

## 四物汤的 HPLC 指纹图谱研究

黄月纯<sup>1</sup>, 魏 刚<sup>2\*</sup>, 刘翠玲<sup>2</sup>, 张琼丹<sup>2</sup>

(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405)

关键词: 四物汤; 指纹图谱; HPLC

摘要: 目的: 建立四物汤(熟地黄, 当归, 白芍和川芎) HPLC 指纹图谱分析方法。方法: 采用 Zorbax SB-Aq 色谱柱; 流动相为乙腈-0.05% 磷酸溶液(梯度洗脱); 白芍特征峰的检测波长为 230 nm, 熟地黄、当归与川芎特征峰的检测波长为 290 nm; 流速为 1 mL/min; 柱温为 35 ℃。结果: 在 230 nm 条件下, 四物汤中共标示出白芍的 10 个共有峰; 在 290 nm 条件下, 共标示出熟地黄、当归与川芎的 17 个共有峰。结论: 方法准确可靠, 重复性好, 为四物汤物质基础研究提供了一定参考。

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2011)03-0379-04

## HPLC fingerprint analysis of Siwu Decoction

HUANG Yue-chun<sup>1</sup>, WEI Gang<sup>2</sup>, LIU Cui-ling<sup>2</sup>, ZHANG Qiong-dan<sup>2</sup>

(1. The First Hospital Affiliated to Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 2. Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

KEY WORDS: Siwu Decoction; fingerprint; HPLC

ABSTRACT: AIM: To establish the method for analysing fingerprint of Siwu Decoction (*Rehmannia radix praeparata*, *Angelicae sinensis radix*, *Paeoniae radix alba* and *Chuanxiong radix*). METHODS: HPLC with Zorbax SB-Aq was used, acetonitrile-0.05% phosphoric acid (gradient elution) as a mobile phase, detection wavelength was set at 230 nm for *Paeoniae radix Alba* and at 290 nm for *Rehmannia radix praeparata*, *Angelicae sinensis radix* and *Chuanxiong*, flow rate was 1 mL/min, and column temperature was 35 ℃. RESULTS: Ten common peaks originated from *Paeoniae radix Alba* were separated from Siwu Decoction at 230 nm; Seventeen common peaks were separated at 290 nm, stemmed from *Rehmannia radix praeparata*, *Angelicae sinensis radix* and *Chuanxiong radix*. CONCLUSION: The method is reliable, accurate and provides a reference for the material base of Siwu Decoction.

四物汤载于《太平惠民和剂局方》,由熟地黄、当归、白芍、川芎组成。熟地为君,滋阴养血、填精补髓,辅以当归补血养肝、活血调经,佐以白芍,和营养肝,使以川芎,活血行滞,自古以来就是补血调血的基础方剂,历来被中医临床用于治疗各种血虚证,包括冲任虚损、月经不调、崩中漏下及血瘀块硬、时发疼痛等<sup>[1-2]</sup>。近年,对四物汤的质量研究方面已有文献报道<sup>[3-6]</sup>,但指纹图谱研究不够完善。根据本方药味所含成分理化性质的差异<sup>[7-8]</sup>,采用一种分析方

法,难以全面地反映四物汤的质量。因此,本研究采用两种检测波长对四物汤进行指纹图谱分析,为四物汤物质基础研究提供一定参考。

### 1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 二极管阵列检测器(美国安捷伦公司); 阿魏酸(批号 0773-9708)、5-羟甲基糠醛(批号 111626-200804)、没食子酸(批号 10831-200302)、芍药苷(批号 110736-200933)、苯甲酸(批号 100419-

收稿日期: 2010-05-24

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B060401010)

作者简介: 黄月纯(1968-),女,主任中药师,硕士生导师,主要从事中药质量标准与指纹图谱研究。Tel: (020) 36591724, E-mail: huangyuechun@163.com

\* 通讯作者: 魏 刚(1969-),男,研究员,硕士生导师,主要从事中药新药研究与指纹图谱分析。Tel: (020) 39358166, E-mail: weigang021@163.com

200301) 与儿茶素对照品(批号 110877-200001), 由中国药品生物制品检定所提供; 熟地黄、白芍、当归与川芎饮片, 分别购于广东多家药材公司, 经广州中医药大学第一附属医院黄月纯主任中药师鉴定, 熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* BgeLi-bisch. 的干燥块根的炮制加工品, 白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎, 以上四种饮片均符合中国药典 2005 版一部项下的质量要求, 10 批饮片按四物汤处方量配成 10 批; 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Zorbax SB-Aq (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈 - 0.05% 磷酸溶液(梯度洗脱: 0 ~ 20 min, 乙腈为 5% → 10%; 20 ~ 30 min, 乙腈为 10% → 13%; 30 ~ 40 min, 乙腈为 13% → 20%; 40 ~ 45 min, 乙腈为 20%; 45 ~ 65 min, 乙腈为 20% → 50%; 65 ~ 70 min, 乙腈为 50% → 55%); 流速为 1 mL/min, 柱温为 35℃; 白芍特征峰采用 230 nm 检测波长, 熟地黄、当归与川芎采用 290 nm 检测波长为宜。

### 2.2 对照品溶液的制备

取没食子酸、儿茶素、苯甲酸、芍药苷对照品适量, 用 60% 甲醇溶解配制成浓度分别为 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液; 取 5-羟甲基糠醛、阿魏酸对照品适量, 用 60% 甲醇溶解配制成浓度分别为 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

按四物汤的处方配比(熟地黄、白芍、当归与川芎为 12 : 12 : 10 : 8), 取 2.5 日剂量的饮片, 加水 800 mL, 浸泡 30 min, 加热煮沸后文火慢煎 40 min, 取出, 趁热滤过, 药渣再加水 500 mL 加热煮沸后文火慢煎 30 min, 取出, 趁热滤过, 合并两次煎液, 放冷, 置 500 mL 量瓶中, 加水至刻度, 得全方煎剂。精密吸取四物汤煎液 4 mL, 精密加入甲醇 6 mL, 放置 2 h, 超声处理 20 min, 取出, 放冷, 离心, 取上清液置 10 mL 量瓶中, 加 60% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。取相同处方量的单味药及缺味药, 同法制成单味煎剂及缺味煎剂供试品溶液。

### 2.4 230 nm 检测波长的分析

2.4.1 精密度试验 分别精密吸取同一四物汤供试品溶液各 10 μL, 连续进样 5 次, 结果 10 个共有峰

的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%。

2.4.2 稳定性试验 精密吸取同一四物汤供试品溶液各 10 μL, 分别在 0、2.5、5、10、24 h 进样 5 次。结果 10 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

2.4.3 重复性试验 分别取同一批饮片 5 份, 按供试品溶液的制备方法操作, 各取供试品溶液 10 μL, 依法进样分析, 结果 10 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值均小于 5.0%。

2.4.4 样品的测定 精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 10 μL, 按拟定方法进样分析。

### 2.4.5 白芍指纹图谱的建立与分析

2.4.5.1 共有峰的确定 分析 10 批四物汤样品, 检出 33 ~ 38 个特征峰, 经白芍单味煎剂及缺白芍煎剂对照, 确定了 10 个共有峰, 均为白芍的特征成分, 见图 1。各样品的出峰总数及其共有峰所占比例、共有峰面积及其所占比例见表 1。

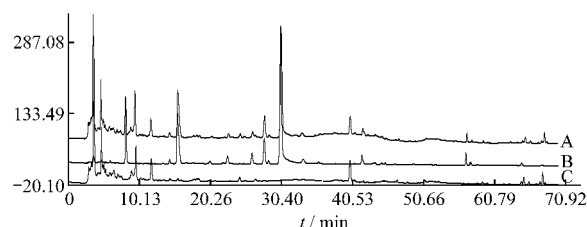


图 1 四物汤 HPLC 图谱(230 nm)  
(A. 四物汤 B. 白芍煎剂 C. 缺白芍煎剂)

Fig. 1 HPLC chromatograms of Siwu Decoction (230 nm)

表 1 样品出峰数及峰面积分析结果(230 nm)

Tab. 1 Results of peak numbers and areas of Siwu Decoction (230 nm)

| 样品号 | 出峰总数/个 | 共有峰数/个 | 共有峰数所占比例/% | 共有峰面积 | 总峰面积  | 共有峰面积% |
|-----|--------|--------|------------|-------|-------|--------|
| S1  | 33     | 10     | 30.30      | 8423  | 13763 | 61.20  |
| S2  | 36     | 10     | 27.78      | 8683  | 15486 | 56.07  |
| S3  | 38     | 10     | 26.32      | 11445 | 17127 | 66.82  |
| S4  | 34     | 10     | 29.41      | 8568  | 14547 | 58.90  |
| S5  | 38     | 10     | 26.32      | 8881  | 15913 | 55.81  |
| S6  | 34     | 10     | 29.41      | 8592  | 13415 | 64.04  |
| S7  | 36     | 10     | 27.78      | 8796  | 13900 | 63.28  |
| S8  | 34     | 10     | 29.41      | 9962  | 14828 | 67.19  |
| S9  | 35     | 10     | 28.57      | 10447 | 16115 | 64.83  |
| S10 | 36     | 10     | 27.78      | 9368  | 14651 | 63.94  |

2.4.5.2 共有峰的鉴别 通过对照品对照及参考文献<sup>[1]</sup>共鉴别了 7 个特征峰, 峰 1、峰 3、峰 4、峰 6、峰 7、峰 8、峰 9 分别为没食子酸、芍药苷亚硫酸酯、

儿茶素、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、苯甲酰芍药苷。

2.4.5.3 共有峰的分析 以芍药苷峰为参照峰进行计算,各共有峰的分析结果见表 2。

表 2 四物汤 HPLC 指纹图谱分析结果(230 nm)  
Tab. 2 Results of HPLC fingerprint of Siwu Decoction (230 nm) Results

| 峰号     | 相对保留时间 | 相对峰面积( $\bar{x} \pm S$ ) |
|--------|--------|--------------------------|
| 峰 1    | 0.2737 | 0.2362 $\pm$ 0.0380      |
| 峰 2    | 0.4800 | 0.0589 $\pm$ 0.0220      |
| 峰 3    | 0.5150 | 0.8090 $\pm$ 0.1820      |
| 峰 4    | 0.7464 | 0.0367 $\pm$ 0.0150      |
| 峰 5    | 0.8624 | 0.0354 $\pm$ 0.0130      |
| 峰 6    | 0.9233 | 0.2615 $\pm$ 0.0560      |
| 峰 7(s) | 1.0000 | 1.0000                   |
| 峰 8    | 1.1128 | 0.0569 $\pm$ 0.0110      |
| 峰 9    | 1.8887 | 0.0398 $\pm$ 0.0040      |
| 峰 10   | 1.9092 | 0.0126 $\pm$ 0.0026      |

2.4.5.4 相似度分析 以国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版),计算相似度,结果在 0.914 ~ 0.991 之间。共有模式 1 见图 2。

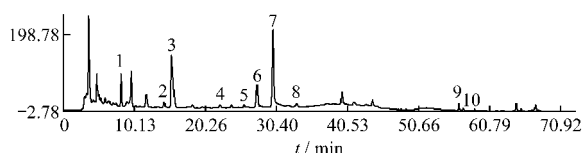


图 2 10 批四物汤生成的指纹图谱共有模式 1(230 nm)  
Fig. 2 Common Pattern 1 of HPLC fingerprint of Siwu Decoction (230nm)

2.5 290 nm 检测波长的分析

2.5.1 精密度试验 分别精密吸取同一四物汤供试品溶液各 10  $\mu$ L,按拟定方法连续进样 5 次,结果

表 3 样品出峰数及峰面积分析结果(290 nm)  
Tab. 3 Results of peak numbers and areas of Siwu Decoction (290 nm)

| 样品号 | 出峰总数/个 | 共有峰数/个 | 共有峰数所占比例/% | 共有峰面积 | 总峰面积  | 共有峰面积% |
|-----|--------|--------|------------|-------|-------|--------|
| S1  | 34     | 17     | 50.00      | 9610  | 11646 | 82.52  |
| S2  | 35     | 17     | 48.57      | 12515 | 14766 | 84.76  |
| S3  | 37     | 17     | 45.95      | 7415  | 9721  | 76.28  |
| S4  | 36     | 17     | 47.22      | 12082 | 14197 | 85.10  |
| S5  | 35     | 17     | 48.57      | 12686 | 15129 | 83.85  |
| S6  | 38     | 17     | 44.74      | 4900  | 6768  | 72.40  |
| S7  | 36     | 17     | 47.22      | 9809  | 11472 | 85.51  |
| S8  | 38     | 17     | 44.74      | 8180  | 10164 | 80.48  |

2.5.5.2 共有峰的鉴定 以对照品对照,鉴定了 2 个共有峰,其中峰 4 为 5-羟甲基糠醛、峰 11 为阿魏

17 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%。

2.5.2 稳定性试验 精密吸取同一四物汤供试品溶液各 10  $\mu$ L,分别在 0、2.5、5、10、24 h 进样 5 次。结果 17 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%,表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

2.5.3 重复性试验 分别取同一批饮片 5 份,按供试品溶液的制备方法操作,各取供试品溶液 10  $\mu$ L,依法进样分析,结果 17 个共有峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 值均小于 5.0%。

2.5.4 样品的测定 精密吸取对照品溶液及供试品溶液各 10  $\mu$ L,按拟定方法进样分析。

2.5.5 指纹图谱的建立与分析

2.5.5.1 共有峰的确定 分析 10 批四物汤样品,检出 34 ~ 38 个特征峰,经单味煎剂及缺味煎剂对照,确定了 17 个共有峰,其中 6 个峰归属熟地黄,其余归属当归与川芎的相同类成分,见图 3。各样品的出峰总数及其共有峰所占比例、共有峰面积及其所占比例见表 3。

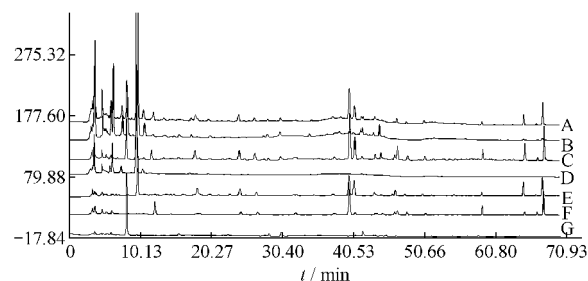


图 3 四物汤 HPLC 图谱(290 nm)  
Fig. 3 HPLC Chromatograms of Siwu Decoction (290nm)  
A. 四物汤 B. 缺当归、川芎煎剂 C. 缺熟地黄煎剂  
D. 熟地黄煎剂 E. 川芎煎剂 F. 当归煎剂  
G. 缺熟地黄、当归、川芎煎剂

酸。  
2.5.5.3 共有峰的分析 以阿魏酸峰为参照峰进

行计算,各共有峰的分析结果见表 4。

表 4 四物汤 HPLC 指纹图谱分析结果(290 nm)

Tab. 4 Results of HPLC fingerprint of Siwu Decoction (290 nm)

| 峰号       | 相对保留时间  | 相对峰面积 ( $\bar{x} \pm s$ ) | 峰位归属     |
|----------|---------|---------------------------|----------|
| 峰 1      | 0.148 5 | 0.661 3 $\pm$ 0.193 4     | 熟地黄      |
| 峰 2      | 0.156 8 | 0.923 4 $\pm$ 0.432 4     | 熟地黄      |
| 峰 3      | 0.189 1 | 0.573 9 $\pm$ 0.202 4     | 熟地黄      |
| 峰 4      | 0.242 3 | 9.877 3 $\pm$ 3.009 6     | 熟地黄 + 川芎 |
| 峰 5      | 0.266 6 | 0.341 7 $\pm$ 0.070 1     | 熟地黄      |
| 峰 6      | 0.296 3 | 0.317 3 $\pm$ 0.048 8     | 当归       |
| 峰 7      | 0.433 9 | 0.105 1 $\pm$ 0.030 4     | 熟地黄      |
| 峰 8      | 0.453 2 | 0.150 6 $\pm$ 0.122 5     | 川芎       |
| 峰 9      | 0.602 7 | 0.267 8 $\pm$ 0.113 4     | 当归 + 川芎  |
| 峰 10     | 0.661 3 | 0.090 5 $\pm$ 0.020 0     | 当归 + 川芎  |
| 峰 11 (s) | 1.000 0 | 1.000 0                   | 当归 + 川芎  |
| 峰 12     | 1.019 9 | 0.283 3 $\pm$ 0.216 4     | 当归 + 川芎  |
| 峰 13     | 1.166 0 | 0.076 1 $\pm$ 0.023 3     | 当归 + 川芎  |
| 峰 14     | 1.476 3 | 0.045 6 $\pm$ 0.010 4     | 当归 + 川芎  |
| 峰 15     | 1.625 6 | 0.341 6 $\pm$ 0.118 7     | 当归 + 川芎  |
| 峰 16     | 1.670 8 | 0.041 0 $\pm$ 0.013 4     | 当归 + 川芎  |
| 峰 17     | 1.693 3 | 0.488 9 $\pm$ 0.130 8     | 当归 + 川芎  |

2.5.5.4 相似度分析 以国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A 版),计算相似度,结果在 0.942 ~ 0.999 之间。共有模式 2 见图 4。

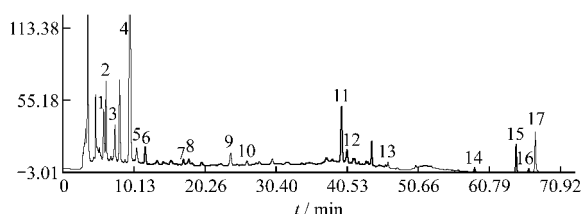


图 4 10 批四物汤生成的指纹图谱共有模式 2(290 nm)

Fig. 4 Common pattern 2 of HPLC fingerprint of Siwu Decoction(290 nm)

### 3 讨论

本研究筛选了色谱柱的型号、流动相系统及梯度,采用两种检测波长可对方中四味药的特征峰均进行分析。

白芍的特征成分的含量较高,取汤剂加一定量的甲醇处理制备供试液,即可获得较理想的分离效

果。汤剂中的当归与川芎特征成分的含量相对较低,曾试验采用有机溶媒萃取富集的方法制备供试液,但由于萃取对不同极性成分萃取效果的差异与浓缩过程部分成分损失,易造成特征峰相对比例的变化,不能体现汤剂中主要成分含量的相对比例,因此,分析熟地黄、当归与川芎的特征成分,采用与分析白芍特征成分的相同供试液。

230 nm 波长能检测四物汤中白芍的 10 个特征峰,与白芍饮片特征峰基本一致<sup>[7]</sup>。290 nm 波长检测的 17 个特征峰中,峰 1~5,峰 7 归属熟地黄,峰 4 为熟地黄与川芎所共有,峰 1、峰 3、峰 4 的紫外光谱基本一致,可能同属一类成分;峰 6 归属当归,峰 8 归属川芎,峰 4 部分归属川芎,峰 9~17 均归属当归与川芎,成分鉴别还有待于进一步研究。

通过 10 批四物汤的分析,不同批次汤剂均具有所标示的共有峰,说明建立四物汤指纹图谱的可行性。230 nm 检测波长下 10 样品的相似度在 0.914 ~ 0.991 之间,290 nm 检测波长下 10 样品的相似度在 0.942 ~ 0.999 之间。本研究为四物汤物质基础探讨提供了一定参考,同时亦为含熟地黄、白芍、当归、川芎的复方煎剂指纹图谱研究提供一定参考。

### 参考文献:

- [1] 陈 奇. 中成药名方药理与临床 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1998:477.
- [2] 李庆业. 方剂学 [M]. 北京:中国医药科技出版社,1989:142.
- [3] 黄月纯,刘翠玲,张琼丹,等. 四物汤煎剂中四种成分的含量测定研究 [J]. 现代中药研究与实践,2010,24(4):64-67.
- [4] 梁乾德,马百平,王升启. 液相色谱/蒸发光散射测定四物汤煎液中单糖和双糖的含量 [J]. 中草药,2004,35(4):395-397.
- [5] 李 媛,鲁定国,雷艳青,等. 四物汤传统饮片汤剂与配方颗粒汤剂中阿魏酸、芍药苷含量比较 [J]. 中药材,2008,31(1):125-128.
- [6] 雷 鹏,流 韶,李新中,等. 四物汤传统饮片汤剂、现代颗粒汤剂的特征色谱比较 [J]. 中国医院药学杂志,2003,23(12):743-744.
- [7] 黄月纯,魏 刚,刘翠玲,等. 白芍 HPLC 特征指纹图谱的稳定性考察 [J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):280-284.
- [8] 曾彩芳,张素中,黄月纯. 热处理对川芎煎剂 HPLC 特征指纹图谱的影响 [J]. 中药新药与临床药理,2010,21(4):410-412.