

· 论著 ·

温经汤高效液相色谱指纹图谱的建立

柴瑞平¹, 路娟¹, 赵颖¹, 王晓静^{1,2}, 吕欣锴¹, 陈曦¹ (1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355)

[摘要] **目的** 建立古代经典名方温经汤 HPLC-DAD 指纹图谱检测方法。**方法** 采用 RP-HPLC-DAD 法, 利用 Waters Xselect HSS T₃ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 柱温 25 °C, 流速 0.8 ml/min, 波长 254 nm, 选取甘草酸铵为参照峰, 分析 10 批次温经汤水煎液的 HPLC 指纹图谱, 并使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对指纹图谱相似度进行评价。**结果** 在温经汤水煎液指纹图谱中标定了 39 个共有峰, 指认了 6 个共有峰, 10 批样品指纹图谱相似度均>0.98, 不同批次间差异较小。**结论** 该方法灵敏度高、稳定性强, 数据准确可靠, 基本体现了温经汤的整体化学成分特征, 可用于温经汤开发的质量控制。

[关键词] 温经汤; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 相似度

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2018)06-0503-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.06.006

Establishment of HPLC fingerprint for Wenjing Tang

CHAI Ruiping¹, LU Juan¹, ZHAO Ying¹, WANG Xiaojing^{1,2}, LÜ Xinkai¹, CHEN Xi¹ (1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 2. Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective** To establish chromatographic fingerprint for Wenjing Tang by HPLC-DAD. **Methods** The fingerprint was determined by Waters Xselect HSS T₃ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% formic acid solution as mobile phase for gradient elution. The temperature of column was 25 °C at a flow rate of 0.8 ml·min⁻¹. The detective wavelength was set at 254 nm and ammonium glycyrrhizinate was selected as the reference peak. The HPLC fingerprints of 10 batches of Wenjing Tang were analyzed and the similarity was evaluated with *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine*. **Results** There were 39 common peaks in the HPLC fingerprints of Wenjing Tang and 6 common peaks were determined by the relative time of the standard substance. The similarities of 10 batches were all above 0.98 and the deviations among these batches are very small. **Conclusion** The HPLC-DAD fingerprint method for Wenjing Tang is accurate, stable and reliable. The fingerprint is the characteristic of the overall chemical components in Wenjing Tang. It can be used as an effective method for the quality control of Wenjing Tang.

[Key words] Wenjing Tang; fingerprint; HPLC; similarity

温经汤始载于《金匱要略·妇人杂病脉证并治第二十二》, 全方由十二味药组成, 方中以吴茱萸、桂枝为君药, 用以温经散寒、通利血脉; 当归、川芎活血化痰以生新, 牡丹皮祛瘀通经并退热, 共为臣药; 阿

胶、麦门冬、芍药滋阴养血, 人参、甘草补气健脾, 半夏降胃气而散结, 生姜温胃降逆, 同为佐药; 甘草调和诸药, 兼为使药^[1,2]。目前临床上常用于治疗妇科疾病, 多见于月经不调、痛经及不孕等病的诊治, 辨证论治, 效果受广泛认可^[3-5]。已有研究发现, 方中单味药材的指纹图谱方法多有报道^[6-10], 但于 2015 版《中国药典》及文献中仍没有关于温经汤水煎液指纹图谱建立的记载, 尚缺乏切实有效的质量控制方法。

本研究建立了温经汤 HPLC-DAD 指纹图谱, 对部分共有峰进行了指认, 基本反映全汤的整体化学成分群, 为古代经典名方温经汤的新药开发及质量控制标准提供可借鉴的方法。

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(No. 81673667); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助(2016-I2M-3-015; 2017-I2M-B&R-09); 云南省中青年学术带头人后备人才项目(2013HB099)

[作者简介] 柴瑞平, 硕士生, 研究方向: 中药复方质量控制, Tel: (010)57833257, Email: 1129523948@qq.com

[通讯作者] 陈曦, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理与毒理, Tel: (010)57833257, Email: chenxi@implad.ac.cn

1 材料

1.1 仪器

Waters UPLC H-Class 系统(含四元溶剂泵,自动进样装置,在线真空脱气装置,PDA 检测器,Empower2 色谱工作站)、AB265-S 型分析天平(瑞士 METTLER 公司)、2-16R 台式高速微量冷冻离心机(上海托莫斯科学仪器有限公司)

1.2 药材与饮片

人参饮片购于吉林敖东健康科技有限公司,生姜购于北京物美超市,其余药材饮片均购于北京市同仁堂药店,具体信息见表 1,经中国医学科学院药用植物研究所云南分所李海涛教授鉴定均为正品,符合 2015 版《中国药典》标准,样品留样于中国医学科学院药用植物研究所化学楼 106 室。根据批号,将药材、饮片随机组合用于制备 10 批次温经汤样品。

表 1 药材与饮片具体信息

品名	产地	批号	来源
吴茱萸	广西	600194080、600193166	
桂枝	广西	170506001、170601001	
川芎	四川	20170527、20170813	
当归	甘肃	17071101、17080801	
白芍	安徽	17043001、20171124	北京市同仁堂药店 (马连洼店)
麦冬	四川	16121301、20171102	
牡丹皮	安徽	17021801、1708166	
甘草	甘肃	20170506、17111412	
阿胶	山东	20160101、20160405	
半夏(法)	四川	601192836-S、60119245-S	
人参	吉林	1710002、1711005	吉林敖东健康科技 有限公司
生姜	北京	/	北京市物美超市

1.3 试药

对照品甘草酸铵(批号:170603),桂皮醛(批号:170328),丹皮酚(批号:170421),吴茱萸碱(批号:170524)和吴茱萸次碱(批号:170609)均购自于上海融禾医药科技有限公司,绿原酸(批号:110753-200212)购自于中国食品药品检定研究院,纯度均>98%。

乙腈(Merck 公司,色谱纯)、甲酸(汕头市西陇化工有限公司,分析纯)、屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters Xselect HSS T3 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~25 min, 5%~22% A, 25~35 min, 22%~30% A, 35~45 min, 30%~60% A, 45~60 min, 60%~100% A),平衡色谱柱 15 min,流速 0.8 ml/min,柱温 25 °C,检测波长 254 nm,进样量 10 μl。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取甘草酸铵、桂皮醛、丹皮酚、吴茱萸碱、吴茱萸次碱和绿原酸对照品适量,置于 10 ml 棕色容量瓶中,加入纯甲醇定容,制得质量浓度分别为甘草酸铵 1.45 g/L、桂皮醛 1.31 g/L、丹皮酚 0.57 g/L、吴茱萸碱 0.54 g/L、吴茱萸次碱 0.48 g/L、绿原酸 0.06 g/L 的混合对照品储备液,4 °C 存放备用,测定前使用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.3 供试品溶液的制备^[1]

参考《名方配伍分析及应用》(人民卫生出版社)收录,按照古时一两相当于 3 g 计算,称取吴茱萸 9 g、当归 6 g、川芎 6 g、人参 6 g、桂枝 6 g、阿胶 6 g、生姜 6 g、牡丹皮 6 g、甘草 6 g、半夏 6 g、麦冬 9 g,加水 10 倍量,浸泡 30 min,加热回流提取 1 h,趁热过滤,滤渣加水 10 倍量,加热回流 1 h 后过滤,合并 2 次滤液,水浴浓缩至 750 ml,取适量滤液,离心(4 °C, 12 000 r/min)10 min,将上清液过 0.22 μm 微孔滤膜即得,其余样品置于-20 °C 冷冻储存。根据不同批号药材/饮片随机组合,按以上方法复制 10 批次温经汤水提液样品(S1-S10 批)。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

精密吸取 S1 批温经汤水煎液样品溶液,按“2.1”项色谱条件,连续进样 6 次,记录谱图。以甘草酸铵为参照峰,各特征共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.8%、1.0%,表明高效液相色谱仪精密度良好,符合指纹图谱的技术要求。

2.4.2 重复性试验

取 S1 批温经汤供试品溶液 6 份,按“2.1”项色谱条件依次进样,各特征共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.8%、0.7%,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱的技术要求。

2.4.3 稳定性试验

取 S1 批室温下放置的温经汤供试品溶液,按“2.1 项”所述的色谱条件,分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 测定 HPLC-DAD 色谱图,以甘草酸铵为参照峰。结果显示,各特征共有峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别为 0.6%、0.8%,表明供试品溶液

在 24 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱建立

按“2.3”项方法制备的 10 批温经汤供试品溶液，采用“2.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图(图 1)。

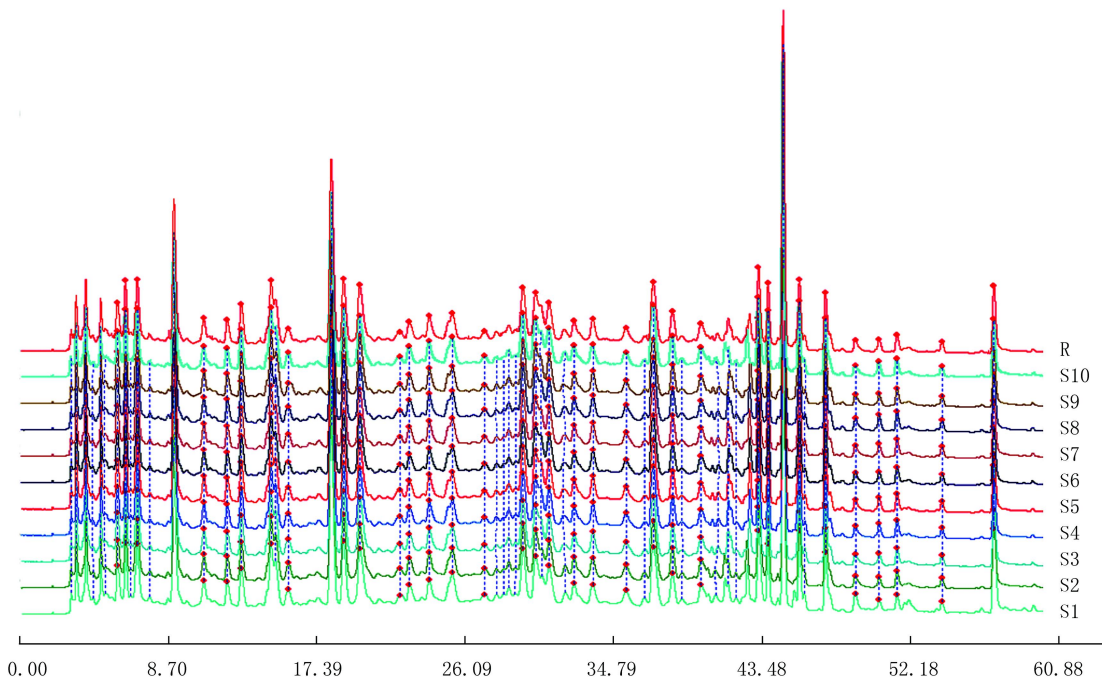


图 1 10 批温经汤 HPLC 指纹图谱

S1-10:10 批温经汤供试品 HPLC 图谱;R:共有模式谱

2.5.1 参照峰的选择

在 10 批供试品指纹图谱中,甘草酸铵色谱峰分离度较好,峰面积较大且稳定,保留时间合适,故确定 33 号甘草酸铵色谱峰为参照峰。

2.5.2 共有峰标定

将 10 批温经汤水提液 HPLC 图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版进行色谱峰匹配,经处理后共标定 39 个共有峰,并确定 6 个共有峰,分别为绿原酸,甘草酸铵,桂皮醛,丹皮酚,吴茱萸碱和吴茱萸次碱,见图 2。

2.5.3 相似度评价

利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版软件计算分析,10 批温经汤供试品色谱图中特征共有峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1%,相对峰面积的 RSD 均小于 6%,色谱图相似度均 > 0.98,表明批次间差异较小,制备工艺稳定,方法准确可靠,见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

温经汤由十二味中药组成,成分复杂,单一波长下很难对全汤中所有化学成分进行检测。本研究采用二极管阵列检测器进行全波长扫描,比较了 210、230、254、275 nm 下样品色谱峰的分离情况,可见 254 nm 波长处共有峰数量较多,且分离度良好,部分峰具有较高相应,故最终选择 254 nm 波长进行检测。

3.2 流动相的选择

温经汤中化学成分多样,主要为甘草酸铵、桂皮醛、绿原酸、丹皮酚等成分,本研究考察了常用流动相甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水等条件,其中乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相时,供试品溶液色谱峰分离度等指标均优于其

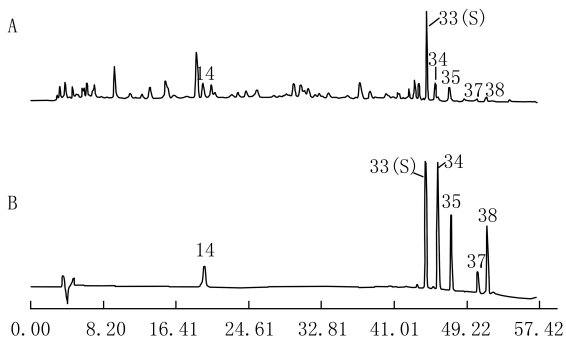


图 2 温经汤水煎液典型 HPLC 图

A.共有模式谱;B.混合对照品;14.绿原酸;33.甘草酸铵;
34.桂皮醛;35.丹皮酚;37.吴茱萸碱;38.吴茱萸次碱

表2 10批温经汤供试品相似度比较

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1	0.974	0.974	0.971	0.971	0.97	0.972	0.974	0.971	0.983	0.983
S2	0.974	1	0.976	0.971	0.971	0.968	0.973	0.977	0.972	0.992	0.984
S3	0.974	0.976	1	0.997	0.997	0.996	0.998	0.994	0.996	0.984	0.997
S4	0.971	0.971	0.997	1	0.999	0.999	0.998	0.996	0.999	0.981	0.997
S5	0.971	0.971	0.997	0.999	1	0.999	0.998	0.996	0.999	0.981	0.997
S6	0.97	0.968	0.996	0.999	0.999	1	0.998	0.995	0.998	0.978	0.996
S7	0.972	0.973	0.998	0.998	0.998	0.998	1	0.995	0.997	0.981	0.997
S8	0.974	0.977	0.994	0.996	0.996	0.995	0.995	1	0.995	0.986	0.997
S9	0.971	0.972	0.996	0.999	0.999	0.998	0.997	0.995	1	0.981	0.997
S10	0.983	0.992	0.984	0.981	0.981	0.978	0.981	0.986	0.981	1	0.991
对照指纹图谱	0.983	0.984	0.997	0.997	0.997	0.996	0.997	0.997	0.997	0.991	1

他,最终确定其为流动相,用梯度洗脱的方法对供试品进行分析。

3.3 指标性成分的选择

中药指纹图谱意在尽可能全面反映全汤的化学成分信息,用于指导后续新药开发的质量控制^[12,13]。温经汤中药材颇多,组方仔细,多成分协同发挥药效作用,其中不乏有毒性成分存在,故选择指标性成分时应综合考虑全方,选取具有代表性、药效相关性强及潜在毒性成分作为该方指标性成分,为后续含量测定等一系列质控环节提供基础。最终,本研究选择了甘草酸铵,桂皮醛,丹皮酚,吴茱萸碱,吴茱萸次碱和绿原酸作为质控的指标性成分,多角度为温经汤内在质量作出了更科学的评价。

综上,本研究建立了古代经典名方温经汤的HPLC-DAD指纹图谱,对部分共有峰进行了化学成分指认,初步反映了温经汤中整体化学特征,检测方法简单可行,重复性、稳定性良好,为温经汤的质量控制提供了新的评价模式,也为其他古代经典名方开发的质量控制研究提供了科学的方法借鉴。

【参考文献】

[1] 魏春,武亿红.基于《金匮要略》温经汤方证相应规律的文献统计分析[J].中国中医急症,2012,21(11):1785-1800.

- [2] 杨荣英.温经汤治疗妇科病举隅[J].中国民间疗法,2010,18(7):36.
- [3] 王萍,黎明全.经方治疗月经不调体会[J].亚太传统医药,2016,16(14):122-123.
- [4] 唐卓,刘宇新.温经汤治疗原发性寒凝血瘀型痛经的疗效观察80例[J].中医临床研究,2015,7(31):95-97.
- [5] 张晓珍.金匮温经汤治疗不孕不育的临床疗效观察[J].海峡药学,2015,27(10):159.
- [6] 温慧玲,程齐来,吴龙火,等.基于指纹图谱探讨吴茱萸不同炮制品成分的差异[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(5):76-80.
- [7] 王元清,韩彬,陈婷,等.桂枝指纹图谱的建立及识别模式研究[J].中药材,2017,40(7):1623-1628.
- [8] 张慧,王涛,陈杰,等.白芍多波长叠加指纹图谱研究[J].中药材,2017,40(9):2121-2124.
- [9] 李成义,马艳茹,李越峰,等.西北地区商品甘草HPLC指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(9):129-132.
- [10] 钟永翠,别甜甜,翟文泽,等.牡丹皮炮制前后HPLC指纹图谱比较[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(10):71-75.
- [11] 孙世发.名方配伍分析及应用[M].北京:人民卫生出版社,2002:483-486.
- [12] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等.中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J].中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [13] 杨方良,张晶,孙国祥,等.中药组方指纹图谱研究方法和思路[J].色谱,2016,34(7):715-725.

【收稿日期】 2017-12-12 【修回日期】 2018-06-21

【本文编辑】 陈盛新