

高效液相-二极管阵列法检测 当归芍药散中主要化学成分

宋欣¹,陶春蕾¹,孟广东²,许杨²,许钊¹

(1. 安徽中医学院药学院,安徽合肥 230031;2. 安徽万邦医药科技有限公司,安徽合肥 230088)

[摘要]目的 定性分析中药复方当归芍药散中的主要化学成分。方法 采用高相液相-二极管阵列检测法(high performance liquid chromatography-diode-array detector, HPLC-DAD),色谱柱为 Welchrom XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(梯度洗脱)。二极管阵列扫描范围:200~400 nm。结果 通过实验并与已有文献的比较,利用 HPLC-DAD 检测后的三维图谱可找出中药复方当归芍药散中所含的主要化学成分川芎嗪、芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸、白术内酯 I、藁本内酯、23-乙酰泽泻醇 B 醋酸酯等。结论 HPLC-DAD 可以对当归芍药散中主要化学成分做出准确定性,为其药效学研究提供依据。

[关键词]当归芍药散;中药复方;高效液相-二极管阵列检测器

[中图分类号]R284.1 [文献标志码]A [DOI]10.3969/j.issn.1000-2219.2012.01.019

当归芍药散出自《金匮要略·妇人妊娠病脉证并治第二十》:“妇人怀妊,腹中疝痛,当归芍药散主之。”妇人妊娠,肝气郁滞,血行不畅,水湿内停,故见腹中急痛、小便不利、下肢浮肿等症。治以当归芍药散,方中当归、芍药、川芎养血和血,缓急止痛,茯苓、白术、泽泻健脾利水消肿,血水同治。该法独具特色,对指导临床具有重要意义^[1]。文献报道多是基于当归芍药散中主要指标成分芍药苷及阿魏酸的检测,本研究采用高效液相-二极管阵列检测器对当归芍药散中主要指标成分进行定性研究^[2],为今后对其药效成分的研究及其主要化学成分的定量分析打好基础。

1 实验材料

1.1 仪器 岛津 LC-20AD 型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪;SPD-20AD 二极管阵列检测器(diode-array detector, DAD);CBM-20A 系统控制器;LC-Solution Light 色谱数据系统;岛津 CTO-20A 柱温箱;AB135-S 型十万分之一电子分析天平;梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 药物与试剂 当归芍药散组成药材:购自南京医药合肥天星医药公司,并按照《中华人民共和国药典》(2010 年版)一部项下标准,对各药材进行鉴别,按文献^[2]制备当归芍药散;芍药苷对照品(批号 110736-200933)、川芎嗪对照品(批号 0817-9502)、

阿魏酸对照品(批号 773-9001):购于中国药品生物制品检定所;芍药内酯苷对照品(批号 A0477,含量≥96.5%)、白术内酯 I 对照品(批号 A0372,含量≥96.5%)、23-乙酰泽泻醇 B 醋酸酯对照品(批号 A0446,含量≥98%)、藁本内酯对照品(批号 A0219,含量≥98%):购于鼎瑞化工(上海)有限公司;甲醇:色谱纯,美国 TEDIA 试剂公司;乙腈:色谱纯,美国 TEDIA 试剂公司;磷酸:分析纯,上海苏懿化学试剂有限公司;纯净水:杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Welchrom XB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)及配套保护柱;流动相:0.05%磷酸水溶液(pH=2.35)-乙腈等度洗脱(0~10 min,15%乙腈),梯度洗脱(10~60 min,15%~100%乙腈),等度洗脱(60~80 min,100%乙腈);流速:1.0 ml/min;柱温:20℃;扫描波长:200~400 nm;进样量:20 μl。

2.2 对照液配制 分别取上述芍药苷、芍药内酯苷、阿魏酸、川芎嗪、白术内酯 I、23-乙酰泽泻醇 B 醋酸酯对照品,精密称定,甲醇溶解并定容,配制芍药苷 60.0 μg/ml,芍药内酯苷 43.6 μg/ml,阿魏酸 12.0 μg/ml,川芎嗪 25.4 μg/ml,白术内酯 I 91.2 μg/ml,23-乙酰泽泻醇 B 醋酸酯 38.2 μg/ml。由于藁本内酯系挥发油成分,且稳定性较差,不易称量,所以将购来的藁本内酯对照品(20 mg)打开连瓶称量后将其投入 50 ml 烧杯中,加入甲醇后,连同烧杯放入冰水中超声使其充分溶解并定容至 200 ml 容量瓶中,空瓶干燥后复称,得到 98.5 μg/ml 藁本内酯对照液,并置于-20℃冰箱保存备用。

基金项目:国家自然科学基金(81173368);安徽省高校省级自然科学研究重点项目(KJ2010A213)

作者简介:宋欣(1982-),男,硕士研究生

通信作者:许钊,0551-5169038, xuafan2008@yahoo.com.cn

2.3 供试品溶液制备 ①复方:取当归 3 g,白芍 16 g,川芎、泽泻各 8 g,茯苓、白术各 4 g,加 50%乙醇浸泡 60 min,回流提取 2 次,第 1 次 2 h,第 2 次 1.5 h,加乙醇倍数分别为 10、8 倍。合并两次滤液,滤过,回收乙醇至无醇味,水浴浓缩至干浸膏 11.9 g。加 75%甲醇溶液超声溶解并定容至 100 ml,精密量取 4 ml,加 75%甲醇溶液定容至 25 ml,超声提取 40 min,最终浓度为 68.8 mg/ml,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液为供试品液。②单方:分别取各单味药材按照上述提取方法同样处理后得到各单味药材的供试液。分别取上述单方及复方供试液 1 ml,加 75%甲醇稀释定容至 10 ml。

2.4 方法学考察

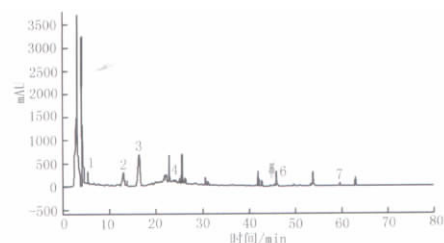
2.4.1 精密度试验:取同一复方供试品溶液,连续进样 6 次,记录其指纹图谱。结果表明,各色谱峰的保留时间和其相对峰面积一致,其峰面积的相对标准偏差 (relative standard deviation, *RSD*) 为 1.2%~3.5%,符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 稳定性试验:取 4 $^{\circ}$ C 冰箱中冷藏放置的同一复方供试品溶液,分别在 2、4、8、24、48 h 检测。结果表明,各色谱峰的保留时间和其相对峰面积无明显变化,其相对峰面积 *RSD* < 5%,说明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验:取同一复方供试品溶液 6 份,依法测定。结果表明,各色谱峰的保留时间和其相

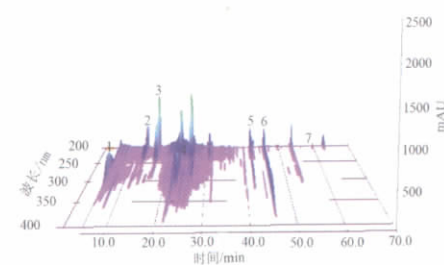
对峰面积一致,其相对峰面积的 *RSD* 为 0.8%~2.8%,符合指纹图谱技术要求。

2.5 色谱行为 同一色谱条件下,将各个对照品及供试品溶液分别进样,根据已知对照品的色谱行为,并由检测波长和保留时间判断出对照成分在复方供试品和单味药材供试品中的色谱行为,并附溶解样品的溶剂作为对比。见图 1、图 2 和图 3。



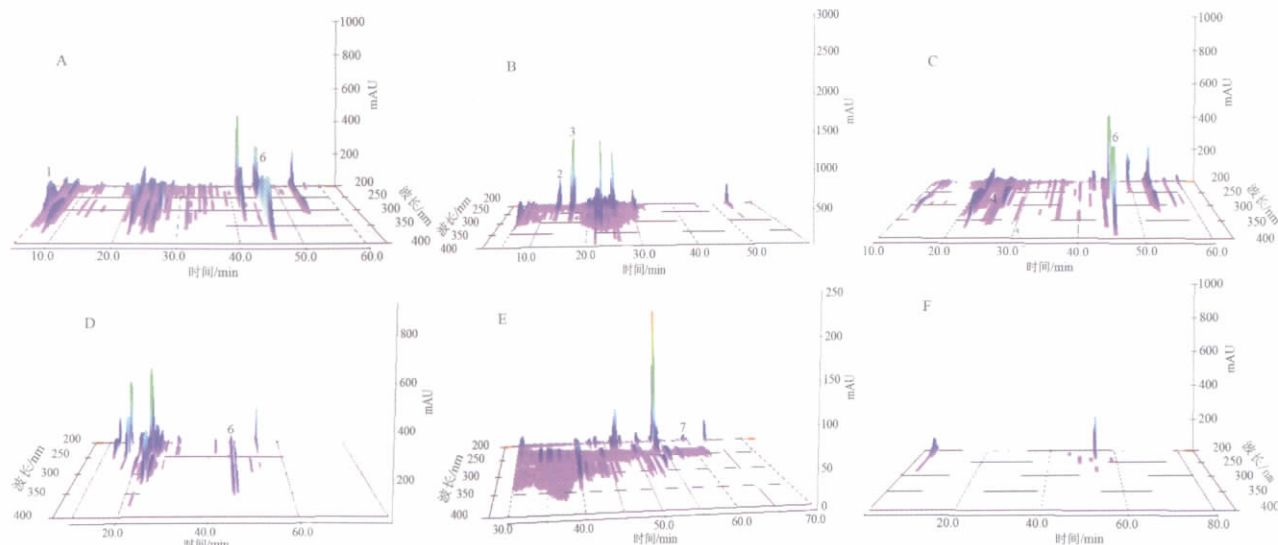
注:1 为川芎嗪,2 为芍药内酯苷,3 为芍药苷,4 为阿魏酸,5 为白术内酯I,6 为藁本内酯,7 为 23-乙酰泽泻醇 B 醋酸酯。

图 1 复方当归芍药散 HPLC-DAD 图谱



注:1 为川芎嗪,2 为芍药内酯苷,3 为芍药苷,4 为阿魏酸,5 为白术内酯I,6 为藁本内酯,7 为 23-乙酰泽泻醇 B 醋酸酯。

图 2 当归芍药散复方 HPLC-DAD 三维图



注:A 为川芎,B 为白芍,C 为当归,D 为白术,E 为泽泻,F 为茯苓,1 为川芎嗪,2 为芍药内酯苷,3 为芍药苷,4 为阿魏酸,5 为白术内酯 I,6 为藁本内酯,7 为 23-乙酰泽泻醇 B 醋酸酯。

图 3 单味药材供试品 HPLC-DAD 三维图

3 讨论

3.1 提取工艺的选择 由于白芍中含可水解鞣质等稳定性较差的成分,选用 50% 醇提液优于水提

液,当归芍药散的醇提液能保留更多的有效成分,为传统散剂采用现代醇提取工艺的合理性提供了一定依据^[3]。

3.2 检测成分的判断 在复方中,药与药之间的相互作用不仅仅表现在共煎过程中化学组分发生质与量的变化,还表现在有些化学成分会对其他化学成分的体内过程产生影响。中药复方配伍关系的研究是探索复方作用机制、药效物质基础的一个重要环节和一条合理途径。其研究需要一个漫长的过程,许多关键问题尚待解决,许多研究思路、研究方法还不尽合理,有待完善。

HPLC与紫外(ultraviolet, UV)或DAD相联接,对于单个色谱峰仅能提供保留时间及紫外吸收等信号,而对未知成分所能提供的结构信息相当有限,色谱峰的指认必须有对照品,而大多数中药化学成分的对照品很难获得^[4-9]。根据各药材所含主要化学成分,以及相关文献^[10-11]对各药材检测指标的测定,选择了芍药内酯苷、芍药苷、川芎嗪、阿魏酸、乙酰泽泻醇B醋酸酯、白术内酯I、藁本内酯7个成分,通过HPLC-DAD法对复方制剂进行分析,结果表明7个成分在复方制剂中均能对应找出,但是全部做出定量分析还有一定困难,需要借助更加精密的检测仪器,如液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱(liquid chromatography-electrospray ionization tandem-mass spectrometry, LC-ESI-MS/MS)或液相色谱-飞行时间-质谱(liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry, LC-TOF-MS)来进一步完成。另外复方中挥发油成分如藁本内酯、白术内酯等的含量较低,可能与提取和干燥工艺有关,茯苓中相关成分在该条件下未发现目标峰。

3.3 色谱条件的选择 由于各个成分的极性相差较大,在保证该复方制剂中主要成分芍药内酯苷、芍药苷、阿魏酸能够被检测出来的情况下,选择乙腈和0.05%磷酸水溶液为流动相,并采用梯度洗脱的方法,使现有的7个指标成分均能在该色谱条件下在较短时间内一次性分离出来。

本实验对当归芍药散复方及其单方成分进行了定性分析,对解释当归芍药散药效成分以及药理学研究具有重要意义,也为后期实验的开展提供了依据,在此基础上,选择灵敏度更高的分析仪器,液相

色谱质谱联用技术可以提供未知色谱峰丰富的结构信息,据此推导其可能的化学结构,结合对药效、化学分析所得数据的逐步回归分析,不但可观察方中各药物对药效影响的主次,判断剂量、炮制、煎煮等因素是否影响药效等,还可直接分析复方药效物质,从而进一步对该中药复方中涉及的相关成分进行分析和判断。

参考文献:

- [1] 戴天木.《金匱要略》血水同治法探析[J]. 中华中医药学刊, 2002, 20(11): 60.
- [2] Akase T, Hihara E, Shimada T, et al. Efficacy of Tokishakuyakusan on the Anemia in the iron-deficient pregnant rats[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(8): 1523-1528.
- [3] 刘俊, 宋欣, 王满媛, 等. 不同提取方法测定当归芍药散中芍药苷和阿魏酸含量的比较研究[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(3): 20-22.
- [4] 段然, 薛润光, 李军, 等. 用 HPLC-DAD 的方法评价不同产地当归药材的质量[J]. 中国现代中药, 2009, 11(8): 28-34.
- [5] 刘文斌, 何振辉, 宾漫容. 中药白芍 HPLC 含量测定及指纹图谱研究[J]. 光谱实验室, 2010(3): 693-699.
- [6] 李志浩, 朱雪松, 郑芳, 朱军. HPLC 测定白术茯苓颗粒中白术内酯 I 的含量[J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(5): 22-31.
- [7] 宋全春, 胡传芹, 曾俊芬, 等. 川芎 RP-HPLC 指纹图谱的建立及其质量研究[J]. 中国药师, 2006, 9(4): 297-301.
- [8] 陈建忠, 潘馨, 黄若旺. HPLC 法同时测定泽泻中 2 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 721-723.
- [9] 李磊, 张宏桂, 孙毅坤, 等. 土茯苓药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(4): 206-208.
- [10] 王平, 梁逸曾. 基于 HPLC-DAD-MS 的当归补血汤化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 28-31.
- [11] 龚志华, 罗琳, 居文政, 等. HPLC-DAD/ELSD、UPLC-MS/MS 分析复方五仁醇胶囊中皂苷类成分[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(1): 38-41.

(收稿日期: 2011-09-01)

Detection of Main Chemical Constituents in Danggui Shaoyao San by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector

SONG Xin¹, TAO Chun-lei¹, MENG Guang-dong², XU Yang², XU Fan¹

(1. School of Pharmacy, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China; 2. Anhui Wanbang Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Anhui Hefei 230088, China)

[Abstract] Objective To qualitatively analyze the main chemical constituents in Danggui Shaoyao San,

木瓜齐墩果酸和熊果酸等三萜酸类 薄层色谱分离鉴别

程菁菁¹, 谢晓梅¹, 张圣龙¹, 葛晓郡¹, 黄丽丹²

(1. 安徽中医学院药学院 安徽省现代中药重点实验室 安徽省“115”新安医药研究与开发产业创新团队, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽省食品药品检验所, 安徽 合肥 230051)

[摘要]目的 建立木瓜齐墩果酸、熊果酸等三萜酸薄层色谱分离鉴别方法。方法 将点于硅胶 G 板上的样品点浸入 1% 碘-二氯甲烷溶液中预处理, 以环己烷-丙酮-乙酸乙酯-甲酸(9:2:1:0.2)为展开剂。结果 木瓜中熊果酸、齐墩果酸以及 3-O-乙酰熊果酸能够被很好地分离和检识。结论 薄层色谱法简便、可靠, 使木瓜鉴别更具客观性和专属性。

[关键词]木瓜; 薄层色谱; 齐墩果酸; 熊果酸; 3-O-乙酰熊果酸

[中图分类号]R284.1 [文献标志码]A [DOI]10.3969/j.issn.1000-2219.2012.01.020

中药木瓜(*Fructus chaenomelis*)为蔷薇科木瓜属植物贴梗海棠[*Chaenomeles Speciosa* (Sweet) Nakai]干燥近成熟的果实, 是中医临床常用中药。其化学成分已报道的有三萜类、有机酸类、黄酮类和鞣质类等成分。三萜类齐墩果酸和熊果酸是木瓜的活性成分^[1]。由于这两个化合物结构相似, 性质相近, 在一般薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)中难以分离, 故《中华人民共和国药典》^[2]记载的木瓜薄层鉴别仅以熊果酸表示这两个成分的混合物斑点, 未能真实反映熊果酸和齐墩果酸客观存在的斑点特征。本研究在前期对木瓜三萜类成分以及含齐墩果酸和熊果酸药材研究^[3-4]的基础上, 参考女贞子的薄层分离条件^[5], 对木瓜三萜类成分进行 TLC 鉴别研究, 同时对包括木瓜在内的 10 余种含有齐墩果酸和(或)熊果酸的中药材进行 TLC 试验, 旨

在为木瓜鉴别提供更为客观、特征、科学的 TLC 方法。

1 仪器与试剂

BP211D 电子天平: 德国赛多利斯股份公司; KQ-250DB 数控超声波清洗器: 江苏省昆山市超声仪器有限公司; 双槽薄层展开槽: 上海信谊仪器厂; DB-3 型不锈钢电热板: 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂; 硅胶 G 预制板: 青岛海洋化工厂分厂; 定量毛细管; Linomat5 半自动点样仪: 瑞士 CAMAG 公司; TLC Visualizer 薄层色谱数码成像系统: 瑞士 CAMAG 公司。木瓜药材采集于安徽宣城新田、重庆石壕、湖北资丘长阳; 其他实验药材(大枣、女贞子、威灵仙、槲寄生、山茱萸、山楂、马鞭草、乌梅、枇杷叶、泽兰、锁阳、光皮木瓜)来自安徽中医学院国医堂, 所有样品均经安徽中医学院药学院周建理教授和彭华胜副教授鉴定。

齐墩果酸对照品(110709-200505)、熊果酸对照品(110742-200516)和木瓜对照药材(121003-200504)由中国药品生物制品检定所提供; 3-O-乙酰熊果酸由实验室自制, 经¹H-核磁共振波谱和质谱

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2011BAI04B06)

作者简介: 程菁菁(1987-), 女, 硕士研究生

通信作者: 谢晓梅, 0551-5169230, xiexiaomei9401@sina.com

which is a famous traditional Chinese prescription mainly composed of *Angelica sinensis* and peony, and recorded in Synopsis of Golden Chamber. **Methods** High performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD) was used, with Welchrom XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) as the column, and acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution (gradient elution) as the mobile phase. The scan range of DAD ranged from 200 to 400 nm. **Results** By comparing the experimental results to related literatures, the three-dimensional atlas could show the main chemical constituents in Danggui Shaoyao San, including ligustrazine, albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid, ligustilide, atractylenolide I, and alisol B monoacetate. **Conclusion** HPLC-DAD can qualitatively detect the main chemical constituents in Danggui Shaoyao San, and provide an experimental basis for its pharmacodynamics studies.

[Key words] Danggui Shaoyao San; traditional Chinese prescription; high performance liquid chromatography-diode array detector