性范围分别为 5.00~80.00、1.25~20.00、0.60~9.60、0.90~14.40、1.00~16.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 精密度试验

精密吸取供试品溶液 20 μL ,按上述色谱条件连续进样 5 次,测得羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸峰面积的 RSD 分别为 2.2%、2.3%、2.1%、1.9%、2.0%,结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取供试品溶液在室温下放置,分别在 0、

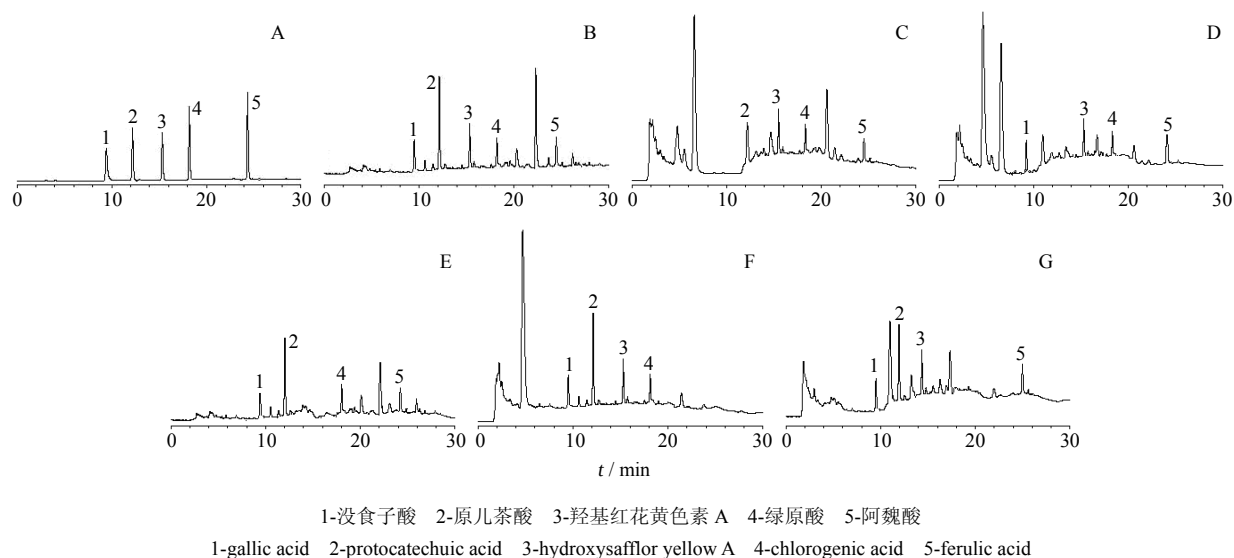


图1 混合对照品溶液 (A)、桃红四物汤供试品溶液 (B)、阴性对照品 (缺没食子酸, C; 缺原儿茶酸, D; 缺羟基红花黄色素 A, E; 缺阿魏酸, F; 缺绿原酸, G) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substance (A), TSD sample solution (B), and negative reference substance without (gallic acid, C; protocatechuic acid, D; hydroxysafflor yellow A, E; ferulic acid, F; chlorogenic acid, G)

2、4、8、12 h 进样 20 μL , 测得羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸峰面积的 RSD 分别为 2.1%、1.7%、1.9%、2.2%、2.0%, 结果表明供试品溶液中上述 5 个成分室温放置 12 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取样品粉末 5 份, 每份 500.0 mg, 按“2.1”项下方法平行制备成供试品溶液, 分别进样 20 μL 进行测定。结果羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸质量分数的 RSD 分别为 1.9%、2.0%、1.7%、2.0%、2.3%, 结果表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取已测定羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸的样品 9 份, 精密称定, 分为 3 组, 分别精密加入羟基红花黄色素 A (3.000、2.500、2.000 $\mu\text{g/mL}$)、阿魏酸 (1.800、1.500、1.200 $\mu\text{g/mL}$)、没食子酸 (1.380、1.150、0.920 $\mu\text{g/mL}$)、原儿茶酸 (0.840、0.700、0.560 $\mu\text{g/mL}$) 和绿原酸 (0.540、0.450、0.360 $\mu\text{g/mL}$) 混合储备液适量, 按“2.1.3”项下方法操作, 制备供试品溶液, 在上述色谱条件下分别进样进行测定, 计算回收率。结果羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸的平均回收率分别为 98.50%、97.17%、97.17%、98.45%、97.16%, RSD 分别为 2.0%、2.0%、

2.0%、2.0%、2.1%。

2.9 样品测定

取桃红四物汤供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样分析, 精密吸取供试品溶液 20 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 代入回归方程计算桃红四物汤中羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸的量, 测定结果见表 1。结果表明, 各批次药材中上述五种酚类物质定量测定精度良好, 说明本实验建立的方法简便可行。

2.10 样品中总酚酸定量测定^[13-14]

2.10.1 检测原理 酚酸化合物在碱性条件下能够还原钨钼酸生成蓝色化合物, 在 760 nm 处有强吸收, 吸光度 (A) 值与酚类化合物质量浓度呈正相关。以没食子酸为对照品确定样品中总酚酸的量。

2.10.2 标准曲线的绘制 精密称取干燥至恒定质量的没食子酸对照品 5.0 mg 置于 50 mL 棕色量瓶中, 用超纯水溶解、定容至刻度, 摇匀, 得 0.10 mg/mL 的没食子酸对照品溶液。精确吸取没食子酸对照品溶液 0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mL 于 25 mL 棕色量瓶中, 加入蒸馏水至 6.0 mL, 依次加入福林试剂 0.50 mL、75 g/L Na_2CO_3 溶液 4.0 mL, 加水定容至刻度, 充分混匀后于 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置 40 min, 以不加对照品的溶液为空白对照, 于 760 nm 处测定 A 值。采用最小二乘法以 A 值对没食子酸质量浓度进行线性回归分析, 得回归方程为 $A=99.89 C+$

表1 桃红四物汤5种酚类物质定量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 1 Quantitative determination of five phenols components in TSD ($\bar{x} \pm s, n=6$)

批次	质量分数 / (mg·g ⁻¹)					
	没食子酸	原儿茶酸	羟基红花黄色素 A	绿原酸	阿魏酸	总酚酸
1	1.140±0.015	0.701±0.011	2.54±0.04	0.450±0.003	1.511±0.016	26.3±0.5
2	0.987±0.016	0.900±0.013	2.12±0.04	0.571±0.004	1.504±0.017	28.3±0.6
3	0.896±0.015	0.922±0.012	2.34±0.06	0.412±0.004	1.479±0.016	24.1±0.6
4	1.007±0.017	0.876±0.014	2.69±0.06	0.597±0.004	1.604±0.017	30.3±0.6
5	1.067±0.019	0.698±0.012	2.58±0.05	0.467±0.005	1.577±0.016	26.6±0.7
6	1.222±0.021	0.711±0.013	2.51±0.04	0.656±0.005	1.522±0.018	27.5±0.5

0.011 8, $r=0.999$ 8, 线性范围为 1~16 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.10.3 样品测定 取桃红四物汤供试品溶液, 按“2.10.2”项方法操作并测定, 结果见表 1。结果表明, 6 个批次药材中总酚酸的量均在 24~30 mg/g。

3 讨论

羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸均为取代芳香化合物, 可以产生 K 吸收带, 所以紫外有强吸收。200~410 nm 扫描显示其最大吸收波长不同, 但是在 286 nm 均有较强吸收, 所以本实验选择 286 nm 为紫外检测波长。

溶液酸度显著影响羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、原儿茶酸和绿原酸的解离程度, 从而影响保留因子、保留时间和分离度。本研究加入少量乙酸作为离子抑制剂, 调节流动相的 pH 值, 应用 ISC-HPLC 测定上述 5 种酚类物质的量, 所建立的 ISC-HPLC 法简便、快速、准确, 为桃红四物汤提取物的质量评价提供了实验依据。

没食子酸、原儿茶酸与羟基红花黄色素 A、绿原酸、阿魏酸的极性差异较大, 采用等度洗脱分离时, 羟基红花黄色素 A、绿原酸和阿魏酸保留时间显著延长, 而采用甲醇-水梯度洗脱系统可以在 30 min 内取得好的分离效果。本实验建立的 ISC-HPLC 法快速、准确、稳定性好, 是一种测定桃红四物汤中没食子酸、原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、绿原酸、阿魏酸量的可靠方法, 可为桃红四物汤质量控制提供实验依据。

参考文献

- [1] 清·吴谦. 医宗金鉴. 第2分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980.
- [2] 丁艳杰, 张前德. 桃红四物汤临床与实验研究进展 [J]. 江苏中医药, 2010, 42(1): 77-79.
- [3] 张国民, 朱伟, 刘慧萍, 等. 桃红四物汤抗急性心肌缺血的实验研究 [J]. 中医药学刊, 2003, 42(9):

1425-1451.

- [4] 康靖东. 桃红四物汤对大鼠激素性股骨头缺血性坏死 TGF- β_1 表达的实验研究 [D]. 福州: 福建中医学院, 2008.
- [5] 刘立, 段金廛, 唐于平, 等. 桃红四物汤抗氧化效应物质基础研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1591-1595.
- [6] 刘立, 段金廛, 朱振华, 等. 当归-红花药物组合效应物质基础研究 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 929-934.
- [7] Esmaeili A H, Moghaddam A H, Chaichi M J. Identification, determinaton, and study of antioxidative activities of hesperetin and gallic acid in hydro-alcoholic extract from flowers of *Eriobotrya japonica* (Lindl.) [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2014, 4(4): 260-266.
- [8] 周鹏, 周惠芬, 何昱, 等. 羟基红花黄色素 A 在 Caco-2 细胞单层模型的转运研究 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2030-2035.
- [9] Kakkar S, Bais S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential [J]. *ISRN Pharmacol*, 2014: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/952943>.
- [10] Fuentes E, Caballero J, Alarcón M, et al. Chlorogenic acid inhibits human platelet activation and thrombus formation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90699.
- [11] Jiang S, Shi Z, Li C, et al. Hydroxysafflor yellow A attenuates ischemia/reperfusion-induced liver injury by suppressing macrophage activation [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5): 2595-2608.
- [12] 汤浩, 高庆剑, 陆钺, 等. 阿魏酸和异阿魏酸对 HepG2 细胞增殖及其细胞色素 P450 酶的影响 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1726-1730.
- [13] 李倩, 李俊娟, 郭春燕, 等. 桃红四物汤水提液中总酚酸含量测定 [J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2009, 26(1): 49-50.
- [14] 杨辉, 胡燕峰, 郭春燕. 桃红四物汤乙醇提取液和水提液中总酚酸含量测定及清除 DPPH 自由基活性的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1439-1440.