

本文引用:王秀兰,洪宗超,段雪云.复方苦参汤有效部位指纹图谱研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(7):738-742.

## 复方苦参汤有效部位指纹图谱研究

王秀兰<sup>1</sup>,洪宗超<sup>2</sup>,段雪云<sup>1,2\*</sup>

(1.湖北省中医院,湖北 武汉 430061;2.湖北中医药大学中药资源与中药化学湖北省重点实验室,湖北 武汉 430061)

**[摘要]** **目的** 建立复方苦参汤有效部位的指纹图谱,为控制相关制剂质量提供科学依据。**方法** 采用 HPLC,色谱柱为 Agilent 5 TC-C<sub>18</sub>(2)柱(250mm×4.6mm,5μm);流动相 A 为乙腈,B 为超纯水,梯度洗脱:0~2 min,10%~20%A;2~10 min,20%~40%A;10~15 min,40%~60%A;15~35 min,60%~65%A;35~40 min,65%~10%A;柱温为 25℃;体积流量 1 mL/min;检测波长 220 nm;进样量为 10 μL。**结果** 10 批不同样品有效部位的图谱,相似度较好(均在 0.88 以上);得到了 26 个共有峰,指认了苦参碱、氧化苦参碱、甘草苷三种成分。**结论** 本研究建立了复方苦参汤有效部位的指纹图谱,此法简便可靠,重现性好,为相关新药的开发利用提供实验依据。

**[关键词]** 指纹图谱;复方苦参汤;有效部位;高效液相色谱法

**[中图分类号]**R284.1

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.07.005

### A Study on the Fingerprint of the Effective Part of Compound Kushen Decoction

WANG Xiulan<sup>1</sup>, HONG Zongchao<sup>2</sup>, DUAN Xueyun<sup>1,2\*</sup>

(1. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China; 2. Hubei Key Laboratory of Resources and Chemistry of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430061, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish the fingerprint of the effective part of Compound Kushen Decoction, and to provide a scientific basis for the quality control of the preparation. **Methods** High-performance liquid chromatography was performed on an Agilent 5 TC-C<sub>18</sub>(2) column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile as mobile phase A and ultrapure water as mobile phase B for gradient elution (0–2 min, 10%–20% A; 2–10 min, 20%–40% A; 10–15 min, 40%–60% A; 15–35 min, 60%–65% A; 35–40 min, 65%–10% A) at a column temperature of 25°C, a flow rate of 1 ml/min, a detection wavelength of 220 nm, and an injection volume of 10 μL. **Results** The fingerprints of the effective parts of 10 batches of samples were obtained, and a good similarity was achieved (>0.88). A total of 26 common peaks were obtained, and the three components of matrine, oxymatrine, and liquiritin were identified. **Conclusion** The fingerprint of the effective part of Compound Kushen Decoction is established in this study. The method is simple and reliable and has good reproducibility, which provides an experimental basis for the development and application of related new drugs.

**[Keywords]** fingerprint; Compound Kushen Decoction; effective part; high-performance liquid chromatography

复方苦参汤由苦参、青黛、地榆、白及等组成,具有清热燥湿、凉血的功效,经长期临床应用发现其是治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)大肠湿热证的有效方剂<sup>[1-3]</sup>,其疗效好,副作用少,患者容易接受,临床治疗有效率达 90%以上<sup>[4]</sup>。本课题组前

期采用系统溶剂法,将复方苦参汤分为石油醚部位、氯仿部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水溶液部位,并采用 2,4,6-三硝基苯磺酸钠(TNBS)诱导的 UC 大鼠模型,运用免疫组化、分子生物学等方法,对复方苦参汤治疗 UC 的有效部位进行筛选,确

**[收稿日期]**2017-11-03

**[基金项目]**国家自然科学基金面上项目(81573784);中国中医科学院中医基础理论研究所自主选题项目(YZ-1605)。

**[作者简介]**王秀兰,女,副主任药师,主要从事中药及复方的质量评价研究。

**[通讯作者]**\* 段雪云,女,博士,主任药师,E-mail:xueyunduan@sina.com。

定了氯仿部位为其主要有效部位,主要活性成分为苦参碱、氧化苦参碱、靛蓝及靛玉红,并对其作用机制进行了初步探讨,发现复方苦参汤对UC有与肾上腺髓质素相似的作用<sup>[5-8]</sup>,开发利用潜力巨大。经研究,本课题组后期欲向开发相关新药产品方向发展,故本实验对复方苦参汤有效部位的HPLC指纹图谱进行了分析研究,为相关新药的开发利用提供实验依据。

## 1 实验材料

### 1.1 仪器

Alliance e2695 型高效液相色谱仪(美国waters公司),包括2695四元梯度洗脱溶剂输送系统、2695自动进样器、2695柱温箱、2998二极管阵列检测器、Empower色谱工作站。E12140万分之一电子天平(瑞士OHAUS公司)、ES225SM-DR十万分之一电子天平(瑞士Precisa公司,UPT-II-10T型超纯水机(优普特公司)。

### 1.2 试剂

苦参碱(批号:110805-200508),甘草苷(批号:111610-201106),氧化苦参碱(批号:110780-201508),均购自中国食品药品检定研究院(含测用);乙腈为色谱纯(德国默克公司);水为超纯水;10批复方苦参汤处方饮片(苦参、地榆、白及、青黛、甘草)均由湖北省中医院采购部采购,由湖北省中医院主任药师陈树和鉴定,均符合《中华人民共和国药典》2015版一部要求。10批复方苦参汤自制,编号S1-S10,批号分别为160908、160912、160914、160918、160920、160923、160926、160929、161003、161006。

## 2 方法与结果

### 2.1 液相色谱条件

色谱柱为Agilent 5 TC-C<sub>18</sub>(2)柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相A为乙腈,B为超纯水,梯度洗脱:0~2 min,10%~20%A;2~10 min,20%~40%A;10~15 min,40%~60%A;15~35 min,60%~65%A;35~40 min,65%~10%A;柱温为25℃;体积流量1 mL/min;检测波长220 nm;进样量为10 μL。

### 2.2 供试品溶液的制备

精密量取复方苦参汤适量,依次用石油醚、氯仿进行萃取(药液:萃取液1:1.5),每份药液连续萃取3次,最终得到氯仿部位溶液,置于旋转蒸发器浓缩,干燥,得氯仿部位粉末。精密称取氯仿部位0.01 g,加

50%乙腈溶液定容至10 mL,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

### 2.3 对照品溶液的制备

分别精确称取苦参碱、氧化苦参碱、甘草苷对照品适量,分别置于10 mL容量瓶中,以50%乙腈溶液溶解并定容至刻度,再精密移取上述溶液适量至10 mL容量瓶中,加乙腈溶解定容得到质量浓度分别为88 μg/mL、85 μg/mL、78 μg/mL的混合对照品溶液,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

### 2.4 精密度试验

精密称取S1样品有效部位0.01 g,按“2.2”项下供试品溶液制备方法制备供试液,连续进样6次进行分析,用中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012 A版计算相似度,所得相似度分别为0.974、0.974、0.976、0.978、0.978、0.977,RSD为0.32%,说明该方法精密度良好。

### 2.5 重复性试验

精密称取6份S1样品有效部位各0.01 g,按“2.2”项下供试品溶液制备方法制备供试液,平行进样分析,用中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012 A版计算相似度,所得相似度分别为0.996、0.995、0.994、0.998、0.998、0.971,RSD为1.05%,说明该方法重复性较好,符合指纹图谱研究要求。

### 2.6 稳定性试验

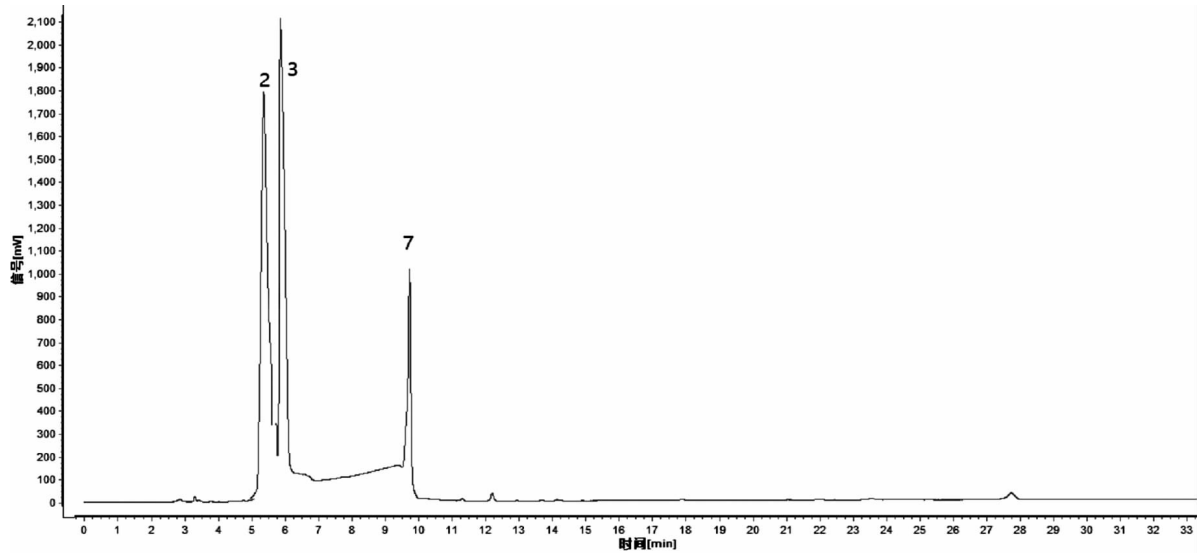
精密称取S1样品有效部位0.01 g,按“2.2”项下供试品溶液制备方法制备供试液,分别在0、2、4、8、12、24 h进样分析,用中药色谱指纹图谱相似度评价系统2012 A版计算相似度,所得相似度分别为0.998、0.998、0.997、0.988、0.981、0.979,RSD为0.88%,说明样品溶液在24 h内稳定,符合指纹图谱研究要求。

### 2.7 复方苦参汤有效部位指纹图谱的建立及各样本之间相似度的比较

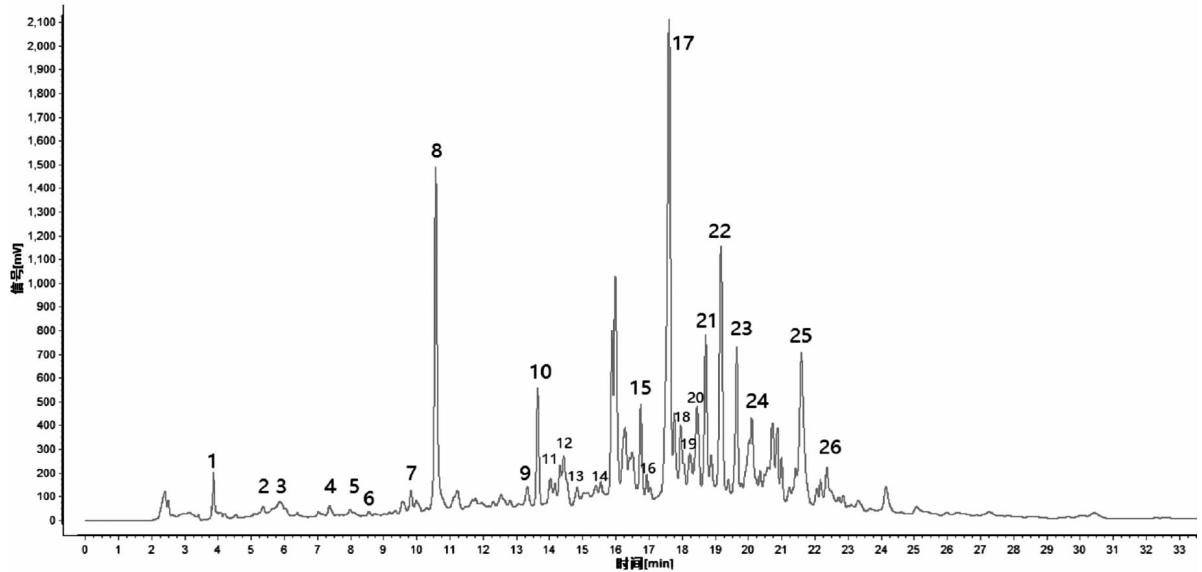
精密称取各样品适量,按“2.2”项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件测定10批样品的HPLC图谱,通过相似度的对比比较,建立复方苦参汤有效部位特征图谱。10批样品共标出26个共有峰,其中2号峰为苦参碱,3号峰为氧化苦参碱,7号峰为甘草苷。见图1。

### 2.8 参照峰的选择

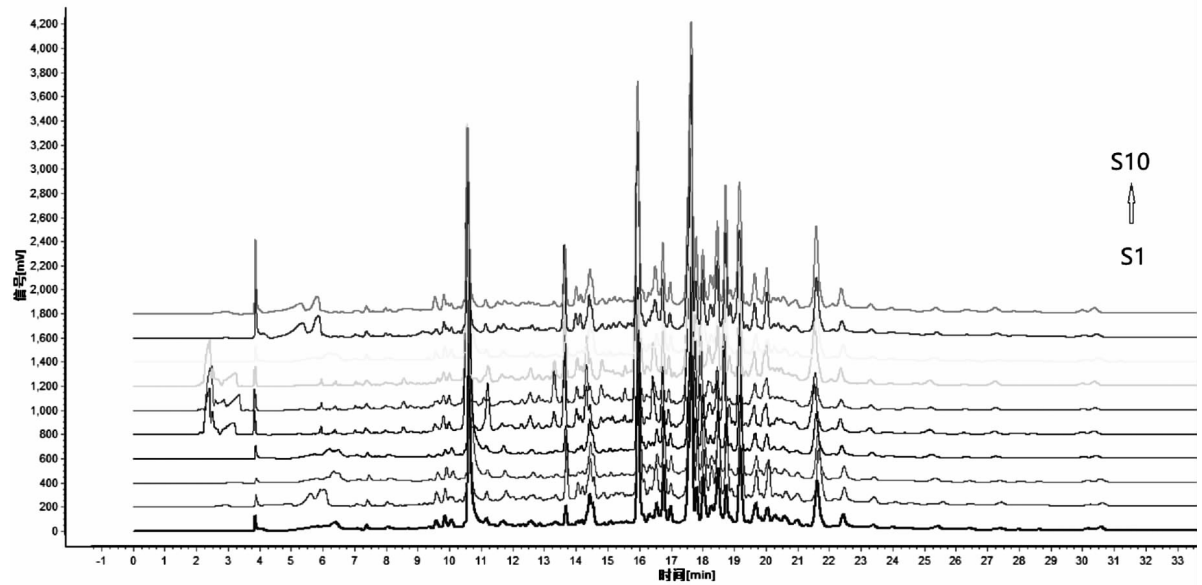
由于8号峰分离度好,响应值高,且比较稳定,故将其作为参照峰,计算其它共有峰的相对保留时



A. 混合对照品



B. 10 批复方苦参汤有效部位液相共有图谱



C. 10 批复方苦参汤有效部位叠加图

注：峰号 2、3、7 分别为苦参碱、氧化苦参碱、甘草苷。

图 1 复方苦参汤 HPLC 图

间及相对峰面积,结果见表1,表2。

## 2.9 复方苦参汤有效部位指纹图谱的建立及相似度评价

将10批复方苦参汤有效部位液相图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A版),以S1药材图谱作为参照谱进行全峰匹配,提取了26个

共有峰,得到了复方苦参汤有效部位叠加图谱和复方苦参汤有效部位液相共有图谱(见图1);并对不同批次复方苦参汤有效部位图谱的相似度进行计算,结果显示各批复方苦参汤有效部位图谱相似度均高于0.880,相似度较好(见表3)。

表1 10批样品的各峰相对峰面积

峰号	样品编号									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.045	0.051	0.053	0.068	0.041	0.042	0.045	0.067	0.058	0.049
2	0.191	0.191	0.144	0.009	0.005	0.007	0.006	0.011	0.308	0.244
3	0.138	0.138	0.016	0.043	0.025	0.023	0.024	0.137	0.239	0.092
4	0.041	0.031	0.047	0.049	0.038	0.036	0.277	0.062	0.051	0.034
5	0.045	0.038	0.029	0.059	0.049	0.037	0.205	0.056	0.031	0.044
6	0.015	0.015	0.021	0.032	0.031	0.024	0.008	0.025	0.025	0.009
7	0.099	0.072	0.082	0.113	0.071	0.066	0.006	0.047	0.119	0.033
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	0.201	0.106	0.158	0.186	0.194	0.154	0.151	0.168	0.093	0.061
10	0.359	0.409	0.413	0.448	0.289	0.333	0.294	0.292	0.357	0.174
11	0.151	1.523	0.155	0.168	0.158	0.145	0.117	0.157	0.150	0.048
12	0.434	0.261	0.312	0.368	0.245	0.268	0.345	0.441	0.442	0.307
13	0.144	0.121	0.114	0.116	0.143	0.156	0.060	0.082	0.156	0.056
14	1.296	0.106	1.015	1.088	0.618	0.721	0.774	1.008	1.270	0.738
15	0.441	0.327	0.318	0.298	0.161	0.176	0.293	0.362	0.368	0.232
16	0.184	0.146	0.125	0.134	0.179	0.121	0.165	0.216	0.213	0.157
17	2.115	1.751	1.594	1.754	1.091	1.516	1.074	1.338	1.907	1.022
18	0.338	0.317	0.284	0.307	0.269	0.247	0.306	0.461	0.346	0.319
19	0.263	0.195	0.232	0.264	0.197	0.289	0.133	0.167	0.229	0.114
20	0.550	0.391	0.418	0.344	0.198	0.320	0.313	0.377	0.511	0.263
21	0.496	0.530	0.428	0.467	0.268	0.377	0.258	0.344	0.671	0.206
22	0.717	0.560	0.571	0.593	0.306	0.458	0.426	0.507	0.883	0.332
23	0.309	0.318	0.301	0.275	0.198	0.244	0.208	0.268	0.314	0.207
24	0.316	0.297	0.255	0.268	0.210	0.275	0.143	0.203	0.294	0.151
25	0.607	0.610	0.529	0.561	0.296	0.545	0.374	0.410	0.766	0.368
26	0.239	0.176	0.159	0.176	0.086	0.140	0.146	0.178	0.271	0.127

## 3 讨论

3.1 本实验在色谱条件的考察中,对甲醇-水,乙腈-水,甲醇-0.3%磷酸水,乙腈-0.3%磷酸水等4种流动相系统进行了考察,发现乙腈-水作为流动相时得到的色谱峰峰型和分离度较为理想,故本实验选择乙腈-水作为流动相系统。

3.2 本课题组研究发现苦参碱、氧化苦参碱(两者可相互转化<sup>[9]</sup>)可以通过调控NOD2/NF- $\kappa$ B、 $\beta$ 2AR- $\beta$ -arrestin2-NF- $\kappa$ B信号转导通路减轻UC的肠粘

膜炎症,是复方苦参汤的主要有效成分<sup>[10]</sup>,苦参碱、氧化苦参碱的最大吸收波长210 nm左右,为末端吸收<sup>[11-12]</sup>,本实验进行190~400 nm全波长扫描发现其出峰数、分离度均较好的波长集中在200~240 nm、330~365 nm范围内,但在330~365 nm范围苦参碱、氧化苦参碱所出峰较在200~240 nm所出峰差,故为了观测和指认两种主要成分,本实验选择了220 nm作为研究的扫描波长。

3.3 共有图谱中有许多色谱峰分离较好,峰面积较大,但不知其到底为何成分?故后期实验拟在此基础上

表 2 10 批样品的各峰相对保留时间

(min)

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.366	0.367	0.364	0.363	0.364	0.367	0.368	0.362	0.366	0.365
2	0.527	0.524	0.509	0.541	0.542	0.539	0.527	0.510	0.503	0.501
3	0.558	0.555	0.523	0.564	0.565	0.565	0.567	0.546	0.550	0.539
4	0.697	0.697	0.692	0.698	0.699	0.699	0.693	0.695	0.697	0.694
5	0.756	0.756	0.738	0.755	0.756	0.756	0.759	0.755	0.754	0.758
6	0.826	0.826	0.822	0.830	0.831	0.832	0.860	0.819	0.851	0.842
7	0.928	0.929	0.926	0.931	0.930	0.931	0.920	0.907	0.902	0.908
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
9	1.258	1.259	1.262	1.263	1.263	1.263	1.267	1.248	1.259	1.259
10	1.290	1.291	1.288	1.294	1.294	1.295	1.323	1.296	1.291	1.308
11	1.324	1.326	1.322	1.330	1.332	1.332	1.341	1.314	1.325	1.324
12	1.362	1.361	1.350	1.360	1.360	1.360	1.377	1.358	1.366	1.359
13	1.401	1.402	1.390	1.404	1.404	1.405	1.418	1.398	1.404	1.400
14	1.503	1.508	1.492	1.506	1.507	1.507	1.520	1.500	1.508	1.503
15	1.581	1.583	1.577	1.588	1.588	1.588	1.598	1.575	1.584	1.579
16	1.601	1.602	1.595	1.606	1.607	1.606	1.620	1.596	1.606	1.600
17	1.663	1.665	1.657	1.669	1.670	1.668	1.683	1.658	1.668	1.663
18	1.700	1.701	1.685	1.701	1.702	1.701	1.718	1.692	1.703	1.697
19	1.722	1.724	1.716	1.728	1.726	1.726	1.741	1.714	1.727	1.719
20	1.743	1.747	1.733	1.752	1.752	1.752	1.752	1.763	1.735	1.741
21	1.768	1.769	1.761	1.773	1.774	1.773	1.789	1.762	1.773	1.766
22	1.811	1.815	1.799	1.819	1.819	1.818	1.831	1.803	1.814	1.807
23	1.856	1.859	1.847	1.864	1.866	1.863	1.878	1.848	1.859	1.853
24	1.893	1.894	1.884	1.899	1.901	1.899	1.913	1.884	1.896	1.888
25	2.042	2.042	2.032	2.045	2.046	2.044	2.063	2.032	2.044	2.035
26	2.118	2.118	2.045	2.123	2.124	2.122	2.142	2.110	2.118	2.111

表 3 复方苦参汤有效部位指纹图谱相似度

样品编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度	0.970	0.968	0.966	0.961	0.880	0.885	0.935	0.970	0.960	0.965

上采用液质联用技术鉴定这些成分的结构和归属,为今后开发相关产品提供更加翔实的研究基础。

### 参考文献:

- [1] 范 恒,张丽娟,段雪云,等.复方苦参汤对溃疡性结肠炎 DOR- $\beta$ -arrestin1-Bcl-2 信号转导通路的干预作用研究[J].世界华人消化杂志 2013,21(8):647-654.
- [2] 徐 萌,范 恒.清热燥湿凉血方治疗溃疡性结肠炎 82 例临床分析[J].中西医结合研究,2015,7(2):79-80.
- [3] ZHOU P Q, FAN H, HU H, et al. Role of DOR- $\beta$ -arrestin1-Bcl2 Signal Transduction Pathway and Intervention Effects of Oxymatrine in Ulcerative Colitis [J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2014,34(6):815.
- [4] 范 恒,庄 雄,段雪云,等.复方苦参汤肠溶胶囊对溃疡性结肠炎患者的治疗作用及其机制[J].世界华人消化杂志,2009,17(23):2429-2432.
- [5] 周从辉,王秀兰,姜 楠,等.复方苦参汤不同提取部位抗炎作用的筛选及作用机制初探[J].中中药学,2016,14(6):585-589.
- [6] 吴松涛.复方苦参汤抗溃疡性结肠炎有效成分及作用机理研究[D].武汉:湖北中医药大学,2016.
- [7] 吴松涛,陈树和,尤朋涛,等.复方苦参汤抗溃疡性结肠炎活性成分的初步研究[J].中中药学,2017,15(6):741-744.
- [8] 彭 颖.AM 调节溃疡性结肠炎肠黏膜通透性的机制及复方苦参汤的干预作用研究[D].武汉:华中科技大学,2016.
- [9] 王秀兰,洪宗超,吴松涛,等.高效液相色谱法测定复方苦参汤中苦参碱、氧化苦参碱的含量[J].中中药学,2017,15(10):1426-1429.
- [10] FAN H, LIAO Y, TANG Q, et al. Role of  $\beta$ 2-adrenoceptor- $\beta$ -arrestin2-nuclear factor- $\kappa$ B signal transduction pathway and intervention effects of oxymatrine in ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine,2012,18(7):514-521.
- [11] 张成志.苦参片中苦参碱含量的反相高效液相色谱测定[J].西南民族大学学报,2009,35(3):562-564.
- [12] 郝明虹,夏才付,王 栋.HPLC 法测定妇炎清泡腾片中苦参碱的含量[J].药物分析杂志,2007,27(12):1996-1997.

(本文编辑 杨 瑛)