

· 论著 ·

大承气汤高效液相色谱指纹图谱研究

魏惠珍 胡景婷 饶毅 王信 王跃生

【摘要】 目的 采用高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)建立大承气汤的指纹图谱分析方法。**方法** 采用 Diamonsil C₁₈柱(250×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),检测波长为 254 nm,流速为 1 ml/min。**结果** 大承气汤中有效成分能较好地分离,标定了 9 个有效成分,10 批大承气汤共标出了 12 个共有峰,方法学考察表明,所用方法符合定性研究要求。**结论** HPLC 法具有较好的分离效果,为大承气汤的物质基础研究提供了可靠依据。

【关键词】 大承气汤; 高效液相色谱; 指纹图谱; 质量控制

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.06.007

Study on the HPLC fingerprints in Dachengqi Decoction WEI Hui-zhen, HU Jing-ting, RAO Yi, et al. Department of Pharmaceutical Analysis Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Corresponding author: RAO Yi, E-mail: raoyi99@126.com

【Abstract】 Objective To develop the fingerprint of Dachengqi Decoction by high-performance liquid chromatography(HPLC). **Methods** The Diamonsil C₁₈(250×4.6 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase of acetonitrile-0.1% H₃PO₄ gradient elution as mobile phase and the detection was set at 254 nm, flow rate being 1.0 ml/min. **Results** The components in Dachengqi Decoction were successfully separated and positioning nine effective ingredient. 21 common peaks were separated in 10 batches of Dachengqi Decoction. The observation of methodology was in keeping with quantitative determination and qualitative study. **Conclusion** HPLC has good separation result to provide reliable basis for Dachengqi Decoction's material foundation research.

【Key words】 Dachengqi Decoction; HPLC; Fingerprints; Quality control

大承气汤,源于汉代张仲景所著的中医经典古籍《伤寒论》和《金匱要略》^[1],由大黄、厚朴、枳实、芒硝四味饮片组成,由多味药、多成分组成的一个富含层次和结构的有机整体,泻法的代表方剂。为了更好的保证大承气汤的一致性,运用指纹图谱技术来控制其质量。目前已有文献对大承气汤的指纹图谱进行研究,标定了 7 个有效成分^[2],本文在

此基础上采用 HPLC 法进一步研究,标定了 9 个有效成分,具有信息量大、基线平稳、分析时间较短的特点,为全面控制大承气汤的质量提供更为科学、直观的参考。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪(Waters2695 分离单元, 2996 型-DAD 二极管阵列检测器,Empower 色谱工作站);Millipore-Q 纯水器;KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

芦荟大黄素对照品,大黄酸对照品,大黄酚对照品,大黄素对照品,厚朴酚对照品,和厚朴酚对照品,柚皮苷对照品,橙皮苷对照品,新橙皮苷对照品(均由中国药品生物制品检定所提供);大黄、厚朴、枳实、芒硝饮片购于北京市双桥燕京饮片厂,经江

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2010CB530602)

作者单位:330004 南昌,江西中医学院药物分析学科组(魏惠珍、胡景婷、王信);中药固体制剂制造技术国家工程研究中心(饶毅、王跃生)

作者简介:魏惠珍(1965-),女,副教授,硕士生导师。研究方向:中药复方质量控制研究。E-mail:weihuihen101@126.com

通讯作者:饶毅(1964-),博士,教授,硕士生导师。研究方向:中药质量控制研究。E-mail:raoyi99@126.com

建议参考文献标引格式:

魏惠珍,胡景婷,饶毅,等.大承气汤高效液相色谱指纹图谱研究[J].环球中医药,2012,5(6):425-428

西医学院付晓梅教授鉴定;乙腈为色谱纯(Tedia 试剂公司),乙醇、磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm);柱温: 25℃;流速: 1 ml/min;检测波长: 254 nm;流动相: A:乙腈, B:0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱,洗脱程序见表 1;进样体积:20 μl;分析时间: 75 分钟。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	A(%)	B(%)
0	19	81
10	19	81
25	25	75
50	57	43
70	68	32
90	75	25

2.2 供试品制备

称取大黄 36 g、厚朴 27 g、枳实 27 g、芒硝 13.5 g,加入 8 倍量水(即 836 ml),浸泡 30 分钟,加热煮沸后,文火慢煎 40 分钟,放冷,纱布滤过,即得大承气汤。精密量取大承气汤 5 ml,置 50 ml 量瓶中,加甲醇稀释并定容至刻度(有沉淀析出),超声提取 30 分钟,摇匀,以微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密性试验 分别吸取同一供试品溶液,连续进样 5 次,每次进样 20 μl,测定 HPLC 色谱图,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 值小于 0.38%,相对峰面积的 RSD 值小于 1.37%,表明仪器精密性良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 20 μl,分别在 0、2、4、8、12、24 小时进样 6 次。结果各共有峰的相对保留时间 RSD 值小于 0.15%,相对峰面积的 RSD 值小于 1.83%,表明供试品溶液在 24 小时内稳定。

2.3.3 重现性试验 取同一批大黄、厚朴、枳实、芒硝饮片各 5 份,按照大承气汤供试品溶液的制备方法平行制备供试品溶液,测定 HPLC 图。结果各共有峰的相对保留时间的 RSD 值小于 0.28%,相对峰面积的 RSD 值小于 2.55%,表明方法重现性良好。

2.4 大承气汤指纹图谱的测定及分析

2.4.1 共有峰的确定 精密量取 10 批大承气汤供试品溶液,各 20 μl,注入液相色谱仪,通过比对相同保留时间的紫外光谱图,最终选择了 12 个特征峰作为指纹图谱的共有峰,见图 1。经对照品的定位归属,确定了其中 9 个峰。其中峰 1 为柚皮苷,峰 2 为橙皮苷,峰 3 为新橙皮苷,峰 6 为芦荟大黄素,峰 7 为大黄酸,峰 9 为和厚朴酚,峰 10 为大黄素,峰 11 为厚朴酚,峰 12 为大黄酚。由于峰 7 的面积较大且保留时间适中,因此,选择峰 7 为参照峰,且计算各共有峰的相对峰面积,结果见表 2。10 批大承气汤的 HPLC 指纹重叠图谱见图 2。

2.4.2 特征指纹峰分析 本文采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度计算软件(2004A 版),对 10 批大承气汤的指纹图谱进行分析,10 批大承气汤之间的相似度和生成的对照指纹图谱的相似度如表 3 所示。从表 3 可以看出,10 批大承气汤之间的相似度在 0.503~0.989 之间,10 批大承气汤与生成的对照指纹图谱的相似度在 0.664~0.979 之间,不同来源、批次的饮片(大黄、厚朴、枳实、芒硝)煎煮所得大承气汤的特征峰峰高有较大差异,且相似度差异较大。

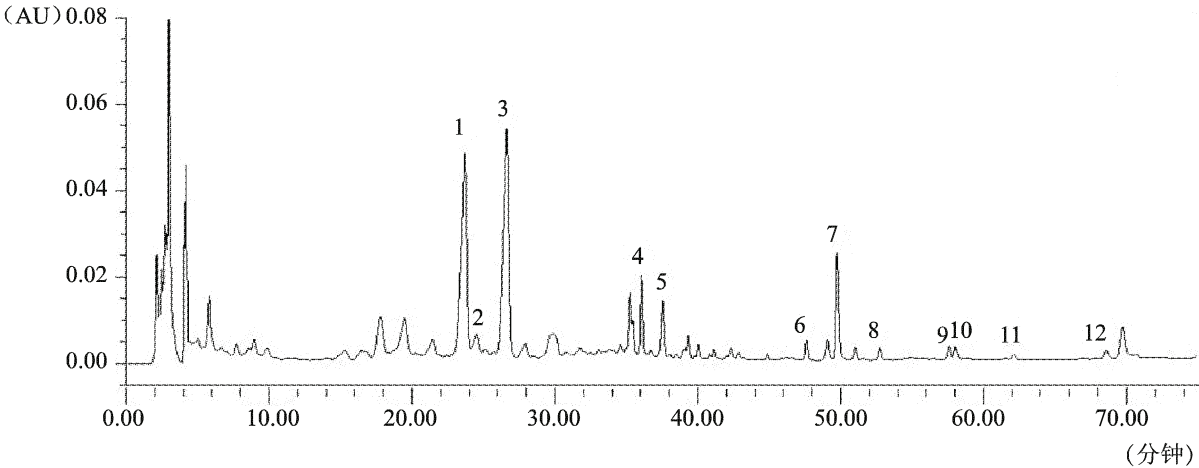
2.5 大承气汤与药材之间的相关性

分别取大承气汤供试品、大黄供试品、厚朴供试品、枳实供试品、芒硝供试品进样测定,在相同的条件下进行对比,确定峰归属。通过比较分析,大承气汤指纹图谱的共有峰中,4、5、6、7、8、10、12 号峰来源于大黄饮片;9、11 号峰来源于厚朴饮片;1、2、3 号峰来源于枳实饮片;没有峰归属于芒硝饮片。

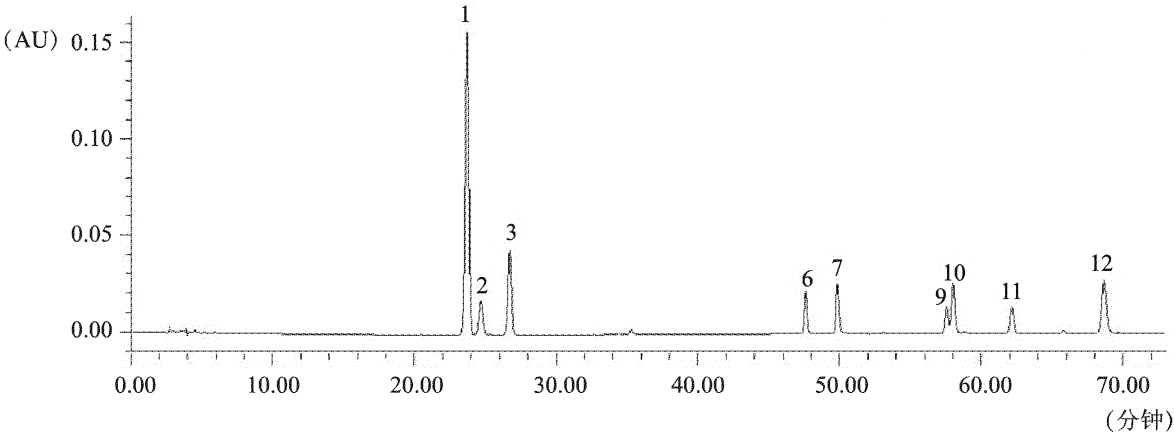
3 讨论

在其他条件不变的前提下,不同产地、批次的饮片煎煮所得十批大承气汤的特征峰高及相似度差异较大。因此,采用指纹图谱技术对大承气汤的质量控制是极有必要的,可参考文献的方法,采用原料勾兑技术^[3]及多指标控制技术^[4]达到总体用药水平,提高不同批次大承气汤之间的相似度以控制其质量。

本研究建立了大承气汤 HPLC 指纹图谱,12 峰分别体现了大黄、厚朴、枳实 3 药材的特征,不仅为大承气汤的物质基础研究提供了部分依据,并且能更好的从整体上对其进行质量控制,充分体现了中医用药的特色,为挖掘传统中药复方的特色提供了有利手段。



(a) 大承气汤指纹图谱色谱图



(b) 对照品指纹图谱色谱图

图 1 大承气汤指纹图谱与对照品指纹图谱的比较

表 2 10 批大承气汤相对峰面积

峰号	保留时间 (min)	相对峰面积										值	RSD/%
		批次 1	批次 2	批次 3	批次 4	批次 5	批次 6	批次 7	批次 8	批次 9	批次 10		
1	23.73	7.37	3.54	35.59	4.54	0.79	1.05	1.00	31.29	3.23	7.17	9.56	134.34
2	24.52	0.94	0.44	3.96	0.52	0.23	0.27	0.24	2.36	0.43	0.90	1.03	117.53
3	26.65	9.62	4.88	52.58	5.72	0.51	1.77	1.89	47.32	4.36	9.33	13.8	140.06
4	36.08	1.91	0.63	13.39	0.38	0.65	1.24	0.89	21.27	0.56	1.92	4.28	166.88
5	37.58	0.77	0.37	2.16	0.32	0.50	0.61	0.54	4.85	0.51	0.78	1.14	123.31
6	39.32	0.32	0.21	1.75	0.27	0.20	0.20	0.18	4.00	0.22	0.32	0.77	160.01
7	47.64	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1	0.00
8	49.82	0.29	0.13	1.22	0.15	0.04	0.07	0.07	2.13	0.13	0.27	0.45	152.26
9	57.59	0.25	0.19	2.99	0.08	0.53	0.17	0.13	5.55	0.26	0.28	1.04	173.91
10	58.08	0.35	0.15	1.29	0.18	0.12	0.15	0.14	3.16	0.16	0.36	0.61	158.06
11	62.13	0.18	0.07	1.47	0.06	0.09	0.10	0.07	2.65	0.11	0.21	0.5	173.76
12	68.66	0.31	0.17	3.04	0.20	0.15	0.19	0.13	7.44	0.20	0.32	1.21	195.22

建议参考文献标引格式：
 魏惠珍，胡景婷，饶毅，等. 大承气汤高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 环球中医药，2012，5(6):425-428

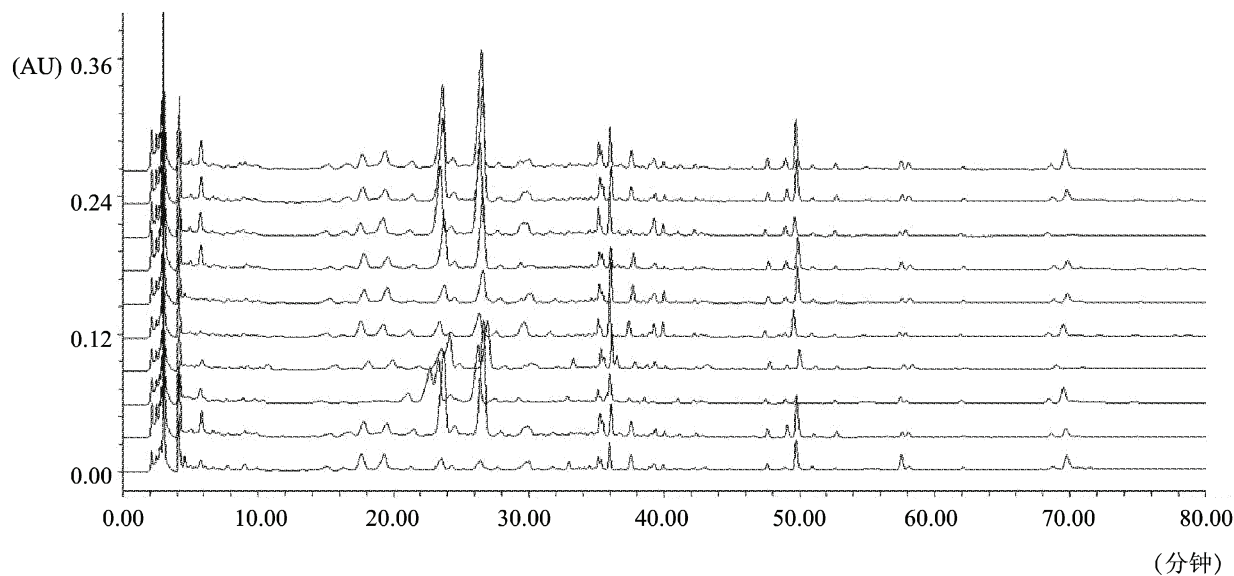


图 2 10 批大承气汤的 HPLC 指纹重叠图谱

表 3 10 批大承气汤的 HPLC 指纹图谱的相似度计算结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照图谱
S1	1										0.979
S2	0.973	1									0.985
S3	0.833	0.838	1								0.888
S4	0.974	0.983	0.839	1							0.971
S5	0.559	0.585	0.612	0.503	1						0.664
S6	0.729	0.729	0.594	0.677	0.78	1					0.784
S7	0.849	0.866	0.688	0.801	0.808	0.857	1				0.889
S8	0.596	0.597	0.91	0.589	0.723	0.554	0.523	1			0.686
S9	0.968	0.989	0.824	0.975	0.614	0.752	0.886	0.589	1		0.983
S10	0.987	0.971	0.831	0.965	0.55	0.768	0.846	0.596	0.966	1	0.979
对照图谱	0.979	0.985	0.888	0.971	0.664	0.784	0.889	0.686	0.983	0.979	1

大承气汤中化学成分较多,除了已知的可测成分,还有许多未知成分无法控制。通过 HPLC 指纹图谱的建立,不仅可控制已知成分的含量,还可对其他未知成分进行定量控制,便于更好的控制大承气汤的内在质量,为大承气汤的客观评价提供了更简便、科学的方法。

参 考 文 献

[1] 解培勋. 大承气汤与燥屎宿食关系初探. 中国中医急症[J],

2001,10(3):152,155.

[2] 李璇,裴秋燕,唐静雯,等. 大承气汤高效液相色谱指纹图谱实验研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(12):3044-3045.

[3] 金樟照,祝明,吴文军,等. 原料勾兑在控制中药注射液指纹图谱中应用[J]. 中成药,2003,25(10):777-779.

[4] 张萍,杨燕,鄢丹,等. 多指标成分含量测定与指纹图谱分析在中药制备工艺与质量控制中的应用[J]. 中华中医药杂志,2010,25(1):120-123.

(收稿日期: 2012-04-08)

(本文编辑: 刘群)