

芍药汤高效液相色谱指纹图谱的建立

马大龙¹, 张晓平², 魏宝红³, 张鹏¹, 马晓青³, 孟凡刚⁴, 刘红兵³, 代龙^{2*}

(1. 青岛海洋生物医药研究院股份有限公司, 山东 青岛 266071;

2. 山东中医药大学 药学院, 济南 250355;

3. 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;

4. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266000)

[摘要] 目的:建立芍药汤水煎液的 RP-HPLC 指纹图谱检测方法。方法:使用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 柱温 25 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 波长 230 nm, 流动相乙腈-0.05% 磷酸水溶液, 以芍药苷为参照峰, 评价 10 批芍药汤 HPLC 指纹图谱。结果:确定了其中 13 个共有峰, 并对其中的 3 个峰进行指认, 分别为芍药苷、黄芩苷、小檗碱, 建立了芍药汤水煎液指纹图谱; 10 批芍药汤 HPLC 指纹图谱相似度均 > 0.96。结论:该法灵敏度高、稳定性和准确性良好, 体现了芍药汤组分整体特征, 为芍药汤制剂质量标准的建立提供了可靠的科学依据。

[关键词] 芍药汤; 高效液相色谱法-二极管阵列检测器; 指纹图谱; 芍药苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)18-0078-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180078

Establishment of HPLC Fingerprint of Shaoyao Tang

MA Da-long¹, ZHANG Xiao-ping², WEI Bao-hong³, ZHANG Peng¹, MA Xiao-qing³,

MENG Fan-gang⁴, LIU Hong-bing³, DAI Long^{2*}

(1. Marine Biomedical Research Institute of Qingdao, Qingdao 266071, China;

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China; 3. National Engineering

Research Center for Marine Drugs, Ocean University of China, Qingdao 266101, China;

4. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the chromatographic fingerprint for Shaoyao Tang by RP-HPLC. **Method:** The fingerprint was determined by Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the column temperature 25 °C, the flow rate 1.0 mL·min⁻¹, the detective wavelength 230 nm and gradient elution with acetoniteile-0.05% phosphoric acid as mobile phase. Using paeoniflorin peak as reference, the HPLC fingerprints of 10 batches of Shaoyao Tang were analyzed. **Result:** Thirteen common peaks were marked and attributed to the herbs, and 3 common peaks were determined by the relative time of the standard substance, they are paeoniflorin, baicalin and berberine respectively. The HPLC fingerprint of Shaoyao Tang was established and the similarity of the 10 batches of samples was above 0.96. **Conclusion:** The established HPLC-DAD fingerprint is accurate, stable and reproducible, which could reflect the overall characteristics of Shaoyao Tang and improve the specificity for quality standard of the Chinese herbal formula.

[Key words] Shaoyao Tang; HPLC-DAD; fingerprint; paeoniflorin

[收稿日期] 20150929(011)

[第一作者] 马大龙, 硕士, 助理工程师, 从事中药新药研究, Tel:18561591803, E-mail: madalong_1988@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

芍药汤出自金·刘完素(1118—1200 年)的《素问病机气宜保命集》。全方由白芍、大黄、当归、肉桂、黄芩、槟榔、木香、炙甘草、黄连 9 味药组成。主治湿热壅滞肠中所致的痢疾,现代临床主要用于治疗结肠炎,疗效显著^[1-8]。目前关于方中各单味药的指纹图谱相关研究已有不少文献报道^[9-15],但 2015 年版《中国药典》及文献中均没有该复方的指纹图谱方法记载。因为中药复方是依据君臣佐使药相互配伍起效,而现代研究对于中药复方的定量方法,仅局限在 1~2 个成分的定量,所以很难对中药复方进行系统的、客观的质量控制。本实验采用反相高效液相色谱法建立芍药汤水煎液的指纹图谱检测方法^[16-17],为提高芍药汤质控标准和对其中进一步的研究提供科学依据。

1 材料

对照品芍药苷(批号 130815),黄芩苷(批号 130829),小檗碱(批号 140920)均购于成都普菲德生物技术有限公司;磷酸、乙腈均为色谱纯,蒸馏水自制。

ME204E 型电子天平(瑞士梅特勒),美国 Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(DAD-3000 检测器,Thermo Fisher)。

10 批药材饮片分别购自国风药店、建联药店、七星大药房、宏仁堂等,经中国海洋大学刘红兵教授鉴定均为正品,符合 2015 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 供试品溶液的制备 按照《素问病机气宜保命集》芍药汤处方比例白芍 30 g,当归 15 g,黄连 15 g,黄芩 15 g,大黄 9 g,肉桂 5 g,槟榔 6 g,木香 6 g,炙甘草 6 g,先加 10 倍量水浸泡 30 min,水煎煮 30 min,趁热滤布过滤;取药渣加 8 倍量水,继续水煎煮 20 min,趁热滤布过滤;合并以上滤液,放冷,得滤液,定容至 970 mL。取适量滤液,离心(转速 12 000 r·min⁻¹) 5 min,得上清液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、黄芩苷、小檗碱对照品适量,置 10 mL 棕色量瓶中,加流动相定容,配置成每 1 mL 含芍药苷 1.3 mg,小檗碱 5 100 μg,黄芩苷 137 μg 的混合对照品溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 色谱条件 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-

0.05% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 5%~12% A; 15~30 min, 12% A; 30~60 min, 12%~25% A; 60~80 min, 25%~55% A; 80~90 min, 55%~70% A),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密量取混合对照品溶液,按 2.3 项下色谱条件,分别吸取 20 μL,连续进样 6 次,记录图谱。以芍药苷为参照峰,各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 0.8%,表明本法精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同批样品,按 2.1 项下方法,制备 6 份供试品,按 2.3 项下方法测定。各共有峰相对保留时间、相对峰面积 RSD 的分别为 0.7%, 0.9%,表明本法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同批供试品,按 2.3 项下方法,在 0, 1.5, 3, 6, 9, 12, 24 h 分别进样 20 μL,各共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.7%,表明样品稳定性良好。

2.5 指纹图谱建立 按 2.1 项下方法制备 10 批芍药汤供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件进行测定,记录色谱图,见图 1。

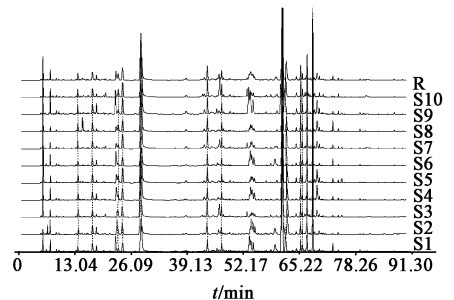


图 1 10 批芍药汤水煎液 HPLC 指纹谱

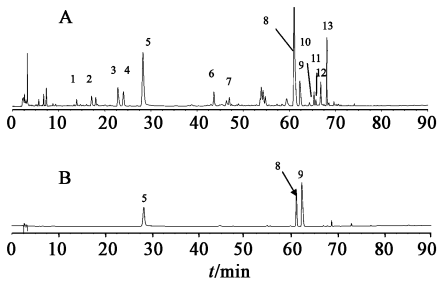
Fig. 1 HPLC fingerprint of 10 batches of Shaoyao Tang

2.5.1 参比峰^[18]的选择 在各批样品指纹图谱中,芍药苷色谱峰分离度良好,峰面积较大,保留位置居中,且为君药白芍的主成分,故确定 5 号芍药苷色谱峰为参比峰。

2.5.2 共有峰的标定 经过分析供试品溶液液相色谱图,标定芍药汤水煎液指纹图谱 13 个共有峰为特征峰,并确定其中 3 个共有峰,5, 8, 9 号峰分别为芍药苷、黄芩苷、小檗碱、黄芩苷,见图 2。

2.5.3 相似度评价 以上 10 批芍药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)。结果芍药汤 10 个批次水煎液的色谱图的相似度均 > 0.96,见表 1。从不同批次指纹图谱确定 13 个共有峰,并根据对照品比对确

定了芍药苷、黄芩苷、小檗碱 3 个共有峰,在以上 10 批次的色谱图中,共有峰的保留时间、峰面积无明显差异。说明芍药汤不同批次之间相关性良好。



5. 芍药苷;8. 黄芩苷;9. 小檗碱;A. 共有模式;B. 对照品

图 2 芍药汤水煎液典型 HPLC

Fig. 2 Typical HPLC chromatographic fingerprint of Shaoyao Tang

表 1 10 批芍药汤水煎液相似度比较

Table 1 Comparison of similarity of 10 batches of Shaoyao Tang

| No. | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | 对照指纹谱 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| S1 | 1 | 0.972 | 0.983 | 0.984 | 0.984 | 0.993 | 0.986 | 0.985 | 0.978 | 0.983 | 0.992 |
| S2 | 0.972 | 1 | 0.967 | 0.979 | 0.979 | 0.967 | 0.976 | 0.97 | 0.965 | 0.977 | 0.982 |
| S3 | 0.983 | 0.967 | 1 | 0.981 | 0.99 | 0.983 | 0.996 | 0.994 | 0.963 | 0.994 | 0.993 |
| S4 | 0.984 | 0.979 | 0.981 | 1 | 0.992 | 0.985 | 0.99 | 0.988 | 0.978 | 0.982 | 0.993 |
| S5 | 0.984 | 0.979 | 0.99 | 0.992 | 1 | 0.984 | 0.997 | 0.994 | 0.978 | 0.993 | 0.997 |
| S6 | 0.993 | 0.967 | 0.983 | 0.985 | 0.984 | 1 | 0.987 | 0.985 | 0.973 | 0.982 | 0.991 |
| S7 | 0.986 | 0.976 | 0.996 | 0.99 | 0.997 | 0.987 | 1 | 0.996 | 0.975 | 0.997 | 0.998 |
| S8 | 0.985 | 0.97 | 0.994 | 0.988 | 0.994 | 0.985 | 0.996 | 1 | 0.97 | 0.991 | 0.995 |
| S9 | 0.978 | 0.965 | 0.963 | 0.978 | 0.978 | 0.973 | 0.975 | 0.97 | 1 | 0.97 | 0.983 |
| S10 | 0.983 | 0.977 | 0.994 | 0.982 | 0.993 | 0.982 | 0.997 | 0.991 | 0.97 | 1 | 0.995 |
| 对照指纹谱 | 0.992 | 0.982 | 0.993 | 0.993 | 0.997 | 0.991 | 0.998 | 0.995 | 0.983 | 0.995 | 1 |

最终选择 230 nm 作为芍药汤指纹图谱的波长。

方中因含有黄芩苷与小檗碱,二者是方中要药,对病症的治疗起到关键性作用,但二者会产生共沉淀现象,现代医学上单用芍药汤治疗结肠炎的临床应用很少,而古方芍药汤治疗结肠炎疗效确切。笔者推测临床使用芍药汤组方黄连和黄芩剂量配比不确切,导致达不到古方芍药汤的疗效,以至于影响本方临床疗效。本文通过模拟临床汤剂,建立芍药汤指纹图谱方法,对黄芩和黄连等药味相对定量,可以更有效地确保本方的疗效,对芍药汤经典名方的开发意义重大。

本文通过选用道地药材组方,建立芍药汤的指纹图谱,从而为今后开发芍药汤制剂工艺的合理性评价提供重要依据;并对其中的君、臣药中芍药苷、黄芩苷、小檗碱进行指认,保证了芍药汤 3 味主药的疗效。此法能更系统、更全面地对经方芍药汤进行

3 讨论与小结

芍药汤处方中有多种成分,主要为皂苷类、黄酮类、生物碱等成分,首先考察常用流动相甲醇-水、甲醇磷酸、乙腈-水、乙腈-磷酸等常用条件,发现乙腈-0.05% 磷酸系统明显优于其他液相条件,故在此基础上对流动相梯度进行优化,结果,峰分离度良好,峰形尖锐,保留时间始终,最终选择此系统。

2015 年版《中国药典》药材项下芍药苷、小檗碱、黄芩苷、甘草苷、阿魏酸的检测波长分别是 230, 345, 280, 237, 316 nm,且《中国药典》及文献多用 254 nm 作为一般检测波长,再结合全波长扫描结果。得出结论,芍药苷在 230 nm 时,峰高明显高于其他波长,而图谱中其他各波长的峰高差别不大,故

质量控制,且本法准确、可靠,可为芍药汤质量评价和控制提供方法学参考。

[参考文献]

[1] 陈锦锋,陈建林,韩宇斌,等. 芍药汤合白头翁汤治疗轻中度溃疡性结肠炎(湿热内蕴型)30 例疗效观察[J]. 新中医,2008,40(7):47-48.

[2] 孙显军,王君红. 柴胡芍药汤加减治疗溃疡性结肠炎 68 例疗效观察[J]. 河北医学,2013,19(2):308-310.

[3] 魏茂春. 芍药汤加减治疗溃疡性结肠炎 30 例[J]. 山西中医,2013,29(3):14.

[4] 陈文杰. 加味芍药汤口服联合灌肠治疗溃疡性结肠炎的疗效观察[D]. 南京:南京中医药大学,2013.

[5] 徐建军,季峰,陈建永,等. 芍药汤加减治疗慢性溃疡性结肠炎疗效观察[J]. 浙江中医杂志,2007,42(6):323-324.

[6] 陈立中,严小大,朱湘生. 加味芍药汤治疗溃疡性结肠炎(湿热证)30 例临床观察[J]. 中医药导报,

- 2007,13(6):34-35.
- [7] 陈晓杨. 芍药汤治疗溃疡性结肠炎 36 例临床观察[J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(5): 39-40.
- [8] 钟育敏. 芍药汤内服配合中药保留灌肠治疗溃疡性结肠炎 64 例总结[J]. 湖南中医杂志, 2010, 26(5): 31-33.
- [9] 杨柳, 许舜军, 田润涛, 等. 白芍的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 药学学报, 2007, 42(1): 71-74.
- [10] 王微. 黄芩指纹图谱及谱效关系研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2009.
- [11] 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 282-287.
- [12] 邵林, 郭庆梅, 冉蓉, 等. 山东不同栽培品种金银花 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 117-121.
- [13] 陈红英. 黄连指纹图谱研究进展[J]. 中国医药信息杂志, 2012, 19(5): 109-112.
- [14] 李会芳, 王伽伯, 金城, 等. 基于 UPLC 指纹图谱的市售大黄不同饮片品质研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2314-2316.
- [15] 陈斌, 蔡宝昌. 大黄药材 HPLC 指纹图谱的化学模式识别[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(1): 47-49, 69.
- [16] 马晓青, 张鹏, 魏宝红, 等. 柴胡龙骨牡蛎汤高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(13): 66-69.
- [17] 魏宝红, 马大龙, 马晓青, 等. 桂枝甘草龙骨牡蛎汤 HPLC-DAD 指纹图谱研究[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(11): 1304-1307, 1320.
- [18] 马晓青, 蔡皓, 刘晓, 等. 硫磺熏蒸前后金银花的 HPLC 指纹图谱比较和聚类分析[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(1): 92-95.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管, 中华中医药学会、中国中医科学院中药研究所主办的学术刊物。本刊创建于 1995 年 10 月, 主要设置栏目包括复方配伍专论、方剂学研究、药剂与炮制、资源与鉴定、化学分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、中医传承及相关综述等。目前为 CSCD 来源期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国学术期刊排行榜核心期刊、美国《化学文摘》统计源期刊; 并被评为中国中医药优秀期刊及中国学术期刊优秀期刊。

本刊为半月刊, 16 开本, 234 页, 标准刊号 ISSN1005-9903; CN11-3495/R。每期定价 35 元, 全年 840 元。国内外公开发行, 国内由北京市报刊发行局办理总发行, 邮发代号 2-417; 国外由中国国际图书贸易集团有限公司办理发行, 代号 SM4655, 欢迎订阅。读者还可通过本刊编辑部办理邮购, 地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 收件人: 《中国实验方剂学杂志》编辑部, 邮编 100700, Tel: (010)84076882, E-mail: syfjx_2010@188.com, 网址: www.syfjxzz.com。