

• 质量标准 •

通窍活血汤的液相指纹图谱研究

许凤清^{1,2}, 汪宁^{1,2*}, 刘金旗¹, 周安¹, 段金廛², 丁安伟², 朱荃²

(1. 安徽中医学院药学院/安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽合肥 230038;

2. 南京中医药大学/江苏省方剂研究重点实验室, 江苏南京 210029)

[摘要] 目的: 用高效液相色谱法建立通窍活血汤的指纹图谱分析方法。方法: 以阿魏酸、芍药苷为对照品, 色谱柱: Phenomenex luna C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(含0.1%磷酸)梯度洗脱; 柱温: 30 °C; 测定波长分别为230 nm、280 nm、320 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 研究通窍活血汤 HPLC 指纹图谱。结果: 标示出通窍活血汤特征色谱峰并对其色谱峰进行归属。结论: 该方法准确、重复性好, 为通窍活血汤的指纹图谱质量控制提供了依据。

[关键词] 通窍活血汤; 高效液相; 指纹图谱; 质量控制

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)12-0001-04

Studies on Fingerprints of Tongqiao Huoxue Decoction by HPLC

XU Feng-qing^{1,2}, WANG Ning^{1,2*}, LIU Jin-qi¹, ZHOU An¹, DUAN Jin-ao², DING An-wei², ZHU Quan²

(1. Anhui Key Laboratory of R&D of Chinese Medicine, Anhui University of TCM, Hefei 230038, China;

2. Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish HPLC fingerprints of Tongqiao Huoxue Decoction for the quality control. **Method:** Ferulic acid and paeoniflorin were used as reference substances. Phenomenex Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used and the methanol and water containing 0.1% phosphoric acid were chosen as the mobile phases in a gradient elution. The column temperature was 30 °C and the fingerprints were detected at 230, 280, 320 nm. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the analysis lasted 80 min. **Result:** Characteristic peaks were indicated on HPLC fingerprints and were assigned by comparison of corresponding part of some herbs. **Conclusion:** It proved that the method is reliable, simple, precise and repeated, which can be used as for quality control of Tongqiao Huoxue Decoction.

[Key words] Tongqiao Huoxue Decoction; HPLC; fingerprint; quality control

通窍活血汤是清代名医王清任创立的活血化瘀方剂, 由赤芍、川芎、桃仁、麝香、红花等组成。具有活血祛瘀、通络开窍之功效, 主治头面部血瘀之证, 实验研究表明, 通窍活血汤对脑缺血及缺血再灌等

神经损伤有显著的保护作用^[1]。对此方的化学成分研究尚未见报道, 本研究建立通窍活血汤指纹图谱, 作为采用神经细胞膜生物色谱法分析和神经细胞特异性结合的效应成分的背景资料, 揭示活性成分的色谱特征及其在指纹图谱当中的位置。以期为进一步研究开发该方剂提供质量控制的理论依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高相液相色谱仪, DAD 检测器, 色谱在线真空脱气机、四元梯度泵、柱温箱; Agilent 化学色谱工作站; 1/10 万电子分析天平(德国 Satorius BP211D)。试剂: 甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸(分析

[收稿日期] 2008-04-21

[基金项目] 江苏省方剂研究重点实验室开放课题(FJK2006009); 安徽省2008年度科研计划项目(08020303079)

[通讯作者] * 汪宁, Tel: (0551) 5169232; E-mail: wangnhf_515@yahoo.com.cn

纯), 水为双蒸水。

赤芍、川芎、桃仁、红花等药材购自合肥和义堂中药饮片有限公司, 人工麝香由北京联馨药业有限公司, 中国药材集团公司总经销。芍药苷对照品(110736-200424)、阿魏酸对照品(110773-200611)均购自中国药品生物制品检定所(含量测定用)。

2 方法与结果^[2,3]

2.1 色谱分析条件^[4] Phenomex C₁₈ 分析色谱柱(4.6 nm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水(含 0.1% H₃PO₄) 梯度洗脱(洗脱程序见表 1); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 230 280 320 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、阿魏酸对照品, 用 50% 色谱甲醇溶解, 配制成每 1 ml 含芍药苷 0.122 mg、阿魏酸 0.143 mg 对照品溶液, 密闭保存。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	CH ₃ OH(%)	0.1% H ₃ PO ₄ ·H ₂ O(%)
0	10	90
15	25	75
30	30	70
55	45	55
70	54	46
80	70	30

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 通窍活血汤供试品溶液制备 称取桃仁 90 g、赤芍 30 g、川芎 30 g、红花 90 g、葱 30 g、红枣 50 g, 加 8 倍量水浸泡 0.5 h, 煎煮 2 次, 每次 2 h, 过滤, 滤液减压浓缩至 320 mL; 浓缩液中加入 95% 的乙醇, 至醇浓度为 75%, 搅拌至沉淀析出, 静置过夜, 抽滤, 滤液减压浓缩。将人工麝香 1 g 混悬于 10 mL 无水乙醇中, 再将混悬液加入上述浓缩液中, 混匀, 定容至 200 mL, 即为通窍活血汤复方的水提醇沉贮备液。

取通窍活血汤复方的水提醇沉贮备液 100 mL 至分液漏斗中, 加入同体积乙酸乙酯, 萃取 3 次; 合并乙酸乙酯萃取液, 减压回收溶剂后, 蒸干, 得到通窍活血汤乙酸乙酯部位, 加少量 DMSO 溶解, 加双蒸水定容至 100 mL, 配制成相当于每 mL 含原药材 1.6 g, 作为供试品贮备液。

精密吸取供试品贮备液 0.5 ml, 加甲醇-水-H₃PO₄(1:1:0.05) 定容至 10 ml 容量瓶中, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 续滤液即为供试品溶液。取该滤

液上 HPLC 检测, 色谱采集图如图 1、图 2、图 3。

2.3.2 川芎、赤芍、红花、桃仁等单味药供试品溶液制备 分别按处方药材 10 倍量称取川芎、赤芍、红花、桃仁药材, 按 2.2.1 项下制备各单味药材的供试品溶液, 取各续滤液上 HPLC 检测。

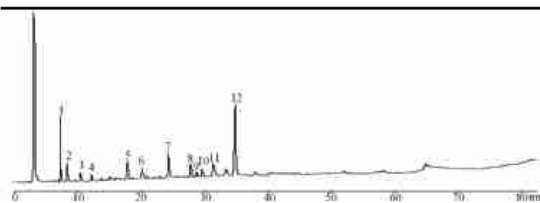


图 1 230 nm 通窍活血汤 HPLC 色谱图

7. 芍药苷

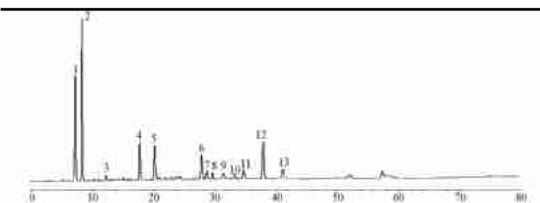


图 2 280 nm 通窍活血汤 HPLC 色谱图

8. 阿魏酸

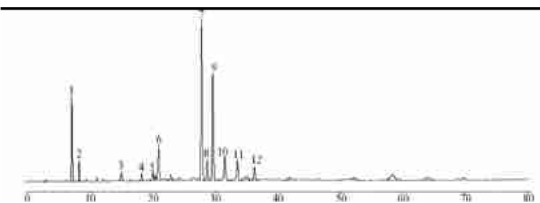


图 3 320 nm 通窍活血汤 HPLC 色谱图

10. 阿魏酸

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度实验 精密吸取通窍活血汤供试品溶液, 连续进样 6 次并记录各特征色谱峰的相对保留时间(以阿魏酸的出峰时间为参考, 其它各峰保留时间与其的比值, 下同), 和相对峰面积(以阿魏酸峰面积为标准峰面积, 其它各峰面积与其的比值, 下同)其 RSD 均小于 3%, 表明仪器精密度良好, 结果见表 2 3 4。

2.4.2 重复性实验 按 2.3.2 项下制备通窍活血汤供试品溶液, 平行 6 份。记录各特征色谱峰, 测得各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 表明其重复性较好, 结果见表 2, 3, 4。

2.4.3 稳定性实验 按 2.3.2 项下制备通窍活血汤供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 测得其特征峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定, 结果见表 2, 3, 4。

2.5 指纹图谱中色谱峰的确认 以 230 nm、280 nm、320 nm 为检测波长, 分别从通窍活血汤色谱图中分辨出 12、13、11 个峰, 经过与相同波长条件下川

表 2 方法学试验结果(λ 230 nm, $n=6$)

峰号	相对保留时间/范围			相对保留峰面积/范围		
	精密度	稳定性	重复性	精密度	稳定性	重复性
1	0.292 ± 0.018 6	0.297 ± 0.001 5	0.297 ± 0.003 2	1.473 ± 0.016 4	1.279 ± 0.011 4	1.312 ± 0.037 1
2	0.338 ± 0.016 6	0.342 ± 0.000 5	0.342 ± 0.000 4	0.415 ± 0.019 6	0.429 ± 0.022 5	0.433 ± 0.021 2
3	0.425 ± 0.015 7	0.431 ± 0.000 4	0.430 ± 0.000 2	0.244 ± 0.013 9	0.289 ± 0.032 2	0.298 ± 0.012 1
4	0.495 ± 0.017 7	0.502 ± 0.001 1	0.501 ± 0.003 0	0.193 ± 0.021 5	0.232 ± 0.013 5	0.241 ± 0.026 5
5	0.726 ± 0.010 1	0.733 ± 0.000 9	0.732 ± 0.002 4	0.569 ± 0.015 0	0.563 ± 0.019 5	0.563 ± 0.027 5
6	0.860 ± 0.010 4	0.862 ± 0.000 4	0.868 ± 0.018 3	0.155 ± 0.030 8	0.157 ± 0.019 2	0.159 ± 0.025 3
8	1.143 ± 0.006 2	1.148 ± 0.000 7	1.147 ± 0.002 1	0.676 ± 0.018 0	0.580 ± 0.014 6	0.603 ± 0.034 2
9	1.180 ± 0.006 7	1.184 ± 0.000 4	1.183 ± 0.001 5	0.351 ± 0.012 8	0.340 ± 0.021 7	0.337 ± 0.020 2
10	1.216 ± 0.008 1	1.221 ± 0.000 4	1.220 ± 0.001 3	0.439 ± 0.016 5	0.464 ± 0.023 0	0.491 ± 0.042 9
11	1.285 ± 0.011 3	1.291 ± 0.000 3	1.291 ± 0.000 5	1.179 ± 0.020 6	1.194 ± 0.008 1	1.201 ± 0.042 9
12	1.429 ± 0.010 2	1.434 ± 0.000 3	1.433 ± 0.000 9	3.223 ± 0.015 3	3.050 ± 0.002 3	3.141 ± 0.023 8
7	参照峰 (芍药苷)			参照峰 (芍药苷)		

表 3 方法学试验结果(λ 280 nm, $n=6$)

峰号	相对保留时间/范围			相对保留峰面积/范围		
	精密度	稳定性	重复性	精密度	稳定性	重复性
1	0.241 ± 0.009 1	0.243 ± 0.001 1	0.243 ± 0.002 0	8.488 ± 0.016 6	8.200 ± 0.023 9	7.890 ± 0.037 1
2	0.279 ± 0.007 5	0.280 ± 0.000 3	0.280 ± 0.000 9	10.537 ± 0.022 5	10.227 ± 0.023 3	9.851 ± 0.021 2
3	0.409 ± 0.007 2	0.411 ± 0.000 7	0.411 ± 0.001 8	0.569 ± 0.026 2	0.618 ± 0.017 8	0.594 ± 0.012 1
4	0.599 ± 0.007 5	0.600 ± 0.000 4	0.600 ± 0.001 1	3.421 ± 0.026 2	3.447 ± 0.021 0	3.324 ± 0.026 5
5	0.679 ± 0.009 3	0.679 ± 0.000 3	0.678 ± 0.000 2	4.444 ± 0.028 1	4.449 ± 0.021 0	4.290 ± 0.027 5
6	0.945 ± 0.013 5	0.940 ± 0.000 3	0.940 ± 0.000 8	3.693 ± 0.017 0	3.188 ± 0.020 3	2.948 ± 0.025 3
7	0.972 ± 0.006 9	0.970 ± 0.000 0	0.969 ± 0.000 4	0.397 ± 0.024 7	1.084 ± 0.020 1	1.030 ± 0.034 2
9	1.062 ± 0.008 0	1.058 ± 0.000 1	1.060 ± 0.002 3	0.758 ± 0.017 9	1.613 ± 0.022 2	1.518 ± 0.020 2
10	1.130 ± 0.007 3	1.126 ± 0.000 1	1.126 ± 0.000 5	0.545 ± 0.028 4	0.712 ± 0.017 8	0.761 ± 0.042 9
11	1.180 ± 0.009 1	1.174 ± 0.000 3	1.174 ± 0.000 8	1.258 ± 0.026 7	1.400 ± 0.020 5	1.365 ± 0.042 9
12	1.289 ± 0.007 7	1.281 ± 0.000 6	1.281 ± 0.002 0	5.757 ± 0.026 5	5.747 ± 0.024 1	5.576 ± 0.023 8
13	1.389 ± 0.007 7	1.380 ± 0.001 0	1.381 ± 0.002 1	1.549 ± 0.026 2	1.620 ± 0.017 0	1.841 ± 0.027 4
8	参照峰 (阿魏酸)			参照峰 (阿魏酸)		

表 4 方法学试验结果(λ 320 nm, $n=6$)

峰号	相对保留时间/范围			相对保留峰面积/范围		
	精密度	稳定性	重复性	精密度	稳定性	重复性
1	0.236 ± 0.009 8	0.238 ± 0.000 4	0.238 ± 0.001 5	0.488 ± 0.009 0	0.509 ± 0.004 4	0.524 ± 0.035 4
2	0.278 ± 0.010 1	0.280 ± 0.000 3	0.280 ± 0.000 9	0.113 ± 0.027 6	0.115 ± 0.008 4	0.120 ± 0.044 4
3	0.509 ± 0.016 2	0.508 ± 0.000 3	0.508 ± 0.000 5	0.058 ± 0.023 2	0.065 ± 0.031 7	0.072 ± 0.038 6
4	0.616 ± 0.005 2	0.616 ± 0.000 3	0.616 ± 0.000 3	0.059 ± 0.018 9	0.060 ± 0.005 8	0.062 ± 0.023 4
5	0.675 ± 0.003 2	0.677 ± 0.000 3	0.677 ± 0.000 3	0.087 ± 0.013 1	0.090 ± 0.007 4	0.093 ± 0.028 8
6	0.709 ± 0.014 6	0.706 ± 0.000 1	0.706 ± 0.000 3	0.287 ± 0.008 2	0.298 ± 0.006 9	0.305 ± 0.033 2
7	0.940 ± 0.002 0	0.940 ± 0.000 2	0.940 ± 0.000 8	1.650 ± 0.013 5	1.565 ± 0.004 4	1.595 ± 0.010 9
8	0.970 ± 0.001 4	0.969 ± 0.000 0	0.969 ± 0.000 4	0.185 ± 0.017 6	0.196 ± 0.002 7	0.197 ± 0.020 7
10	1.134 ± 0.002 7	1.133 ± 0.000 2	1.133 ± 0.003 0	0.256 ± 0.016 0	0.256 ± 0.008 8	0.259 ± 0.038 8
11	1.225 ± 0.004 4	1.226 ± 0.000 1	1.226 ± 0.000 2	0.163 ± 0.017 1	0.163 ± 0.021 0	0.156 ± 0.017 2
9	参照峰 (阿魏酸)			参照峰 (阿魏酸)		

芎、赤芍、红花、桃仁单味药材提取液的色谱对照比较,发现 230 nm 色谱图中的 1, 6, 7, 11, 12 号峰为赤芍峰,其中 7 号峰为芍药苷;280 nm 色谱图中的 2, 4, 10 号峰为桃仁峰;2, 3, 8~ 8, 11~ 13 号峰为川芎峰,其中 8 号峰为阿魏酸;320 nm 色谱图中的 1, 6~ 7, 8~ 11, 12 号峰为红花峰,9 号峰为阿魏酸。将保留时间进行平行比较,可以发现 230 nm 和 320 nm 波长下色谱图中的 1, 6 号峰为红花和赤芍共有的峰;230 nm 与 280 nm 色谱图中 10, 11 号峰为和赤芍共有的峰;而且川芎和红花中均有阿魏酸的色谱峰。

3 讨论

分析条件的确定: 选用一个 3D-plot 图, 根据三维图谱显示的吸收范围, 结合复方中单味药指标性成分的 UV 最佳吸收波长, 综合整个色谱图的色谱峰的数目、分布、峰形多种因素, 最终选用 230 nm、280 nm、320 nm 作为监控检测波长; 同时试验过程中选用了不同的流动相系统, 预先设定洗脱梯度条件下逐步优化, 结果得到甲醇-水-0.1% 磷酸系统, 在表 1 条件下, 获得的色谱图无论是分离度、分辨率、重复性均较理想。

经通窍活血汤及复方中多个单味药多维全息化学特征谱的测定, 发现赤芍、川芎、红花、桃仁的大多数峰在复方指纹图谱中存在, 但同浓度下峰的反应

值部分有很大差别(如阿魏酸、芍药苷等), 而且全方谱中, 有少数峰在单味药谱中比对不出, 而单味药中亦有不少峰在全方谱中显示不出, 这些说明在药物煎煮, 提取过程中, 各物质之间相互助溶、促溶、阻溶以及萃取率的不同, 产生各种复杂的物理和化学过程, 使得最终结果产生了较为复杂的局面。因此, 应用分析化学技术对中药成分进行分离和分析, 结合药理学的药效试验, 构成了研究中药(复方)活性成分研究的基本方法。本研究通过对通窍活血汤的指纹图谱分析条件的确定, 为下一步研究该复方药效的物质基础提供了依据。

[参考文献]

- [1] 汪宁, 刘青云, 彭代银, 等. 通窍活血汤对反复脑缺血再灌注小鼠的保护作用及机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 10(5): 22-23.
- [2] 马悦颖, 李沧海, 李兰芳, 等. 关于中药复方研究的几点思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(11): 68-71.
- [3] 曹进, 戴德舜, 王义明, 等. 桂枝汤 A 部分有效成分指纹图谱归属(二)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(3): 1-4.
- [4] 宋金春, 刘红, 刘薇芝. 当归、川芎、红花不同组合方式提取物的指纹图谱比较[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(15): 1136-1137, 1198.