

当归芍药散 HPLC-DAD 指纹图谱峰来源分析

胡虎尧¹, 周瑜¹, 陶春蕾¹, 宋欣², 许钒^{1*}, 王运来¹

(¹安徽中医药大学药学院, 合肥 230038; ²安徽万邦医药科技有限公司, 合肥 230088)

摘要 建立了当归芍药散的HPLC-DAD指纹图谱分析方法,确定了部分特征峰的归属。采用高效液相色谱法,色谱柱为Welchrom C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(梯度洗脱),检测波长为230 nm,流速为1 mL/min。从建立的当归芍药散指纹图谱中,对照出当归芍药散中的21个特征峰8个来自当归,11个来自白芍,13个来自川芎,4个来自白术,2个来自茯苓,3个来自泽泻,同时鉴定出7个峰的化学结构。当归芍药散指纹图谱的结果为鉴别当归芍药散的质量提供了依据,也为阐明各部位的药效物质基础提供了参考。

关键词 当归芍药散; HPLC-DAD; 指纹图谱

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)02-0205-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140213

HPLC-DAD fingerprint of *Danggui-Shaoyao-San* and its synergy

HU Siyao¹, ZHOU Yu¹, TAO Chunlei¹, SONG Xin², XU Fan^{1*}, WANG Yunlai¹

¹Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038;

²Anhui Wanbang Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Hefei 230038, China

Abstract An HPLC-DAD fingerprint method was developed for the simultaneous determination of *Danggui-Shaoyao-San*. A Welchrom C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with a gradient mobile phase system of acetonitrile-water containing 0.05% phosphoric acid. The detection wavelength was 230 nm; the flow rate was 1 mL/min. From the fingerprint we can conclude that in the total 21 peaks, 8 was from *Angelicae sinensis*, 11 from *Paeonia lactiflora*, 13 from the *Ligustici Chuanxiong*, 4 from *Atractylodis macrocephala*, 2 from *Poria cocos*, and 3 from *Rhizoma Alismatis*. The validated method was applied to the quality control of *Danggui-Shaoyao-San*, providing a basis for the efficacy of various parts to clarify the material basis.

Key words *Danggui-Shaoyao-San*; HPLC-DAD; fingerprint

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81173368)

当归芍药散(*Danggui-Shaoyao-San*, DSS)出自张仲景所著《金匮要略》中,该方由当归、白芍、川芎、白术、茯苓、泽泻六味药组成。该方原治“妇人怀妊,腹中病痛”、“妇人腹中诸疾痛”,活血利水而不伤正,养血益脾而不敛邪,为治疗水瘀互阻、肝脾不调之良剂。方以芍药养血柔肝、缓急止痛,佐以当归川芎调肝养血,配以茯苓、白术、泽泻健脾利湿,使肝血足而气条达,脾运健而湿邪除肝脾调和,从而达到活血利水,调肝理脾之功。临床主要用于妇科疾病,也主治消化、呼吸、

泌尿、内分泌、生殖、神经、循环等多个系统病症,体现出广泛的适应性。

复方指纹图谱不仅可以反映出所含药物本身的信息,而且在某种程度上反映出复方是一个多样化的天然组合化学库,考察不同配伍对复方主要特征指纹峰的影响可以为配伍规律及物质基础的研究提供一定的参考^[1-6]。本实验采用HPLC-DAD方法建立当归芍药散的指纹图谱,并找到当归芍药散部分特征峰的归属,旨为鉴别当归芍药散的质量提供依据。

* 收稿日期 2013-11-21 *通信作者 Tel:0551-65169030 E-mail:13505514407@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81173368)

1 材料

1.1 药物与试剂

药材购自安徽协和成药业饮片有限公司,经安徽中医学院生药教研室金传山教授鉴定药材饮片性状均符合2010年版《中华人民共和国药典》规定。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 纯度≥96.5%),白术内酯I对照品(批号:A0372 纯度≥96.5%),23-乙酰泽泻醇B醋酸酯对照品(批号:A0446 纯度≥98%),藁本内酯对照品(批号:A0219 纯度≥98%),购于鼎瑞化工(上海)有限公司。甲醇、乙腈(色谱纯,美国Tedia试剂公司)。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

岛津LC-10AD型高效液相色谱仪;SPD-10AD二极管阵列检测器;CBM-10A系统控制器;LC-Solution Light英文色谱数据系统;岛津CTO-10A柱温箱;AB135-S型十万分之一电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Welchchrom C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流速:1.0 mL/min;柱温:25 ℃;进样量:20 μL;灵敏度0.640 AUFS;流动相:(乙腈A-0.05%磷酸水溶液B)梯度洗脱,洗脱条件为:0~15 min,5%~12%A;15~25 min,12%A;25~60 min,12%A~25%A;60~80 min,25%A~55%A;80~100 min,55%A~70%A;100~120 min,70%A~95%A;120~130 min,95%A。检测波长:230 nm。

2.2 供试品溶液的制备

因市售制剂中芍药苷含量较低,故实验采用课题组自己提取的复方制剂。依据前期考察的当归芍药散最佳提取工艺方法^[8],按处方量(当归3 g,白芍16 g,川芎8 g,白术4 g,茯苓4 g,泽泻8 g)准确称取各药材粗粉,充分混匀后置1 000 mL圆底烧瓶中,浸泡1 h,加入8倍量75%的乙醇,温度控制在80 ℃,回流提取2次,每次1.5 h,合并滤液,过滤,浓缩至生药浓度为1.72 g/mL,取适量用甲醇定容至最终生药浓度为43 mg/mL,微孔滤膜滤

过,取续滤液供HPLC检测。单味药材、缺味药材的溶液制备同上。

2.3 对照品溶液制备

依照课题组前期研究基础^[7],分别取芍药苷、芍药内酯苷、阿魏酸、川芎嗪、白术内酯I以及23-乙酰泽泻醇B醋酸酯对照品,精密称定,甲醇溶解并定容。分别配制成质量浓度为芍药苷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,藁本内酯98.5 μg/mL,23-乙酰泽泻醇B醋酸酯38.2 μg/mL,并置-20 ℃冰箱保存备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度 按样品制备方法制备当归芍药散供试品溶液,连续进样5次,测定HPLC图,结果各共有峰相对峰面积的RSD小于5%,相对保留时间的RSD小于1%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性 取当归芍药散样品,按“2.2”项下操作,分别在0、4、8、12和24 h在上述分析条件下进样分析,记录色谱图,计算各色谱峰的相对峰面积。结果各共有峰相对峰面积的RSD小于2%,相对保留时间的RSD小于1%,表明供试品溶液在24 h内测定稳定性良好。

2.4.3 重复性 取5批自制当归芍药散样品,按“2.2”项下操作,在上述分析条件下对5批样品进行重复性分析,记录色谱图,并计算各色谱峰相对峰面积的,结果各共有峰相对峰面积的RSD小于5%,相对保留时间的RSD小于1%,表明方法的重复性良好。

2.5 指纹图谱以及峰归属的测定

2.5.1 指纹图谱各峰来源归属 采集全方、单味药材和缺味组方的HPLC图中各峰的保留时间和紫外光谱图的比对,认定峰来源。结果:比较当归芍药散全方HPLC图与各拆方图谱可知,在当归芍药散指纹图谱21个共有峰中,2、4、5、6、10、15、17、19号峰来源于当归,1、2、4、5、6、7、8、9、11、12、13号峰来源于白芍(图1~2),用同法测定(图略)得知,1、2、3、4、5、6、10、12、14、15、16、17、19号峰来源于川芎,2、4、18、20号峰来源于白术,2、4号峰来源于茯苓,1、2、4、21号峰来源于泽泻(表1)。

2.5.2 指纹图谱的测定 取芍药苷对照品溶液及10批当归芍药散供试样品,在上述色谱条件下进行HPLC分析与混合对照品对比确定成分,结果见图3~4。

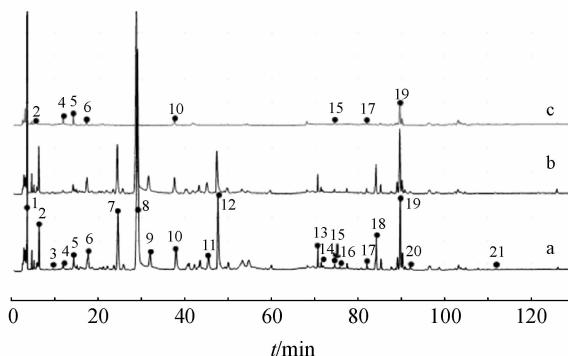


Figure 1 HPLC chromatograms of *Danggui-Shaoyao-San* (DSS), *Angelica sinensis* and Lack of *Angelica sinensis* of DSS powder
a;DSS;b:Lack of *Angelica sinensis*;c:*Angelica sinensis*

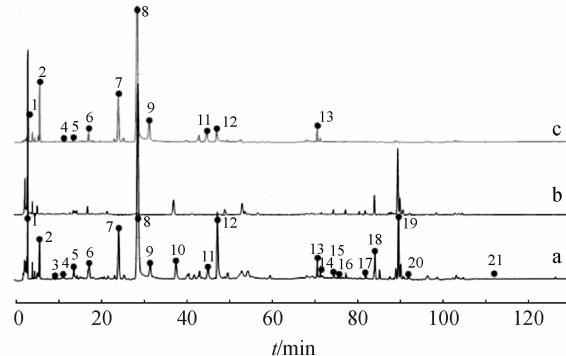


Figure 2 HPLC chromatograms of DSS, *Paeonia lactiflora* and Lack of *Paeonia lactiflora* of DSS powder
a;DSS;b:Lack of *Paeonia lactiflora*;c:*Paeonia lactiflora*

Table 1 Total peak source attribution

No.	t _R /min	Compound	<i>Angelica sinensis</i>	<i>Paeonia lactiflora</i>	<i>Ligusticum Chuanxiong</i>	<i>Atractylodes macrocephala</i>	<i>Poria cocos</i>	<i>Alisma orientalis</i>
1	4.87		✓	✓			✓	
2	6.25	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
3	10.26	Tetramethylpyrazine		✓				
4	11.96	✓	✓	✓	✓	✓		✓
5	14.25	✓	✓	✓				
6	17.57	✓	✓	✓				
7	24.46	Albiforin		✓				
8	28.94	Paeoniflorin		✓				
9	31.86		✓					
10	37.9	Ferulic acid	✓			✓		
11	45.37		✓					
12	47.56		✓	✓				
13	70.66		✓					
14	71.42		✓					
15	74.55	✓		✓				
16	75.74		✓					
17	81.97	✓		✓				
18	84.17		✓					
19	89.68	Ligustilide	✓			✓		
20	92.04	Atractylenolide I			✓			
21	112.51	Alisol B 23-acetate						✓

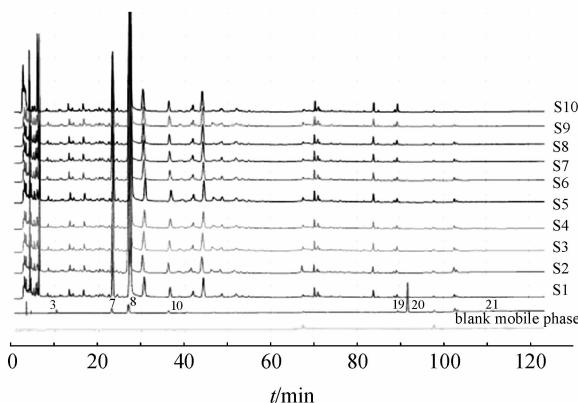


Figure 3 HPLC fingerprint of DSS powder

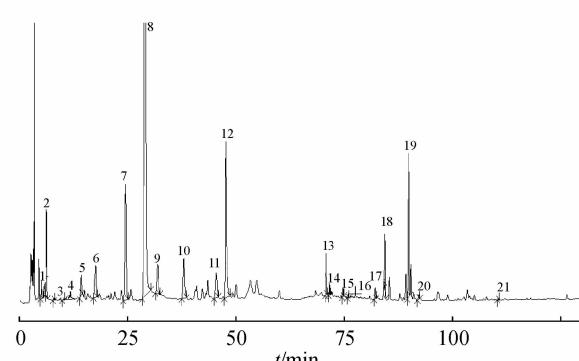


Figure 4 HPLC chromatograph of DSS powder
4:Tetramethylpyrazine; 7: Albiforin; 8: Paeoniflorin; 10: Ferulic acid;
19:Ligustilide;20:Atractylenolide;21:Alisol B 23-acetate

2.5.3 参照峰的选择 在HPLC图谱中选择峰面积较大、出峰时间适中且稳定的色谱峰作为参照峰,结果 t_R 为28.94 min的色谱峰符合此条件,经对照品认定为芍药苷的吸收峰,故选择芍药苷作为参照峰(图5)。

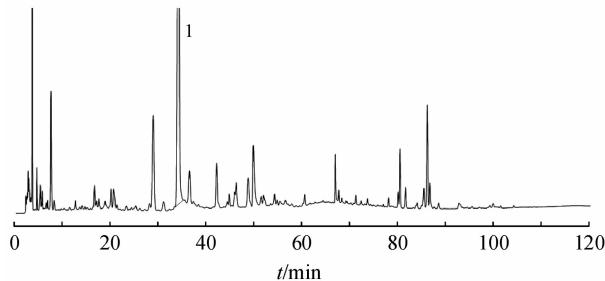


Figure 5 HPLC chromatograph of DSS powder

1:Paeoniflorin

2.5.4 共有指纹峰的标定及均值相似度的计算

采集10批DSS供试品的HPLC-UV指纹图谱,将采集到得色谱图输出为*.cdf格式,导入到“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”中进行多点校正,确定共有指纹的数目,自动生成共有模式并进行相似度计算。以芍药苷的保留时间和峰面积积分值为1,选取了色谱图中的21个共有峰进行标定;以21个共有峰峰面积的均值做模板,利用“相关系数”法和“夹角余弦”法计算指纹图谱的相似度,两种方法计算的相似度结果均在0.99以上。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的选择

3.1.1 流动相梯度条件的选择 依据课题组对当归芍药散中7成分做出的初步定性分析^[7],在此基础上摸索流动相条件。在此基础上摸索流动相条件。结果显示表明,流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B)梯度洗脱,洗脱条件为:0~15 min,5%~12% A;15~25 min,12% A;25~60 min,12% A~25% A;60~80 min,25% A~55% A;80~100 min,55% A~70% A;100~120 min,70% A~95% A;120~130 min,95% A,此时流动相及梯度的分离效果最好,130 min内出峰完全,并且30 min后无干扰峰。

3.1.2 检测波长的选择 精密吸取当归芍药散供试液20 μL,进样分析,利用DAD检测器进行紫外

扫描检测,对208,210,230,238,254,276,280,300,320 nm等9个波长下检测的色谱图进行比较。确定合适的检测波长,结果供试品在230 nm检测波长下检出色谱峰信息较全、峰面积最大,且基线较为稳定,故选择230 nm作为检测波长。

3.2 指纹图谱评价

建立了当归芍药散的HPLC-DAD指纹图谱,确定了21个共有峰,利用“相关系数法”和“夹角余弦法”计算指纹图谱的相似度,结果均大于0.90以上,表明所建立的指纹图谱的技术指标稳定,重复性好,提取工艺稳定可靠。再次基础上确认了各共有峰的归属,并对拆方后的图谱进行了分析归属。指纹图谱研究结果使当归芍药散中尚不明确的众多成分由无序到有序,使各成分的来源清晰,并依其相对保留时间和相对峰面积等参数来客观的评价当归芍药散的内在质量。

3.3 复方指纹图谱归属

当归芍药散中的21个特征峰中2、4、5、6、10、15、17、19号峰来源于当归,1、2、4、5、6、7、8、9、11、12、13号峰来源于白芍,1、2、3、4、5、6、10、12、14、15、16、17、19号峰来源于川芎,2、4、18、20号峰来源于白术,2、4号峰来源于茯苓,1、2、4、21号峰来源于泽泻。

本试验首次对当归芍药散进行HPLC-DAD指纹图谱的相似度计算和分析。根据分析结果可看出,当归芍药散中的特征峰大多来自于当归、白芍、川芎3个单味药。这与当归芍药散在组方机制中的君臣佐使也是一致的。该指纹图谱相关性分析方法可较为准确地判别当归芍药散指纹图谱中主要色谱峰的归属,使作者对当归芍药散体外成分的数量、比例及存在状态有了一个很好的掌握,同时也为当归芍药散进一步的药效物质基础分析建立了方法。

参 考 文 献

- [1] Yi L, Qi LW, Li P, et al. Simultaneous determination of bioactive constituents in *Danggui Buxue Tang* for quality control by HPLC coupled with a diode array detector, an evaporative light scattering detector and mass spectrometry [J]. *Anal Biol Chem*, 2007, 389(2): 571~580.
- [2] Liu HM, Liu J, Li KY. RP-HPLC simultaneous determination of ferulic acid and paeoniflorin in angelica and peony [J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2007, 29(11): 1 707~1 707.

- [3] Wang B, Han G, Zhang XJ, et al. Content changes of glycyrrhizin between single and mixed decoction of *Dahuang-Gancao* decoction [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, 32(10): 1 794 - 1 796.
- [4] Wang R, Zhan XR, Wang J, et al. Study in contents of paeoniflorin in *Radix Paeoniae alba* individual boiling extracts and *Guizhi* decoction co-boiling extracts [J]. *J Shanxi Coll Tradit Chin Med* (山西中医学院学报), 2011, 12(3): 23 - 25.
- [5] Yi X, Huang YC, Wei G. Research on the influence of various compatibility on fingerprint of *Yupingfeng* decoction by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2009, 15(3): 1 - 3.
- [6] Zhu W, Qiu XH, Ruan XM. Comparation of paeoniflorin and ferulic acid between single and mixed decoction of *Buyanghuanwu* decoction [J]. *Beijing J Tradit Chin Med* (北京中医药), 2008, 27(8): 643 - 645.
- [7] Song X, Tao CL, Meng GD, et al. HPLC - DAD detection of *Danggui-Shaoyao* powder main chemical components [J]. *J Anhui Tradit Chin Med* (安徽中医学院学报), 2012, 31(1): 65 - 68.
- [8] Zhou Y, Tao CL, Xu F, et al. Optimization of extraction technology for *Danggui-Shaoyao* powder by multiple-index comprehensive scoring method [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18(19): 20 - 23.

• 新趋势 •

2014 年药物市场展望(1)

Thomson Reuters 发表“Drugs to watch in 2014”一文,对 2014 年药物市场进行了预测和展望。几类药物的市场前景看好,包括 Gilead 公司的 Sovaldi, GSK/Theravance 公司的 Anoro Ellipta 和 Gilead 公司的 idelalisib。

1 Sovaldi

2013 年 12 月,FDA 批准 Gilead 公司口服 NS5B 聚合酶抑制剂 Sovaldi 作为联合抗病毒片段的一部分用于治疗慢性丙型肝炎病毒(HCV)传染病。而批准依据来自 NEUTRINO、FISSION、POSITRON 和 FUSION 的 3 期试验,在试验中,Sovaldi 优于对照或安慰剂组,并显示使 SVR12 率下降 50% ~ 90%。已向欧盟递交新药申请。预计该药物 2014 年市场销售额达 24.03 亿美元,于 2017 年达销售峰值 91.21 亿美元。

Gilead 公司目前正在开发 Sovaldi 的新适应证,作为 NS5A 聚合酶抑制剂 ledipasvir 联合制剂的一部分用于治疗基因 1 型 HCV。2013 年 12 月,ION-1、ION-2 和 ION-3 的 3 期试验显示了阳性结果。试验旨在评估联合 ribavirin 或不联合 ribavirin 的差异。结果显示 Sovaldi/ledipasvir 联合制剂能干预感染过程,因而有抵消对 ribavirin 需求的潜力。2014 年上半年将向美国和欧盟递交申请。预计 2014 年该产品的销售额在 11.16 亿美元,2016 年增至 62.38 亿美元。

2 Anoro Ellipta

在 COPD 治疗领域,预计 GSK/Theravance 公司的 Anoro Ellipta 将比 Relovair 销售更加看好,预计 2019 年销售额达 30.81 亿美元,而 Relovair 的销售额预计达 27.47 亿美元。Relovair 是由支气管扩张剂长效 β2 激动剂(LABA)联合糖皮质激素受体激动剂弗替卡松组成,而 Anoro Ellipta 是由两种支气管扩张剂:vilanter 和 umeclidinium(长效毒蕈碱激动剂,LAMA)组成。Anoro Ellipta 于 2013 年 12 月获得美国授权,批准用于长期维持性治疗慢性阻塞性肺病患者气流阻塞症状,包括慢性支气管炎和肺气肿,可口服,并将于 2014 年的 1 季度投放市场。目前该药物正在等待欧盟和日本的审批。

3 Idelalisib

Gilead 公司的 idelalisib 是一种口服 PI3K p110-δ 亚单位抑制剂,于 2013 年 9 月递交申请用于治疗无痛性非霍奇金淋巴瘤。2013 年 10 月,向欧盟递交该药用于治疗慢性淋巴细胞白血病(CLL)和难治性惰性非霍奇金淋巴瘤(iNHL)的申请,目前正计划向美国递交用于治疗 CLL 的申请。此前在对经 Rituxan 和烷化剂治疗后复发的 iNHL 进行的 2 期 δ 试验中,对滤泡性淋巴瘤、小淋巴细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞淋巴瘤/Waldenstrom 巨球蛋白血症和边缘带淋巴瘤的整个响应率分别为 65%、61%、80% 和 47%。3 期试验正在进行中,预计 2022 年数据将公布。在针对 CLL 的 3 期试验中,idelalisib 联合 Rituxan 显示出显著疗效,24 周无进展存活率达 93%,而单独使用 Rituxan 的相对应数据仅为 46%。因而,该试验已经提前结束,并允许仅使用 Rituxan 治疗的病患转换成联合使用 idelalisib 的疗法。预计至 2017 年,idelalisib 的销售额将超过 10 亿美元,甚至可以达到 12.18 亿美元。