

真武汤的 HPLC 指纹图谱研究

罗国安^{1,2}, 付婵^{2,3}, 李莎莎¹, 韩凌¹, 王义明^{1,2,3}, 卢传坚¹

(1 广东省中医院中心实验室, 广州 510120; 2 清华大学分析中心, 北京 100084;

3 江西中医学院研究生部, 南昌 330004)

摘要 目的: 应用 HPLC 法建立真武汤的指纹图谱。方法: 以 Phenomenex Luna C₁₈ 5 μm 反相色谱柱为分析柱, 0.025% 甲酸水溶液 (用氨水调 pH = 3.5) - 乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 242 nm, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL。结果: 本色谱条件下真武汤各成分得到较好的分离, 经方法学验证, 该方法具良好精密度、重复性和稳定性。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2004A 版) 进行指纹图谱分析, 10 批真武汤样品相似度均在 0.90 以上。结论: 本方法建立的真武汤指纹图谱, 用于真武汤的质量控制。

关键词: 真武汤; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0892-04

Study on HPLC fingerprint chromatography of Zhenwu decoction

LUO Guo-an^{1,2}, FU Chan^{2,3}, LI Sha-sha¹, HAN Ling¹,

WANG Yi-ming^{1,2,3}, LU Chuan-jian¹

(1. Guangdong Provincial Hospital Guangzhou 510120, China; 2. Analysis Center of Tsinghua University, Beijing 100084, China;

3. Jiangxi Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract Objective To establish HPLC fingerprint of analyzing Zhenwu decoction **Methods** The separation was applied with a Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column by gradient elution with acetonitrile - 0.025% formic acid solution (adjusted to pH 3.5 with aqueous ammonia) as the mobile phase. The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 242 nm. The injection volume was 20 μL and the column temperature was maintained at 30 ℃. **Results** Among the obtained fingerprint, the most of the detected peaks were separated effectively. The accuracy, repeatability and stability of this method were satisfied. The operating standard of Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica (Version 2004A) was used to calculate Similarity of 10 batches of Zhenwu decoction samples was higher than 0.90. **Conclusion** The method can be well used for the component analysis and the quality control of Zhenwu decoction.

Key words Zhenwu decoction; fingerprint chromatography; HPLC

真武汤出自《伤寒论》是张仲景温阳化水之方, 由炮附子、茯苓、白术、白芍、生姜 5 味药组成, 具有温阳利水的功效, 主治脾肾阳虚、水气内停及太阳病、心下悸、头晕眩等症^[1]。方中附子温肾助阳使水有所主, 兼温脾土。茯苓、白术健脾祛湿, 使水气从小便而利; 生姜既助附子温中散寒, 又能温散水饮, 配合苓、术以行水气; 芍药和里益阴, 《本经》谓其能“利小便”。全方温阳与利水并用且佐以敛阴之品, 使之温热不伤阴, 敛阴不助邪。后世医家推崇

此为温阳利水的代表方, 广泛应用于临床各科疾病, 尤其在慢性肾脏病中应用甚广^[2]。

中药指纹图谱是通过现代的分析检测手段对复杂物质体系特征的一种阐释^[3], 是目前一种能够为国内外广泛接受的中药质量评价模式^[4]。中药复方的指纹图谱应将复方中的所有有效成分尽可能多地表现出来, 这样才可能认为是起到表现出中药复方的整体观念、协同配合, 即表现出其质量^[5], 应满足特征性、重现性和可操作性, 才能满足指纹图谱的

实用要求^[6]。本实验采用 HPLC 方法,建立了真武汤的指纹图谱,尽可能较为全面地反映其整体的化学成分,为中药复方真武汤药效物质研究以及质量控制奠定基础。经方法学验证,该方法具良好精密、重复性和稳定性。

1 仪器、试剂与药材

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪,包括在线脱气机、二极管阵列检测器、Chemstation 色谱工作站等; Agilent 1100 LC MSD TOF 飞行时间质谱仪; Agilent 1100 LC MSD Trap 离子阱质谱仪; Milli Q 超纯水仪(自制); BS110S 型电子天平(万分之一,德国 Sartorius 公司); KQ-500E 超声波处理器(昆山超声设备有限公司)。

1.2 试剂和药材 乙腈为色谱纯(Fisher),甲酸、醋酸、醋酸铵、氨水均为分析纯(北京现代东方精细化学制品有限公司),超纯水(自制)。炮附子系毛茛科乌头属乌头 *Aconitum camichaelii* Debx 的子根,按 2010 年版《中华人民共和国药典》一部附子项下炮制,由广东省中医院提供;茯苓(*Poria cocos* (Schw.) Wolf)、白术(*Atractylodes macrocephala* Koilz)和白芍(*Paeonia lactiflora* Pall)购于北京同仁堂;生姜(*Zingiber officinale* Rosc)购于清华大学照澜园,符合《中华人民共和国药典》2010 年版一部中有关规定。

2 方法和结果

2.1 供试品溶液的制备 称取炮附子、茯苓、白芍、生姜各 9 g 白术 6 g 附子洗净后加入水 300 mL,大

火煎至沸腾后改至小火(保持微沸状态)煎煮 1.5 h。茯苓、白术、白芍、生姜洗净后,用冷水浸泡 20 min 弃去浸泡液,于 1.5 h 处一起加入与附子共煎。同样先用大火煎至沸腾后改至小火(保持微沸状态)煎煮 1.5 h 过滤煎煮液,过 0.45 μm 针头滤器,即得。

2.2 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: A 相为 0.025% 甲酸水溶液(用氨水调 pH = 3.5), B 相为乙腈,按表 1 程序进行梯度洗脱; 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长: 242 nm; 进样量: 20 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Mobile phase gradient program

时间 (time) / min	流动相 (mobile phase) A - B
0	97.5 : 2.5
25	88 : 12
45	83 : 17
55	80 : 20
87	20 : 80
93	0 : 100

2.3 测定方法 精密吸取供试品溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图和各色谱峰的保留时间。以面积归一化法计算峰面积较大的 10 个共有峰的相对峰面积,由于 7 号峰分离度较好,峰面积较大,出峰时间适中,且比较稳定,故确定其作为参照峰。结果如图 1 所示。

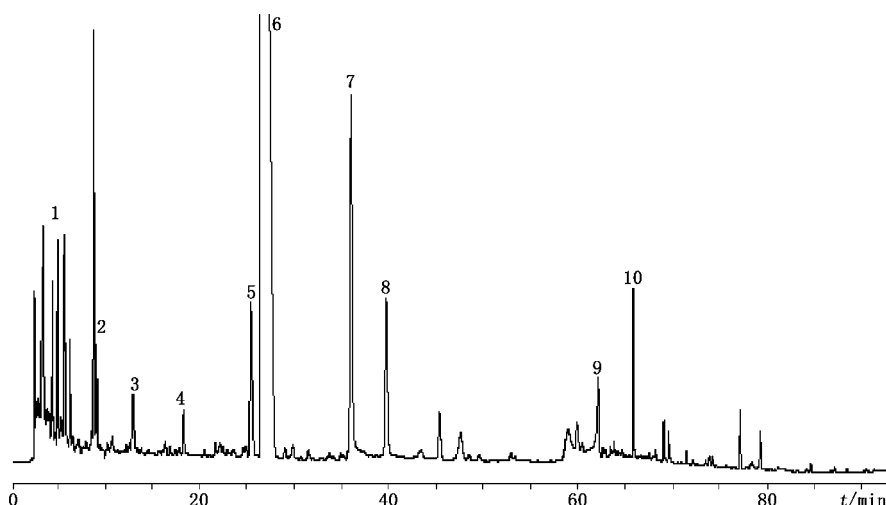


图 1 真武汤的 HPLC 指纹图谱

Fig 1 HPLC fingerprint of Zhenwu decoction

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份真武汤供试品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,测定其 HPLC 色谱图,以

7 号峰为参照峰,考察各共有色谱峰的保留时间和峰面积的一致性。结果各共有色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 0.00% ~ 0.53%, 相对峰面积的 RSD 为

0.63% ~ 3.66%, 均小于 5%, 符合指纹图谱的要求。

2.4.2 重复性试验 取同一批药材, 按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 测定其 HPLC 色谱图, 以 7 号峰为参照峰, 考察各共有色谱峰的保留时间和峰面积的一致性。结果各共有色谱峰相对保留时间的 RSD 为 0.01% ~ 0.69%, 相对峰面积的 RSD 为 1.01% ~ 4.02%, 均小于 5%, 符合指纹图谱的要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一份真武汤供试品溶液, 分别在 0 4 8 12 16 20 h 进样分析, 测定其 HPLC 色谱图, 以 7 号峰为参照峰, 考察各共有色谱峰的保留时间和峰面积的一致性。结果各共有色谱峰的相对保留时间的 RSD 为 0.00% ~ 0.55%, 相对峰面积的 RSD 为 0.63% ~ 3.66%, 均小于 5%。表明供试品溶液在常温实验条件下稳定性较好, 在 20 h 时间内能保证实验结果的科学可靠, 符合指纹图谱的要求。

2.5 指纹图谱分析

2.5.1 共有峰的鉴定 使用飞行时间质谱 (TOF-MS) 和离子阱多级质谱 (Trap-MSⁿ) 对真武汤中所含成分进行鉴定分析, 飞行时间质谱检测条件: LC/MS 系统使用 ESI 离子源, 采用分流设置, 分流比约为 1:3 在正离子模式与负离子模式下分别采集数据。扫描质量范围: m/z 50~1200 毛细管电压: 3.5 kV (负模式), 4.0 kV (正模式); 干燥气流速: $9\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 干燥气温度: 350 °C; 雾化气压: 241.3 kPa 碎裂电压 190 V。Skimmer 电压 60 V, 八极杆 DC1 电压 -38.0 V, 八极杆射频电压 250 V。选择内标校准液做实时质量数校正。实验数据采用 Analyst QS

软件处理。测定样品之前, 使用校正液校准质量轴, 以保证质量精度误差小于 2×10^{-6} 。元素组成计算参数设定如下: $C\leq 50\ H\leq 100\ O\leq 30$ 环加双键数: 0~30 电子状态: 偶数; 带电个数: +1; 容许质量范围: 5×10^{-6} 。离子阱多级质谱检测条件: LC/MS 系统使用 ESI 离子源, 采用分流设置, 分流比约为 1:3 在正离子模式与负离子模式下分别采集数据, 自动三级碎片分析, 扫描质量范围: m/z 50~1200 毛细管电压: 3.5 kV (负模式), 4.0 kV (正模式); 干燥气流速: $9\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 干燥气温度: 350 °C; 雾化气压: 241.3 kPa 目标相对分子质量: 622 化合物稳定性: 100%。推测 1 号峰为钠离子化的四糖, 2 号峰为没食子酸, 3 号峰为腺苷, 6 号峰为芍药苷硫酸酯, 7 号峰为芍药内酯苷, 8 号峰为 1,2,3,6-*O*-四没食子酰基葡萄糖, 9 号峰为苯甲酰芍药苷亚硫酸酯, 10 号峰为苯甲酰乌头原碱, 其中 1 号、3 号峰来自于茯苓药材, 2 号、6 号、7 号、8 号、9 号峰来自于白芍药材, 10 号峰来自于炮附子药材, 4 号、5 号峰尚未鉴定出。其他鉴定结果另发文章。

2.5.2 相似度分析 按“2.1”项下方法制备 10 批真武汤样品并制备成供试品溶液, 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2004 A 版), 计算真武汤样品指纹图谱的相似度。选择第 1 批样品的指纹图谱为参照图谱, 结果 10 批真武汤样品指纹图谱的相似度均在 0.90 以上, 指纹图谱的重叠图见图 2。

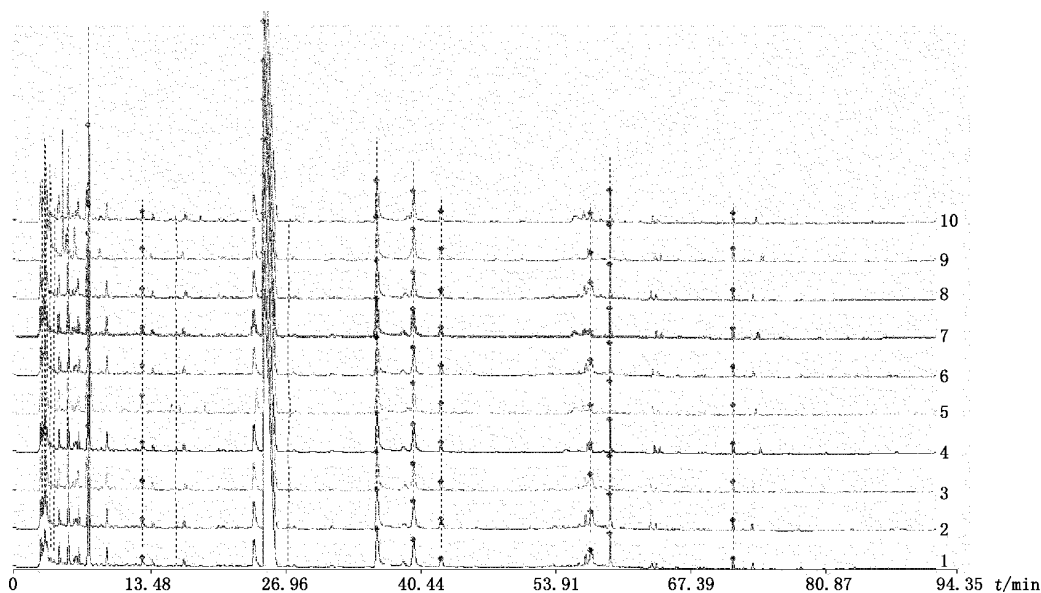


图 2 10 批真武汤样品指纹图谱重叠图

Fig 2 Fingerprint of 10 batches of Zhenwu decoction samples

3 讨论

3.1 检测波长的选择 采用光电二极管阵列检测器(DAD)于 190~400 nm 波长进行扫描,比较不同波长吸收峰的数量和强弱,真武汤主要成分在 230 nm、242 nm 波长处有最大吸收且吸收峰较多,但在 230 nm 波长处色谱峰基线漂移较严重,242 nm 下各色谱峰的分布均匀,峰形较好,且基线也较平稳。因此,确定 242 nm 为其分析的检测波长。

3.2 不同流动相添加剂的选择 真武汤中含多种酸性成分,如芍药苷呈弱酸性,加入一定的酸或缓冲溶液可起调节 pH 和离子抑制剂的作用,减少拖尾,使芍药苷与其他组分达到基线分离,提高灵敏度。参考相关文献^[7,8],大多在水相中加磷酸抑制芍药苷拖尾,但考虑 HPLC 与 MS 联用时要求使用挥发性酸,而磷酸为无机酸,无挥发性,本实验尝试了能与 MS 联用的甲酸、醋酸铵-醋酸缓冲盐、甲酸铵-甲酸缓冲盐流动相添加剂。使用甲酸时各成分能基本分离,但图谱中最大峰拖尾严重,加大甲酸量拖尾稍有改善,但随着甲酸量的增加,基线后半段向下漂移严重。使用醋酸铵-醋酸缓冲盐时最大峰的拖尾问题能基本解决,但出峰数减少,且加大添加剂的量时基线下移。使用甲酸铵-甲酸缓冲盐时各成分能较好分离,最大峰的拖尾问题能基本解决,且出峰数较多,基线较平稳。因此,确定使用甲酸铵-甲酸缓冲盐作为流动相添加剂。

3.3 流动相添加剂浓度的选择 分别考察了在水相的水相中加入 0.01%、0.015%、0.02%、0.025%、0.035% 的甲酸,再用氨水调 pH 至 3.8,发现随甲酸量的增加,图谱中各色谱峰峰形得到改善,拖尾缓解,峰变高变尖,但酸度加大到 0.035% 时在 242 nm 下基线后半段下移超过 20 mAU。因此,确定在水相中加入 0.025% 的甲酸(用氨水调 pH 3.8),这一适中的流动相添加剂浓度即能较好改善最大峰拖尾及各色谱峰峰形,又能保持基线平稳。

3.4 流动相 pH 的选择 分别考察了在水相中加入 0.025% 的甲酸,用氨水调 pH 3.0 3.2 3.5 3.8

4.5 4.7。发现随着流动相 pH 的升高,图谱中各色谱峰峰形得到改善,拖尾缓解,峰变高变尖,但加大到 pH 3.8 时,图谱中各色谱峰响应强度开始降低,峰变矮变胖。因此,确定在水相中加入 0.025% 的甲酸(用氨水调 pH 3.5),这一适中的流动相 pH 即能较好改善各色谱峰峰形,又能保持各色谱峰峰强度。

参考文献

- 1 JIA Jin-hui(贾进辉), FENG Li-hua(封丽华). Zhen Wu decoction with Western analysis of patients with congestive heart failure(真武汤加减配合西药治疗充血性心力衰竭临床分析). *Mod J Integr Tradit Chin West Med*(现代中西医结合杂志), 2008, 17(20): 3098
- 2 LIU Cai-xiang(刘彩香), GUO Li-zhong(郭立中). Zhen Wu Tang in chronic kidney disease in the research survey(真武汤在慢性肾脏病中的研究概况). *Tradit Chin Med Res*(中医研究), 2008, 21(4): 61
- 3 LUO Guo-an(罗国安), LIANG Qiong-lin(梁琼麟), WANG Yi-ming(王义明). Chinese Fingerprint Quality Assessment Quality Control and Drug Development(中药指纹图谱—质量评价、质量控制与新药研发). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2009: 11
- 4 LUO Guo-an(罗国安), WANG Yi-ming(王义明), CAO Jin(曹进), et al. Chinese medicine theory and practical application of fingerprints(中药指纹图谱理论和实际应用). *Clin Med J*(临床药物治疗杂志), 2006, 4(6): 6
- 5 LUO Guo-an(罗国安), WANG Yi-ming(王义明). Classification and development of TCM fingerprint(中药指纹图谱的分类和发展). *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2002, 11(1): 46
- 6 LI Yue-feng(李越峰), YAN Xing-ke(严兴科), SHEN Fei(沈菲), et al. HPLC fingerprinting similarity analysis of Radix Paeoniae Alba(白芍 HPLC 指纹图谱相似度的分析研究). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2008, 30(7): 942
- 7 CAO Xian-feng(曹现峰), SHEN Jia(沈嘉). Study on HPLC fingerprint determination Huanglianjiadu decoction(黄连解毒汤的 HPLC 指纹图谱测定条件初探). *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2003, 25(7): 519
- 8 ZHANG Ke-rong(张克荣), BI Kai-shun(毕开顺). HPLC fingerprinting similarity analysis of Radix Paeoniae Alba(白芍 HPLC 指纹图谱相似度的分析). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2004, 29(4): 380

(本文于 2010 年 7 月 28 日收到)