

甘遂半夏汤的UPLC-DAD指纹图谱研究[△]

洪博*,刘军,张杰,徐天娇,王玉春,李文静[#](齐齐哈尔医学院药学院,黑龙江齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)17-2373-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.17.16

摘要 目的:建立甘遂半夏汤的指纹图谱,为完善其质量控制提供参考。方法:采用超高效液相色谱-二极管阵列检测器(UPLC-DAD)法建立13批甘遂半夏汤的指纹图谱,色谱柱为Waters Acquity UPLC HSS T₃,流动相为0.1%甲酸-乙腈(梯度洗脱),流速为0.5 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为35 ℃,进样量为4 μL。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对指纹图谱进行评价,并采用SPSS 13.0软件对各样品进行聚类分析。结果:方法学考察中,各色谱峰的保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%(n=6)。13批甘遂半夏汤指纹图谱的相似度均大于0.95,确定了21个共有色谱峰,并指认了其中芍药苷、甘草苷及甘草酸3个共有色谱峰。聚类分析结果显示,甘遂半夏汤样品分为2类。结论:建立的UPLC-DAD指纹图谱体现了甘遂半夏汤组分的整体特征,为甘遂半夏汤制剂质量标准的建立提供了可靠依据。

关键词 甘遂半夏汤;超高效液相色谱-二极管阵列检测器法;指纹图谱;质量控制

Study on UPLC-DAD Fingerprint of Gansui Banxia Decoction

HONG Bo, LIU Jun, ZHANG Jie, XU Tianjiao, WANG Yuchun, LI Wenjing (College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprints of Gansui banxia decoction, and to provide reference for improving quality control. METHODS: UPLC-DAD was used to establish the fingerprints of 13 batches of Gansui banxia decoction. The determination was performed on Waters Acquity UPLC HSS T₃ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.5 mL/min. The detection wavelength was set at 254 nm, and column temperature was 35 ℃. The sample size was 4 μL. Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (2004A edition) was used to evaluate the fingerprints. SPSS 13.0 software was used for cluster analysis of those samples. RESULTS: In the methodology validation, RSDs of retention time and relative peak area were all lower than 2% for each peak (n=6). The similarity of fingerprints for 13 batches of Gansui banxia decoction was higher than 0.95; 21 common chromatographic peaks were marked, and 3 common chromatographic peaks of paeoniflorin, liquiritin, glycyrrhizic acid were identified. The results of cluster analysis indicated that Gansui banxia decoction samples were classified into 2 classes. CONCLUSIONS: The established UPLC-DAD fingerprint shows the overall characteristics of components in Gansui banxia decoction. It provides reliable evidence for the establishment of quality standard for Gansui banxia decoction.

KEYWORDS Gansui banxia decoction; UPLC-DAD; Fingerprint; Quality control

甘遂半夏汤收载于《金匱要略·痰饮咳嗽病脉证并治》,有攻逐水饮、洁净肠腑之功效^[1]。甘遂半夏汤由甘遂、半夏、芍药、甘草组成,方中甘遂为君,降逆,攻逐饮邪,善行肠间经隧之饮邪;半夏为臣,醒脾燥湿,化饮降逆,宣畅气机;芍药补血益阴缓急,甘草益气和中,同为佐^[2-3]。虽然本方中甘遂药性峻猛,有一定毒性,加之与甘草配伍的“十八反”禁忌,但其仍有广泛的临床应用,主要用于治疗(结核性)胸膜炎、肝硬化腹水、肾积水、肺源性心脏病腹水、慢性腹泻等^[4-7]。现代药理实验也表明,该方对实验性大鼠心包积液、尿毒症、肾积水、肝硬化腹水、肝癌、高血糖及甲状腺功能紊乱等都有一定的

改善作用^[8-12]。

近年来,关于甘遂半夏汤的研究多集中在药理作用及临床应用方面,质量标准研究鲜有报道。对本方中的甘遂、半夏、芍药、甘草单味药材的指纹图谱已有大量的文献报道^[13-16],但目前未见甘遂半夏汤指纹图谱研究的相关报道。为了进一步完善我国有效方剂质量标准,本研究以经典名方甘遂半夏汤为研究对象,建立超高效液相色谱-二极管阵列检测器(UPLC-DAD)指纹图谱,为其质量标准的建立提供一定参考。

1 材料

1.1 仪器

Acquity UPLC-H-Class 高效液相色谱(HPLC)仪,包括四元泵洗脱系统、自动进样系统、柱温箱及DAD(美国Waters公司);BSA224S-CW 高分辨电子天平(德国Sartorius公司);5417R 台式高速离心机(德国Eppendorf科技有限公司)。

△ 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(No.81403173);齐齐哈尔医学院院内基金面上项目(No.QY2016M-11)

* 讲师,硕士。研究方向:中药化学成分分析。电话:045-22663159。E-mail:bohong200630174@163.com

通信作者:讲师,硕士。研究方向:中药质量标准。电话:045-22663159。E-mail:lwj022325@163.com

1.2 药品与试剂

13批药材分别购自齐齐哈尔新药特药大药房(标记为S1,批号:20160221;S13,批号:20160311)、齐泰药店(标记为S2,批号:20151218;标记为S3,批号:20151129;标记为S4,批号:20160923;标记为S5,批号:20161211;标记为S6,批号:20160823)、齐市建华区鸿福大药房(标记为S7,批号:20160923)、齐齐哈尔市鹤城中药批发站卜奎药店(标记为S8,批号:20170223;标记为S9,批号:20171129;标记为S10,批号:20161117;标记为S11,批号:20171202)和齐齐哈尔康盈国药堂中药店(标记为S12,批号:20161214),所购药材经齐齐哈尔医学院药学院中药教研室主任郭丽娜教授鉴定均为真品,符合2015年版《中国药典》(一部)药材标准的有关规定,并留样于齐齐哈尔医学院药学院中药材标本室;芍药苷对照品(批号:160524,纯度:99%)、甘草苷对照品(批号:161201,纯度:98.5%)及甘草酸对照品(批号:160602,纯度:98.5%)均购自上海博顿生物化工有限公司;甲醇、乙腈(美国Fisher公司,色谱级);甲酸(美国Tedta公司,色谱级);无水乙醇(济南世纪通达化工有限公司,分析纯);水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC HSS T₃(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),预柱为Waters Acquity UPLC HSS T₃(5 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相:A为0.1%甲酸,流动相B为乙腈,梯度洗脱(0~2 min, 90%~80% A; 2~5 min, 80%~60% A; 5~10 min, 60%~45% A; 10~15 min, 45%~0% A; 15~16 min, 0% A);流速:0.5 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:35℃;进样量:4 μL。

2.2 供试品溶液的制备

按照《金匱要略》甘遂半夏汤处方比例,精密称取甘遂0.3 g、半夏0.9 g、芍药1.5 g、甘草0.6 g,置于同一圆底烧瓶中,加入70%乙醇60 mL回流提取2次,每次1 h,抽滤,合并2次滤液,浓缩至60 mL,称质量;将滤液放至室温后再次称质量,用70%乙醇补足损失的质量。然后将滤液以17 217×g离心5 min,收集上清液,0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称取芍药苷、甘草苷和甘草酸对照品适量,置于同一5 mL棕色瓶中,乙腈溶解并定容至刻度,制备成每mL含芍药苷400 μg、甘草苷510 μg和甘草酸620 μg的混合对照品溶液,0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 取“2.2”项下供试品(S1)溶液、“2.3”项下混合对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,供试品溶液色谱图中的芍药苷、甘草苷和甘草酸的测定与其他成分不存在明显的干扰,表明本方法对甘遂半夏汤中指认成分的检出具有较好的

专属性。

2.4.2 精密性 取同一供试品(S1)溶液4 μL,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱。以甘草酸的保留时间和峰面积为参照,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%(n=6),表明仪器的精密性良好,符合指纹图谱的要求。

2.4.3 稳定性 取同一供试品(S1)溶液,分别于制备后的0、2、4、6、8、10、12、24 h,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。以甘草酸的保留时间和峰面积为参照,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%(n=8),表明样品溶液在室温条件下24 h内稳定。

2.4.4 重复性 取同批次样品(S1)6份,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱。以甘草酸的保留时间和峰面积为参照,计算各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于2%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立及相似度评价

取13批药材,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,并以混合对照品溶液进样进行色谱峰的定位。然后将13批色谱图数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)版,以样品S1的图谱为参照图谱R,设定时间窗宽度为0.5 min,自动匹配生成13批样品的指纹图谱;并以样品S1的图谱为参照图谱,采用自动匹配模式进行相似度评价。供试品(S1)溶液与混合对照品溶液的典型色谱见图1,13批样品的指纹图谱见图2,相似度评价结果见表1。

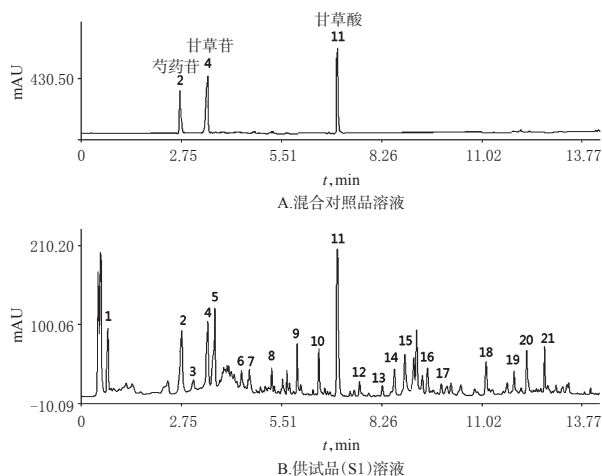


图1 典型色谱图

Fig 1 Typical chromatograms

结果显示,13批样品色谱图的相似度均大于0.95。共得到21个共有色谱峰,并指认了其中的3个共有色谱峰:2号共有色谱峰为芍药苷、4号共有色谱峰为甘草苷和11号共有色谱峰为甘草酸。

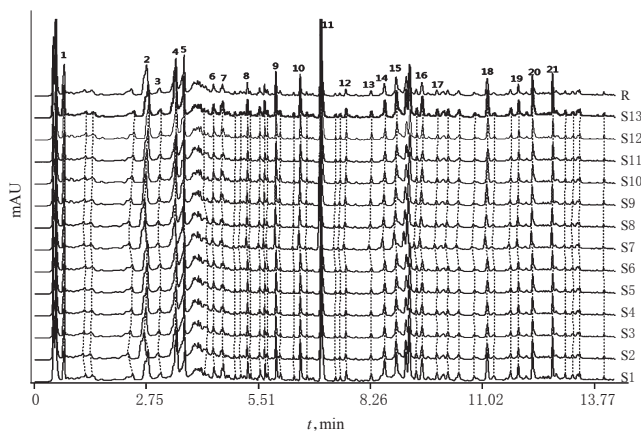


图2 13批甘遂半夏汤的指纹图谱

Fig 2 Fingerprints of 13 batches of Gansui banxia decoction

表1 13批甘遂半夏汤的相似度测定结果

Tab 1 Similarity determination of 13 batches of Gansui banxia decoction

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	对照(R)
S1	1.000	0.979	0.962	0.968	0.958	0.957	0.929	0.958	0.979	0.983	0.963	0.984	0.998	0.980
S2	0.979	1.000	0.994	0.998	0.995	0.994	0.973	0.989	0.987	0.993	0.996	0.996	0.984	0.998
S3	0.962	0.994	1.000	0.997	0.997	0.998	0.970	0.988	0.976	0.982	0.996	0.986	0.968	0.993
S4	0.968	0.998	0.997	1.000	0.999	0.997	0.974	0.991	0.983	0.989	0.998	0.993	0.975	0.996
S5	0.958	0.995	0.997	0.999	1.000	0.998	0.972	0.991	0.977	0.982	0.998	0.987	0.965	0.993
S6	0.957	0.994	0.998	0.997	0.998	1.000	0.974	0.99	0.978	0.983	0.996	0.987	0.965	0.993
S7	0.929	0.973	0.97	0.974	0.972	0.974	1.000	0.962	0.956	0.965	0.971	0.969	0.942	0.973
S8	0.958	0.989	0.988	0.991	0.991	0.99	0.962	1.000	0.988	0.981	0.991	0.983	0.963	0.990
S9	0.979	0.987	0.976	0.983	0.977	0.978	0.956	0.988	1.000	0.994	0.977	0.992	0.981	0.990
S10	0.983	0.993	0.982	0.989	0.982	0.983	0.965	0.981	0.994	1.000	0.982	0.998	0.988	0.993
S11	0.963	0.996	0.996	0.998	0.998	0.996	0.971	0.991	0.977	0.982	1.000	0.988	0.970	0.994
S12	0.984	0.996	0.986	0.993	0.987	0.987	0.969	0.983	0.992	0.998	0.988	1.000	0.989	0.996
S13	0.998	0.984	0.968	0.975	0.965	0.965	0.942	0.963	0.981	0.988	0.970	0.989	1.000	0.985
对照(R)	0.980	0.998	0.993	0.996	0.993	0.993	0.973	0.99	0.99	0.993	0.994	0.996	0.985	1.000

2.6 聚类分析

以共有峰峰面积为变量,运用SPSS 13.0软件对13批样品进行聚类分析,得出树状图。聚类谱系中,当判别条件距离 $d_i=10$ 时,将13批样品分为3类:S2、S3、S4、S5、S6、S8、S9、S10、S11、S12批次样品聚为一类,S1、S13批次样品聚为一类,S7批次样品聚为一类;当判别条件距离 $d_i=15$ 时,将13批样品分为2类:S1、S7、S13批次样品聚为一类,其余10批次样品聚为一类。这说明药材的产地可能不同,由于气候、生长环境、采收时间等因素,会影响药材中化学成分的含量,造成药材质量的差别较大,影响由各个药材组成的中药复方甘遂半夏汤中化学成分的含量差别,最终影响该方药效的发挥。13批甘遂半夏汤的聚类树状图见图3。

3 讨论

特征中药指纹图谱是中药质量控制的有效途径,是保证中药安全、有效的重要环节,为中药质量评价提供了新思路和新方法。本研究共标定了21个共有色谱峰,并指认了其中3个共有色谱峰。13批样品的指纹图谱

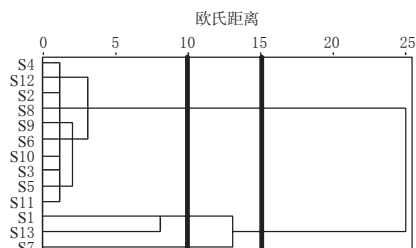


图3 13批甘遂半夏汤的聚类树状图

Fig 3 Dendrogram of 13 batches of Gansui banxia decoction

相似度均大于0.95,说明不同来源或批次甘遂半夏汤的化学组成的一致性较好,这为其质量标准研究奠定了一定的物质基础,同时也为我国经典名方的现代化研究和开发提供了一种新思路。

3.1 色谱方法的选择

在前期研究中,笔者分别采用了HPLC法和UPLC法进行甘遂半夏汤指纹图谱的建立分析,发现HPLC法分析时间较UPLC法更长,且甘遂半夏汤中的各成分的色谱峰有拖尾的现象,而采用UPLC法分析后,色谱峰峰形较好,分析效率更高,可显著缩短分析时间以及减少流动相的消耗,故在本研究中采用UPLC法进行指纹图谱的构建。

3.2 流动相的选择

在前期研究中,笔者分别对甲醇-水、乙腈-水、0.1%甲酸-乙腈、0.1%甲酸-水和0.1%磷酸-水等流动相组成进行了考察。结果表明,以0.1%甲酸-乙腈为流动相系统时分离效果最佳,各峰间分离度和峰形均更好,保留时间也合适。因此,本研究选择0.1%甲酸-乙腈为流动相体系进行梯度洗脱。

3.3 检测波长的选择

笔者采用DAD在200~400 nm波长范围内进行全波长扫描,并参考甘遂、半夏、芍药及甘草的检测波长,发现供试品在254 nm波长处出峰数最多,各峰间分离度良好,特征峰明显且峰形较好,能较好地反映甘遂半夏汤的整体化学形态及色谱保留行为,故在本研究选定254 nm为检测波长。

3.4 样品提取溶剂的选择

本研究选用70%乙醇为溶剂进行样品提取,是因为乙醇的溶解性能较好,对中草药细胞的穿透能力较强,用乙醇提取比用水提取的用量更少,且提取时间较短,溶解出的水溶性杂质也少。乙醇虽为有机溶剂但毒性小,可反复回收使用,而且乙醇提取液不易发霉变质,所以用乙醇提取也是中药材成分分析样品处理的常用方法之一。

本研究的目的是建立甘遂半夏汤的指纹图谱,为甘遂半夏汤的质量标准奠定基础,所以用乙醇提取更利于分析甘遂半夏汤的主要成分及其质量进行分类分析。但不足之处是未对甘遂半夏汤的水煎剂进行分析,后者的分析结果更适合指导临床用药,故本课题组

切片与切段对叠鞘石斛多糖、联苜类化合物及石斛酚提取量的影响研究[△]

谢巧^{1*}, 栗圣榕¹, 廖莉¹, 颜成功², 张廷模¹, 夏厚林^{1#}(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.四川万安石斛产业开发有限公司, 成都 610213)

中图分类号 R284.2; R282.4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)17-2376-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.17.17

摘要 目的:研究切片、切段对叠鞘石斛中多糖、联苜类化合物及石斛酚提取量的影响,比较叠鞘石斛切片、切段的优劣。方法:将叠鞘石斛焯蒸后切制成长度为10 mm的段及厚度为4 mm的片,于60 ℃烘干,然后将叠鞘石斛片(段)煎煮60、90、120 min及温浸60、90 min;采用紫外-可见分光光度法测定其在煎煮及温浸过程中多糖、联苜类化合物提取量,采用高效液相色谱法测定叠鞘石斛片(段)中石斛酚的提取量;另计算浸出物提取率。结果:在煎煮过程中,叠鞘石斛片较石斛段多糖、联苜类化合物提取量分别增加了0.06~0.17、0.08~0.11 mg/g,石斛酚提取率增高了37.5%;在温浸过程中,叠鞘石斛片较石斛段多糖、联苜类化合物提取量分别增加了0.33~0.58、0.17~0.28 mg/g;叠鞘石斛片较石斛段的水溶性浸出物及醇溶性浸出物提取率分别增高了2.89%、0.98%。结论:叠鞘石斛切片优于切段,本研究可为《中国药典》中石斛切制时改段为片提供一定的参考。

关键词 叠鞘石斛;切片;切段;多糖;联苜类化合物;石斛酚

Study on the Effects of Slice and Segment on the Extraction Amount of Polysaccharides, Bibenzyl Compounds and Dendrophenol from *Dendrobium denneanum*

XIE Qiao¹, LI Shengrong¹, LIAO Li¹, YAN Chenggong², ZHANG Tingmo¹, XIA Houlin¹(1.School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2.Sichuan Wan'an Dendrobium Industry Development Co., Ltd., Chengdu 610213, China)

接下来的研究重点将是在本研究基础上针对甘遂半夏汤水煎液进行成分分析。

参考文献

- [1] 张仲景.金匱要略[M].北京:人民卫生出版社,2012:49.
- [2] 王付.学用甘遂半夏汤方证的思考与探索[J].中医药通报,2015,14(1):14-16.
- [3] 程力敏,李景凡.甘遂半夏汤方证刍议[J].中医药学报,1987,13(5):33-34.
- [4] 赵桐,钟赣生,张建美,等.含甘遂-甘草反药组合的甘遂半夏汤临床应用分析[J].中国临床医生杂志,2014,42(12):89-91.
- [5] 刘宾,孙宁,王付.甘遂半夏汤的临床应用[J].河南中医,2014,34(12):2297-2298.
- [6] 陈锐.甘遂半夏汤临床新用[J].中国社区医师,2011,13(24):28-29.
- [7] 刘超.甘遂半夏汤治疗痰饮久泻1例[J].中国社区医师,2010,12(27):150-152.
- [8] 王茜,钟赣生,王宏蕾,等.甘遂半夏汤中甘遂与甘草不同

[△]基金项目:国家十二五科技支撑计划项目(No.2011BAI13B02-8);成都市科技项目(No.2015-NY02-00399-NC)

* 硕士研究生。研究方向:中药质量控制与物质基础研究。E-mail: Xieqiao1995@126.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药质量控制与物质基础研究。E-mail: xhl64@163.com

比例配伍对癌性腹水模型大鼠生物效应影响的研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(4):177-181.

- [9] 王付,程秀娟,张大伟,等.甘遂半夏汤对正常大鼠心肾功能及形态学的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(8):155-159.
- [10] 王付,程秀娟,王帮民,等.甘遂半夏汤对大鼠肝功能及形态学的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(8):160-164.
- [11] 王付,程秀娟,王帮民,等.甘遂半夏汤对大鼠血常规血糖及甲状腺形态的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(8):165-168.
- [12] 王付,张延武,程秀娟,等.甘遂半夏汤对正常大鼠一般情况及心率、肾上腺的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(8):169-172.
- [13] 王磊,李明华,程显隆,等.甘遂的HPLC指纹图谱研究及指标成分含量测定[J].药物分析杂志,2014,34(4):628-631.
- [14] 郑宵蓓,陈科力,尹文仲,等.鄂西高产半夏甾醇类成分的GC指纹图谱研究[J].中国药房,2009,20(3):194-196.
- [15] 马大龙,张晓平,魏宝红,等.芍药汤高效液相色谱指纹图谱的建立[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(18):78-81.
- [16] 王青,张亚楠,张伟云,等.乌拉尔甘草的UPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2018,29(6):774-777.

(收稿日期:2017-12-26 修回日期:2018-05-20)

(编辑:林静)