

- [7] Li SL, Song JZ, Choi FF, et al. Chemical profiling of Radix Paeoniae evaluated by ultra-performance liquid chromatography/photo-diode-array/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 49(2): 253-266.
- [8] 张子龙, 刘东辉, 黄月纯, 等. 关黄柏、黄柏及其精制提取物 HPLC 指纹图谱的相关性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 549-553.
- [9] 王黎, 高苏亚, 李华. 不同产地粉葛的指纹图谱及 PCA 模式识别分析研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(4): 448-451.

(编辑: 邓响潮)

三黄汤 HPLC 指纹图谱初步研究

李 强¹, 朱晓红^{1,2}(1. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121000; 2. 解放军二〇二医院, 辽宁 沈阳 110000)

摘要: **目的** 通过 HPLC 指纹图谱探索三黄汤的药效物质基础。**方法** 采用迪马公司 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇(A)-1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 277 nm, 对 10 批三黄汤样本进行检测分析, 建立三黄汤 HPLC 指纹图谱, 对比相同条件下体外复方图谱、单味药材图谱、药材阴性图谱及混合对照品图谱, 初步确认三黄汤主要有效成分及来源。**结果** 在该色谱条件下, 三黄汤指纹图谱中标示出 44 个共有峰, 7 个成分得到认定, 其中绿原酸来源于茵陈; 盐酸小檗碱来源于黄柏; 黄芩苷来源于黄芩; 甘草酸铵来源于甘草; 大黄酸、大黄素、大黄酚来源于大黄。**结论** 该方法准确可靠, 重复性好, 为三黄汤有效成分的确定提供了一定的实验依据。

关键词: 三黄汤; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0087-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.021

Preliminary Studies on HPLC Fingerprint of *Sanhuang* Decoction

LI Qiang¹, ZHU Xiaohong^{1,2}(1. Liaoning Medical University, Jinzhou 121000 Liaoning, China; 2. No.202 Hospital of PLA, Shenyang 110000 Liaoning, China)

Abstract: **Objective** To explore the active components in *Sanhuang* decoction (SHD) based on the establishment of SHD fingerprint. **Methods** The method was established on a Diamonsil C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase composed of methanol(A) -1% aqueous phosphoric acid(B) in gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30℃ and the detection wavelength was 277 nm. By analysis of 10 batches of SHD samples, HPLC fingerprinting was established. The main effective ingredients and their material sources in SHD were identified after comparing the in-vitro fingerprint of SHD under the same conditions, fingerprint of single herb medicine, fingerprint of negative patterns and fingerprint of mixed reference. **Results** Under the chromatographic conditions, 44 common peaks were presented in SHD fingerprint, and 7 components were identified, including chlorogenic acid from *Herba Artemisiae Scopariae*, berberine from *Cortex Phellodendri*, baicalin from *Radix Scutellariae*, ammonium glycyrrhizinate from *Radix Glycyrrhizae*, and rhein, emodin and chrysophanol from *Radix et Rhizoma Rhei*. **Conclusion** The method is accurate and reproducible, which provides experimental evidence for the determination of the effective components of SHD.

Keywords: *Sanhuang* decoction; High performance liquid chromatography; Fingerprint

收稿日期: 2014-06-18

作者简介: 李强, 男, 硕士研究生。研究方向: 中药物质基础研究。Email: liqiang607@yeah.net。通讯作者: 朱晓红, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 天然药物的提取与分离及临床药学。Email: zxh3688@sina.com。

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(201102234)。

中药复方三黄汤是解放军二〇二医院课题组根据传统验方“茵陈蒿汤”方加减制成的医院制剂,由茵陈、大黄、黄芩、甘草、黄柏 5 味清热利湿中药组成,用于预防新生儿 ABO 溶血症,对免疫抗体生成细胞也有抑制作用^[1-2]。中药指纹图谱能较全面地反应中药饮片或制剂的内在质量,改善质量标准不统一的状况等,是较为有效的中药质量评价技术之一^[3]。本研究通过 HPLC 法建立了中药复方三黄汤的指纹图谱,并对指纹图谱中共有色谱峰的药材来源作了相应的归属,为下一步深入研究三黄汤药效物质基础奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器 日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(配二元泵、脱气装置、SPD-20A 紫外检测器)、LCsolution 工作站,日本岛津公司; Milli-Q 超纯水系统,法国 Millipore 公司; KDC-40 低速离心机,科大创新股份公司中佳公司; KQ-400DB 型数控超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司; SHB-III 循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司; N-1001S-WA 旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司; PHG-9076A 电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司; FA 2004A 电子分析天平,上海垒固仪器有限公司。

1.2 试剂 乙腈、甲醇,色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号同为: 20121208; 磷酸,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号: 20100726; 冰醋酸,分析纯,台山市新宁制药有限公司,批号: 20070905; 甲酸,分析纯,北京市红星化工厂,批号: 941031-A; 二甲基亚砜,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号: 20040626。

1.3 对照品及药品 绿原酸、盐酸小檗碱、甘草酸铵、黄芩苷、大黄酸、大黄素、大黄酚,均购自中国药品生物制品检定所,批号分别为: 110753-200413、110713-200609、110731-200614、110715-200212、110757-200206、110756-200110、110796-200615; 茵陈、黄芩、黄柏、甘草、炙大黄,均购自安徽新兴中药材饮片有限公司,批号分别为: 20121001、20121001、20121014、20121013、20121201,经解放军二〇二医院刘兰娣副主任中药师鉴定,以上中药饮片原植物来源分别为菊科茵陈蒿(*Artemisia scoparia* Waldst.et Kit.) 的干燥部分、唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi) 干燥根、芸香科植物黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid.) 的干燥树皮、豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis*

Fisch.) 的干燥根和根茎、蓼科植物掌叶大黄(*Rheum Palmatum* L.) 的干燥根和根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 迪马公司 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以甲醇(A)-1%磷酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱,见表 1,柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长为 277 nm,进样量 15 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流速/mL·min ⁻¹	甲醇(A)/%	磷酸水溶液(B)/%
1	1.0	15	85
5	1.0	17	83
10	1.0	20	80
17	1.0	26	74
25	1.0	29	71
37	1.0	37	63
50	1.0	43	57
65	1.0	49	51
85	1.0	70	30
105	1.0	92	8
130	1.0	92	8

2.2 样品制备方法

2.2.1 三黄汤复方样品制备 各单味药经适量粉碎后,过筛,参考《伤寒论》原文茵陈蒿汤及三黄颗粒的制备方法,折合成现代剂量,准确称取茵陈 30 g,黄芩 9 g,黄柏 9 g,甘草 6 g,加 8 倍量水,浸泡 1 h,加热回流提取 3 h,加入炙大黄 3 g,再继续加热回流提取 1 h,药液过滤,置容器内低温静置 24 h,取上清液,浓缩至相对密度为 1.28 ~ 1.30(60 °C ~ 65 °C) 清膏,移至蒸发皿中,最后移至鼓风干燥箱中干燥至恒质量,按以上方法制得 10 批次棕褐色粉末,出粉率为 16.15%,供 HPLC 分析。

2.2.2 单味药材样品制备 分别准确称取茵陈、黄芩、黄柏、甘草、炙大黄粉碎后粉末 30, 9, 9, 6, 3 g,按 2.2.1 方法制备茵陈、黄芩、黄柏、甘草、炙大黄味药材样品粉末,出粉率分别为 16.59%、42.04%、21.13%、24.45%、41.85%,供 HPLC 分析。

2.2.3 药材阴性样品制备 按 2.2.1 方法中剂量制备各药材阴性样品,出粉率分别为 40.24%、29.56%、26.34%、40.36%、22.15%,供 HPLC 分析。

2.3 溶液的制备

2.3.1 三黄汤供试品溶液的制备 取三黄汤水煎液浓缩干粉 0.2 g(含生药材 1.2384 g),精密称定,置 50

mL 量瓶中, 加入 75 %乙醇适量, 超声处理 30 min, 定容至刻度, 摇匀, 移至 50 mL 离心管中, 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液移至蒸发皿中, 60℃ ~ 65℃ 水浴蒸干, 用适量甲醇复溶, 最后移至 5 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取滤液作为供试品溶液。进样前用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 供 HPLC 检测分析。

2.3.2 单味药材供试品溶液制备 取各单味药材水煎液浓缩干粉 0.2 g(含生药材分别为 1.2055, 0.4757, 0.9465, 0.8180, 0.4779 g), 按 2.3.1 方法制备各单味药材供试品溶液。进样前用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 供 HPLC 检测分析。

2.3.3 药材阴性供试品溶液制备 取各药材阴性样品水煎液浓缩干粉 0.2 g(含生药材分别为 0.4970, 0.6766, 0.7593, 0.4955, 0.9029 g), 按 2.3.1 方法制备各药材阴性供试品溶液。进样前用孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 供 HPLC 检测分析。

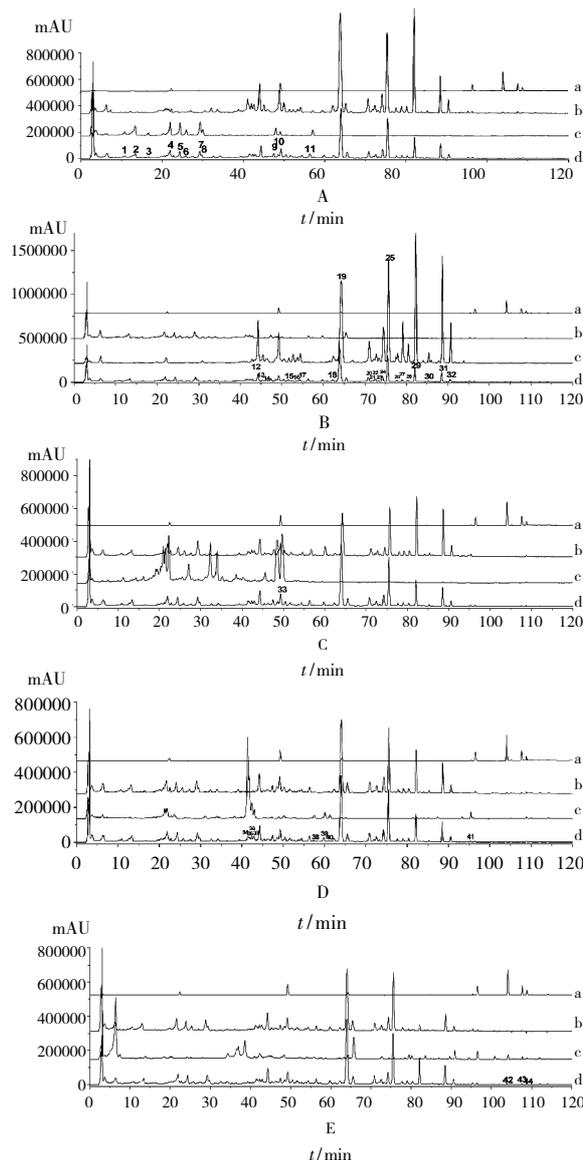
2.3.4 对照品溶液制备 分别精密称取对照品绿原酸、盐酸小檗碱、黄芩苷、甘草酸铵、大黄酸、大黄素、大黄酚, 加甲醇制得浓度分别为 0.027, 0.028, 0.028, 0.025, 0.023, 0.027, 0.028 mg·mL⁻¹ 的对照品混合溶液。

2.4 样品分析 精密量取 10 批三黄汤供试品、各单味药材供试品、各药材阴性供试品及混合对照品各 15 μL, 按 2.1 项下的色谱条件进样分析。

2.5 体外成分认定 采用药材样品图谱比对的方法, 用相同的色谱条件进行检测, 以保留时间作为鉴定标准, 进行色谱峰的指认, 并对共有峰进行初步归属分析, 见图 1。由图 1 可知, (1)初步建立的三黄汤指纹图谱有 7 个成分得到鉴定: 绿原酸来源于茵陈; 盐酸小檗碱来源于黄柏; 黄芩苷来源于黄芩; 甘草酸铵来源于甘草; 大黄酸、大黄素、大黄酚来源于大黄。(2)指纹图谱保留时间在 10 ~ 30 min 及 45 ~ 60 min 共有峰主要来源于茵陈; 保留时间在 44 ~ 45 min、50 ~ 55 min 及 60 ~ 95 min 共有峰主要来源于黄芩; 保留时间在 49.7 min 共有峰来源于黄柏; 保留时间在 42 ~ 44 min 及 55 ~ 60 min 共有峰来源于甘草; 而保留时间在 100 min 以后的共有峰来源于炙大黄。

2.6 指纹图谱的建立与分析

2.6.1 三黄汤指纹图谱的建立与分析 根据以上样品分析结果及建立的 10 批三黄汤样品的色谱图, 见图 2。三黄汤标示出 44 个共有峰(峰 3、峰 38、峰 40、峰 42、峰 43 较微量); 除部分样品未能检出峰 42、



A. 茵陈; B. 黄芩; C. 黄柏; D. 甘草; E. 炙大黄; a. 对照品; b. 阴性样品; c. 单味药材; d. 三黄汤复方

图 1 对照品、阴性样品、单味药材和三黄汤复方 HPLC 色谱图
Figure 1 HPLC results for the control, negative samples, positive samples and SHD compound

峰 43 外, 三黄汤提取物均能检出三黄汤的其他 42 个峰。在相同色谱条件下, 以保留时间作为鉴定标准, 参照文献^[4]各生药谱峰与复方谱峰相关性的研究方法, 阴性样品、单味药材及复方色谱图比对, 进行色谱峰的指认, 并对该 44 个共有峰作了相应的药材来源归属: 峰 1 ~ 峰 11 归属于茵陈, 峰 12 ~ 峰 32 归属于黄芩, 峰 33 归属于黄柏, 峰 34 ~ 峰 41 归属于甘草, 峰 42 ~ 峰 44 归属于炙大黄。经与对照品图谱(见图 3)比对, 峰 4 为绿原酸、峰 19 为黄芩苷、峰 33 为盐酸小檗碱、峰 41 为甘草酸铵、峰 42 为大黄酸、峰 43 为大黄素、峰 44 为大黄酚。

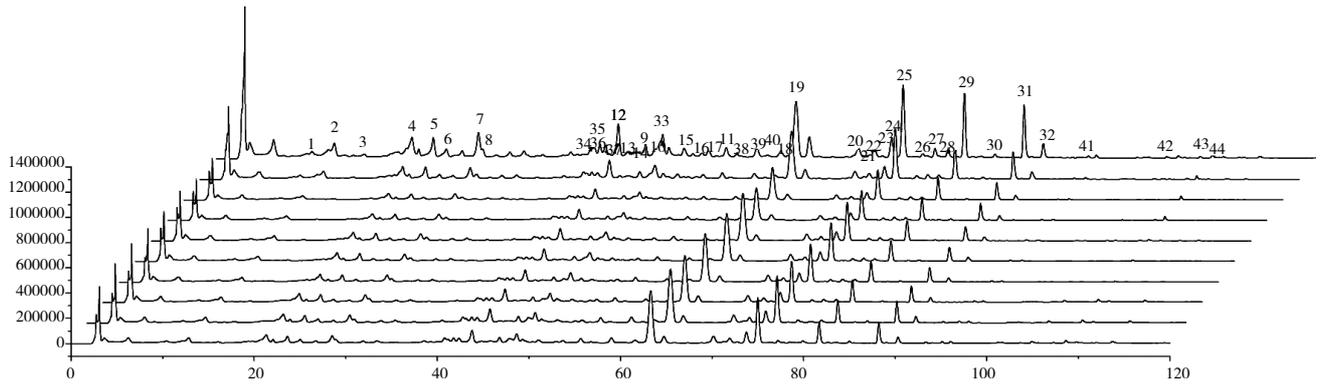


图2 10批三黄汤的指纹图谱

Figure 2 Fingerprint of 10 samples of SHD

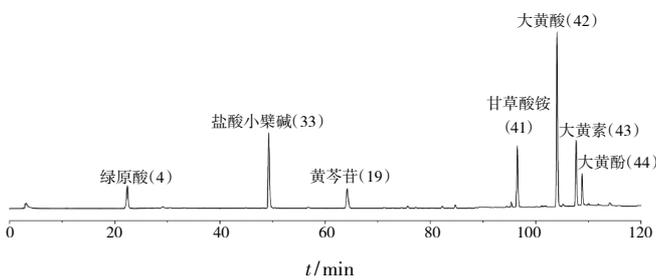


图3 对照品 HPLC 图谱

Figure 3 HPLC chromatograms of reference substance

昔为参照确定 44 个共有峰中的 11 个共有峰为构成三黄汤指纹图谱的特征峰，其保留时间和峰面积为 1，各特征峰的相对保留时间及相对峰面积分别列于表 2 和表 3。10 批三黄汤样品与对照指纹图谱相似度分别为 0.985、0.985、0.929、0.998、0.999、0.985、

表 2 10 批三黄汤特征峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of characteristic absorption peaks for the 10 batches of SHD

编号	t/min										
	峰 19	峰 5	峰 11	峰 12	峰 24	峰 25	峰 29	峰 31	峰 32	峰 33	峰 39
S1	1.000	0.383	0.886	0.697	1.167	1.187	1.291	1.391	1.424	1.031	0.940
S2	1.000	0.383	0.881	0.691	1.162	1.187	1.296	1.390	1.419	1.033	0.940
S3	1.000	0.381	0.888	0.688	1.165	1.180	1.297	1.396	1.424	1.029	0.940
S4	1.000	0.390	0.886	0.689	1.160	1.184	1.292	1.394	1.427	1.035	0.943
S5	1.000	0.381	0.886	0.697	1.164	1.184	1.294	1.393	1.421	1.037	0.944
S6	1.000	0.385	0.886	0.696	1.166	1.186	1.292	1.394	1.421	1.029	0.941
S7	1.000	0.385	0.890	0.698	1.162	1.184	1.295	1.393	1.425	1.031	0.939
S8	1.000	0.387	0.883	0.696	1.162	1.182	1.298	1.396	1.426	1.031	0.945
S9	1.000	0.382	0.880	0.691	1.162	1.188	1.291	1.391	1.426	1.033	0.942
S10	1.000	0.383	0.886	0.693	1.161	1.184	1.300	1.397	1.428	1.032	0.947

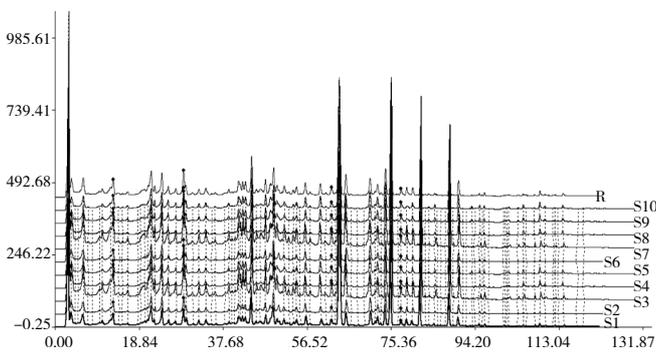


图4 10批三黄汤 HPLC 指纹图谱纵向叠加图

Figure 4 Vertical overlap of HPLC fingerprint of 10 batches of SHD samples

表 3 10 批三黄汤特征峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of characteristic absorption peaks for the 10 batches of SHD

编号	相对峰面积										
	峰 19	峰 5	峰 11	峰 12	峰 24	峰 25	峰 29	峰 31	峰 32	峰 33	峰 39
S1	1.000	0.178	0.104	0.233	0.146	0.553	0.249	0.173	0.059	0.124	0.083
S2	1.000	0.195	0.100	0.230	0.154	0.650	0.258	0.006	0.015	0.122	0.085
S3	1.000	0.188	0.104	0.236	0.152	0.597	0.252	0.180	0.020	0.124	0.084
S4	1.000	0.196	0.116	0.243	0.154	0.891	0.313	0.121	0.017	0.137	0.091
S5	1.000	0.187	0.101	0.236	0.153	0.476	0.239	0.179	0.015	0.119	0.084
S6	1.000	0.232	0.101	0.397	0.219	0.600	0.310	0.247	0.038	0.239	0.178
S7	1.000	0.138	0.086	0.200	0.143	0.598	0.238	0.007	0.015	0.097	0.029
S8	1.000	0.232	0.162	0.365	0.219	0.599	0.287	0.220	0.038	0.236	0.132
S9	1.000	0.186	0.104	0.230	0.152	0.588	0.249	0.184	0.022	0.130	0.080
S10	1.000	0.132	0.100	0.389	0.206	0.600	0.296	0.243	0.038	0.227	0.169

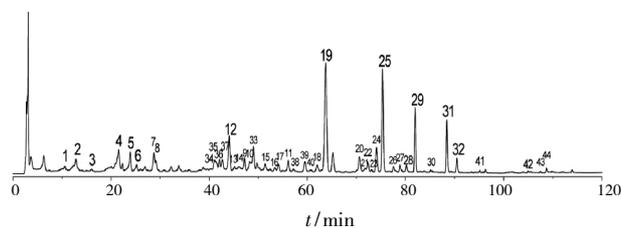


图5 10批三黄汤 HPLC 指纹图谱共有模式图

Figure 5 Common pattern of HPLC fingerprint of 10 batches of SHD samples

采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2004A版)对 10 批三黄汤样品 HPLC 图谱进行处理，匹配结果见图 4，所得共有模式图谱见图 5。以 19 号峰黄芩

0.929、0.998、0.999、0.999、1.000。

2.7 方法学考察

2.7.1 精密度试验 取同一批三黄汤样品,按样品溶液制备方法制备供试品溶液,以黄芩苷的峰面积为测量指标,连续进样 5 次, $RSD < 3\%$ ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.7.2 稳定性试验 取同一批三黄汤样品,按样品溶液制备方法制备供试品溶液,以黄芩苷的峰面积为测量指标,分别在 0, 6, 12, 18, 24 h 测定 HPLC 色谱图, $RSD < 3\%$ ($n=5$),表明样品在 24 h 内稳定。

2.7.3 重复性试验 取同一批三黄汤样品,按样品溶液制备方法平行操作制备 5 份供试品溶液,以黄芩苷的峰面积为测量指标, $RSD < 3\%$ ($n=5$),表明方法重复性良好。

3 讨论

本试验对提取溶剂及色谱条件中流动相、检测波长、柱温及运行时间进行严格的选择性考察。试验的供试品溶液制备取自样品水煎液浓缩干粉的 75% 乙醇提取液,主要原因是乙醇为半极性溶剂。用乙醇提取可减少药材中黏液质、淀粉、蛋白质等杂质的浸出^[9]。经考察先用 75% 乙醇提取挥发干后,用甲醇复溶的供试品溶液较直接用甲醇提取液作为供试品溶液进样后的色谱图基线更平稳,峰形更好,且出峰个数基本一致。因此选用 75% 乙醇作为提取液更为合理。吸取三黄汤供试品溶液适量稀释液进行紫外(200 ~ 400 nm)全波长扫描,结果表明,在 277 nm 下出峰最丰富,其他波长下未见新成分色谱峰,因此选定 277 nm 为指纹图谱测定波长。同一条件下考察柱温对各峰的影响,结果以 30 °C 为佳。流动相条件优化时分别比较了甲醇-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-1% 磷酸水溶液和乙腈-1% 磷酸水溶液作为流动相的分离效果,结果表明同一条件下甲醇较乙腈对三黄汤样品溶液的分离效果更佳,出峰较多,且甲醇-1% 磷酸水溶液较甲醇-0.1% 磷酸水溶液对三黄汤样品溶液的 HPLC 色谱图基线较平坦。因此,选择甲醇-1% 磷酸水溶液作为流动相。比较甲醇(A)-1% 磷酸(B)水溶液系统 3 种不同梯度变化程序,结果表明,按表 1 梯度程序洗脱,在 277 nm 波长下色谱峰分离情况较好。考察了上述选定条件下 130 min 色谱图,发现 120 min 后无特征峰出现,故将分析时间定为 120 min。

本实验色谱图特征峰的选取参考了文献^[6]的粗糙

集方法,该方法是一种模式识别方法。其主要优势在于无需任何额外的有关数据信息(如统计学中的概率分布),只依靠“内部”数据知识,在保持分类能力的前提下,去除冗余知识(即特征选取),获取分类决策规则。研究选择的 11 个特征峰在色谱图共有峰中均属相对含量较大,分离度较好的色谱峰。不仅包括了该制剂大部分原料药材的主要成分,还包括了该制剂现有质量标准中用于质量控制的可控成分黄芩苷,现代药理研究表明黄芩中的黄酮类成分是其发挥药理活性的基础,其中黄芩苷是最主要的活性成分之一^[7],亦具有较好的抗菌、抗病毒、抗炎及抑制免疫作用^[8],应作为三黄汤质量标准的特征成分。

通过多批三黄汤样品指纹图谱分析,三黄汤样品具有较稳定的特征指纹峰,大部分峰形尖锐,分离度好。44 个共有峰中源自茵陈、黄芩的峰相对比例较大,源自黄柏、甘草、炙大黄的峰相对比例较小。且源自黄芩的相对峰面积明显大于其他峰的峰面积。以黄芩苷为参照峰确定了三黄汤的 11 个特征峰,并通过相似度评价软件得到 10 批三黄汤的对照指纹图谱及各批样品与对照指纹图谱之间的相似度。结果 10 批样品相似度均在 0.9 以上。从本次实验结果看,三黄汤体外所含化学成分可通过指纹图谱表达,也为下一步建立三黄汤体内指纹图谱奠定了基础。

参考文献:

- [1] 钱美伦,姜梅. 预防治疗新生儿溶血病中药的实验研究[J]. 中华妇产科杂志, 1984, 19(4): 207-209.
- [2] 周华友,于艳涛,石文. 茵陈蒿汤对免疫小鼠 ABO 血型抗体产生的抑制作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(7): 607-610.
- [3] 李昕,王月茹,马利,等. 中药色谱指纹图谱在中药质量评价中的应用[J]. 生物医学工程学杂志, 2012, 29(1): 192-196.
- [4] 宋金春,曾俊芬,胡传芹. 生化汤的血清药物化学[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(13): 977-979.
- [5] 张洪飞. 中药前处理、提取浓缩及分离设备与工艺[J]. 中国制药装备, 2010, 3(3): 1-11.
- [6] Bonikowski Z. Algebraic structures of rough sets. In: Ziarko W. (Ed.), rough sets, fuzzy sets and knowledge discovery[M]. Springer verlag, 1994: 242-247.
- [7] Sagarak, Itoy, Oshimat, et al. Simultaneous determination of baicalin, wogonin, oroxylin-A and their glucuronides in Scutellaria radix by ion-pair high performance liquid Chromatography[J]. Chromatogra, 1985, 3(28): 289-297.
- [8] 黄志军. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. 天津药学, 2012, 24(3): 61-64.

(编辑: 邓响潮)