

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00682

• 短篇论著 •

高效液相色谱法同时测定四逆汤中6个指标性成分

刘敏¹, 张海², 蔡亚梅³, 张国庆², 柴逸峰^{3*}

1. 南京军区联勤部药品仪器检验所, 南京 210002
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438
3. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 采用高效液相色谱法同时测定四逆汤中苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、异甘草素、甘草酸和6-姜酚6个成分的含量。**方法** 采用 Waters Terra C₁₈ 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 3.5 μm), 检测波长: 除异甘草素外的5种成分采用235 nm检测, 异甘草素采用370 nm的检测波长; 流动相为A: 95%乙腈和5%水的混合溶液(0.1%甲酸+5 mmol/L 醋酸铵), B: 0.1%甲酸水溶液(5 mmol/L 醋酸铵), 梯度洗脱, A相随时间的变化: 25%~35%(0~5 min), 35%~50%(5~15 min), 50%~85%(15~20 min); 流速0.5 mL/min; 柱温25℃; 进样量5 μL。四逆汤按照传统煎煮方法提取。**结果** 6个指标性成分苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、异甘草素、甘草酸、6-姜酚分别在5.600~112.0、6.560~131.2、6.130~122.6、4.590~91.8、31.00~620.0、4.920~98.4 μg/mL 范围内线性良好($r>0.9990$), 在15 min内实现完全分离。方法学考察表明, 日内及日间精密度RSD<5%, 加样回收率($n=6$)分别为101.07%(RSD=1.3%)、98.72%(RSD=1.1%)、101.57%(RSD=1.8%)、101.71%(RSD=3.6%)、102.12%(RSD=2.3%)、99.58%(RSD=3.8%)。**结论** 该方法简便、准确、实用性强, 可用于四逆汤中6个指标性成分的含量测定。

[关键词] 四逆汤; 高压液相色谱法; 中药理化鉴定**[中图分类号]** R 284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)06-0682-05

Simultaneous determination of six marker components in *Sini* decoction by high performance liquid chromatography

LIU Min¹, ZHANG Hai², CAI Ya-mei³, ZHANG Guo-qing², CHAI Yi-feng^{3*}

1. The Institute of Quality Control of Medical Material and Equipment, The Joint Logistic Department, PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China
2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To simultaneously determine the contents of six marker components, including benzoylmesaconine, benzoylconine, benzoylhyaconine, isoliquiritigenin, glycyrrhizic acid, and 6-gingerol, in *Sini* decoction by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The HPLC condition was as follows: column: Waters Terra C₁₈ (3.0 mm×100 mm, 3.5 μm); the detective wavelength was set at 370 nm for isoliquiritigenin and 235 nm for the other five components. Mobile phase: A was 95% acetonitrile+5% H₂O (5 mmol/L ammonium acetate), B was 0.1% formic acid aqueous solution (5 mmol/L ammonium acetate), with gradient elution, the gradient of A phase: 25%-35% (0-5 min), 35%-50% (5-15 min), 50%-85% (15-20 min); flow speed: 0.5 mL/min; temperature of column: 25℃; injection volume: 5 μL. *Sini* decoction was obtained by using the traditional decoction preparation method. **Results** Benzoylmesaconine, benzoylconine, benzoylhyaconine, isoliquiritigenin, glycyrrhizic acid and 6-gingerol were separated at baseline within 15 min, showing good linearity ($r>0.9990$) between (5.600-112.0) μg/mL, (6.560-131.2) μg/mL, (6.130-122.6) μg/mL, (4.590-91.8) μg/mL, (31.00-620.0) μg/mL, and (4.920-98.4) μg/mL, respectively. The results of intra-day and inter-day precisions were at normal range (RSD<5%), with the recovery rates ($n=6$) being 101.07% (RSD=1.3%), 98.72% (RSD=1.1%), 101.57% (RSD=1.8%), 101.71% (RSD=3.6%), 102.12% (RSD=2.3%), and 99.58% (RSD=3.8%), respectively. **Conclusion** The present method is rapid, simple, and accurate and it can be used to determine the above 6 components in *Sini* decoction.

[收稿日期] 2013-01-06 **[接受日期]** 2013-04-25**[作者简介]** 刘敏, 博士, 主管药师. E-mail: lm_yaofen2003@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871201, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

[Key words] *Sini* decoction; high-pressure liquid chromatography; TCD physic chem identific

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6): 682-686]

四逆汤是《伤寒论》中的经典名方,由附子、干姜、甘草组成,具有回阳救逆之功效^[1],现代药理和临床实践表明四逆汤具有很好的心血管活性,常用于心肌梗死和心力衰竭^[2-3]。其中附子大辛大热,具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛的功效,为君药,其主要成分为二萜类生物碱,分为双酯型乌头碱、单酯型乌头碱和胺醇型乌头碱,其中双酯型乌头碱的毒性最大,但活性也最强,单酯型乌头碱毒性较小,活性较强,而醇胺型生物碱毒性较小,活性仅为双酯型生物碱的1/2 000,活性较弱^[4];干姜性味辛热,具有温中散寒、回阳通脉的功效,在四逆汤中可助附子回阳,为臣药,其主要成分为6-姜酚等姜辣素类成分^[5];甘草和中益气,既能缓解附子、干姜的暴烈,又能协助附子、干姜的回阳救逆之功效,为佐使药,其主要成分为甘草酸、异甘草素等甘草黄酮类成分^[6]。

目前国内外学者对四逆汤进行了不同层面的研究^[7-20],主要包括有效成分的定性定量、临床研究、药效学以及化学成分溶出层面的配伍研究,特别是其心血管活性的研究取得了令人瞩目的进展,相继从四逆汤降低心衰大鼠血清内皮素水平与升高降钙素基因相关肽^[7];活化蛋白激酶C和减少线粒体Smac蛋白释放^[8];减少血管紧张素II的生成和抑制转化生长因子-β1水平^[9];减少去磷酸化NFATc蛋白的相对表达^[10]等角度报道了四逆汤心血管作用。然而,这些研究在化学层面上并没有对四逆汤其中的关键药效成分进行明确定量,缺乏量化依据,而2010年版《中国药典》所记载四逆汤含量测定项下仅有甘草酸一个检测指标,这与四逆汤的作用药效成分与作用机制不符。我们前期对附子的研究证明附子经水煎煮后,大部分双酯型生物碱都转变成了单酯型生物碱,仅有的少量双酯型生物碱口服给药后,经肠道菌群的代谢也转变成了单酯型生物碱,所以控制四逆汤的质量应重点控制其中单酯型生物碱的含量;甘草的主要药效成分为黄酮和皂苷类成分,甘草酸和异甘草素是甘草的主要代表性成分,另外,干姜的代表性成分6-姜酚。本研究采用HPLC法对四逆汤中6个成分同时进行了含量测定,该法操作简便、快速、准确,为控制四逆汤质量及后期的作用机制研究提供了基础。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),包括G1379A真空脱气机,G1311A四元泵,G1367A自动进样器,G1316A柱温箱和G1315B DAD检测器;KUDOS-SK2200H超声发生器(上海科导超声仪器公司);METTLER AE240型十万分之一电子天平(德国梅特勒公司);DJ-04药材粉碎机(上海淀久公司)。

1.2 药品与试剂 苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、异甘草素、甘草酸铵和6-姜酚购自中国食品药品检定研究院(纯度均>98.0%),淡附片(产地:江苏,批号:2011070107)、甘草(炙)(产地:内蒙,批号:2011100107)和干姜(产地:四川,批号:YT10072611)购自上海雷允上中药饮片厂,经第二军医大学药学院生药学教研室孙莲娜副教授鉴定,均符合2010年版中国药典标准。HPLC级甲醇购自Burdick&Jackson公司(Honeywell, USA),HPLC级乙腈购自Merck公司(Darmstadt, Germany),HPLC级甲酸购自Fluka公司(Buchs, Switzerland),水为娃哈哈纯净水,其余试剂为分析纯。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、异甘草素、甘草酸铵和6-姜酚各11.20、13.12、12.26、9.18、15.50、9.840 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得浓度分别为1.120 mg/mL、1.312 mg/mL、1.226 mg/mL、918 μg/mL、1.550 mg/mL、984 μg/mL的母液。精密吸取上述对照品溶液各100、100、100、100、400、100 μL,分别置1 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得6个成分的混合对照品溶液,然后依次用甲醇逐级稀释,即得系列浓度的混合对照品溶液,置于4℃冰箱保存。

2.1.2 四逆汤样品溶液的制备 依据2010年版《中国药典》四逆汤制剂规范,制得每1 mL含生药量1 g的汤剂,将提取的汤剂至离心机中1 500×g离心10 min。精密吸取上清液150 μL加850 μL乙腈,涡旋30 s,至离心机中13 800×g离心5 min,取

上清液用于 HPLC 分析。

2.2 色谱条件 色谱柱: Waters Terra C₁₈ 色谱柱 (3.0 mm×100 mm, 3.5 μm); 流动相为 A 相: 95% 乙腈和 5% 水的混合溶液 (0.1% 甲酸+5 mmol/L 醋酸铵), B: 0.1% 甲酸水溶液 (5 mmol/L 醋酸铵), 梯度洗脱, A 相随时间的变化: 25%~35% (0~5 min), 35%~50% (5~15 min), 50%~85% (15~20 min), 流速 0.5 mL/min; 检测波长 235 或 370 nm; 柱温 25℃; 进样量 5 μL。按出峰顺序 6 种成分苯甲

酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、异甘草素、甘草酸和 6-姜酚的保留时间分别为 2.858、3.762、4.364、9.364、10.332、12.238 min。根据样品溶液的色谱图中 6 个峰的相关参数计算系统适用性, 其理论塔板数分别为 10 054、9 451、10 876、201 142、128 244、92 452, 分离度分别为 1.42、1.62、1.65、6.58、1.56、1.82, 拖尾因子分别为 0.947、0.911、0.947、0.971、0.949、0.945。混合对照品、四逆汤样品的 HPLC 色谱图如图 1 所示。

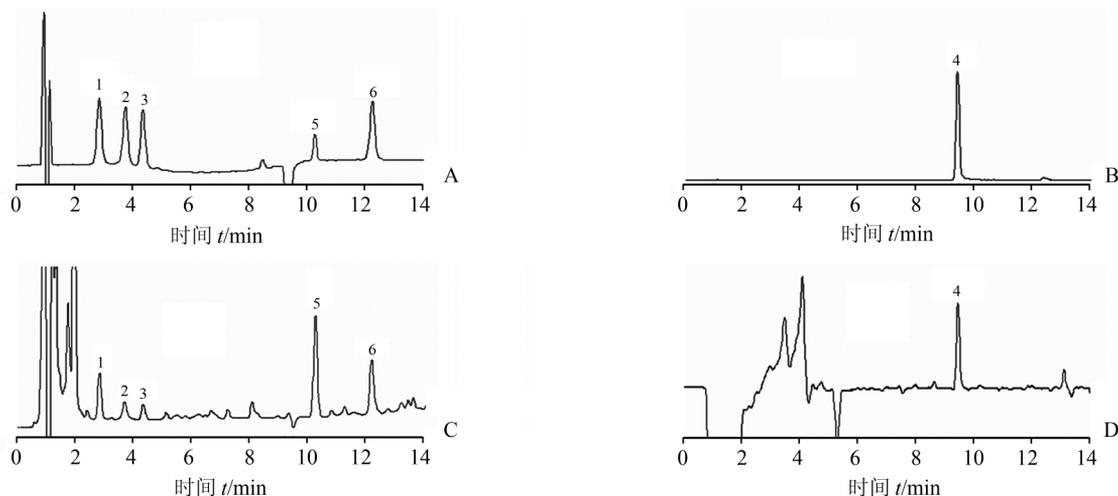


图 1 对照品(A, 235 nm 检测波长)、对照品(B, 370 nm 检测波长)、四逆汤样品溶液(C, 235 nm 检测波长)、四逆汤样品溶液(D, 370 nm 检测波长)的 HPLC 色谱图

1: 苯甲酰新乌头原碱; 2: 苯甲酰乌头原碱; 3: 苯甲酰乌头次碱; 4: 异甘草素; 5: 甘草酸; 6: 6-姜酚

2.3 线性关系的考察 分别将 2.1.1 项下制备的不同浓度的系列对照品溶液按 2.2 项下色谱条件依次连续进样, 分别重复 5 次, 以对照品溶液浓度(x,

μg/mL)对峰面积(y)进行线性回归, 呈良好的线性关系, 见表 1。

表 1 6 种指标性成分的线性关系考察结果

成分	回归方程	线性范围 ρ _B /(μg·mL ⁻¹)	r
苯甲酰新乌头原碱	y=12.38x+0.140 2	5.60~112.0	0.999 9
苯甲酰乌头原碱	y=11.25x-1.215	6.560~131.2	0.999 4
苯甲酰乌头次碱	y=10.25x+1.088	6.130~122.6	0.999 6
异甘草素	y=4.874x-0.684 1	4.590~91.8	0.999 8
甘草素	y=11.92x-1.015	31.00~620.0	0.999 5
6-姜酚	y=9.268x+0.791	4.920~98.4	0.999 6

2.4 精密度实验 取 2.1.1 项下制备的系列混合对照品溶液, 连续 3 d 每天 3 次和 1 d 内连续进样 6 次, 根据所得峰面积分别考察日间精密度和日内精密度。结果 6 个指标性成分的日内、日间精密度 RSD 均<5%, 表明方法的精密度良好。

2.5 定量限和检测限考察 将 6 个对照品溶液依

次进行稀释, 以信噪比 10:1 时, 确定其最低定量限; 以信噪比 3:1 时, 确定其最低检测限。6 个指标性成分的最低定量限分别为 5.60、6.56、6.13、4.59、6.25、4.92 μg/mL; 最低检测限分别为 2.800、3.280、2.065、2.245、3.125、2.460 μg/mL。

2.6 稳定性实验 取制备的四逆汤样品溶液, 分别

在0、2、4、6、8、12、24 h测定6个成分的峰面积,考察其稳定性。结果6个成分峰面积的RSD分别为2.55%、3.72%、3.55%、1.87%、1.82%、1.41%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.7 重复性实验 精密称取同一批次附子、干姜、甘草药材样品5份,按2.1.2项方法分别制成样品溶液,进样分析。四逆汤中6种成分的平均含量和RSD($n=5$)分别为64.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (RSD=0.33%)、22.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (RSD=1.95%)、18.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (RSD=1.57%)、12.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (RSD=1.48%)、451.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (RSD=2.33%)、27.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (RSD=2.90%),表明方法的重复性良好。

2.8 加样回收率实验 精密吸取已知含量的同一

批次四逆汤样品6份各5 mL,置10 mL量瓶中,精密加入各对照品溶液1 mL,定容到10 mL。依法测定,计算回收率。苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰乌头次碱、异甘草素、甘草酸和6-姜酚的加样回收率和RSD($n=6$)分别为101.07% (RSD=1.3%)、98.72% (RSD=1.1%)、101.57% (RSD=1.8%)、101.71% (RSD=3.6%)、102.12% (RSD=2.3%)、99.58% (RSD=3.8%)。结果表明,采用本法同时测定6种成分的含量,其加样回收率结果良好。

2.9 样品测定 按2.1.2项下方法制备3个批次的四逆汤样品溶液,再按2.2项下色谱条件进样分析,计算样品含量,结果见表2。

表2 3个批次四逆汤中6个指标性成分的含量测定结果

批号	$n=3, \bar{x} \pm s, \rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$					
	苯甲酰新乌头原碱	苯甲酰乌头原碱	苯甲酰乌头次碱	异甘草素	甘草素	6-姜酚
201112011	62.85±0.55	23.51±0.12	18.03±1.32	12.41±0.09	464.3±1.8	28.55±0.26
201112012	69.45±1.12	20.70±1.10	16.59±0.75	16.17±0.67	489.5±2.2	26.75±0.32
201112013	74.40±1.50	22.58±1.13	17.14±0.45	13.78±0.33	538.5±4.2	25.14±0.14

3 讨论

3.1 提取方法的选择 对提取方法的选择,考察了煎煮法和超声法,发现煎煮法和超声法都能提取出3种药材中相应的有效成分,但考虑到传统中药的制备方法,还是采用传统的煎煮法,保证与传统给药方案的一致性。

3.2 液相条件的选择

3.2.1 色谱柱的选择 在色谱柱的选择上,分别考察了反相色谱柱250 mm×4.6 mm, 5 μm ; 150 mm×4.6 mm, 5 μm ; 100 mm×3.0 mm, 3.5 μm 以及HILLIC色谱柱150 mm×2.0 mm, 5 μm 等4种规格的柱子,由于待分离成分极性差别较大,在HILLIC色谱柱上很难将其同时一一分离,因此选择反相色谱柱进行优化。在反相色谱柱上,长柱有利于提高分离度但会延长分析时间,3.5 μm 小粒径的短柱能有效地提高柱效并缩短分析时间,还能获得良好的分离度。因此选用100 mm×3.0 mm, 3.5 μm 粒径的色谱柱进行分析。

3.2.2 流动相的选择 流动相的选择比较了甲醇-水和乙腈-水系统,后者的洗脱效果要明显好于前者,并且由于乙腈黏度小,可以有效降低系统压力,于是采用乙腈-水系统。由于乌头碱类成分具有弱

碱性,仅仅采用乙腈-水系统难免造成各乌头碱成分的拖尾出现,因此考虑在流动相中加入甲酸铵、醋酸铵、甲酸、乙酸或三乙胺等含有有机酸或盐,结果表明在流动相中加入5 mmol/L的醋酸铵和0.1%的甲酸水溶液后能够明显缓解乌头碱的拖尾现象,并且实现对各个成分的完全分离,所以最终选择乙腈和水系统,在其中添加5 mmol/L的醋酸铵及0.1%的甲酸水溶液作为流动相。

3.2.3 色谱条件的优化 选择合适的梯度是分离的关键,本研究中6个成分色谱分离的难点在于3个单酯型乌头碱成分的极性非常相似且极性较大,而甘草和干姜中的成分极性相对较小。实验中采用100 mm×3.0 mm, 3.5 μm 的色谱柱,考察出了最佳的梯度比例,A相(95%乙腈和5%水)25%~35%(0~5 min),在保证峰形和柱效的前提下在较短时间内完成了3种乌头碱的基线分离,后面通过增加乙腈的比例,A相35%~50%(5~15 min)来分离甘草和干姜中极性相对较小的成分。

3.2.4 温度和流速的选择 温度和流速对分离的影响较大,实验结果表明,降低温度能有效提高皂苷的分离度,但由于降低温度会增加流动相的黏度,明显增加系统的压力,综合考虑选择室温25℃为运行温度。低流速有利于提高分离度但会延长分析时

间,选择 0.5 mL/min 的流速既能保证分离度又良好地控制了分析时间,因此选为最佳流速。

本实验对 3 个批次的四逆汤中 6 个成分进行了含量测定,其结果符合《中华人民共和国药典》(2010 年版)中人参项下 HPLC 法对甘草酸的要求。方法学考察表明,日内及日间精密度、最低检测限、加样回收率的范围均符合相关标准。结果表明,在本文介绍的供试品制备方法和色谱条件下,6 个指标性成分在较短时间内分离良好,所建立的方法快速简便,稳定可靠,可以用于四逆汤的质量控制。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2010: 650.

[2] 刘平, 葛迎春, 马天舒. 四逆汤类方药理研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34: 248-251.

[3] 商李超, 郁宝生. 四逆汤的药理作用研究进展 [J]. 中西医结合心血管杂志, 2009, 7: 1333-1335.

[4] 肖凤霞, 周莉玲, 李悦. 四逆汤制剂中乌头生物碱的药动学相关性研究 [J]. 中药材, 2005, 28: 587-588.

[5] 葛尔宁, 通脉四逆汤毒性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12: 12-14.

[6] 王晓琳, 中药方剂“四逆汤”分析 [J]. 中医医药导报, 2010, 7: 104-105.

[7] 黄亮, 张雅丽, 张晓芬, 朱奔奔. 四逆汤对慢性充血性心力衰竭大鼠模型血清内皮素、降钙素基因相关肽水平的影响 [J]. 河北中医, 2006, 28: 65-67.

[8] 刘颖, 聂咏梅, 吴伟康. PKC 的活化和 Smac 释放的改变在四逆汤预处理抑制心肌细胞凋亡中的作用 [J]. 中药材, 2008, 31: 1675-1678.

[9] 廖火城, 刘勇, 周彬, 吴琳, 吴伟康, 钱孝贤. 四逆汤对异丙肾上腺素引起的大鼠心肌纤维化和 TGF- β 1 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26: 1316-1320.

[10] 党万太, 苗维纳, 杨晓放, 姜岑, 童妍. 去磷酸化 NFATc 蛋白的相对表达与四逆汤治疗心力衰竭的机制分析 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27: 1-3.

[11] Yue H, Pi Z, Song F, Liu Z, Cai Z, Liu S. Studies on the aconitine-type alkaloids in the roots of *Aconitum car-*

michaeli Debx. by HPLC/ESIMS/MSn [J]. Talanta, 2009, 77: 1800-1807.

[12] Jiang H, Solyom A M, Timmermann B N, Gang D R. Characterization of gingerol-related compounds in ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19: 2957-2964.

[13] Wu S, Tan G, Dong X, Zhu Z, Li W, Lou Z, et al. Metabolic profiling provides a system understanding of hypothyroidism in rats and its application [J]. PLoS One, 2013, 8: e55599.

[14] Tan G, Liao W, Dong X, Yang G, Zhu Z, Li W, et al. Metabonomic profiles delineate the effect of traditional Chinese medicine *Sini* Decoction on myocardial infarction in rats [J]. PLoS One, 2012, 7: e34157.

[15] Tan G, Lou Z, Liao W, Zhu Z, Dong X, Zhang W, et al. Potential biomarkers in mouse myocardium of doxorubicin-induced cardiomyopathy: a metabonomic method and its application [J]. PLoS One, 2011, 6: e27683.

[16] Tan G, Lou Z, Liao W, Dong X, Zhu Z, Li W, et al. Hydrophilic interaction and reversed-phase ultraperformance liquid chromatography TOF-MS for serum metabonomic analysis of myocardial infarction in rats and its applications [J]. Mol Biosyst, 2012, 8: 548-556.

[17] Chen H C, Chen W C, Lin K H, Chen Y H, Lo L C, Lee T C, et al. Simultaneous use of traditional Chinese medicine (*si-ni-tang*) to treat septic shock patients: study protocol for a randomized controlled trial [J]. Trials, 2011, 12: 199-204.

[18] Tan G, Zhu Z, Jing J, Lv L, Lou Z, Zhang G, et al. Characterization of constituents in *Sini* decoction and rat plasma by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to time-of-flight mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2011, 25: 913-924.

[19] 高志祥, 姜笑寒, 王岩, 王琳, 姜志明, 孟繁浩. HPLC 法同时测定四逆汤中 3 种有效成分的含量 [J]. 中国医科大学学报, 2011, 40: 662-664.

[20] 刘晓, 范林乾, 蔡皓, 蔡宝昌. HPLC 法同时测定四逆汤中 4 种指标性成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37: 803-805.

[本文编辑] 尹茶