

· 化学与分析 ·

真武汤水提液 HPLC 特征图谱研究及指标成分的测定

吴俊标, 贺雨, 梁春玲, 欧阳辉, 林劲, 欧浩荣, 容燕婷, 叶淑芳, 周玖瑶*

(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立真武汤水提液 HPLC 特征图谱及同时测定方中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、白术内酯Ⅲ、芍药苷、6-姜辣素 5 种主要指标成分的方法。方法: 采用高效液相色谱法, Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.2% 磷酸水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱, 检测波长 230 nm, 柱温 30 °C, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL。结果: 建立的特征图谱包含 36 个共有峰, 各峰峰形、分离度好, 明确并定量真武汤水提液中 5 种指标成分, 芍药苷 (1.410 ± 0.024) g·L⁻¹, 苯甲酰新乌头原碱 (0.066 ± 0.001) g·L⁻¹, 苯甲酰乌头原碱 (0.015 ± 0.001) g·L⁻¹, 白术内酯Ⅲ (0.028 ± 0.003) g·L⁻¹, 6-姜辣素 (0.069 ± 0.001) g·L⁻¹。经方法学验证该方法具有良好线性关系芍药苷 $Y = 25.907X + 9.741$ ($r = 0.9997$)、苯甲酰新乌头原碱 $Y = 15.265X - 3.202$ ($r = 0.9995$)、苯甲酰乌头原碱 $Y = 15.660X - 4.699$ ($r = 0.9991$)、白术内酯Ⅲ $Y = 63.730X - 10.740$ ($r = 0.9996$)、6-姜辣素 $Y = 21.645X - 4.074$ ($r = 0.9995$), 精密度 (峰面积 RSD 分别为 1.72%, 1.76%, 2.78%, 1.20%, 1.05%), 保留时间 RSD 分别为 0.81%, 0.47%, 0.43%, 0.07%, 0.05%), 重复性 (峰面积 RSD 分别为 1.95%, 2.56%, 2.93%, 2.65%, 3.01%), 保留时间 RSD 分别为 0.03%, 0.19%, 0.28%, 0.11%, 0.12%), 稳定性 (峰面积 RSD 分别为 1.05%, 1.36%, 2.89%, 2.81%, 2.64%), 保留时间 RSD 分别为 0.15%, 0.12%, 0.39%, 0.04%, 0.08%) 和加样回收率 (99.85%, 101.67%, 101.91%, 99.82%, 101.44%)。结论: 建立的真武汤水提液特征图谱可同时对真武汤 5 种主要指标成分进行分析, 可全面评价真武汤水提汤剂的质量。

[关键词] 真武汤; 特征图谱; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 白术内酯Ⅲ; 芍药苷; 6-姜辣素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0045-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180045

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140722.1446.004.html>

[网络出版时间] 2014-07-22 14:46

HPLC Characteristics of Aqueous Extract of Zhenwu Decoction and Determination of Markers

WU Jun-biao, HE Yu, LIANG Chun-ling, OUYANG Hui, LIN Jin, OU Hao-rong,
RONG Yan-ting, YE Shu-fang, ZHOU Jiu-yao*

(Dept. of Pharmacology, College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University
of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** This study was aimed to establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for HPLC characteristics of aqueous extract of Zhenwu decoction (ZWT) and simultaneous determination of makers-characteristic chromatography, benzoylmesaconine, benzoylaconine, atractylenolide III, paeoniflorin and 6-gingerol. **Method:** The separation was carried out on a Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column eluted with mobile phases of acetonitrile (A) and water containing 0.2% phosphoric acid

[收稿日期] 20131204(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072978); 广东省自然科学基金委重点项目(S2011020005170); 教育部博士点基金项目(201114425110011); 广东省高等学校高层次人才项目(A1-AFD004132A13)

[第一作者] 吴俊标, 博士, 从事中药复方肾脏药理与药效基础研究, Tel:15013099159, E-mail: janbry@outlook.com

[通讯作者] *周玖瑶, 博士生导师, 教授, 从事中药复方肾脏药理与药效基础研究, Tel:020-39358084, E-mail: zhoujiuyao@tom.com

(B) in gradient mode at the flow rate of $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The column temperature was maintained at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and the detection wavelength was set at 230 nm . **Result:** The obtained HPLC characteristics containing 36 common peaks, which were in well shape and high resolution. Five constituents of ZWT were analyzed and quantified paeoniflorin (1.410 ± 0.024) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, benzoylmesaconine (0.066 ± 0.001) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, benzoylaconine (0.015 ± 0.001) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, atractylenolide III (0.028 ± 0.003) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 6-gingerol (0.069 ± 0.001) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, with the linear range as follows $Y = 25.907X + 9.741$ ($r = 0.9997$), $Y = 15.265X - 3.202$ ($r = 0.9995$), $Y = 15.660X - 4.699$ ($r = 0.9991$), $Y = 63.73X - 10.740$ ($r = 0.9996$), $Y = 21.645X - 4.074$ ($r = 0.9995$), respectively. The precision (1.72%, 1.76%, 2.78%, 1.20%, 1.05% for RSD of peak area, 0.81%, 0.47%, 0.43%, 0.07%, 0.05% for RSD of retention time), repeatability (1.95%, 2.56%, 2.93%, 2.65%, 3.01% for RSD of peak area; 0.03%, 0.19%, 0.28%, 0.11%, 0.12% for RSD of retention time), stability (1.05%, 1.36%, 2.89%, 2.81%, 2.64% for RSD of peak area; 0.15%, 0.12%, 0.39%, 0.04%, 0.08% for RSD of retention time), and average recovery (99.85%, 101.67%, 101.91%, 99.82%, 101.44%, respectively) of this method were all satisfied. **Conclusion:** The method established in this study could be used in simultaneous determination of the five makers of zhenwu decoction and could be used to control the quality of ZWT aqueous extract.

[**Key words**] Zhenwu decoction; characteristic chromatography; benzoylmesaconine; benzoylaconine; atractylenolide III; paeoniflorin; 6-gingerol

真武汤是张仲景《伤寒论》中温阳利水经方,全方由制附子、白术、茯苓、生姜、芍药(3:2:3:3:3)组成,扶阳抑阴、化气行水,是针对脾肾阳虚、气不化水、水气内停而设。方中附子大辛大热,温肾助阳以化气行水,暖脾益阴以温运水湿,为君药。茯苓、白术补气健脾,利水渗湿,合附子可温脾阳而助脾运,同为臣药。佐以生姜辛温,配附子温阳散寒,伍苓、术辛散水气,并可和胃而止呕。白芍为佐,可柔肝缓急以止腹痛、敛阴舒筋肉瞤动、利小便以行水气、可兼制附子燥热伤阴之弊^[3]。全方泻中有补,标本兼顾,后世医家推崇为温阳利水代表方,对其进行了较为系统的研究,广泛用于临床各科疾病,如慢性肾病、充血性心力衰竭、肝硬化腹水等,取得满意疗效^[4-6]。

真武汤复方成分复杂,目前对真武汤的物质基础和配伍反应鲜有报道,仅罗国安等^[7]建立了真武汤的指纹图谱,但其未对指标成分进行标定及明确各峰的药材归属。本实验建立真武汤 HPLC 特征图谱,同时对方中指标成分进行含量测定,明确各色谱峰的药材归属,通过主要指标成分的测定尽可能反映其整体的化学成分,为中药复方药效物质研究以及质量控制提供参考。

1 材料

Summit P680 型高效液相色谱仪(包括 summit P680A 低压四元泵, UVD170U Dionex softron GmbH 检测器, ASI-100 自动进样器, summit 柱温箱, 变色龙色谱工作站, 美国戴安), BP211D 型 1/10 万电子

天平(Sartorius), XS225A 型 1/1 万电子天平(Precisa)。

甲醇、乙腈、磷酸(均为色谱纯), 怡宝纯净水。

芍药苷(批号 110738-201337)、6-姜辣素(批号 111833-201102)购自中国食品药品检定研究院。苯甲酰乌头原碱(批号 B-010-130416)、苯甲酰次乌头原碱(批号 B-016-130416)、苯甲酰新乌头原碱(批号 B-009-13016)、白术内酯 III(批号 B-035-130-25)对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。真武汤药材:制附子(批号 131001)、茯苓(批号 2309180)、白芍(批号 130601)、白术(批号 1309160), 购自广州致信药材公司, 生姜另购; 药材均经广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室童家赟讲师鉴定:制附子为毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 子根的加工炮制品、茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核处理切制的茯苓块、白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液制备 精密称定对照品芍药苷 2.93 mg、6-姜辣素 0.80 mg、苯甲酰乌头原碱 1.12 mg、苯甲酰次乌头原碱 1.24 mg、苯甲酰新乌头原碱 1.11 mg、白术内酯 III 1.08 mg 置 2 mL 量瓶, 加甲醇定容至刻度, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取真武汤方中各味药材制附子 9 g,白芍 9 g,茯苓 9 g,生姜 9 g,白术 6 g,剪成小块,加 10 倍水浸泡 20 min,加热回流煎煮 1.5 h,纱布过滤药液,药渣加 8 倍水继续回流煎煮 1 h 后纱布过滤,合并 2 次滤液进行减压浓缩,最后定容到 50 mL,即得供试品溶液。

2.1.3 阴性供试品溶液制备 取除制附子、白芍、茯苓、生姜和白术外的各味药材,按供试品溶液制备方法,制得阴性样品溶液。

2.2 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 0.2% 磷酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~5 min,95% A;5~10 min,95%~93% A;10~25 min,93%~90% A;20~35 min,90%~88% A;35~38 min,88%~87% A;38~45 min,87%~86% A;45~60 min,86%~82% A;60~100 min,82%~50% A),柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,检测波长 230 nm。在此色谱条件下,对照品及样品各峰分离度较好。

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线的绘制 精密吸取 2.1.1 项下混合对照品溶液 3,5,10,15,20 μL,在 2.2 项色谱条件下进样测定。以各自峰面积为纵坐标,进样量(μg)为横坐标,得到回归方程。结果表明芍药苷在 4.395~36.625 μg,苯甲酰新乌头原碱在 1.665~13.875 μg,苯甲酰乌头原碱在 1.68~14 μg,白术内酯Ⅲ在 1.62~13.5 μg,6-姜辣素在 1.2~10.0 μg 与峰面积呈良好的线性关系。得回归方程,芍药苷 $Y = 25.907X + 9.7411 (r = 0.9997)$,苯甲酰新乌头原碱 $Y = 15.265X - 3.2022 (r = 0.9995)$,苯甲酰乌头原碱 $Y = 15.66X - 4.6988 (r = 0.9991)$,白术内酯Ⅲ $Y = 63.73X - 10.74 (r = 0.9996)$,6-姜辣素 $Y = 21.645X - 4.0744 (r = 0.9995)$ 。

2.3.2 精密度试验 取同一份真武汤供试品溶液在 2.2 项色谱条件下进样 20 μL 测定,连续进样 6 次。芍药苷、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、白术内酯Ⅲ及 6-姜辣素峰面积 RSD 分别为 1.72%,1.76%,2.78%,1.20%,1.05%,保留时间 RSD 分别为 0.81%,0.47%,0.43%,0.07%,0.05%,说明精密度良好。

2.3.3 重复性试验 按 2.1.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,在 2.2 项色谱条件下分别进样 20 μL 测定。结果芍药苷、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、白术内酯Ⅲ及 6-姜辣素峰面积 RSD 分别为 1.95%,2.56%,2.93%,2.65%,3.01%,保留时

间 RSD 分别为 0.03%,0.19%,0.28%,0.11%,0.12%。表明本法具有较好重复性。

2.3.4 稳定性试验 取同一份真武汤供试品溶液,密闭置于室温条件下放置,分别于 0,2,4,8,16,24 h 测定峰面积。芍药苷、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、白术内酯Ⅲ及 6-姜辣素峰面积的 RSD 分别为 1.05%,1.36%,2.89%,2.81%,2.64%,保留时间 RSD 分别为 0.15%,0.12%,0.39%,0.04%,0.08%。结果表明,供试品溶液中 5 种指标成分在 24 h 内较为稳定。

2.3.5 加样回收试验 按药材比例称取一定量的真武汤共 6 份,分别精密加入另行配制的混合对照品溶液 1 mL(含芍药苷 14.450 mg,苯甲酰新乌头原碱 0.655 mg,苯甲酰乌头原碱 0.150 mg,白术内酯Ⅲ 0.653 mg,6-姜辣素 0.285 mg),按 2.1.2 项下方法制备,最后加蒸馏水定容至 10 mL。测定平均回收率,结果见表 1。

表 1 银黄颗粒中黄酮类成分加样回收率试验

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
芍药苷	14.412	14.450	28.109	99.85	1.4
苯甲酰新乌头原碱	0.658	0.655	1.2978	101.67	2.8
苯甲酰乌头原碱	0.154	0.150	0.326	101.91	3.9
白术内酯Ⅲ	0.681	0.653	1.315	99.82	2.2
6-姜辣素	0.284	0.285	0.563	101.44	3.1

注:称样量均为 8.400 g。

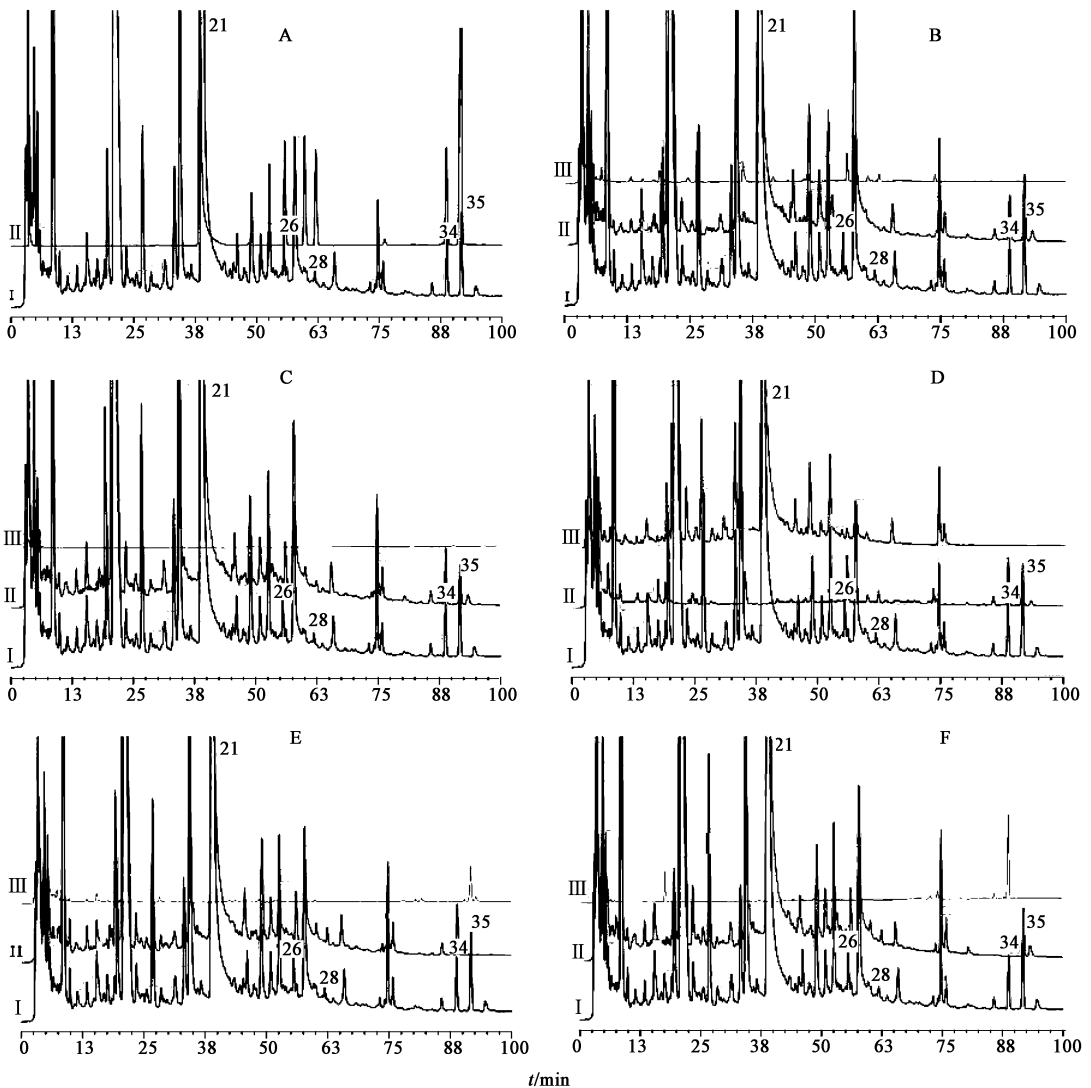
2.4 样品测定 取 3 个批次样品,分别按照供试品溶液的制备方法制备,再按 2.2 项下色谱条件测定真武汤水提液,得芍药苷(1.716±0.024) mg·g⁻¹,苯甲酰新乌头原碱(0.0783±0.001) mg·g⁻¹,苯甲酰乌头原碱(0.0179±0.001) mg·g⁻¹,白术内酯Ⅲ(0.0811±0.001) mg·g⁻¹,6-姜辣素(0.0338±0.00) mg·g⁻¹。

2.5 色谱峰归属 平行制备单味药材水煎液及其相应的阴性对照样品,进样 20 μL 测定。在 230 nm 波长下与对照品及全方的色谱图对比,研究 36 个共有峰的药材归属,见图 1,表 2。

3 讨论

本实验通过梯度洗脱同时测定中药复方真武汤水提取物中 5 种指标成分的含量,方法简便、快捷、重复性好。

本实验中选用了 3 个吸收波长 230,255,280



A. 真武汤全方 I 与混标 II; B. 真武汤全方 I、缺附子对照 II、单味附子 III; C. 真武汤全方 I、缺茯苓阴性对照 II、单味茯苓 III; D. 真武汤全方 I、缺白芍阴性对照 II、单味白芍 III; E. 真武汤全方 I、缺白术阴性对照 II、单味白术 III; F. 真武汤全方 I、缺生姜阴性对照 II、单味生姜 III

图 1 真武汤、混标、单味药及阴性对照的 HPLC

nm,各个波长吸收情况不一致,通过比较可以看出在 230 nm 下出峰最多,峰形较好,分离度符合要求,所以特征图谱研究以 230 nm 作为检测波长。

由于水提液成分复杂,较少作为控制药材质量方法,但汤剂作为传统剂型仍是主要中药复方服用方式,故对传统水提煎煮方法的质控显得尤为必要。本研究发现真武汤水提液的 HPLC 特征图谱大部分峰归属来自于白芍,扣除前面 5 个不明归属的峰,白芍色谱峰的贡献率达 66.7%,白术占 12.9%、附子占 9.7%、生姜占 9.7%、茯苓占 0%。茯苓经水煎煮提取后扣除前面可能的多糖峰外,其他保留时间在波长为 230 nm 处无吸收,故未检测出吸收峰。腺苷可来自茯苓与白术,但由于腺苷保留时间太短,易

跟溶剂峰重叠,故本研究不对其含量进行分析。从图谱中还可看到真武汤水提液中苯甲酰次乌头原碱无法明显检出,但在 27,28 号峰之间有两个小峰分离度不高,其中有一个峰可能就是苯甲酰次乌头原碱,但由于含量太低且与另一个来自白芍的峰不能分离,无法准确测定其含量,苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱均能从真武汤水提液中检出。此外,在做真武汤全方与单味药的图谱时发现很多相同物质峰面积会发生改变,Xu, F. 等人也证实各药材成分之间会发生增强或抑制生物活性成分的提取率的现象^[8],即中药配伍后,发挥药效作用的物质基础的量会发生变化,且这种变化与药效具有一定的相关性^[9]。另外,随着色谱技术的发展,质谱技术已

表 2 真武汤水提液共有峰的归属

No.	成分	归属	No.	成分	归属
1	-	-	19	-	白芍
2	-	-	20	-	附子
3	-	-	21	芍药苷	白芍
4	-	-	22	-	白芍
5	-	白芍	23	-	白芍
6	-	-	24	-	白芍
7	-	白芍	25	-	白芍
8	-	白芍	26	苯甲酰新乌头原碱	附子
9	-	白芍	27	-	白芍
10	-	白芍、生姜	28	苯甲酰乌头原碱	附子
11	-	白朮	29	-	白芍
12	-	白芍	30	-	白朮
13	-	白芍	31	-	白芍
14	-	白芍	32	-	白芍
15	-	白芍	33	-	生姜
16	-	白芍	34	6-姜辣素	生姜
17	-	白芍	35	白朮内酯Ⅲ	白朮
18	-	白芍	36	-	白朮

被大量用于复方药效物质基础的解析研究^[10-11]。因此,真武汤配伍后化学成分的变化规律和复方入血成分的鉴定,将会是作者下一步研究着重点。

综上,本研究建立的方法可同时对真武汤水提液 5 种指标成分进行测定,并能够更全面的控制该药的质量,为其在临床广泛应用提供了质量保证,为中药复方药效物质基础研究提供一定参考。

[参考文献]

[1] 李冀. 方剂学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006:358.

[2] Lin J, Nie H, Chou A, et al. Effects of Qi-Dan Fang on renal function and serum lipid in nephrotic syndrome rats induced by adriamycin [J]. J Pharm Biomed Sci, 2012, 24(24):26.

[3] 萧翠玉. 真武汤的临床运用和药理研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2007.

[4] 丑安, 周玖瑶, 周园, 等. 真武汤对 C-BSA 渗透泵肾小球肾炎大鼠的治疗作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6):626.

[5] 罗国安, 付婵, 李莎莎, 等. 真武汤的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(5):892.

[6] XU F, LIU Y, SONG R, et al. HPLC/DAD comparison of sixteen bioactive components between Da-Cheng-Qi decoction and its parent herbal medicines [J]. Nat Prod Commun, 2010, 5(6):893.

[7] 沈岚, 胡蓉婉, 林晓, 等. 不同煎煮方式对芍药甘草复方大鼠血中移行组分的药动学影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(1):52.

[8] SU S L, CUI W X, ZHOU W, et al. Chemical fingerprinting and quantitative constituent analysis of Siwu decoction categorized formulae by UPLC-QTOF/MS/MS and HPLC-DAD [J]. Chin Medicine, 2013, 8:5

[9] HU Y F, LU T L, MAO C Q, et al. Simultaneous determination of 10 components in traditional Chinese medicine Dachaihu granule by reversed-phase-high-performance liquid chromatographic-diode array detector [J]. Pharmacognosy Mag, 2013, 9(33):33.

[责任编辑 顾雪竹]