

柴胡龙骨牡蛎汤高效液相色谱指纹图谱的建立

马晓青^{1,2}, 张鹏², 魏宝红^{1,2}, 马大龙², 刘红兵², 高鹏³, 代龙^{3*}

(1. 中国海洋大学, 国家海洋药物工程技术研究中心, 山东 青岛 266101;

2. 青岛海洋生物医药研究院股份有限公司, 山东 青岛 266071;

3. 山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] **目的:**建立柴胡龙骨牡蛎汤水煎液和正丁醇萃取液的反相高效液相色谱指纹图谱的检测方法。**方法:**采用高效液相色谱法, Thermo Fisher Hypersil GOLD C₁₈色谱柱, 流动相乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 柱温35℃, 流速1 mL·min⁻¹, 检测波长276, 210 nm。**结果:**分别建立了柴胡龙骨牡蛎汤水煎液和正丁醇萃取液指纹图谱共有模式, 并指认其中的共有色谱峰。通过与对照品的保留时间和紫外光谱图比较, 水煎液指纹图谱中8, 12, 14, 15号峰分别归属为黄芩苷、肉桂酸、桂皮醛、大黄酸。正丁醇萃取液指纹图谱中16, 17, 28, 29号峰分别归属为人参皂苷R_{g1}, 人参皂苷Re, 柴胡皂苷a, 柴胡皂苷b₂。10批柴胡龙骨牡蛎汤水煎液和正丁醇萃取液的HPLC指纹图谱相似度, 均>0.88。**结论:**该方法灵敏度高、稳定性和准确性良好, 为柴胡龙骨牡蛎汤质量标准建立提供了可靠的科学依据。

[关键词] 柴胡龙骨牡蛎汤; 正丁醇萃取物; 指纹图谱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0066-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130066

Establishment of HPLC Fingerprint of Chaihu Longgu Muli Tang MA Xiao-qing^{1,2}, ZHANG Peng², WEI Bao-hong^{1,2}, MA Da-long², LIU Hong-bing², GAO Peng³, DAI Long^{3*} (1. National Engineering Research Center for Marine Drugs, Ocean University of China, Qingdao 266101, China; 2. Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266071, China; 3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the chromatographic fingerprint for Chaihu Longgu Muli Tang and *n*-butanol extraction by RP-HPLC-DAD. **Method:** HPLC method was applied to establish the chromatographic fingerprint. The separation was performed on a Thermo Fisher Hypersil GOLD C₁₈ column with a gradient elution composed of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid. The column temperature was 35℃ and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detective wavelength was 276, 210 nm. **Result:** The common pattern of chromatographic fingerprint of Chaihu Longgu Muli Tang and *n*-butanol extraction was established, and 4 peaks of them were identified respectively. In decoction, the 8th, 12th, 14th and 15th peaks were assigned to baicalin, cinnamic acid, cinnamaldehyde and rhein respectively by comparison with the retention times and UV spectra of reference substances. The 16th, 17th, 28th and 29th peaks were assigned to ginsenoside R_{g1}, ginsenoside Re, saikosaponin a and saikosaponin b₂ respectively of *n*-butanol extraction. The similarity of 10 batches of Chaihu Longgu Muli Tang and *n*-butanol extraction were all more than 0.88. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint of Chaihu Longgu Muli Tang has desirable precision, reproducibility, and can provide a basis for quality evaluation of Chaihu Longgu Muli Tang.

[Key words] Chaihu Longgu Muli Tang; *n*-butanol extraction; fingerprint; HPLC

柴胡龙骨牡蛎汤出自张仲景《伤寒论》,由柴胡、龙骨、牡蛎、黄芩、生姜、人参、桂枝、茯苓、半夏、

大枣、大黄组成,具有和解清热、镇惊安神的功效,主伤寒往来寒热,胸胁苦满,烦躁惊狂不安,时有谵语,

[收稿日期] 20150106(009)

[第一作者] 马晓青, 硕士, 工程师, 从事中药分析及质量控制研究, Tel: 15092121461, E-mail: qinger725210@163.com

[通讯作者] *代龙, 硕士, 教授, 从事中药新药开发及新剂型研究, Tel: 13156189167, E-mail: druglab@sina.com

身重难以转侧。现代临床多用于抑郁症、失眠、癫痫、神经异常、头晕目眩、神经性心悸以及神经痛、高血压病、甲状腺功能异常、妇女更年期综合征等神经类疾病^[1-5]。目前关于方中各单味药的质量标准相关研究已有不少文献报道^[6-7],但尚无柴胡龙骨牡蛎汤全方汤剂的指纹图谱相关研究,2010年版《中国药典》也无柴胡龙骨牡蛎汤的相关规定。现行的通过1~2种化学成分表征中药质量的质控方法无法反映中药复方的物质基础和化学成分群的整体性和复杂性,难以全面控制中药复方内在质量。本实验采用RP-HPLC-DAD法建立柴胡龙骨牡蛎汤水煎液和正丁醇萃取液的指纹图谱,为提高柴胡龙骨牡蛎汤的质控标准和开展进一步的深入研究提供科学依据。

1 材料

1.1 试药 黄芩苷(批号130829),肉桂酸(批号130924),桂皮醛(批号131129),大黄酸(批号131220),人参皂苷Rg₁(批号130721),人参皂苷Re(批号130807),柴胡皂苷a(批号131128),柴胡皂苷b₂(批号130621)对照品均购自成都普菲德生物技术有限公司;乙腈、磷酸均为色谱纯(美国Honeywell),水为超纯水。

1.2 仪器 Ultimate 3000型RSLC高效液相色谱仪(美国Thermo Fisher,包括LPG-3400SDN四元泵洗脱系统,WPS-3000SL ANALYTICAL自动进样系统,TCC-3000RS柱温箱,DAD-3000检测器),ME204E型,MS105DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司),UPH-II-20T型纯水制备系统(成都优普电子有限公司)。

1.3 药材饮片 10批药材分别购自建联大药房、七星大药房、青岛国风大药房、宏仁堂等,经中国海洋大学刘红兵副教授鉴定均为正品,符合2010年版《中国药典》一部规定,样品留样于青岛海洋生物医药研究院股份有限公司现代海洋中药研发室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用Thermo Hypersil GOLD色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相0.1%磷酸水(A)-乙腈(B),流速1 mL·min⁻¹,柱温35℃。

水煎液:梯度洗脱,0~5 min,98%~88% A;5~15 min,88%~76% A;15~35 min,76%~70% A;35~48 min,70%~26% A;48~50 min,26%~0% A;检测波长276 nm。

正丁醇萃取液:梯度洗脱,0~5 min,95%~92% A;5~15 min,92%~85% A;15~20 min,85% A;

20~30 min,85%~82% A;30~45 min,82%~80% A;45~55 min,80%~75% A;55~65 min,75%~68% A;65~85 min,68% A;85~95 min,68%~60% A;95~122 min,60%~40% A;检测波长210 nm。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷、肉桂酸,桂皮醛,大黄酸,人参皂苷Rg₁,人参皂苷Re,柴胡皂苷a,柴胡皂苷b₂对照品适量,置10 mL棕色量瓶中,甲醇溶解并定容至刻度线,配置成每1 mL含黄芩苷27.4 μg,肉桂酸11.1 μg,桂皮醛160 μg,大黄酸16 μg,人参皂苷Rg₁560 μg,人参皂苷Re292 μg,柴胡皂苷a252 μg,柴胡皂苷b₂430 μg的混合对照品溶液,0.45 μm微孔滤膜过滤。

2.3 供试品溶液的制备 水煎液制备:取柴胡(12 g),龙骨(4.5 g),牡蛎(4.5 g),黄芩(4.5 g),生姜(4.5 g),人参(4.5 g),桂枝(4.5 g),茯苓(4.5 g),半夏(6 g),大枣(6枚),大黄(6 g)。加10倍体积水浸泡30 min,龙骨、牡蛎先煎30 min,加入除大黄外的其余药材,共煎煮30 min后,加入大黄继续煎煮10 min,8层纱布过滤,放冷,得滤液。4 000 r·min⁻¹离心10 min,上清液过0.45 μm微孔滤膜,即得。

正丁醇萃取液制备^[8] 取水煎液100 mL,加入水饱和正丁醇溶液100 mL萃取3次,合并萃取液加50%的氨水溶液100 mL洗涤2次,取正丁醇液置旋转蒸发仪蒸干,残渣加甲醇定量转移至5 mL量瓶中,过0.45 μm微孔滤膜,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件,连续进样6次,分别进样5 μL,记录色谱图。结果各对照品相对保留时间、相对峰面积的RSD均<3%,表明本方法精密度良好。

2.4.2 重复性试验 分别取水煎液和正丁醇萃取液同批次样品,按2.3项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定。结果显示各共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD均<3%,表明本方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 分别取水煎液和正丁醇萃取液同一供试品溶液,按2.1项下色谱条件,分别于0,2,4,6,8,10,12,24 h进样,结果各共有峰相对保留时间、相对峰面积的RSD均<3%,表明样品24 h内稳定。

2.5 特征指纹图谱的建立 按2.3项方法制备10批柴胡龙骨牡蛎汤供试品溶液,按2.1项下色谱条件进行测定,记录色谱图,见图1,2。

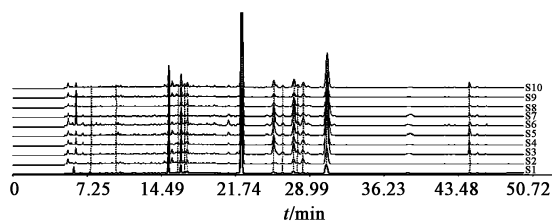


图 1 10 批柴胡龙骨牡蛎汤水煎液 HPLC 指纹谱
Fig. 1 HPLC chromatographic fingerprint of 10 batches of Chaihu Longgu Muli Tang

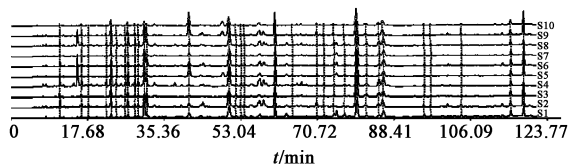
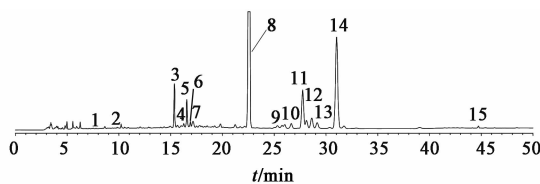


图 2 10 批柴胡龙骨牡蛎汤正丁醇萃取液 HPLC 指纹谱
Fig. 2 HPLC chromatographic fingerprint of 10 batches of Chaihu Longgu Muli Tang *n*-butanol extraction

2.5.1 参比峰的选择 在各批样品溶液的水煎液指纹图谱中,黄芩苷保留时间居中,分离度良好,峰面积较大且为黄芩的主要成分之一,故确定 8 号峰黄芩苷为参比峰。

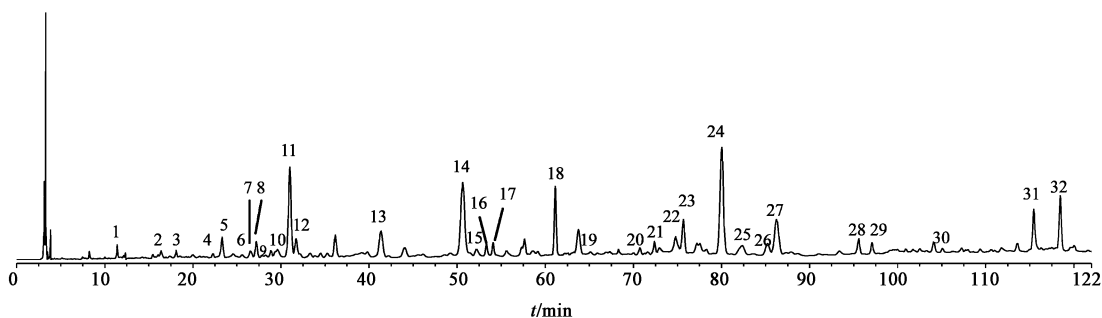
在各批样品溶液的正丁醇萃取液指纹图谱中,柴胡皂苷 a 分离度良好,且为柴胡的主要成分之一,故确定 28 号峰柴胡皂苷 a 为参比峰。

2.5.2 共有峰的标定 经过对供试品溶液液相色谱图的分析,标定 15 个共有峰为柴胡龙骨牡蛎汤水煎液指纹图谱的特征峰,其中 8,12,14,15 号峰与对照品图谱对照分别为黄芩苷、肉桂酸、桂皮醛、大黄酸,见图 3。标定 32 个共有峰为柴胡龙骨牡蛎汤正丁醇萃取液指纹图谱的特征峰,其中 16,17,28,29 号峰与对照品图谱对照分别为人参皂苷 Rg₁,人参皂苷 Re,柴胡皂苷 a,柴胡皂苷 b₂,见图 4。



8. 黄芩苷;12. 肉桂酸;14. 桂皮醛;15. 大黄酸

图 3 典型柴胡龙骨牡蛎汤水煎液 HPLC
Fig. 3 Typical HPLC chromatographic fingerprint of Chaihu Longgu Muli Tang



16. 人参皂苷 Rg₁;17. 人参皂苷 Re;28. 柴胡皂苷 a;29. 柴胡皂苷 b₂

图 4 典型柴胡龙骨牡蛎汤正丁醇萃取液 HPLC
Fig. 4 Typical HPLC chromatographic fingerprint of Chaihu Longgu Muli Tang *n*-butanol extraction

2.5.3 相似度评价 将 10 批柴胡龙骨牡蛎汤色谱图数据导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)。计算相似度,结果 10 批柴胡龙骨牡蛎汤水煎液和正丁醇萃取液的色谱图相似度均 > 0.88,见表 1,2。水煎液色谱图同时确定了 15 个共有峰,根据对照品保留时间与紫外光谱图指认了其中的 4 个共有峰,分别为黄芩苷、肉桂酸、桂皮醛和大黄酸,各图谱共有峰相对保留时间和相对峰面积无显著差异。正丁醇萃取液色谱图确定了 32 个共有峰,根据对照品保留时间与紫外光谱图指认了其中的 4 个共有峰,分别为人参皂苷 Rg₁,人参皂苷 Re,柴胡皂苷 a,柴胡皂苷 b₂,各图

谱共有峰相对保留时间和相对峰面积无显著差异,说明不同批次的柴胡龙骨牡蛎汤之间存在较好的相关性。

3 讨论与小结

分别考察了甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-水、乙腈-0.05% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.15% 磷酸等流动相条件。结果表明乙腈-0.1% 磷酸系统最佳,各峰分离度好,峰形尖锐,保留时间适中,因此选择其为色谱条件。

2010 年版《中国药典》柴胡、黄芩的检测波长分别为 210,280 nm,药典及文献报道的其他药材多为 203,254,280,290 nm,本实验结合二极管阵列检测

表 1 10 批柴胡龙骨牡蛎汤水煎液相似度比较

Table 1 Comparison of similarity of 10 batches of Chaihu Longgu Muli Tang

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹谱
S1	1.000	0.985	0.965	0.863	0.972	0.972	0.963	0.971	0.923	0.923	0.978
S2	0.985	1.000	0.984	0.875	0.968	0.968	0.955	0.966	0.939	0.943	0.977
S3	0.965	0.984	1.000	0.858	0.952	0.951	0.938	0.949	0.941	0.948	0.958
S4	0.863	0.875	0.858	1.000	0.885	0.880	0.841	0.871	0.807	0.798	0.901
S5	0.972	0.968	0.952	0.885	1.000	0.999	0.992	0.996	0.887	0.892	0.996
S6	0.972	0.968	0.951	0.880	0.999	1.000	0.994	0.998	0.888	0.894	0.995
S7	0.963	0.955	0.938	0.841	0.992	0.994	1.000	0.995	0.867	0.880	0.982
S8	0.971	0.966	0.949	0.871	0.996	0.998	0.995	1.000	0.887	0.894	0.993
S9	0.923	0.939	0.941	0.807	0.887	0.888	0.867	0.887	1.000	0.975	0.898
S10	0.923	0.943	0.948	0.798	0.892	0.894	0.880	0.894	0.975	1.000	0.901
对照指纹谱	0.978	0.977	0.958	0.901	0.996	0.995	0.982	0.993	0.898	0.901	1.000

表 2 10 批柴胡龙骨牡蛎汤正丁醇萃取液相似度比较

Table 2 Comparison of similarity of 10 batches of Chaihu Longgu Muli Tang *n*-butanol extraction

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹谱
S1	1.000	0.870	0.792	0.832	0.912	0.945	0.946	0.931	0.847	0.821	0.952
S2	0.870	1.000	0.812	0.835	0.841	0.975	0.884	0.868	0.918	0.834	0.947
S3	0.792	0.812	1.000	0.837	0.740	0.840	0.940	0.841	0.781	0.865	0.887
S4	0.832	0.835	0.837	1.000	0.764	0.860	0.872	0.971	0.778	0.782	0.899
S5	0.912	0.841	0.740	0.764	1.000	0.895	0.871	0.845	0.956	0.939	0.902
S6	0.945	0.975	0.840	0.860	0.895	1.000	0.940	0.919	0.922	0.859	0.977
S7	0.946	0.884	0.940	0.872	0.871	0.940	1.000	0.933	0.856	0.887	0.967
S8	0.931	0.868	0.841	0.971	0.845	0.919	0.933	1.000	0.823	0.813	0.950
S9	0.847	0.918	0.781	0.778	0.956	0.922	0.856	0.823	1.000	0.952	0.909
S10	0.821	0.834	0.865	0.782	0.939	0.859	0.887	0.813	0.952	1.000	0.887
对照指纹谱	0.952	0.947	0.887	0.899	0.902	0.977	0.967	0.950	0.909	0.887	1.000

器对 190 ~ 400 nm 进行波长扫描,结果显示 276, 210 nm 能更好的整体反应柴胡龙骨牡蛎汤的化学成分和色谱保留行为。

柴胡龙骨牡蛎汤含有多类成分^[9-11],如皂苷、黄酮、挥发油、萜醌等。传统水煎液中能检测出黄酮类,挥发油类和萜醌类成分,但皂苷类成分检测不到,而柴胡为方中君药,是质量控制的关键成分,人参也为方中主要成分,所以考虑采用正丁醇萃取,氨水洗涤的方法,检测本复方中含有的皂苷类成分。

本实验通过建立柴胡龙骨牡蛎汤传统水煎液和正丁醇萃取液的高效液相指纹图谱,全面、系统而又特征地反映其化学成分,可以较好地体现中医中药多成分多靶点的优势,可为柴胡龙骨牡蛎汤质量评价和控制提供方法学参考。

【参考文献】

[1] 翁黄,念慈,刘继林. 中药复方治疗抑郁状态的述评[J]. 四川中医,2005,23(10):40-42.

[2] 邓暖繁. 柴胡龙骨牡蛎汤治疗恶性肿瘤化疗后抑郁症临床观察[J]. 光明中医,2012,27(1):76-78.

[3] 尚俊平. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗老年抑郁症 30 例[J]. 甘肃中医,2010,23(2):247-248.

[4] 王洪然. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗中风后抑郁临床观察[J]. 中国实用医药,2011,6(7):175-176.

[5] 石月平,赵建宇,周亚滨. 柴胡加龙骨牡蛎汤治疗心血管神经症体会[J]. 中医药信息,2006,19(3):53.

[6] 蔡华,叶方,黄良永,等. 超高效液相质谱联用法研究柴胡特征指纹图谱[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(5):359-364.

[7] 赵恒强,王晓,周洁,等. 山东产区黄芩 HPLC 定量指纹图谱研究[J]. 中国现代中药,2014,16(7):528-533.

[8] 王举涛,徐文方,刘金旗,等. HPLC-ELSD 法测定黄芪中黄芪甲苷的含量[J]. 安徽医药,2006,10(1):28-29.

[9] 刘金欣,孟繁蕴,魏英勤,等. UPLC-ELSD 同时测定北柴胡中柴胡皂苷 a,c,d 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(5):83-86.

[10] 刘晓帆,娄子洋,朱臻宇,等. 采用 HPLC-TOF/MS 对中药复方小柴胡汤中化学成分的快速分析鉴别[J]. 第二军医大学学报,2009,30(8):941-946.

[11] 林佳,徐丽珍,刘江云. 中药桂枝的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2006,28(2):169-171.

【责任编辑 顾雪竹】