

栀子大黄汤 UFLC 指纹图谱研究

唐 峥¹, 毕开顺², 韩 飞², 朱鹤云², 陈科霖², 王粉绒², 尹 然^{2*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 建立栀子大黄汤(Zhizi Dahuang Decoction, ZDD)的超快速液相色谱(UFLC)指纹图谱,并研究全方与其组成药味的相关性。方法 采用 RP-UFLC 法,以 Shimadzu Shim-pack XR-ODS 色谱柱(75 mm×3.0 mm, 2.2 μm)为分析柱,乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相,梯度洗脱,体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 254 nm。结果 建立 ZDD 的 UFLC 指纹图谱,标定 51 个共有色谱峰,并通过对照品比对指认了其中的 14 个色谱峰;考察 ZDD 全方与各组成药味指纹图谱的相关性,对各共有色谱峰进行了峰位归属。结论 所建立的 UFLC 指纹图谱分析方法快速、可靠,重复性好,可为 ZDD 物质基础和质量控制方法的研究提供参考。

关键词: 栀子大黄汤; 指纹图谱; 相关性; 超快速液相色谱; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)03-0367-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.013

Fingerprint of Zhizi Dahuang Decoction

TANG Zheng¹, BI Kai-shun², HAN Fei², ZHU He-yun², CHEN Ke-lin², WANG Fen-rong², YIN Ran²

1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To establish the ultra-fast liquid chromatographic (UFLC) fingerprint of Zhizi Dahuang Decoction (ZDD), and to study the correlation between ZDD and its composition herbs. **Methods** The separation was achieved on a Shimadzu Shim-pack XR-ODS column (75 mm × 3.0 mm, 2.2 μm) by gradient elution with acetonitrile-0.1% formic acid solution as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min and the measurement wavelength was 254 nm. **Results** The UFLC fingerprint of ZDD was established and 51 characteristic common peaks were found, among which 14 peaks were recognized by comparing with reference substances. Furthermore, the peak attribution was analyzed so as to investigate the correlation between the fingerprint of composition herbs and ZDD. **Conclusion** The method is rapid, accurate, reliable, and reproducible. The established fingerprint could provide the references for the study of substance basis and quality control of ZDD.

Key words: Zhizi Dahuang Decoction; fingerprint; correlation; ultra-fast liquid chromatography; quality control

栀子大黄汤(Zhizi Dahuang Decoction, ZDD)出自东汉名医张仲景所著《金匮要略》,主治湿热蕴结之酒疸。该方由栀子、大黄、枳实、淡豆豉 4 味中药材组成,具有清热利湿、解郁除烦的功效,方中栀子清泻湿热或酒毒之邪从小便而去,使邪有退路;大黄清泻湿热或酒毒之邪从大便而去;枳实破气行滞,使湿热或酒毒之邪不得留结而溃散;淡豆豉轻清宣散、行气消满。中医临床上主要用其治疗热重湿轻之肝胆疾患或心经郁热者,如急慢性肝

炎、传染性肝炎、无黄疸型肝炎、酒精性肝炎、急性胰腺炎、胆囊炎及复发性口腔溃疡属热重于湿者等^[1]。ZDD 是医圣张仲景论治湿热黄疸的良方,在我国应用历史久远,虽然目前涉及其组方中单味药材的质量研究已有较多文献报道^[2-8],但关于 ZDD 全方的研究报道甚少^[9-12],且尚无有关其质量分析方面的研究。本实验以 ZDD 为研究对象,采用超快速液相色谱(UFLC)方法建立色谱指纹图谱,并考察各组成药味与全方指纹图谱的相关性,以期

收稿日期: 2013-09-13

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81202893); 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2012360)

作者简介: 唐 峥(1988—),女,硕士研究生。Tel: (024)23986296 E-mail: tangzheng1988@163.com

*通信作者 尹 然,副教授。Tel: (024)23986296 E-mail: yinran100@126.com

为 ZDD 的物质基础和质量控制方法研究提供科学依据。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC—30AD UFLC 色谱仪系统, 包括二元高压梯度泵、在线真空脱气机、自动进样装置、SPD—20A 型紫外检测器、柱温箱, LabSolutions 色谱工作站; AB135—S 十万分之一天平 (瑞士 Mettler Toledo 仪器有限公司); VFD—2000 真空冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); KQ—250DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); TGL—16 高速台式冷冻离心机 (沈阳杰龙仪器有限公司)。

栀子、大黄、枳实、淡豆豉药材均购自沈阳天益堂药店, 经沈阳药科大学中药学院袁久志副教授鉴定, 分别为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根和根茎, 芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果, 豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子的发酵加工品。

对照品京尼平苷 (批号 110749-201115)、没食子酸 (批号 110831-201204)、芦荟大黄素 (批号 110795-201007)、大黄酸 (批号 110757-200206)、大黄素 (批号 110756-200110)、大黄酚 (批号 110796-201118)、大黄素甲醚 (批号 110758-201013)、柚皮苷 (批号 110722-201111)、橙皮苷 (批号 110721-201014)、新橙皮苷 (批号 111857-201102)、大豆苷 (批号 111738-200501) 和染料木素 (批号 111704-200501) 均购自中国食品药品检定研究院, 对照品京尼平龙胆双糖苷 (批号 121214) 和柚皮芸香苷 (批号 121220) 购自上海融禾医药科技有限公司, 各对照品质量分数均大于 98%。色谱用乙腈和甲醇均购自美国 Fisher 公司, 色谱用甲酸购自天津市科密欧化学试剂有限公司, 水为二次蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Shimadzu Shim-pack XR-ODS 柱 (75 mm×3.0 mm, 2.2 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~8 min, 5%~8%乙腈; 8~21 min, 8%~17%乙腈; 21~24 min, 17%~18%乙腈; 24~33 min, 18%~40%乙腈; 33~38 min, 40%~90%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 35 °C; 进样量 2 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷、没食子酸、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、柚皮芸香苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、大豆苷和染料木素对照品适量, 分别用甲醇溶解配制成一定质量浓度的储备液; 精密吸取各对照品储备液适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 配制成质量浓度分别为京尼平苷 273.0 μg/mL、京尼平龙胆双糖苷 204.0 μg/mL、没食子酸 54.3 μg/mL、芦荟大黄素 10.1 μg/mL、大黄酸 6.8 μg/mL、大黄素 1.4 μg/mL、大黄酚 4.6 μg/mL、大黄素甲醚 4.6 μg/mL、柚皮芸香苷 102.0 μg/mL、柚皮苷 205.0 μg/mL、橙皮苷 101.0 μg/mL、新橙皮苷 340.0 μg/mL、大豆苷 20.4 μg/mL 和染料木素 4.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

全方供试品溶液的制备: 按照 ZDD 处方比例, 称取栀子 9 g、大黄 3 g、枳实 12 g、淡豆豉 24 g, 加 10 倍量水, 浸泡 30 min 后, 回流提取 1 h, 滤过, 残渣再加 10 倍量水继续回流提取 1 h, 合并 2 次滤液, 冷冻干燥, 即得 ZDD 冻干粉样品。同法共制备 5 批 ZDD 冻干粉样品, 编号为 S1~S5, 并分别计算各批次样品出粉率 (样品出粉率=所得冻干粉质量/生药总质量)。取 ZDD 冻干粉 1.0 g (相当于生药约 3.3 g), 精密称定, 置 50 mL 具塞碘量瓶中, 加甲醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 30 min 后, 放冷, 再次称定质量, 并用甲醇补足减失的质量, 提取液经 13 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

分煎液供试品溶液的制备: 按处方量分别称取栀子、大黄、枳实、淡豆豉药材, 各按全方相同方法提取, 合并 4 个单味药材滤液, 冷冻干燥, 即得分煎液冻干粉样品, 进而按全方相同的制备方法处理, 得分煎液供试品溶液。

单味药材供试品溶液的制备: 按处方量分别称取栀子、大黄、枳实、淡豆豉药材, 按全方相同的制备方法处理, 得 4 个单味药材供试品溶液。

阴性对照供试品溶液的制备: 按处方量称取除某味药材外的其他 3 味组成药材, 按全方相同的制备方法处理, 得缺栀子、缺大黄、缺枳实、缺淡豆豉 4 个阴性对照供试品溶液。

2.4 精密度试验

取同一份 ZDD 冻干粉样品供试品溶液连续进

样 6 次, 记录色谱图, 计算各共有峰与参照峰 (色谱峰 27) 的相对峰面积和相对保留时间。结果各共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.3%, 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批次 ZDD 冻干粉样品共 6 份, 分别制备供试品溶液, 进样分析, 记录色谱图, 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果各共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 2.8%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.4%, 表明方法的重复性良好。

2.6 稳定性试验

将同一份 ZDD 冻干粉样品供试品溶液分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录色谱图, 计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果各共有峰的相对峰面积的 RSD 均小于 2.6%, 相对保留时间的 RSD 均小于 0.6%, 表明 ZDD 样品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 ZDD 指纹图谱的建立

按照“2.1”项下色谱条件, 对 5 批 ZDD 冻干粉样品进行了测定, 记录色谱图, 并采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2009 版) 软件, 建立 ZDD 对照指纹图谱, 共标定了 51 个共有特征色谱峰。由于柚皮苷 (色谱峰 27) 的峰面积较大且出峰稳定, 与相邻色谱峰分离良好, 故选作参照峰。特征峰的选取原则为主要的特征峰与相邻峰的分离度应达到有效的分离, 即分离度为 1.2

以上, 其他特征峰也应达到一定分离, 峰尖到峰谷的距离至少应大于该峰高的 2/3 以上, 如果达不到则 2 个峰可以合并为 1 个峰计算。5 批 ZDD 样品的色谱叠加图见图 1; 所建立的 ZDD 对照指纹图谱见图 2, 其中峰 8、23、33、38 为双峰。

2.8 ZDD 指纹图谱中主要色谱峰的指认

在相同的色谱条件下, 取对照品混合溶液进样分析, 混合对照品色谱图见图 3。与样品指纹图谱中的相应色谱峰进行比较, 指认了全方指纹图谱中的 14 个色谱峰, 其中峰 1、9、11、18、25、27、30、32、40、44、45、49、50、51 分别为没食子酸、京尼平龙胆双糖苷、京尼平苷、大豆苷、柚皮芸香苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、染料木素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚, 保留时间分别为 1.02、7.31、8.76、13.34、20.09、21.25、22.46、23.69、28.80、31.97、33.03、35.51、36.65、37.20 min。

2.9 ZDD 与其组成药味之间的相关性

按“2.3”项下方法分别制备 ZDD 全方供试品溶液、分煎液供试品溶液、各单味药材供试品溶液及各阴性对照供试品溶液, 在相同色谱条件下进样分析, 得到各样品的 UFLC 图谱, 见图 4。比较各样品色谱图, 对 ZDD 化学指纹图谱的色谱峰进行了归属。结果显示, ZDD 全方指纹图谱的 51 个共有峰中, 4、9 (京尼平龙胆双糖苷)、11 (京尼平苷)、13、19、35、37、43 号峰来源于栀子药材; 1 (没

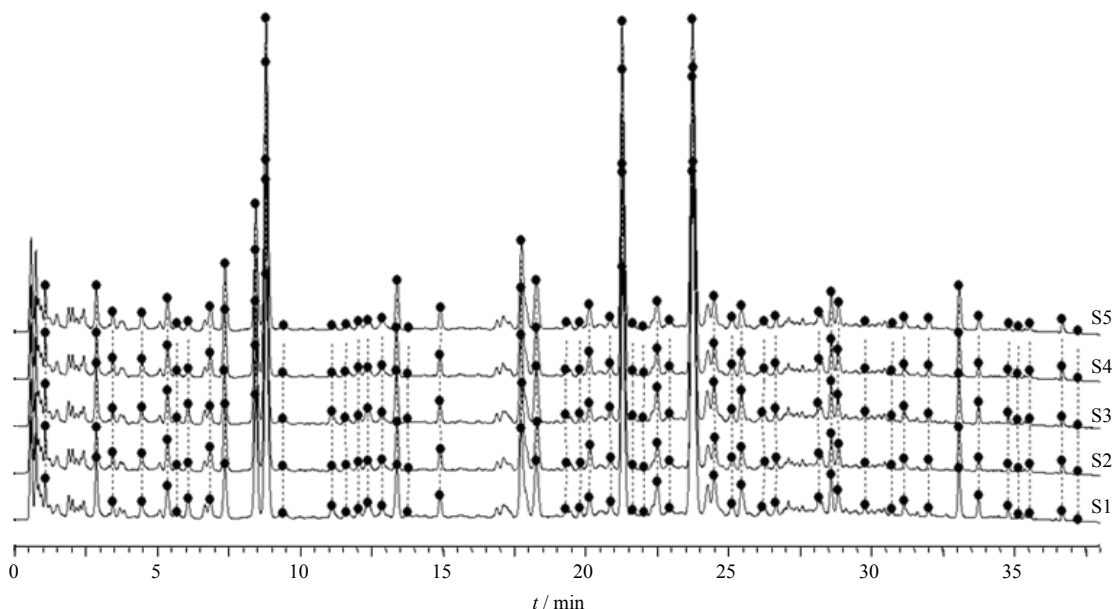


图 1 5 批 ZDD 样品 UFLC 色谱叠加图

Fig. 1 UFLC overlap of five batches of ZDD samples

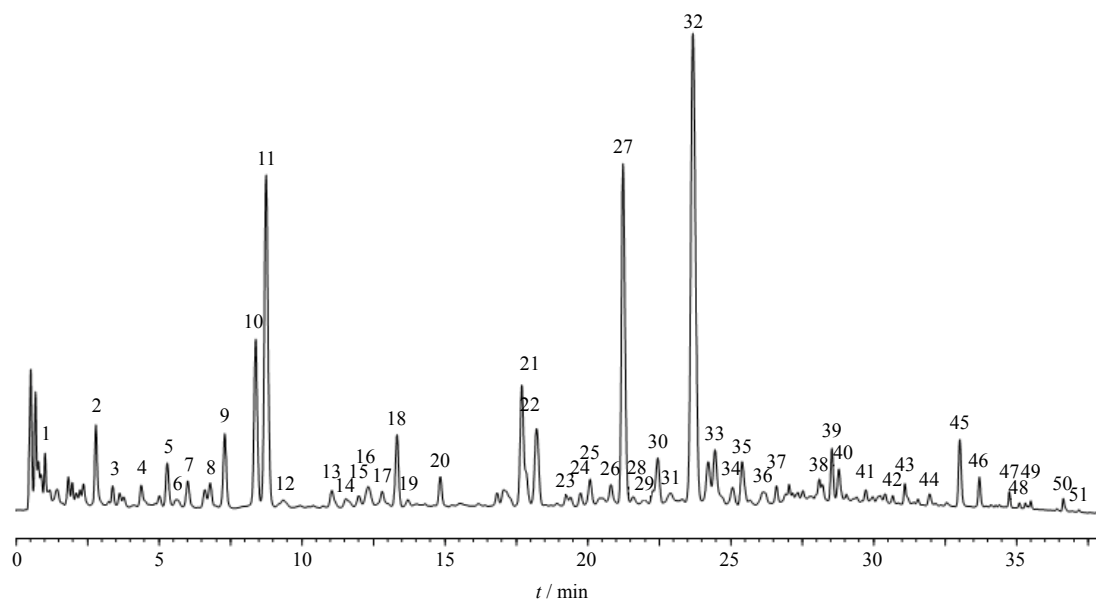
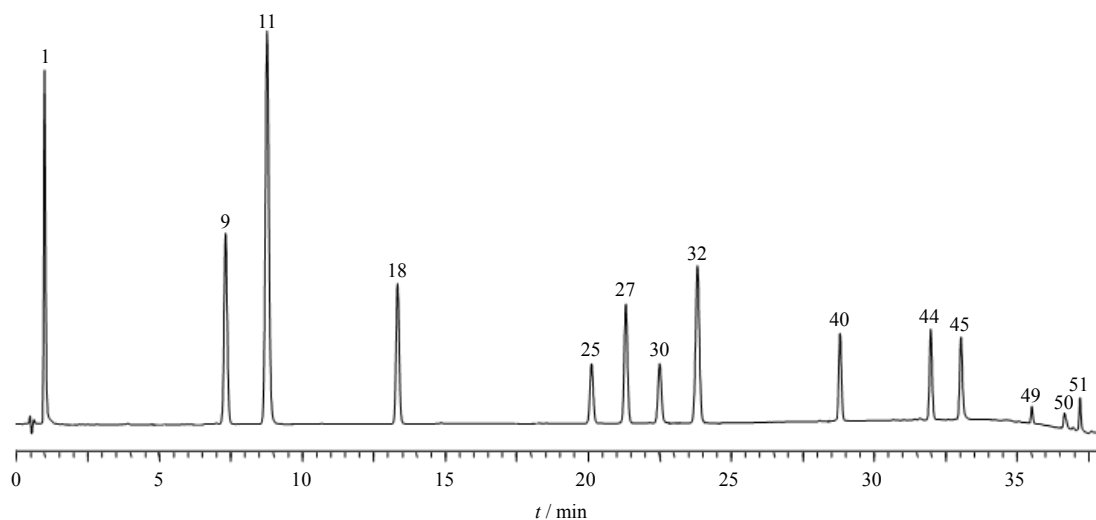


图 2 ZDD UFLC 对照指纹图谱

Fig. 2 UFLC reference fingerprint of ZDD



1-没食子酸 9-京尼平龙胆双糖苷 11-京尼平苷 18-大豆苷 25-柚皮芸香苷 27-柚皮苷 30-橙皮苷 32-新橙皮苷
40-染料木素 44-芦荟大黄素 45-大黄酸 49-大黄素 50-大黄酚 51-大黄素甲醚
1-gallic acid 9-genipin-1-β-D-gentiobioside 11-geniposide 18-daidzin 25-narirutin 27-naringin 30-hesperidin
32-neohesperidin 40-genistein 44-aloe emodin 45-rhein 49-emodin 50-chrysophanol 51-phycion

图 3 混合对照品 UFLC 色谱图

Fig. 3 UFLC of mixed reference substances

食子酸)、31、42、44 (芦荟大黄素)、45 (大黄酸)、48、49 (大黄素)、50 (大黄酚)、51 (大黄素甲醚) 号峰来源于大黄药材; 6、7、10、12、15、16、23、24、25 (柚皮芸香苷)、27 (柚皮苷)、29、30 (橙皮苷)、32 (新橙皮苷)、41、46、47 号峰来源于枳实药材; 18 (大豆苷)、20、28、34、40 (染料木素) 号峰来源于淡豆豉药材; 38 号峰为栀子与大黄所共有, 2、5、8、22 号峰为栀子与枳实所共有, 26、

36 号峰为栀子与淡豆豉所共有, 3、39 号峰为大黄与枳实所共有, 14 号峰为栀子、大黄和枳实 3 味药材所共有, 21 号峰为栀子、大黄和淡豆豉 3 味药材所共有, 17 号峰为枳实和淡豆豉 3 味药材所共有, 33 号峰则为组方 4 味药材所共有。

3 讨论

本实验采用冷冻干燥工艺将以水提取的 ZDD 制备成冻干粉样品, 与传统的中药样品制备方法相

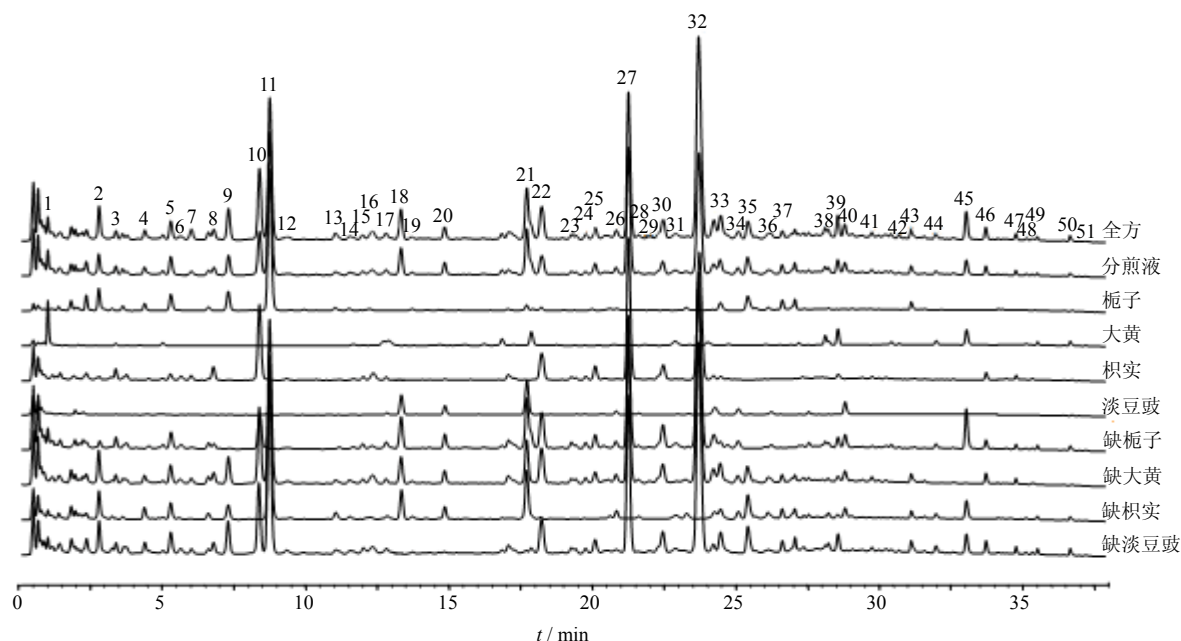


图 4 ZDD 全方、分煎液、各单味药材及各阴性对照方的 UFLC 色谱图

Fig. 4 UFLC of admixture decoction, dividual decoction, single herbs, and negative control decoction of ZDD

比, 所得样品更加稳定, 更易保存, 且有利于进一步的实验研究。5 批 ZDD 的冻干粉的平均出粉率为 30.3%, RSD 为 0.6%, 表明该样品制备工艺稳定。分别考察了 30%、50%、70%、90% 甲醇及纯甲醇超声提取 ZDD 冻干粉样品, 结果表明, 使用纯甲醇提取时, 极性大的化合物干扰相对较小, 且较有利于极性小的化合物的提取, 因此, 最终选定纯甲醇作为 ZDD 冻干粉样品的提取溶剂。

实验比较考察了甲醇-水、乙腈-水流动相系统, 结果表明在确定的波长下, 乙腈-水较甲醇-水系统所得基线更平稳, 各峰分离度较好。向流动相系统中适量加酸可改善色谱峰的拖尾现象, 实验分别对不同比例的甲酸、乙酸进行了考察, 最终发现乙腈-0.1% 甲酸水溶液系统得到的色谱图峰形较好, 峰数较多, 分离良好, 故选其为流动相系统。由于 ZDD 所含成分复杂, 极性差别较大, 采用梯度洗脱样品能够获得较理想的分离效果。

采用二极管阵列检测器, 对样品在 200~400 nm 波长范围内进行扫描, 综合比较发现 254 nm 波长下检测的色谱图基线平稳, 色谱峰信息相对完整, 各主要特征峰吸收强度较大, 故选定该波长作为检测波长。

实验中考察了 3 种不同型号的色谱柱: Phenomenex kinetex C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm)、Agela Technologies Bonshell ASB C₁₈ 色谱

柱 (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm) 和 Shimadzu Shim-pack XR-ODS 色谱柱 (75 mm×3.0 mm, 2.2 μm), 结果表明 Shimadzu Shim-pack XR-ODS 色谱柱的柱效较高, 色谱峰整体分布均匀, 分离效果好, 因此选用该色谱柱。

实验分别考察了柱温 25、30、35、40 °C 对分离效果的影响, 结果显示柱温 35 °C 时, 出峰较快且分离度良好; 考察了不同体积流量 0.8、1.0、1.2 mL/min 对分离度的影响, 结果体积流量为 1.0 mL/min 时分析时间适中, 各峰分离度较好。

综合比较 ZDD 全方、分煎液、各单味药材及各阴性对照方的色谱图可知, 全方汤剂的特征峰基本为 4 种组成药味特征峰的加和, 未出现新的色谱峰; 分煎液图谱中峰的数目和保留时间与合煎液基本一致, 但大多数色谱峰的峰面积与合煎时相比有所减小, 由此推断 ZDD 合并煎煮过程有利于药材中有效成分的溶出, 佐证了临床以传统的合煎用药的科学性。各色谱峰归属结果显示, 枳实中含有多个峰面积较大的色谱峰, 对 ZDD 指纹图谱的贡献最大, 而淡豆豉中所含成分较少, 对 ZDD 指纹图谱的贡献最小, 但各组成药味对于 ZDD 药效的影响大小则还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 黄仰模, 林昌松. 金匱要略临床发挥 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.

- [2] 石凤鸣, 王文君, 陈 阳, 等. 栀子指纹图谱及不同生长期西红花苷和栀子苷含量的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(8): 1874-1876.
- [3] He M L, Cheng X W, Chen J K, *et al.* Simultaneous determination of five major biologically active ingredients in different parts of *Gardenia jasminoides* fruits by HPLC with diode-array detection [J]. *Chromatographia*, 2006, 64(11/12): 713-717.
- [4] 高晓燕, 卢建秋. HPLC-DAD 法同时测定大黄中 7 个蒽醌类化合物的含量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1636-1641.
- [5] 黎 阳, 刘素香, 张铁军. 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1469-1474.
- [6] Xu X N, Jiang J H, Liang Y Z, *et al.* Chemical fingerprint analysis for quality control of *Fructus Aurantii Immaturus* based on HPLC-DAD combined with chemometric methods [J]. *Anal Methods*, 2010, 2(12): 2002-2010.
- [7] 魏 锋, 李启艳, 马玲云, 等. 对照品替代法同时测定中药和保健食品中 6 种大豆异黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5): 725-730.
- [8] 廖艳华, 韩 锋, 马 莉, 等. 高效液相色谱法测定丹安神颗粒中栀子苷 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 191-193.
- [9] Wang H, Feng F. Identification of components in Zhi-Zi-Da-Huang decoction by HPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, photodiode array and fluorescence detectors [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(5): 1157-1165.
- [10] Wang H, Feng F, Zhuang B Y. Evaluation of hepatoprotective effect of Zhi-Zi-Da-Huang decoction and its two fractions against acute alcohol-induced liver injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(2): 273-279.
- [11] 汪 航, 冯 芳, 王学全. 栀子大黄汤化学成分的 HPLC-PDA-ESI-MS/MS 分析 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(3): 232-237.
- [12] 王学全, 冯 芳, 孙艳清. 栀子大黄汤配伍变化对栀子中京尼平苷药动学的影响 [J]. 药学进展, 2010, 34(8): 371-376.