

HPLC 法测定玉屏风不同配伍中 4 种黄酮成分

刘焕蓉, 王 虹, 秦雪梅, 张丽增, 吴 恩

山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: 目的 研究玉屏风黄芪-白术-防风 1:1:1、2:2:1、3:1:1、4:4:1 和防风-黄芪 1:2、黄芪-白术 1:1、防风-白术 1:2 配伍剂量变化对槲皮素、芒柄花素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和升麻苷 4 种黄酮成分的影响。方法 对玉屏风配伍剂量变化的 4 组整方和 3 组拆方分别先用水回流提取, 药渣再用 80%乙醇回流提取, 并采用 HPLC 法对水醇提取液中 4 种黄酮成分的含量进行了测定。结果 在整方中, 4 种黄酮成分的总量为 3:1:1>1:1:1>2:2:1>4:4:1, 在拆方中, 防风-黄芪>防风-白术>黄芪-白术。对单一成分而言, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷>升麻苷>槲皮素>芒柄花素; 除芒柄花素外, 其余 3 种成分的量均为水提液大于药渣醇提液, 药渣醇提可使 4 种黄酮成分的量增加 12.24%~40.64%。槲皮素和芒柄花素是黄芪药材中的有效成分, 二者的含量均为 3:1:1>2:2:1>4:4:1>1:1:1, 白术不含 4 种黄酮成分。结论 随着玉屏风配伍剂量的变化, 水醇提取液中 4 种黄酮成分的含量明显改变, 但这种改变并不是药材含量的线性加减。

关键词: 玉屏风; 配伍; 槲皮素; 芒柄花素; 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷; 升麻苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)06-1122-03

Determination of four flavonoids from Yupingfeng prescription in different compatibility proportion by HPLC

LIU Huan-rong, WANG Hong, QIN Xue-mei, ZHANG Li-zeng, WU En

School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Key words: Yupingfeng; compatibility; quercetin; formononetin; 5-*O*-methylvisammioside; cimicifugoside

玉屏风由黄芪、白术、防风 3 味中药组成。经文献统计, 3 药比例有 12 种之多^[1], 临床医家用药剂量不同, 药效也不同^[2-3]。为了系统地探讨配比变化所致有效成分差异与临床用药的相关性^[4], 本实验对玉屏风配伍中黄芪-白术-防风比例分别为 3:1:1^[5]、1:1:1、2:2:1、4:4:1 整方和防风-黄芪比例为 1:2、黄芪-白术比例为 1:1、防风-白术比例为 1:2^[6]拆方先分别进行水回流提取, 药渣再用 80%乙醇回流提取^[7], 并采用 HPLC 法测定水提液和药渣醇提液中槲皮素、芒柄花素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和升麻苷 4 种黄酮成分的量。通过量化经典方, 为发挥传统医药的资源优势以及进行创新药物研究提供可靠的理论依据。

1 仪器与材料

日立 (Hitachi) 高效液相色谱仪, L-2130 型泵, L-2200 自动进样器, L-2420 UV-Vis 检测器。

黄芪 (产地山西浑源)、防风 (产地内蒙古乌兰浩特)、白术 (产地浙江磐安) 均由山西大学化学化工学院秦雪梅教授鉴定为正品。甲醇为色谱纯, 95%乙醇、无水乙醇、磷酸均为分析纯, 水为纯净水。槲皮素、芒柄花素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和升麻苷对照品均购于中国药品生物制品检验所, 质量分数均≥99.6%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为大连 Elite Hypersil ODS2 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 槲皮素: 流动相为甲醇-0.4%磷酸 (50:50), 检测波长 360 nm^[8], 体积流量 1.0 mL/min; 芒柄花素: 流动相为甲醇-0.4%磷酸 (50:50), 检测波长 254 nm, 体积流量 0.8 mL/min; 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷: 流动相为甲醇-水 (38:62), 检测波长 254 nm^[9], 体积流量 0.8 mL/min; 升麻苷:

收稿日期: 2010-09-01

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目 (2007011026); 全国大学生创新性实验计划项目 (080009)

作者简介 刘焕蓉 (1956—), 女, 山西大同人, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为生药学。

Tel: (0351)7011716 13935172273 Fax: (0351)7011688 E-mail: liuhr@sxu.edu.cn

流动相为乙腈-水-醋酸(13:88:0.03),检测波长291 nm^[10],体积流量0.8 mL/min;柱温均为室温。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取槲皮素对照品2.00 mg,置25 mL量瓶中;芒柄花素对照品2.00 mg,置10 mL量瓶中;5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品2.20 mg,置10 mL量瓶中;升麻苷对照品3.80 mg置50 mL量瓶中,分别加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,备用。

2.3 供试品溶液的制备

按比例准确称取总质量为40 g的玉屏风配伍药材,分别置500 mL圆底烧瓶中,加8倍量的蒸馏水浸泡过夜;保持微沸回流提取3次,每次1 h,合并滤液,浓缩至适量;用80%乙醇沉淀,离心,上清液浓缩,蒸干,称质量,得水提液固形物;用蒸馏水溶解定容于50 mL量瓶中,得水提液。水提后的药渣再用80%乙醇回流提取2次,每次2 h,合并滤液,浓缩,蒸干,称质量,得药渣乙醇提取液固形物;用蒸馏水溶解定容于50 mL量瓶中,得药渣醇提液。

2.4 线性关系考察

准确移取槲皮素对照品溶液2、5、10、15、20 μL;芒柄花素对照品溶液1 mL稀释定容至10 mL,再分别移取2、5、10、15、20 μL;5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品溶液2、5、10、15、20、25 μL;升麻苷对照品溶液2、5、10、15、20、25 μL;按各色谱条件分别进样,记录色谱峰,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程:槲皮素 $Y=2\ 294.6 X-4.493$, $r=0.999\ 8$;芒柄花素 $Y=4\ 238.7 X-398.1$, $r=0.996\ 0$;5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 $Y=808.6 X-45.939$, $r=0.999\ 2$;升麻苷 $Y=756.09 X+42.573$, $r=0.999\ 0$;表明槲皮素在0.400~2.000 μg,芒柄花素在0.100~1.000 μg,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷在0.440~5.500 μg,升麻苷在0.152~7.600 μg线性关系良好。

2.5 精密度试验

分别取槲皮素、芒柄花素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和升麻苷对照品溶液20 μL,按各色谱条件进样测定,重复6次,记录色谱峰,计算得各色谱峰面积的RSD分别为0.22%、0.21%、1.23%、0.76%。

2.6 稳定性试验

取黄芪-白术-防风比例为4:4:1的玉屏风水提液,分别在0、2、4、6、8、12、24 h时按各色谱条件分别进样20 μL,记录色谱峰,计算得各色

谱峰面积的RSD分别为3.95%、3.24%、3.41%、3.52%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.7 重现性试验

按比例称取黄芪-白术-防风比例为4:4:1的玉屏风样品6份,分别制备供试品溶液,进样测定,记录色谱峰,计算得槲皮素、芒柄花素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和升麻苷质量分数的RSD分别为3.63%、1.94%、2.43%、2.99%。

2.8 加样回收率

按比例称取总质量25 g的黄芪-白术-防风比例为4:4:1的玉屏风样品6份,分别精密加入槲皮素对照品4.0 mg、芒柄花素对照品2.0 mg、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品11.0 mg、升麻苷对照品7.6 mg,制备供试品溶液,按各色谱条件分别进样20 μL,记录色谱峰,计算得槲皮素、芒柄花素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和升麻苷的平均回收率及RSD分别为100.21%、0.93%;98.93%、0.71%;100.21%、0.93%;98.99%、0.63%。

2.9 玉屏风不同配伍剂量中4种黄酮成分的测定

分别取不同配伍剂量的水提液和药渣醇提液各10 μL,进样分析,重复测定3次,记录色谱峰,计算槲皮素、芒柄花素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和升麻苷4种黄酮成分的量,结果见表1。在保持玉屏风配伍药材总质量不变的条件下,随着配伍剂量的变化,4种黄酮成分在水提液和药渣醇提液中的质量分数明显改变,这种改变并不是药材中各成分质量分数的线性加减。在整方中,4种黄酮成分的总量为3:1:1>1:1:1>2:2:1>4:4:1;在拆方中,防风-黄芪>防风-白术>黄芪-白术。对单一成分而言,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷>升麻苷>槲皮素>芒柄花素;且除芒柄花素外,其余3种成分均为水提液质量分数大于药渣醇提液。药渣醇提可使4种黄酮成分的量增加12.24%~40.64%。槲皮素和芒柄花素是黄芪药材中的有效成分,二者的质量分数均为3:1:1>2:2:1>4:4:1>1:1:1,白术不含4种黄酮成分。

3 讨论

文献报道^[6]玉屏风不同配伍对免疫力低下小鼠均有较好的恢复作用,达到或接近正常水平。从抑制小鼠腹腔巨噬细胞吞噬率和吞噬指数的增加表明,在整方组中防风高剂量1:1:1配伍的吞噬效果最好;在拆方组中防风-黄芪组的最强,结论是其药理作用机制与4种黄酮成分的含量高低有关。

表 1 玉屏风不同配伍剂量中 4 种黄酮成分的测定 ($n=3$)
 Table 1 Determination of four flavonoids from three components of Yupingfeng prescription
 in different compatibility proportion ($n=3$)

样 品		质量分数/(mg·g ⁻¹)				药渣醇提占总量比/%
		槲皮素	芒柄花素	5-O-甲基维斯阿米醇苷	升麻苷	
黄芪-白术-防风 1:1:1	水提液	0.084	0.013	0.667	0.577	20.18
	药渣醇提液	0.039	0.016	0.215	0.069	
黄芪-白术-防风 2:2:1	水提液	0.099	0.016	0.422	0.347	31.63
	药渣醇提液	0.091	0.045	0.202	0.071	
黄芪-白术-防风 3:1:1	水提液	0.153	0.024	0.633	0.397	28.24
	药渣醇提液	0.136	0.057	0.240	0.042	
黄芪-白术-防风 4:4:1	水提液	0.111	0.022	0.260	0.171	30.63
	药渣醇提液	0.071	0.025	0.136	0.017	
防风-黄芪 1:2	水提液	0.200	0.026	0.636	0.278	29.45
	药渣醇提液	0.190	0.052	0.190	0.044	
防风-白术 1:2	水提液	0.000	0.000	0.674	0.724	12.24
	药渣醇提液	0.000	0.000	0.122	0.073	
黄芪-白术 1:1	水提液	0.129	0.020	0.000	0.000	40.64
	药渣醇提液	0.073	0.029	0.000	0.000	

2:2:1 配伍中槲皮素和芒柄花素的含量最高,对提升溶血素和溶血空斑指标及淋巴细胞转化作用趋势最明显。《中国药典》2010 年版中的 3:1:1 与 2:2:1 尽管防风剂量相同,但 4 种黄酮成分的含量差异较大。在 3:1:1 中槲皮素和芒柄花素的含量居前位,4 种黄酮成分的总含量也居前位,由此可知《中国药典》选用 3:1:1 的原因所在。另外传统的水煎法可使 4 种黄酮成分溶出近 80%,由于黄酮类苷元分子中羟基甲基化及糖苷化,有部分溶于醇,尤其芒柄花素为甚,所以对药渣再进行乙醇提取是很有必要的。

综上所述,4 方主治相似,但由于防风、黄芪剂量不同,其功效又有些许差异,临床上遣方用药,应辨证施治。

参考文献

- [1] 陈馥馨,高晓山. 玉屏风散组成考查及联想 [J]. 中成药, 1995, 17(4): 45-46.
- [2] 杨小秋. 从中药的化学有效成分谈中药的用量 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2007, 87(4): 199-200.
- [3] 刘焕蓉,秦雪梅,王利平,等. 玉屏风配伍剂量变化与有效成分的相关性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(12): 1922-1924.
- [4] 刘青,杨雪,李庆生. 玉屏风散不同剂量比例关系研究及治疗上呼吸道感染概况 [J]. 云南中医学院学报, 2008, 31(3): 61-64.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 李晓琳. 玉屏风散配伍对小鼠免疫功能的影响 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2005.
- [7] 刘焕蓉,王松柏,石美凤,等. 提高中成药玉屏风有效成分含量的研究 [J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2006, 29(4): 403-406.
- [8] 方玲芬,徐洪,林开中. 高效液相色谱法测定贵州苦荞麦中槲皮素的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2006, 23(5): 383-384.
- [9] 谷学新,毛彦杰,岳敏,等. HPLC 测定五虎散中升麻苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(13): 1037-1038.
- [10] 刘素香,万军. HPLC 法测定玉屏风口服液升麻苷的含量 [J]. 中草药, 2004, 35(12): 1370-1371.