

本文引用:毛文点,鹿玲玲,齐文续,苏睿智,邓常清,邹 龙. 黄芪-当归不同配伍对其6种主要有效成分溶出的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021,41(3): 350-354.

黄芪-当归不同配伍对其6种主要有效成分溶出的影响

毛文点,鹿玲玲,齐文续,苏睿智,邓常清*,邹 龙*
(湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 观察黄芪-当归不同配比对毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、阿魏酸及洋川芎内酯 I 含量的影响。**方法** 采用水提法制备黄芪、当归及黄芪-当归不同配比(5:1、1:1、1:5)的药液,通过高效液相色谱法对6种主要成分分别进行线性关系、精密度、重复性及回收率检测。**结果** 6种对照样品线性关系良好,仪器的精密度、样品的重复性及回收率均满足标准。黄芪-当归5:1配伍时,6种成分的溶出量均未达90%;当配伍为1:1和1:5时,6种成分的溶出大多高于或接近100%。**结论** 黄芪-当归以1:1和1:5配伍时可促进两者主要成分的溶出,且1:1配伍时溶出效果最好,说明在1:1配伍时当归对有效成分的溶出有促进作用。

[关键词] 高效液相色谱法;黄芪;当归;黄酮类成分;阿魏酸;洋川芎内酯 I;含量测定

[中图分类号] R284.2

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.03.005

Effects of Different Compatibility of Huangqi (Astragali Radix)-Danggui (Angelicae Sinensis Radix) on the Dissolution of 6 Main Active Components

MAO Wendian, TUO Lingling, QI Wenxu, SU Ruizhi, DENG Changqing*, ZOU Long*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of different ratios of Huangqi (Astragali Radix)-Danggui (Angelicae Sinensis Radix) on the contents of calycosin-7-O-glucoside, calycosin, ononin, formononetin, ferulic acid and senkyunolide I. **Methods** The medicinal solutions of Huangqi (Astragali Radix), Danggui (Angelicae Sinensis Radix) and Huangqi (Astragali Radix)-Danggui (Angelicae Sinensis Radix) in different ratios (5:1, 1:1, 1:5) were prepared by water extraction method, and the linear relationship, precision, repeatability and recovery rate of the 6 main components were tested by high performance liquid chromatography. **Results** The linear relationship of the 6 control samples was good, and the precision of the instrument, the repeatability of the sample and the recovery rate all met the standards. When the Huangqi (Astragali Radix)-Danggui (Angelicae Sinensis Radix) 5:1 compatibility, the dissolution of the 6 components was lower than the 90%; when the compatibility was 1:1 and 1:5, the dissolution of the 6 components was mostly higher than or close to 100%. **Conclusion** Huangqi (Astragali Radix)-Danggui (Angelicae Sinensis Radix) can promote the dissolution of most ingredients in the medicine when the compatibility is 1:1 and 1:5, and the dissolution effect is the best when the compatibility is 1:1, indicating that Danggui (Angelicae Sinensis Radix) can promote the dissolution of active ingredients in the 1:1 compatibility.

[Keywords] high performance liquid chromatography; Huangqi (Astragali Radix); Danggui (Angelicae Sinensis Radix); flavonoids; ferulic acid; senkyunolide I; assay

药对是中医学精粹之一,是中医临床遣药组方常用的配伍形式,许多药对已成为经典名方。黄芪-当归配伍是常用的补气生血类药对,通常用于治疗

血液系统、心脑血管系统及其肿瘤等疾病,在临床上应用频繁^[1-4]。在中药复方中,名同实异的当归补血汤有很多,其中,使用最多的源自李东垣所创《内外

[收稿日期] 2021-01-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81874406)。

[作者简介] 毛文点,女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学研究。

[通讯作者] * 邓常清,男,教授,博士研究生导师,E-mail:dchangq@sohu.com;邹 龙,男,博士,教授,E-mail:1042231287@qq.com。

伤辨惑论》,该方由黄芪5倍于当归配伍组成^[5]。

已有研究表明,黄芪中的主要活性成分为黄酮、皂苷以及多糖^[6]。当归中的主要成分为当归多糖、有机酸和挥发油等^[7],在两者配伍中,黄芪中的黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素和当归中的阿魏酸均有较高含量^[8]。黄芪当归不同配比,主要成分含量会发生不同改变。研究发现,毛蕊异黄酮为典型的植物雌激素,产生雌激素样作用,还有抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等作用^[9];毛蕊异黄酮苷具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等作用^[10];芒柄花素具有抗氧化、抗病毒等作用^[11];阿魏酸是当归中的主要成分之一,具有抗氧化、抗血栓、降血脂等作用^[12];洋川芎内酯I具有抗氧化损伤、抗炎镇痛以及抗凝及抗血小板聚集等作用^[13]。中药中的有效成分众多,不同成分之间的药理作用有一定差异,两药合用会对药理作用及各成分的含量等方面产生一定影响。本文通过研究黄芪-当归不同比例配伍下6种主要药效成分的含量变化,以探求其配伍规律,为接下来研究各成分在动物体内外的吸收情况提供研究基础,同时也为临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);AR224CN 电子分析天平(奥豪斯仪器有限公司);SHB-III 循环水式多用真空泵(巩义市中天仪

器科技有限公司);H3-20KR 台式高速冷冻离心沉淀机(湖南可成仪器设备有限公司);Eppendorf 微量移液器(德国艾本德股份公司);超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 实验用药

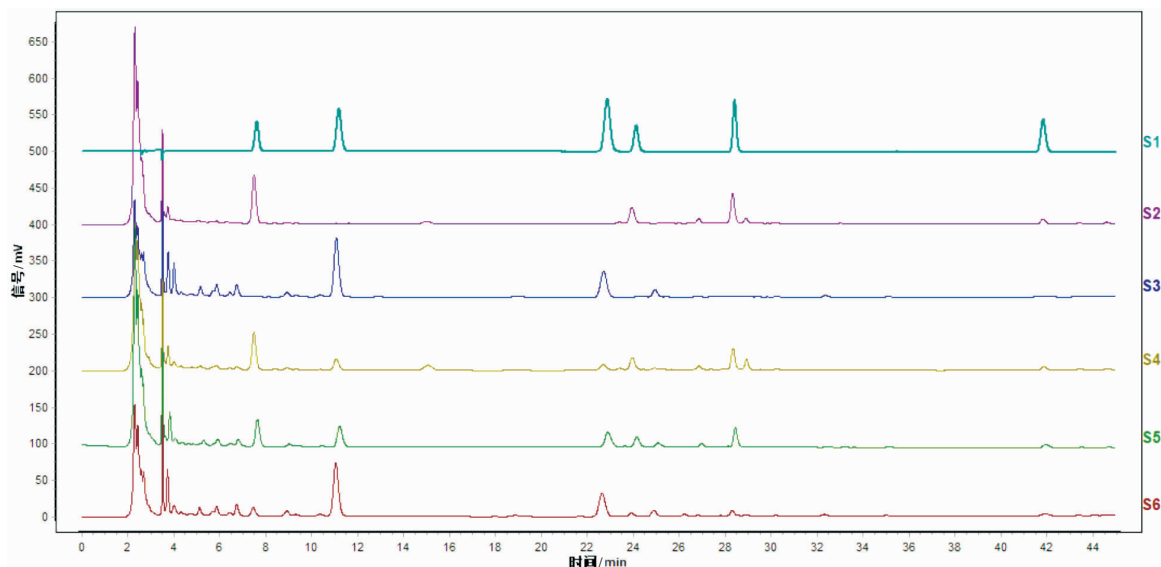
黄芪、当归均由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供并鉴定,当归样品为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根。毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、阿魏酸及洋川芎内酯 I 均购自上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 R31A10F96530、Y11J10H92789、P03A10F84910、F27J7S18516、H27J7L16718、P16A10F85918,纯度均 $\geq 98\%$ 。乙腈、甲醇均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

1.3 色谱条件

Welchrom HPLC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),流动相 0.1%磷酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~16 min 20% B,16~25 min 20%~32% B,25~34 min 32%~34% B,34~45 min 34%~48% B,45~65 min 48%~65% B),柱温 35 $^{\circ}$ C,流速 1 mL/min,进样量 10 μ L,检测波长 280 nm。

1.4 对照品溶液的制备

应用电子分析天平精密称取适量对照品毛蕊异黄酮苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素,分别置于 10 mL 的容量瓶中,加甲醇



注:1.毛蕊异黄酮苷;2.阿魏酸;3.洋川芎内酯I;4.芒柄花苷;5.毛蕊异黄酮;6.芒柄花素。S1.混合对照品;S2.单用黄芪组;S3.单用当归组;S4.黄芪:当归=5:1组;S5.黄芪:当归=1:1组;S6.黄芪:当归=1:5组

图1 混合对照品和黄芪-当归不同配伍组 HPLC 图

定容至刻度,配制成浓度分别为 600、620、520、540、580、630 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备溶液。

1.5 黄芪当归不同配伍水提液的制备

设立以下 5 个组,单用当归组、单用黄芪组、黄芪-当归 5:1、1:1、1:5 组。按照以上比例分别称取适量药材饮片,以水热回流法提取 3 次,第 1 次 8 倍量的水提取 1 h,第 2、3 次 6 倍量的水提取 1 h,合并 3 次提取液,真空减压浓缩至生药量 1.0 g/mL 备用^[14]。

1.6 供试品溶液的制备

精密量取各不同比例配伍的药液 1 mL,置于 10 mL 离心管中,加甲醇 8 mL,混合,3 000 r/min 离心 12 min,离心半径为 9 cm,吸取上清液,甲醇溶液定容至 10 mL,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2 结果

2.1 方法学考察

2.1.1 线性关系考察 精密吸取对照品储备溶液,分别加甲醇定容至 5 mL 的容量瓶中,得到毛蕊异黄酮苷的浓度为 1.875、3.75、7.5、15、30、60、120 $\mu\text{g/mL}$,阿魏酸的浓度为 3.875、7.75、15.5、31、62、124 $\mu\text{g/mL}$,洋川芎内酯 I 的浓度为 1.625、3.25、6.5、13、26、52 $\mu\text{g/mL}$,芒柄花苷的浓度为 3.125、6.25、13.5、21.6、27.5、54 $\mu\text{g/mL}$,毛蕊异黄酮的浓度为 1.719、3.438、6.875、13.75、27.5、55 $\mu\text{g/mL}$,芒柄花素的浓度为 1.575、3.15、6.3、12.6、25.2、50.4 $\mu\text{g/mL}$ 。按照“1.3”项下的色谱条件进行测定,并记录其峰面积,以各成分的质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归分析,绘制标准曲线,求得 6 种成分的回归方程、相关系数 R 以及线性范围。见表 1。

表 1 6 种成分的回归方程、相关系数 R 以及线性范围

指标成分	回归方程	相关系数 R	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
毛蕊异黄酮苷	$Y=16.22X+10.052$	0.999 9	1.875~120
阿魏酸	$Y=26.091X+31.182$	0.999 8	3.875~124
洋川芎内酯 I	$Y=50.034X+27.539$	0.999 9	1.625~52
芒柄花苷	$Y=17.128X+15.251$	0.999 7	3.125~54
毛蕊异黄酮	$Y=45.059X+43.524$	0.999 8	1.719~55
芒柄花素	$Y=24.392X+13.149$	0.999 8	1.575~50.4

2.1.2 精密度实验 取黄芪-当归 1:1 组的供试品溶液,连续进样 6 次,每次进样 10 μL ,测得毛蕊异黄酮苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I、芒柄花苷、毛蕊异黄

酮、芒柄花素峰面积的相对标准偏差 RSD 值分别为 0.20%、0.14%、0.07%、0.19%、0.15%、1.08%,表明仪器精密度好。

2.1.3 稳定性实验 取黄芪-当归 1:1 配伍组的供试品溶液,在配制后的 0、2、4、6、8、12 h 进样分析,每次进样 10 μL ,测得毛蕊异黄酮苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素峰面积的相对标准偏差 RSD 值分别为 0.57%、3.43%、0.12%、0.31%、0.43%、1.34%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.4 重复性实验 精密量取黄芪-当归 1:1 配伍组的原药液 6 份,每份 1 mL,配制供试品溶液,各进样 10 μL ,测得毛蕊异黄酮苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素峰面积的相对标准偏差 RSD 值分别为 1.76%、2.47%、1.56%、1.54%、1.46%、1.16%,表明该方法重复性良好。

2.1.5 加样回收率实验 精密量取已知 6 种化合物含量的黄芪-当归 1:1 配伍组的原药液 6 份,每份 1 mL,制备供试品溶液,每份中精密加入毛蕊异黄酮苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素峰标准品 19.9、7.6、3.7、6.0、1.75、1.7 μg 。色谱条件下进样分析,计算各对照品的加样回收率。见表 2。

2.2 供试品含量测定

精密量取各配伍组药液 1 mL,制备成供试品溶液,各配伍组均平行配制 3 份,在“1.3 项”色谱条件下进样分析,测定不同配伍剂量药液中 6 种主要成分的实际含量及溶出率。溶出率(%)=不同配比提取液的实测含量/该配比下的理论含量 $\times 100\%$,理论含量指单味药材在此配伍下应测得的含量值。结果显示,黄芪-当归为传统 5:1 配伍时,6 种成分的溶出率均低于 90%;1:5 配伍时,芒柄花素的溶出显著增加,毛蕊异黄酮则明显降低,其余成分与理论值接近;1:1 配伍时,除阿魏酸溶出率明显降低外,其他 5 种成分的溶出率均高于或接近 100%。实验结果表明,在传统黄芪-当归 5:1 配伍下毛蕊异黄酮苷及芒柄花苷的总含量高于 1:1 组,其余各成分含量显著低于或接近 1:1 组分,黄芪-当归以 1:1 和 1:5 配伍时可促进药液中大多数成分的溶出,尤其在 1:1 配伍时,当归对黄芪中有效成分的溶出有显著的促进作用。见表 3。

表2 加样回收率结果

指标成分	回收率/%						平均值/%	RSD/%
	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	第6次		
毛蕊异黄酮苷	100.80	97.78	96.52	100.18	103.00	101.93	100.04	2.47
阿魏酸	100.21	95.34	103.34	97.04	101.26	99.25	99.41	2.91
洋川芎内酯 I	102.54	97.84	96.63	100.17	103.22	101.26	100.28	2.60
芒柄花苷	101.26	98.10	97.25	100.43	103.30	100.58	100.15	2.19
毛蕊异黄酮	100.05	97.82	95.09	98.89	104.96	101.42	99.71	3.36
芒柄花素	102.43	96.82	102.97	102.02	96.29	96.15	99.45	3.36

表3 黄芪-当归不同配伍中6种成分的含量变化及其百分比($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $n=3$)

指标成分	单用黄芪	黄芪-当归 5:1	溶出率/%	黄芪-当归 1:1	溶出率/%	黄芪-当归 1:5	溶出率/%	单用当归
毛蕊异黄酮苷	496.63	366.30	88.51	320.35	129.01	91.10	110.06	-
阿魏酸	-	70.65	81.81	171.05	66.12	435.09	100.87	517.68
洋川芎内酯 I	-	22.14	88.28	73.90	98.23	122.36	97.59	150.46
芒柄花苷	191.00	122.80	77.16	113.94	119.31	28.71	90.20	-
毛蕊异黄酮	95.24	58.84	74.13	59.44	124.82	10.12	63.77	-
芒柄花素	39.24	24.00	73.39	29.24	149.03	16.06	245.56	-

3 讨论

3.1 色谱条件的考察

本试验分别考察了甲醇-0.3%甲酸水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.3%甲酸水、乙腈-0.1%磷酸水对于黄芪与当归中6种成分的洗脱能力,结果表明,当流动相为乙腈-0.1%磷酸水时,在梯度洗脱的条件下,对于目标成分的分离效果均较好。同时,在乙腈-0.1%磷酸水梯度洗脱的条件下,也考察了在20、25、30、35℃不同温度下的影响,结果表明,随着温度的升高,分离度也逐步增加,35℃时分离效果最佳。

3.2 指标成分的选择

以当归补血汤中的药物“黄芪”“当归”为关键词,通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库查询当归补血汤中的成分,分析得当归补血汤中共有27个活性成分,其中23个属于黄芪,4个属于当归^[15],此药对中黄芪活性成分远多于当归,且刘傲雪^[16]研究当归补血汤在体代谢过程中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、芒柄花苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I 为7种原型成分。本实验通过指纹图谱发现除黄芪甲苷外的其余6种成分响应值较高,因此,选择这几种作为指标成分来检测不同配比的溶出效果,为后续的大鼠吸收实验奠定基础。

3.3 不同配伍比例的设立

本课题组前期研究表明,黄芪和当归配伍在减

轻血管局部炎症反应中,单用当归及黄芪-当归 1:1 配伍时作用较强^[17],在促进造血的功效中,黄芪与当归以 1:1、1:2.5、1:5 比例配伍时的促造血作用较佳^[18]。本实验以黄芪-当归 1:1 配伍为基础,设立不同的配伍比例,以比较主要成分的溶出效果,与后期药理实验相结合,可望找出有效配伍比例。

3.4 配伍前后主要化学成分变化及其意义

当归补血汤中黄芪与当归的配伍比例不同时,主要成分含量及药理作用均会发生较大变化^[19],顾志荣等^[20]研究中黄芪-当归传统 5:1 配伍时,毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、阿魏酸、Z-藁本内酯 5 种指标性成分含量降低显著。唐蓉等^[21]对黄芪-当归配伍比例 10:1、5:1、1:1、1:5 中的主要化学成分进行测定,结果显示,黄芪-当归按 10:1 和 5:1 配伍时,其主要化学成分的含量与理论值相近或较低。而黄芪-当归 1:1 和 1:5 配伍时,可促进药物中部分成分的溶出。本研究对唐蓉研究进行优化,删减溶出率较低的 10:1 配伍组,同时新增含量较高且具有增强免疫功能、抗缺血性损伤等作用的芒柄花苷及具有抗炎镇痛、抗凝和抗血小板聚集等作用的洋川芎内酯 I 作为考察对象,为本课题组后期研究黄芪-当归配伍改善病理性血管重构提供理论依据。结论得出,黄芪-当归 5:1 配伍时,6 种成分的实际含量均低于理论含量,而 1:1 和 1:5 配伍时,主要成分含量溶出增加,且 1:1 溶出效果最好。动物实验

发现,黄芪当归以5:1 配伍时促血管新生疗效最好^[22]。黄小平等^[18]用当归黄芪单体及不同比例配伍对抑制骨髓造血功能模型小鼠的研究发现,各配比均可不同程度地提高骨髓造血功能,其中当归黄芪按 1:1、1:2.5、1:5 配比时效果最好。当归补血汤中黄芪-当归不同配比其作用效果并不固定,应根据不同需要灵活应用。综上所述,本研究通过对黄芪-当归在不同配伍时其主要成分的溶出率的考察,可为后期研究黄芪当归配伍改善病理性血管重构的药效物质提供实验依据。

参考文献

- [1] 龚廷栋,黄水清.当归补血汤有效组分抗动脉粥样硬化配伍比例的基础研究[J].中药新药与临床药理,2017,28(4):468-472.
- [2] 徐厚谦,颜春鲁,张永花,等.当归补血汤通过 PI3K/Akt 通路对 Ang II 诱导肥大心肌细胞的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(2):135-139.
- [3] ZHOU J W, LI X, DENG P Y, et al. Chinese herbal formula, modified Danggui buxue tang, attenuates apoptosis of hematopoietic stem cells in immune-mediated aplastic Anemia mouse model[J]. Journal of Immunology Research, 2017, 2017: 9786972.
- [4] GONG A G, ZHANG L M, LAM C T, et al. Polysaccharide of Danggui buxue tang, an ancient Chinese herbal decoction, induces expression of pro-inflammatory cytokines possibly via activation of NFκB signaling in cultured RAW 264.7 cells [J]. Phytotherapy Research: PTR, 2017, 31(2): 274-283.
- [5] 张孟之,管连城,陈雨佳,等.当归补血汤的研究进展[J].湖南中医杂志,2018,34(8):241-243.
- [6] 高克立,王永昌,夏小军,等.甘肃永登产黄芪与陇西产黄芪主要成分对比分析[J].甘肃医药,2020,39(1):68-71.
- [7] 邓雪琪,管小军,黄娜娜,等.HPLC 法同时测定当归中 8 种成分[J].中成药,2020,42(8):2075-2079.
- [8] SHI X Q, TANG Y P, ZHU H X, et al. Pharmacokinetic comparison of seven major bio-active components in normal and blood deficiency rats after oral administration of Danggui Buxue decoction by UPLC-TQ/MS[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 153(1): 169-177.
- [9] 张冬青,王海宝,王淑芳,等.毛蕊异黄酮生物活性的研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(22):4339-4345.
- [10] 李亮亮,黄金智.毛蕊异黄酮葡萄糖苷药理作用的研究进展[J].海南医学院学报,2020,26(2):156-160.
- [11] 王茹月,叶雨.芒柄花黄素应用于抗癌药物开发的研究进展[J].肿瘤防治研究,2019,46(2):183-187.
- [12] 张欣,高增平.阿魏酸的研究进展[J].中国现代中药,2020,22(1):138-147.
- [13] 张丽娟,刘继勇,姚翀,等.洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展[J].中国药理学杂志,2015,50(13):1081-1084.
- [14] 阎卉芳.黄芪当归配伍对大鼠血管内膜增生 VSMC 增殖的影响及 PI3K/Akt 信号途径机制的研究[D].长沙:湖南中医药大学,2019.
- [15] 刘鑫,赵颖,王永洁,等.基于网络药理学的当归补血汤辅助治疗肺癌的作用机制研究[J].天津中医药,2019,36(10):1012-1020.
- [16] 刘傲雪.基于序贯代谢的当归补血汤质控成分遴选研究[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [17] 彭熙炜,阎卉芳,黄娟,等.黄芪-当归配伍对大鼠血管内膜增生模型炎性反应的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(2):580-584.
- [18] 黄小平,李菲,陈凌波,等.黄芪和当归配伍对环磷酸腺苷所致骨髓造血功能抑制小鼠造血功能的影响[J].中草药,2017,48(1):121-128.
- [19] 魏春华.当归补血汤中当归与黄芪不同比例搭配对其化学成分的影响[J].四川中医,2015,33(6):51-53.
- [20] 顾志荣,马天翔,祁梅,等.黄芪-当归药对配伍前后 HPLC 指纹图谱及主要化学成分变化[J].中国现代应用药学,2020,37(3):275-281.
- [21] 唐蓉,张依人,陈叶童,等.不同剂量配伍对黄芪-当归中 5 种化学成分的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(23):1-5.
- [22] 谢瑞芳,林评兰,王瑛,等.不同配伍比例当归补血汤化学成分及促血管新生作用比较[J].中国中医药信息杂志,2016,23(6):83-87.

(本文编辑 匡静之 周旦)