不同制备工艺对桃红四物汤中5种成分含量的影响

李峥嵘[1],李培培[2],张 伟[3,4],李 正[3],王雅丽[3],许凤清[3,4],王桐生[3,4],吴德玲[3,4]

(1.驻马店市中医院,河南 驻马店 463000;2.亳州职业技术学院,安徽 亳州 236800;
3.安徽中医药大学,安徽 合肥 230012;4.安徽省中药研究与开发重点实验室,安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 研究不同制备工艺对桃红四物汤中成分的影响。**方法** 采用高效液相色谱法测定桃红四物汤中没食子酸、5-羟甲基糠醛、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸含量。**结果** 桃红四物汤A液中5种成分含量均值分别为82.9、11.1、235.7、917.3、49.3 mg/L;桃红四物汤B液中5种成分含量均值分别为126.6、13.2、187.3、1 040.4、28.6 mg/L,说明不同制备工艺使桃红四物汤中5种成分含量产生显著性差异。**结论** 不同制备工艺得到的桃红四物汤中化学成分种类和含量会产生变化。

[关键词]桃红四物汤;含量测定;制备工艺

[中图分类号]R284.1 [DOI]10.3969/j.issn.2095-7246.2017.03.021

桃红四物汤出自清代吴谦所著《医宗金鉴·妇科心法要诀·调经门》,由基本方四物汤(当归、川芎、熟地黄、白芍)加桃仁、红花所组成,具有活血祛瘀、养血调经之功效,主治妇女月经先期属瘀血者。近年来研究表明,桃红四物汤具有抗炎[1]、镇痛[2]、改善微循环[3]、促进血管生成[4-6]、提高机体非特异性免疫功能[7]、促进骨折愈合[8]、治疗股骨头缺血坏死[9]、延缓肝脏纤维化进程[10]等功效。桃红四物汤一般采用水煎煮法提取,为兼顾其中脂溶性成分及水溶性成分,考虑到复方化学成分复杂,课题组采用先以90%乙醇提取复方中脂溶性成分,再以水提取方法提取亲水性成分制备桃红四物汤。课题组前期实验已对桃红四物汤的提取方法进行优选,本实验采用高效液相色谱法测定两种提取液中5种主要成分,从多指标含量测定角度比较传统提取方法和优选后的制备方法所得到的两种提取液化学成分的差异,为后期药效学研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent 1260型高效液相色谱仪(G1312C二元泵,G1316A柱温箱,G1329B自动进样器,二极管阵列检测器G4212B,ChemStation色谱工作站):美国安捷伦科技有限公司;Milli-Q Advantage A10一体式超纯水机:德国默克密理博公司;AS-3120超声清洗仪:江苏昆山力波超声设备有限公司;HH-S恒温水浴锅:江苏国胜实验仪器厂;R1001N旋转蒸发仪:郑州长城科工贸有限公司;CP225D十万分之一电子天平:德国赛多利斯。

1.2 材料 桃仁、红花、当归、川芎、白芍、熟地黄6味药材,均购自安徽省协和成药业有限公司,经安徽中医药大学中药资源教研室刘守金教授鉴定为2015版《中华人民共和国药典》收载品种;没食子酸(批号110831-201204)、5-羟甲基糠醛(批号111626-201308)、羟基红花黄色素A(批号111637-200905)、芍药苷(批号110736-201337)、阿魏酸(批号110773-201313):中国食品药品检定研究院;乙腈(色谱纯):瑞典欧森巴克化学有限公司;甲醇(分析纯):天津四友化学试剂有限公司;水为超纯水;其余均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱Welch Materials C_{18}(4.6 nm×250 nm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B)梯度洗脱,流速1.0 mL/min,检测波长0~11 min,290 nm;11~27 min,320 nm;27~45 min,230 nm,柱温40 ℃,进样量20 μL。梯度洗脱系统见表1。

表1 梯度洗脱系统

时间/min	乙腈/%	0.05%磷酸水/%
0~7	5	95
7~20	5~13	95~87
20~28	13~15	87~85
28~45	15~17	85~83
45~60	17~33	83~67
60~70	33~95	67~5
70~80	95~5	5~95

2.2 对照品溶液的制备 精密称定于真空干燥箱24 h的没食子酸、5-羟甲基糠醛、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸对照品适量,加入50%色谱甲醇制成每毫升含没食子酸0.080 8 mg、5-羟甲基糠醛0.010 0 mg、羟基红花黄色素A 0.184 0 mg、芍药苷0.604 0 mg和阿魏酸0.046 0 mg的对照品溶液,备用。

作者简介:李峥嵘(1970-),女,副主任药师

通信作者:吴德玲,aucmctcm@163.com

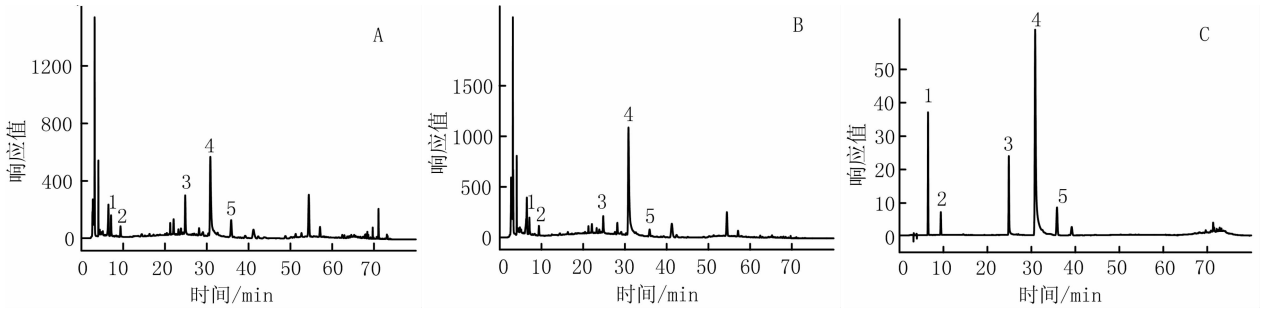


图1 A液(A)、B液(B)和混合标准品(C)的高效液相色谱图

(1.没食子酸;2.5-羟甲基糠醛;3.羟基红花黄色素A;4.芍药苷;5.阿魏酸)

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 A液的制备 90%乙醇-水提法:称取0.5倍处方量(桃仁4.5 g,红花3 g,当归4.5 g,川芎3 g),加10倍量的90%乙醇,回流提取3次,每次1.5 h,滤过,滤液回收乙醇,药渣与白芍4.5 g、熟地黄6 g,用8倍量水煎煮2次,每次2 h,滤过,滤液合并,水浴浓缩,转移至100 mL量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 B液的制备 传统煎煮法:称取0.5倍处方量(桃仁4.5 g,红花3 g,当归4.5 g,川芎3 g,白芍4.5 g,熟地黄6 g)加10倍量水煎煮2 h,滤过,药渣再加8倍量水煎煮40 min,滤过,滤液合并,水浴浓缩,转移至100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.3 供试液的制备 分别精密吸取两种样品溶液A液、B液各5 mL,挥干溶剂,残渣加50%甲醇溶解,转移至10 mL量瓶中。用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,分别制得供试液A、供试液B。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取没食子酸、5-羟甲基糠醛、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸对照品溶液,以进样量(x)为横坐标,以峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归分析。结果见表2。

表2 线性关系考察

化合物	线性方程	r	线性范围/g
没食子酸	$y=1\ 903.8x-110.0$	1.000 0	0.808 0～3.230 0
5-羟甲基糠醛	$y=8\ 152x-0.101$	1.000 0	0.050 0～0.400 0
羟基红花黄色素A	$y=807.9x+14.88$	1.000 0	0.920 0～7.360 0
芍药苷	$y=1\ 520.1x-948.4$	1.000 0	3.020 0～24.160 0
阿魏酸	$y=2\ 877.9x-2.03$	1.000 0	0.230 0～1.840 0

2.4.2 精密度试验 取同一对照品溶液重复进样6次,记录没食子酸、5-羟甲基糠醛、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸的峰面积,计算其峰面积的RSD分别为0.21%、0.15%、0.19%、0.39%、0.26%。结果表明仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 按“2.3.2”“2.3.3”项下方法制备供试液B 6份,并进行含量测定,计算没食子酸、5-羟甲基糠醛、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸的含量,其RSD分别为0.80%、2.29%、2.82%、2.76%、2.13%。结果表明重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 按“2.3.2”“2.3.3”项下方法制备供试液B,分别于0、3、6、10、16、24 h,记录没食子酸、5-羟甲基糠醛、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸的峰面积,计算得峰面积的RSD分别为1.22%、0.91%、1.02%、1.17%、1.77%。结果表明,供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.4.5 回收率试验 取已知含量的桃红四物汤B液6份,每份5 mL,每份分别加入等量的各对照品溶液,按“2.3.3”项下方法制备溶液,定容至10 mL,进行含量测定,计算加样回收率。没食子酸的平均加样回收率为100.60%,相对标准偏差为2.46%;5-羟甲基糠醛的平均加样回收率为100.00%,相对标准偏差为2.34%;羟基红花黄色素A的平均回收率为98.90%,相对标准偏差为1.95%;芍药苷的平均加样回收率为102.20%,相对标准偏差为2.11%;阿魏酸的平均加样回收率为100.70%,相对标准偏差为2.60%。结果见表3。

2.4.6 样品测定 按“2.3.3”项下方法分别制备两种供试液各5份,按照上述色谱条件进行含量测定,色谱图见图1,计算两种提取液中没食子酸、5-羟甲基糠醛、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸的含量。结果见表4。

表3 回收率试验

成 分	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
没食子酸	0.630 0	0.652	1.300 0	102.90	100.60	2.46
	0.630 0	0.652	1.289 0	100.80		
	0.638 0	0.652	1.307 0	102.60		
	0.636 0	0.652	1.263 0	96.20		
	0.643 0	0.652	1.305 0	101.50		
	0.631 0	0.652	1.280 0	99.50		
5-羟甲基糠醛	0.065 0	0.071	0.137 0	101.40	100.00	2.34
	0.067 0	0.071	0.139 0	101.40		
	0.066 0	0.071	0.136 0	98.60		
	0.068 0	0.071	0.140 0	101.40		
	0.069 0	0.071	0.137 0	95.80		
	0.066 0	0.071	0.138 0	101.40		
羟基红花黄色素 A	0.985 0	0.937	1.841 0	101.00	99.40	1.74
	0.930 0	0.937	1.869 0	100.20		
	0.938 0	0.937	1.853 0	97.70		
	0.913 0	0.937	1.864 0	101.50		
	0.958 0	0.937	1.871 0	97.40		
	0.950 0	0.937	1.875 0	98.70		
芍药苷	4.872 0	4.910	9.984 0	104.10	102.20	2.11
	4.951 0	4.910	9.970 0	102.20		
	4.962 0	4.910	10.020 0	103.00		
	5.148 0	4.910	9.993 0	98.70		
	4.963 0	4.910	10.085 0	104.30		
	5.065 0	4.910	10.0100	100.70		
阿魏酸	2.880 0	2.933	5.943 0	104.40	100.70	2.60
	3.060 0	2.933	5.891 0	96.50		
	3.010 0	2.933	5.960 0	100.70		
	2.960 0	2.933	5.880 0	99.50		
	2.910 0	2.933	5.870 0	101.10		
	2.950 0	2.933	5.937 0	101.80		

表4 桃红四物汤A液和B液中5种成分含量比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	没食子酸/(mg/L)	5-羟甲基糠醛/(mg/L)	羟基红花黄色素 A/(mg/L)	芍药苷/(mg/L)	阿魏酸/(mg/L)
桃红四物汤A液	5	82.9±0.7	11.1±0.2	235.7±3.7	917.3±13.7	49.3±0.8
桃红四物汤B液	5	126.6±2.2*	13.2±0.3*	187.3±5.5*	1 040.4± 9.5*	28.6±0.6*

注:与桃红四物汤A液比较,* $P<0.05$。

3 讨论

课题组参照2015版《中华人民共和国药典》[11]并结合文献资料[12-13],汇总了桃红四物汤中6味药材采用高效液相色谱法测定含量的主要成分,并确定了5种主要成分的最大吸收波长,没食子酸在271 nm有较强吸收,5-羟甲基糠醛在284 nm处有较强的吸收,羟基红花黄色素A在403 nm处有最大吸收,芍药苷和阿魏酸的最大吸收波长分别为230 nm和316 nm。基于这5种成分的最大吸收波长差异较大,实验初期先以230 nm作为检测波长考察梯度洗脱的色谱条件,待初步确定出各主要成分的出峰时间及各自出峰顺序后,再进一步考察250 nm、270 nm、290 nm、320 nm、410 nm波长条件下色谱峰出峰情况,最终确定了波长的切换条件:0～11 min,290 nm;11～27 min,320 nm;27～45 min,230 nm;45～80 min,270 nm。对比两种提取液各主要成分含量发现,在每升提取液中,桃红四物汤A液中没食子酸、5-羟甲基糠醛、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸含量均值分别为82.9、11.1、235.7、917.3、49.3 mg;桃红四物汤B液中没食子

酸、5-羟甲基糠醛、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸含量均值分别为126.6、13.2、187.3、1 040.4、28.6 mg。桃红四物汤B液中没食子酸、5-羟甲基糠醛、芍药苷均显著高于A液($P<0.05$),羟基红花黄色素A、阿魏酸均显著低于B液($P<0.05$),说明不同提取方法会使各成分含量产生显著性改变;对比A液和B液色谱图也可以发现,A液化学成分种类明显较B液多,提示先以90%乙醇提取再以水提取方法得到的A液中脂溶性成分较B液多,说明提取方法不同,使得A液中脂溶性成分和水溶性成分均被提取出来,而B液中水溶性成分提取较充分,至于其与药效之间相关性还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 任国辉,叶任高,李幼姬,等.桃红四物汤对实验性肾炎肾内血小板活化因子、血栓素B2的影响[J].中国中西医结合杂志,1996,16(S1):91-93.

[2] 姚金梁,徐立,李少康.桃红四物汤及其拆方不同提取工艺的镇痛作用[J].中国新药与临床药理,2008,19(2):114-116.

[3] 金翔,时乐,汪珊珊,等.桃红四物汤不同提取部位对血虚血瘀模型大鼠微循环的影响[J].安徽医药,2010,14(4):387-389.

[4] 梁杰,尹登科,李白坤,等.桃红四物汤对药物致不完全流产早孕大鼠的血管生成及Ang-1, Ang-2, Tie-2表达的影响[J].中国中药杂志,2013,38(21):3731-3735.

[5] 王淑美,徐晓玉,张文亮,等.桃红四物汤及其拆方对血管生成的影响[J].中药药理与临床,2005,21(4):4-7.

[6] 董海燕,杨建刚,肖志强,等.4种中药和3个方剂促血管新生作用及有效组分的研究[J].中药材,2013,36(8):1297-1300.

[7] 李树强,于涛,齐振熙.桃红四物汤对激素诱导骨髓间充质干细胞成脂分化的干预作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(19):3539-3543.

[8] 熊辉,左亚杰,罗志勇,等.桃红四物汤对实验性骨折愈合过程中VEGF mRNA表达的影响[J].中医正骨,2004,16(4):8-9.

[9] 曹彦俊,宁长青,冯伟,等.中药治疗股骨头缺血性坏死临床研究进展[J].上海中医药杂志,2014,48(1):90-92.

[10] 罗利琼,陈东波.桃红四物汤对肝纤维化大鼠肝组织星状细胞增殖的影响[J].宜春学院学报,2014,36(3):69-71.

[11] 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.

[12] 付煜荣,张万明,陈桂敏,等.景天三七中没食子酸和总酚酸含量测定[J].中成药,2006,28(7):1016-1018.

[13] 秦向阳,周军,李晓晔,等.RP-HPLC法测定熟地黄中5-羟甲基糠醛的含量[J].第四军医大学学报,2006,27(6):510-511.

(收稿日期:2016-12-16;编辑:张倩)

Influence of Different Preparation Processes on the Content of Five Constituents in Taohong Siwu Decoction

LI Zheng-rong[1], *LI Pei-pei*[2], *ZHANG Wei*[3,4], *LI Zheng*[3], *WANG Ya-li*[3], *XU Feng-qing*[3,4], *WANG Tong-sheng*[3,4], *WU De-ling*[3,4]

(1. *Zhumadian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Henan Zhumadian* 463000, *China*; 2. *Bozhou Vocational and Technical College, Anhui Bozhou* 236800, *China*; 3. *Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei* 230012, *China*; 4. *Anhui Province Key Laboratory of R&D of Chinese Medicine, Anhui Hefei* 230012, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the influence of different preparation processes on the content of five constituents in Taohong Siwu Decoction. **Methods** High-performance liquid chromatography was used to measure the content of gallic acid, 5-hydroxymethyl furfural, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, and ferulic acid in Taohong Siwu Decoction. **Results** The mean content of these five constituents was 82.9, 11.1, 235.7, 917.3, and 49.3 mg/L in Taohong Siwu Decoction solution A and 126.6, 13.2, 187.3, 1 040.4, and 28.6 mg/L in Taohong Siwu Decoction solution B, which suggested that different preparation processes led to significant differences in the content of these five constituents in Taohong Siwu Decoction. **Conclusion** Different preparation processes can result in the changes in the type and content of chemical constituents in Taohong Siwu Decoction.

[**Key words**] Taohong Siwu Decoction; Content determination; Preparation process