

凉膈散汤剂 HPLC-DAD 指纹图谱研究

胡建兰, 邵 萌, 余林中*

南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

摘要: 目的 研究凉膈散汤剂 HPLC-DAD 指纹图谱, 建立该方汤剂整体特征的质量评价方法。方法 采用 HPLC 法, 二极管阵列检测器 (DAD), Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 检测波长 235 nm, 柱温 38 °C。以黄芩苷作为参照峰, 测定 10 批凉膈散汤剂及各缺味药材阴性对照色谱图。结果 建立凉膈散汤剂的 HPLC 指纹图谱, 10 批样品的相似度均在 0.9 以上。标定了 22 个共有峰, 均归属到各药材, 其中 8 个色谱峰可明确其化学成分。结论 建立的 HPLC-DAD 指纹图谱准确稳定、重复性好, 体现了凉膈散汤剂组分的整体特征, 提高了对中药复方质量控制的专属性。

关键词: 凉膈散汤剂; HPLC; 指纹图谱; 中药复方; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)01-0050-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.010

HPLC-DAD fingerprint of Lianggesan Decoction

HU Jian-lan, SHAO Meng, YU Lin-zhong

Southern Medical University School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the fingerprint of Lianggesan Decoction and to establish a quality evaluation method for the overall features of the decoction. **Methods** The fingerprint was established by HPLC with Diode Array Detector (DAD) and Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), gradient eluted with methanol-0.1% phosphoric acid as mobile phase. The detection wavelength was at 235 nm, and column temperature was at 38 °C. Using baicalin peak as reference, the chromatograms of 10 batches of Lianggesan and negative control decoctions were established. **Results** The HPLC fingerprint of Lianggesan Decoction was established, the similarity of the 10 batches of samples was above 0.9, 22 common peaks were marked and attributed to the herbs. Eight chromatographic peaks were identified. **Conclusion** The established HPLC-DAD fingerprint is accurate, stable, and reproducible, which could reflect the overall characteristics of Lianggesan Decoction and improve the specificity for quality control of Chinese herbal formula.

Key words: Lianggesan Decoction; HPLC; fingerprint; Chinese herbal formula; quality control

凉膈散出自《太平惠民和剂局方》, 由连翘、大黄、栀子、黄芩、甘草、薄荷和芒硝 7 味药组成, 该方具有泻火通便、清上泻下功效, 主治上中二焦火热症^[1], 方中连翘为君药, 黄芩、栀子、大黄为臣药。目前关于方中各单味药的质量标准相关研究已有不少文献报道^[2-6], 但尚无凉膈散全方汤剂的指纹图谱相关研究。现行的通过 1~2 种化学成分表征中药质量的质控方法无法反映中药复方的物质基础和化学成分群的整体性和复杂性, 难以全面控制中药制剂内在质量^[7-9]。本研究采用 HPLC-DAD 法^[10-11]

建立凉膈散汤剂指纹图谱, 并对指纹色谱峰所代表的化学成分进行归属, 为该方的物质基础研究及质量控制提供科学依据。

1 仪器和材料

十万分之一天平 (Denver 公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪 (包括 G1311C1260 Quat 四元泵、G1329B 1260ALS 进样器、G1315D 1260DAD VL 检测器, 美国安捷伦公司); 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇 (色谱纯, Merck 公司)、屈臣氏蒸馏水,

收稿日期: 2013-08-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072747、81353739)

作者简介: 胡建兰 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药抗炎免疫药理。Tel: (020)61648540 E-mail: lan1101257@sina.com

*通信作者 余林中 (1962—), 男, 博士生导师。Tel: (020)61648262 E-mail: yulzh@smu.edu.cn

其他试剂均为分析纯。对照品栀子苷(批号 110749-201115)、甘草苷(批号 111610-201106)、连翘酯苷 A(批号 111810-201103)、连翘苷(批号 110821-201112)、黄芩苷(批号 110715-201117)、黄芩素(批号 111595-200905)、大黄酸(批号 110757-200206)、大黄素(批号 110756-200110)均购自中国食品药品检定研究院。10 批次凉膈散复方药材由南方医科大学中医药学院中药鉴定教研室刘传明教授鉴定,分别为木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实;蓼科植物掌叶大黄 *Rheum*

palmatum L. 的干燥根及根茎;唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根;茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis. 的干燥成熟果实;豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根及根茎;唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的地上干燥部分;硫酸盐类矿物芒硝 *Natrii Sulfas*。药材来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250

表 1 凉膈散汤剂药材来源

Table 1 Sources of traditional Chinese medicinal materials in Lianggesan Decoction

编号	药材来源	产地						
		连翘	大黄	黄芩	栀子	甘草	薄荷	芒硝
S1	广东致信中药饮片有限公司	河南	四川	河北	江西	广东	安徽	湖南
S2	广州采芝林药业有限公司	山西	四川	黑龙江	广西	内蒙古	广东	广西
S3	广州济和堂连锁药业有限公司	山西	四川	河北	江西	新疆	江苏	广东
S4	广州一笑堂医药连锁有限公司	山西	四川	河北	广西	甘肃	江苏	湖北
S5	广东致信中药饮片有限公司	河南	四川	河北	江西	内蒙古	安徽	湖南
S6	康美药业股份有限公司	山西	四川	河北	江西	内蒙古	江苏	青海
S7	广州仁和堂药业连锁有限公司	江西	河南	河北	贵州	内蒙古	广西	广西
S8	广州济善堂药店	陕西	安徽	安徽	广西	宁夏	贵州	广西
S9	广州康宁大药房	山西	四川	河北	江西	新疆	江苏	广东
S10	北京同仁堂广州药业连锁有限公司	山西	甘肃	内蒙古	江西	内蒙古	江苏	安徽

mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~16 min, 5%~25%甲醇; 16~30 min, 25%~37%甲醇; 30~60 min, 37%~70%甲醇; 60~80 min, 70%~95%甲醇; 80~85 min, 95%甲醇; 柱温为 38 °C; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 235 nm; 进样量为 10 μL; 检测时间为 85 min。

2.2 供试品溶液的制备

按处方比例称取连翘 24 g、大黄 12 g、栀子 6 g、黄芩 6 g、甘草 12 g、薄荷 6 g、芒硝 12 g。药材煎煮前 10 倍量水浸泡 30 min, 先煎连翘、栀子、甘草、黄芩 10 min, 后下大黄、薄荷煎煮 10 min。6 倍量水二煎 15 min, 合并 2 次煎液, 趁热加入芒硝, 四层纱布滤过, 浓缩至 200 mL, 4 °C 保存。

精密移取 2 mL 浓缩液加入 80%甲醇定容至 10 mL, 超声 20 min 后放至室温, 80%甲醇补足至刻度, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量, 加 80%甲醇配制成含黄芩苷 12 μg/mL、黄芩素 100 μg/mL、大黄素 1.6 μg/mL、大黄酸 3.2 μg/mL、连翘苷 100 μg/mL、连翘酯苷 A 20 μg/mL、栀子苷 100 μg/mL、甘草苷 20 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.4 参照峰的选择

在凉膈散汤剂指纹图谱中, 选择峰面积较大且稳定, 分离度较好的 13 号峰(黄芩苷)作为参照峰。在以下研究中, 均以各供试品溶液色谱图中黄芩苷色谱峰保留时间和峰面积值为参照, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

2.5 方法学考察

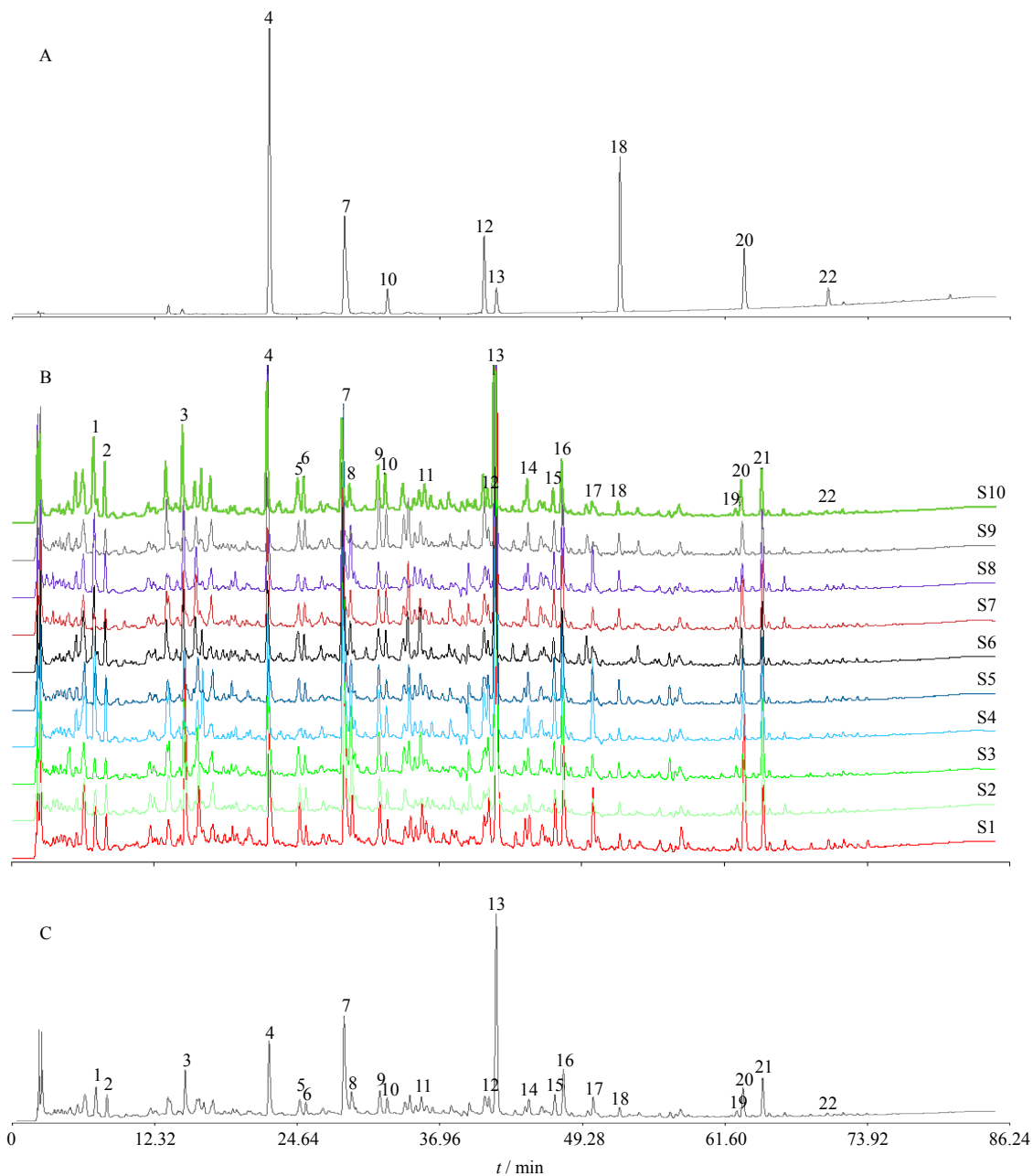
2.5.1 精密度试验 取“2.2”项下供试品溶液, 连续进样 5 次, 检测指纹图谱。考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果共有峰的相对保留时间 RSD<0.3%, 相对峰面积 RSD<3.0%, 表明精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取“2.2”项下供试品溶液，分别在0、3、6、12、24 h进样，检测指纹图谱。结果共有峰的相对保留时间RSD<0.5%，相对峰面积的RSD<4.0%，表明供试品溶液24 h内稳定。

2.5.3 重复性试验 取同批次药材5份，按“2.2”项下方法制备成供试品溶液，检测指纹图谱。结果共有峰的相对保留时间RSD<2.0%，相对峰面积的RSD<2.0%，表明该方法重复性良好。

2.6 指纹图谱研究

2.6.1 指纹图谱的建立及相似度评价 精密吸取10批供试品溶液和混合对照品溶液各10 μL，按上述色谱条件进样分析，检测指纹图谱，结果见图1。采用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”进行相似度计算，相似度测定结果S1~S10分别为0.946、0.922、0.963、0.961、0.945、0.916、0.982、0.958、0.972、0.924。由此可知，S3、



4-栀子苷 7-甘草苷 10-连翘酯苷 A 12-连翘苷 13-黄芩苷 18-黄芩素 20-大黄酸 22-大黄素
4-gardenoside 7-liquiritin 10-forsythoside A 12-phillyrin 13-baicalin 18-baicalein 20-rhein 22-emodin

图1 混合对照品(A)、10批样品(B)的HPLC图及生成的对照指纹图谱(C)

Fig.1 HPLC of mixed reference substances (A), 10 batches of samples (B) and comparative fingerprint (C)

S4、S7、S8、S9 相似度良好，均大于 0.95；S1、S2、S5、S6、S10 相似度大于 0.9，均符合要求。共检测出 22 个共有色谱峰，以 13 号峰黄芩苷为参照峰 (S)，计算各色谱峰相对保留时间和相对峰面积，结果相对保留时间的 RSD < 1.0%，相对峰面积的 RSD 介于 5.8%~79.6%。可知，各批次药材共有物质出峰时间大致相同，成分较稳定，但其量相差较大。

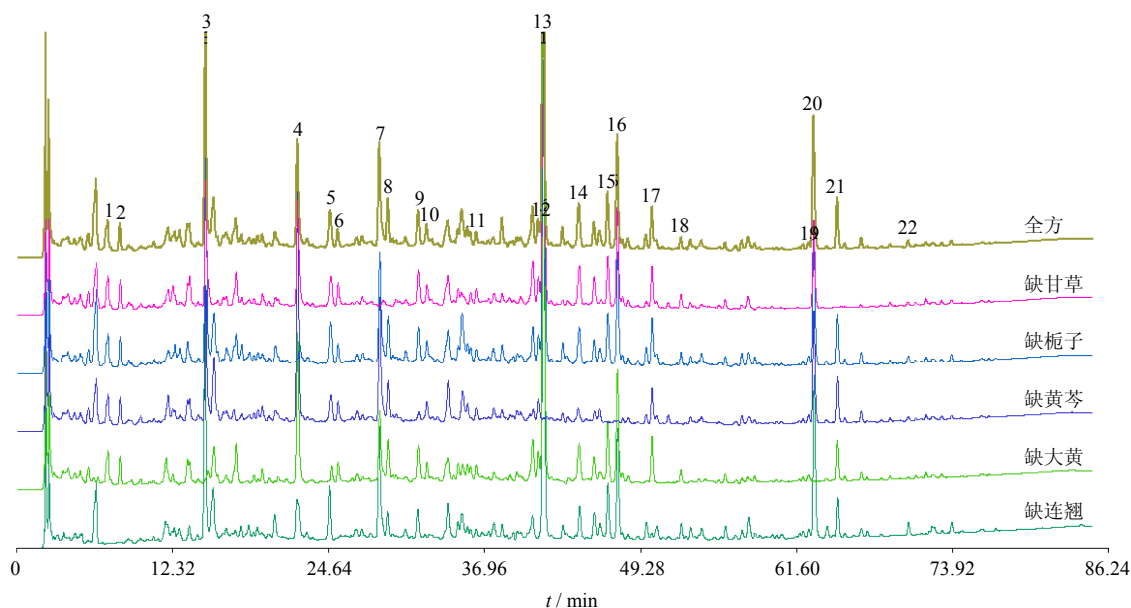


图 2 各缺味药汤剂阴性对照图

Fig. 2 Negative control fingerprint of each lack of medicine in Lianggesan Decoction

使用已有对照品对共有峰的成分进行指认，共指认了 8 个色谱峰，分别为 4 号峰 (栀子苷)、7 号峰 (甘草苷)、10 号峰 (连翘酯苷 A)、12 号峰 (连翘苷)、13 号峰 (黄芩苷)、18 号峰 (黄芩素)、20 号峰 (大黄酸)、22 号峰 (大黄素)。

2.6.3 样品色谱数据的系统聚类分析 以 10 批次凉膈散汤剂共有峰相对峰面积为变量，运用 SPSS 13.0 软件采用欧式距离进行系统聚类分析，见图 3。将 10 批样品分为 4 类，其中 S1、S4、S7、S9 分在第 I 类，S2、S8、S10 分在第 II 类，S3、S5 分在第 III 类，S6 分在第 IV 类。由分析结果可知，不同批次凉膈散汤剂质量存在一定差异。

3 讨论

3.1 煎煮方法的选择

实验初步考察了浸泡及煎煮时间对有效成分溶出的影响。结果发现，药材浸泡 30、60 min 后煎煮差异不大，但煎煮时间长短对有效成分溶出存在很大影响，考虑到药材本身及其他因素，最终选定

2.6.2 指纹图谱与组方药材的相关性分析 精密吸取供试品及缺连翘、大黄、黄芩、栀子、甘草药材阴性对照溶液各 10 μL 进行 HPLC 分析，色谱图见图 2。结合各峰紫外吸收图，通过对比分析，对 22 个共有峰进行归属，其中 1、2、6、10、12、17 号峰出自连翘，3、5、20、22 号峰出自大黄，7、8、19、21 号峰出自甘草，4 号峰出自栀子，9、11、13、14、15、16、18 号峰出自黄芩。

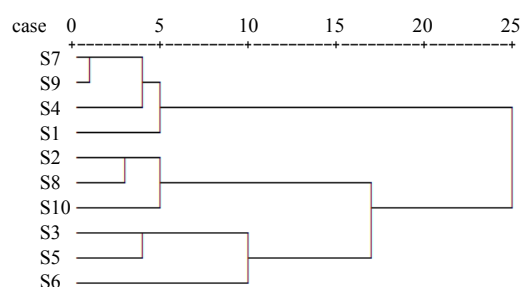


图 3 聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis

“2.2”项下供试品溶液制备方法。

3.2 色谱条件的选择

实验分别对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-0.1%磷酸水体系进行了梯度洗脱试验。结果表明，甲醇-0.1%磷酸水梯度洗脱系统有助于各色谱峰的分离，出峰数最多，分离度最好，且 85 min 内出峰完全。

实验采用 DAD 检测器进行 200~400 nm 范围

全波长扫描,对 220、235、254、280、330 nm 波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,供试品在 235 nm 检测波长下出峰数最多,各峰分离良好,特征峰明显且峰形较好,从图谱中可以较全面的获取色谱组分信息,故选择 235 nm 作为检测波长。依次考察了 25、30、35、38、40 °C 不同柱温,结果表明,柱温的变化对色谱峰峰形、保留时间影响较大,尤其是 7、8 号峰的分离,在 38 °C 柱温条件下各峰整体分离效果较好。

3.3 小结

中药指纹图谱研究作为一种多指标的质控模式可较全面反映复方中所含化学成分的种类和数量^[12],为中药质量评价提供了新思路和新方法,已日益成为国内外广泛接受的中药质量评价模式^[13]。本实验对凉膈散汤剂进行指纹图谱研究,共标定 22 个共有指纹峰,并归属到各药材,其中明确了 8 个色谱峰的化学成分。该方法简便易行且稳定可靠、重现性良好。采用相似度分析和聚类分析对不同批次凉膈散汤剂的指纹图谱进行评价,2 种评价分析方法获得的结果基本吻合,且不同批次相似度较好,均大于 0.9,说明不同来源凉膈散汤剂的化学组成一致性较好,但各批次样品共有物质的量差异较大。本研究采用 HPLC-DAD 方法建立凉膈散汤剂指纹图谱,为其质量研究奠定了一定的物质基础。

参考文献

- [1] 马晓梅,穆齐金. 略论凉膈散 [J]. 中国实用医药, 2008, 3(15): 161-162.
- [2] 张继全,沈平嬢,薛东升,等. 连翘药材 HPLC 指纹图

谱的研究 [J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5): 94-96.

- [3] Boyle S P, Doolan P J, Andrews C E, et al. Evaluation of quality control strategies in *Scutellaria* herbal medicines [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(5): 951-957.
- [4] 任淑娟,孙辉,丁野,等. 梔子药材的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 华西药学杂志, 2012, 27(3): 309-311.
- [5] 张然,胡昌江,李倩,等. 生大黄与一制至九制大黄 HPLC 指纹图谱的对比 [J]. 华西药学杂志, 2011, 26(4): 372-375.
- [6] 任子瑜,秦雪梅,薛黎明,等. 黄芩不同中医调剂品的 HPLC 指纹图谱比较研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 573-576.
- [7] 李倩,罗祖良,杨小丽. 中药质量控制方法研究述评 [J]. 中医学报, 2012, 27(4): 448-451.
- [8] 鄢丹,熊吟,马丽娜,等. 建立以临床功用为导向的中药质量评控格局与适宜模式的设想 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 1-5.
- [9] 赵超,李会军,陈君,等. 中药复杂成分解析与质量评价的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(3): 283-288.
- [10] Zhao W C, Song L J. Simultaneous determination of multiple bioactive constituents in total alkaloid of *Sophora alopecuroides* by HPLC-DAD [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(1): 66-69.
- [11] 王平,梁逸曾. HPLC-DAD-MS 研究黄芪的化学成分 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 226-229.
- [12] 李强,李超. 中药指纹图谱研究综述 [J]. 齐鲁药事, 2010, 29(3): 158-161.
- [13] 秦昆明,方前波,蔡宝昌,等. 指纹图谱技术在方剂现代研究中的应用现状 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(2): 287-293.