

基于指纹图谱技术分析四神丸中吴茱萸的有效成分

乌日根 王 阳

(内蒙古医科大学附属医院药学部, 呼和浩特, 010000)

摘要 目的: 基于指纹图谱技术分析探讨四神丸中吴茱萸的有效成分, 阐释中药合理配伍的科学内涵。方法: 精密量取 10 μL 的样品进样量或对照品溶液, 采用 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm 的色谱柱, 选择流动相的条件是在乙腈、甲醇和水中以 1 mL/min 的流速进行梯度洗脱, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 225 nm, 根据高效液相 (HPLC) 指纹图谱的梯度洗脱程序进行试验, 并在 HP HPLC (3D) 化学工作站上进行指纹图谱分析四神丸中吴茱萸的有效成分。结果: 四神丸 HPLC 指纹图谱检测精密度、重复性和稳定性均良好。不同批次四神丸中的吴茱萸的有效成分是吴茱萸碱和吴茱萸次碱, 不同厂家四神丸中吴茱萸的有效含量有明显差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 以同仁堂四神丸中吴茱萸的有效成分含量为最多, 其次为仲景牌四神丸。结论: 基于指纹图谱技术用高效液相色谱法分析四神丸中吴茱萸的有效成分测定, 发现其有效成分主要是吴茱萸碱和吴茱萸次碱, 进而对该药物进行质量控制。

关键词 指纹图谱; 四神丸; 吴茱萸; 有效成分

Analysis of Effective Components of Fructus Evodiae in Shishen Pill Based on Fingerprint Technology

Wu Yuegen, Wang Yang

(Pharmaceutical Department, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010000, China)

Abstract **Objective:** To explore the effective constituents of Fructus Evodiae in Shishen Pill with fingerprint technology based on the scientific connotation of the reasonable compatibility of Chinese medicine. **Methods:** The precise amount of 10 μL sample or standard solution was obtained. 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm chromatographic column was used, and mobile phase condition was in acetonitrile, methanol and water at a flow rate of 1 mL/min by gradient elution. The column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$, and the detection wave length was 225 nm. According to HPLC (high performance liquid chromatography), fingerprint gradient elution program was tested, and effective constituents of Fructus Evodiae in Shishen Pill was analyzed with fingerprint based on HP HPLC (3D) chemical workstation. **Results:** The precision, repeatability and stability of Shishen Pill HPLC fingerprint detection were good. The effective components of Fructus Evodiae in Shishen Pill with different batches were evodiamine and rutaecarpin. There was significant difference in the effective contents of Fructus Evodiae in Shishen Pill of different manufacturers ($P < 0.05$). The content of effective components of Fructus Evodiae in Shishen Pill in Tongrentang was the most, followed by Zhongjing Brand. **Conclusion:** The technology of fingerprint by HPLC analysis of effective constituents of Fructus Evodiae in Shishen Pill based assay found that the main active component is evodiamine and rutaecarpine, and control the quality of the drug.

Key Words Fingerprint; Shishen pill; Fructus Evodiae; Effective components

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.072

四神丸是治疗脾肾阳虚证型首见于《内科摘要》的著名方剂, 临床上用于肾泄、肠炎等疗效独到^[1-3]。四神丸的方药组成主要由以下四种药物组成, 分别是吴茱萸、补骨脂、肉苁蓉和五味子^[4,5], 其中吴茱萸药性属于辛苦大热, 具有除湿燥脾之功效, 由于归经属少阴经, 因此药效能入少阴气分而补肾阳, 四神丸中佐吴茱萸, 以其辛温之性顺肝木欲散之势, 为肾阳水气开滋生之路, 滋补肾阳; 肝顺则不乘土, 而先天之本肾阳得滋, 供后天之本脾阳之需, 相辅相成脾肾阳虚得解, 疾病自愈^[6-8]。吴茱萸单味中

药的主要化学成分有挥发油、吴茱萸碱和吴茱萸次碱等生物碱组成^[9], 然而在四神丸中吴茱萸发挥药效的有效成分是否为这 2 种生物碱还有待研究, 因此本课题基于指纹图谱技术分析探讨四神丸中吴茱萸的有效成分, 为四神丸的质量控制提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 高效液相色谱仪 (型号: 1100 Series, 厂家: AGILENT 安捷伦科技有限公司); 5 μm 的色谱柱 (型号: Agilent Eclipse C₁₈ 柱, 厂家: AGILENT 安捷伦科技有限公司)。

基金项目: 内蒙古自治区科技厅面上项目 (2013MS1139)

作者简介: 乌日根 (1972.06—), 男, 本科, 副主任药师, 研究方向: 中西医药理 E-mail: 147206358@qq.com

通信作者: 王阳 (1968.09—), 男, 本科, 副主任药师, 研究方向: 中西医药理, E-mail: 2011nm@sina.com

1.2 试剂 由 Fisher scientific 公司提供的甲醇(批号 LOT:111280)和乙腈(批号 LOT:096328);中国食品药品检定研究院提供的超纯水、中国食品药品检定研究院吴茱萸碱对照品(批号:802-9401)和吴茱萸次碱对照品(批号:801-9001)。

1.3 分析样品 取3个不同厂家不同批次的四神丸每个厂家各2取两批不同生产批次(A厂家:北京同仁堂天然药物(唐山)有限公司,国药准字 Z1302065;B厂家:山西华康药业股份有限公司,国药准字 Z14020017;C厂家:河南省宛西制药股份有限公司,国药准字 Z41021923)的四神丸用研磨器研细,精密取2g四神丸粉末。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 精密量取10 μL 的样品进样量或对照品溶液,采用250 mm×4.6 mm,5 μm 的色谱柱(AgilentEclipse C₁₈柱),选择流动相的条件是在乙腈、甲醇和水中以1 mL/min 的流速进行梯度洗脱(详见表1),柱温为30℃,检测波长为225 nm,根据高效液相(HPLC)指纹图谱的梯度洗脱程序进行试验,并在HPLC(3D)化学工作站上进行指纹图谱分析。

表1 流动相梯度			
时间(min)	乙腈(%)	甲醇(%)	水(%)
0.00	40	30	30
10.00	40	30	30
15.00	70	0	30
25.00	70	0	30
27.00	40	30	30

2.2 对照品溶液制备 1)对照品溶液制备:精密称取购于中国食品药品检定研究院吴茱萸碱对照品(批号:802-9401)和吴茱萸次碱对照品(批号:801-9001)置于容量瓶中,甲醇溶解,采用0.45 μm 有机滤膜滤过,取续滤液,即得对照品溶液。2)阴性对照溶液的制备:按照四神丸的处方比例制备缺少吴茱萸的浓缩药液,采用0.45 μm 有机滤膜滤过,取续滤液,即为阴性对照溶液。

2.3 供试品溶液制备 3个不同厂家不同批次的四神丸中每个厂家各取2批不同生产批次,精密取2g四神丸粉末浸泡于甲醇中0.5 h,随后采用索氏法提取约2 h,将过滤液置于精准的50 mL 容量瓶中以甲醇定容后加塞密封,摇匀,采用0.45 μm 有机滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.4 专属性试验 取同一供试品溶液根据2.3制备的供试品溶液,采用薄层层析的方法对四神丸进

行专属性试验,结果显示四神丸专属性良好。

2.5 线性关系考察 精密量取混合对照品的甲醇溶液(0.107 2 mg/mL)3.0、6.0、12.0、18.0、24.0 mL,分别置50 mL 量瓶中。加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别精密吸取10 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积;以混合对照品进样量(u g)为横坐标(X),峰面积积分值为纵坐标(Y),绘制标准曲线,回归方程 $y=2581530.89X-12670.48$, $r=0.9999(n=5)$,结果表明,混合对照品在0.06432~0.1456 μg 范围内线性关系良好。

2.6 中间精密度试验 取同一供试品溶液,连续5次进样,测试HPLC 仪器的精密密度,四神丸供试品溶液检测出30多个共有峰,一下仅选择6个特征峰进行共有峰结果统计报道。见表2。

表2 大于总峰面积5%的色谱峰相对峰面积精密密度结果							
峰号	第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	平均	RSD(%)
1	0.88	0.84	0.85	0.89	0.86	0.87	4.687
2	0.73	0.78	0.74	0.75	0.77	0.76	3.021
3	0.55	0.54	0.55	0.56	0.55	0.54	2.754
4	0.39	0.37	0.41	0.38	0.40	0.38	2.012
5	0.30	0.32	0.29	0.31	0.30	0.29	1.564
6	0.46	0.48	0.47	0.46	0.47	0.50	2.184

2.7 供试品溶液稳定性试验 取同一供试品溶液根据2.3制备的供试品溶液,依照2.1的色谱条件,连续5次进样,测试样品的稳定性,由表3得,稳定性试验中各主要色峰的相似度均大于0.99,显示良好的稳定性。

表3 稳定性相似度评价结果						
次数	稳定性1	稳定性2	稳定性3	稳定性4	稳定性5	对照指纹图谱
稳定性1	1.000	0.997	0.997	0.997	0.997	0.998
稳定性2	0.997	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999
稳定性3	0.997	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000
稳定性4	0.999	0.997	0.999	0.999	1.000	0.999
稳定性5	0.999	0.999	1.000	1.000	0.998	1.000

2.8 重复性试验 取同一供试品溶液根据2.2制备的供试品溶液,依照2.1的色谱条件,连续5次进样,测试HPLC 指纹图谱方法的重复性,重复试验中各主要色峰的相似度均大于0.99,显示良好的重复性。见表4。

表4 重复试验相似度评价结果						
次数	重复度1	重复度2	重复度3	重复度4	重复度5	对照指纹图谱
重复度1	1.000	0.994	0.992	0.995	0.990	0.997
重复度2	0.996	1.000	0.994	1.000	0.992	0.997
重复度3	0.992	0.996	1.000	0.992	0.997	0.996
重复度4	0.995	0.996	0.992	1.000	0.992	0.997
重复度5	0.990	0.997	0.997	0.992	1.000	0.998

2.9 回收率试验 采用加样回收法,精密称取 5 份已知含量的同一批号样品各约 0.5 g,分别精密加入 20 mL 混合对照品甲醇溶液(0.005 36 mg/mL),进行回收率试验测定,计算结果显示平均回收率为 98.54%,*RSD* 为 0.76%。

2.10 样品测定结果 四神丸中吴茱萸有效成分含量测定四神丸指纹图谱建立如图 1~3 所示,不同批次四神丸中的吴茱萸的有效成分是吴茱萸碱和吴茱萸次碱,不同厂家四神丸中吴茱萸的有效含量有明显差异($P<0.05$),以同仁堂四神丸中吴茱萸的有效成分含量为最多,其次为仲景牌四神丸。见表 5。

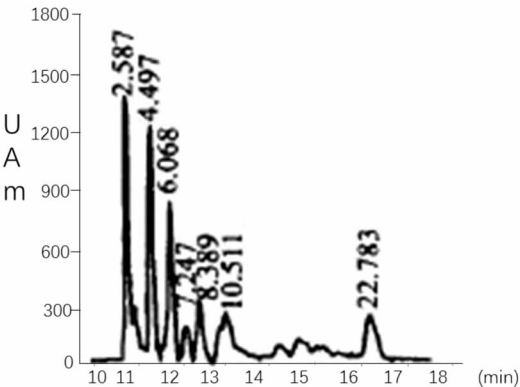


图 1 四神丸指纹图谱色谱图

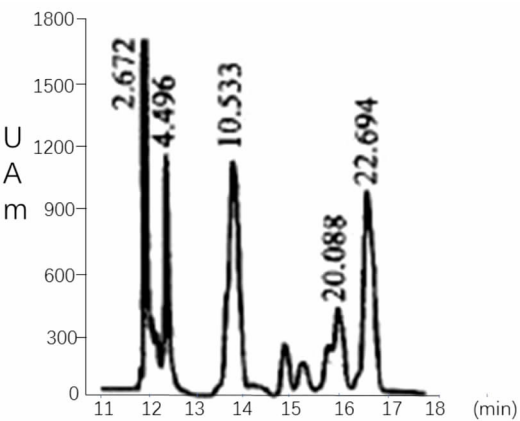


图 2 阴性对照指纹图谱色谱图

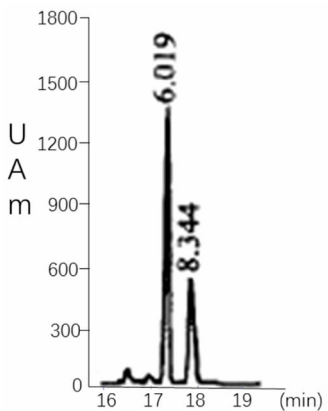


图 3 吴茱萸碱和吴茱萸次碱对照品指纹图谱色谱图

表 5 四神丸中吴茱萸有效成分含量测定

批次	吴茱萸碱(mg/g)	吴茱萸次碱(mg/g)
A 厂家 001	1.717	0.996
A 厂家 002	1.699	0.987
B 厂家 003	0.325	0.382
B 厂家 004	0.349	0.401
C 厂家 005	0.967	0.661
C 厂家 006	0.978	0.659

3 讨论

3.1 流动相的选择 本研究前期工作中四神丸中吴茱萸有效成分测定中流动相进行 HPLC 严谨性考察试验研究,首先是溶剂的选择,根据大量的文献查阅后分析^[10-12],可能溶解吴茱萸的溶剂有以下 5 种,分别是水、酸水、碱水、甲醇和乙醇,分别以五种溶剂以同样条件浸泡吴茱萸 0.5 h,结果发现水、酸水、碱水浸泡 0.5 h 后吴茱萸提取率检测几乎没有,而甲醇和乙醇中吴茱萸提取率均较前三者高,而甲醇中吴茱萸的提取不仅提取率较乙醇高,且杂质更少^[13-14],因此本课题研究选取甲醇作为吴茱萸的提取溶剂。由于甲醇对吴茱萸的提取率高,因此在梯度洗脱条件中比较乙腈-磷酸-水和乙腈-甲醇-水中,是乙腈-甲醇-水系统的对吴茱萸中的吴茱萸碱和吴茱萸次碱的分离度更高^[15-16],所产生的干扰性特异性倒峰少,基线较好^[17-18],保证了四神丸后期指纹图谱分析中的良好重复性和稳定性。

3.2 不同厂家吴茱萸有效成分差异性分析 四神丸一直秉承经典古方,对药物配伍一丝不苟的继承原方原剂量,而在剂型方面展开了积极的规范化研究,目前临床上四神丸的剂型研发主要有水丸剂和滴丸剂,滴丸剂相对水丸剂而言是一种新型的制备工艺,其设备要求较高较昂贵,且技术人员要求有纯熟的提取技能,因此滴丸剂相对水丸剂起效更快,药物的生物利用度也更高^[19]。而本研究中同仁堂所生产的四神丸中吴茱萸有效成分,吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量均较其他 2 个药厂高,可能和同仁堂高精度、高质量、高技术和高设备等完备的制备工艺,制备流程和制备技术有关。

参考文献

[1] 高长玉,李冀. 四神丸方源溯源[J]. 中医药学报,2011,39(4): 147-149.
[2] 黄小英,赵海梅,管咏梅,等. 四神丸对溃疡性结肠炎小鼠外周血 CD40,CD40L 的调节作用[J]. 时珍国医国药,2011,35(11): 2625-2627.
[3] 郑全章. 痛泻要方合四神丸治疗五更泻疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2003,12(7):722-723.

性好、操作简便^[14-16]。本实验建立 HPLC-ELSD 法测定黄芪白术配伍前后黄芪中黄芪甲苷含有量,结果准确可靠,适合黄芪及其制剂中黄芪甲苷含有量的测定。黄芪甲苷成分在含水正丁醇中溶解度较大,故本实验参照《中华人民共和国药典》,应用该溶剂从水煎液中萃取黄芪甲苷类成分,效果较好。另外,还将《中华人民共和国药典》中大孔吸附树脂分离纯化黄芪皂苷改为氧化铝,可减少前者反复洗涤纯化的不便,也取得了理想的效果,并为其他相关研究提供借鉴。本研究结果显示,黄芪白术配伍前后黄芪甲苷与其他成分的基线分离良好,且内蒙古产地的黄芪白术配伍中黄芪甲苷的含量最高。

参考文献

- [1]梁晓东,唐迎雪. HPLC 测定马钱子配伍苏木主要生物碱含量变化[J]. 中华中医药杂志,2014,34(4):1101-1104.
- [2]刘焕蓉,王虹,秦雪梅,等. HPLC 法测定玉屏风不同配伍中 4 种黄酮成分[J]. 中草药,2011,42(6):1122-1124.
- [3]张靖,徐文,吴钉红,等. HPLC-MS 法分析不同提取方法黄芪三七配伍的化学成分变化[J]. 药物分析杂志,2011,27(6):1131-1136.
- [4]张文娟,徐媛,王庆伟. HPLC 法分析川芎-香附配伍前后指标成分的变化[J]. 中国医药导报,2011,8(20):96-97,100.
- [5]贾贞超,陈锦瑶,张立实. 黄芪甲苷的药理作用与毒理学评价研究进展:低碳生活与健康损害论坛——中国环境诱变剂学会风险评价专业委员会全国第十三届学术会议暨第四届第 5 次委员会会议[C]. 内蒙古海拉尔,2011:132-136.

- [6]张林,林轶群,傅延龄. 历代黄芪临床用量分析[J]. 中医杂志,2015,56(6):518-521.
- [7]杨娥,钟艳梅,冯毅凡. 白术化学成分和药理作用的研究进展[J]. 广东药学院学报,2012,28(2):218-221.
- [8]尹华,王知青,王玲,等. HPLC-DAD 波长切换法同时测定白术中白术内酯 I、II、III 和苍术酮的含量[J]. 中华中医药杂志,2013,9(1):233-236.
- [9]罗兰,张素中,黄月纯,等. 玉屏风煎剂中氨基酸类成分 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):64-68.
- [10]周劲松,张洪坤,黄玉瑶,等. 多波长 HPLC 法测定玉屏风散中 10 种化学成分的含量[J]. 药物分析杂志,2016,31(6):1072-1081.
- [11]吴铁,谢华,崔燎,等. 黄芪、白术及其复方制剂对类固醇性骨质疏松的防治作用研究[J]. 中国中西医结合杂志,1998,9(1):284-286.
- [12]后盾,吴正翔. 黄芪、白术对再生障碍性贫血骨髓红系造血祖细胞促增殖作用的实验研究[J]. 江西中医学院学报,1999,11(1):28.
- [13]尹雪,黄月纯,魏刚. 黄芪、白术、防风单煎、合煎对玉屏风煎剂 HPLC 指纹图谱的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(3):1-3.
- [14]刘晓芳,张淑蓉,郭爱玲,等. 不同配伍防己黄芪汤中黄芪甲苷含量变化[J]. 中成药,2017,39(3):642-644.
- [15]蒋红艳,杨元娟,何静,等. 黄芪及其制剂中黄芪甲苷定量分析方法研究进展[J]. 中国医药指南,2009,7(10):209-211.
- [16]王建核. 高效液相色谱法测定脑脉通口服液中的黄芪甲苷[J]. 药事实践杂志,2005,23(6):364-365.

(2017-07-06 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 3153 页)

- [4]李冀,邹大威,杜雅薇,等. 二神丸与四神丸对脾虚泄泻作用的配伍比较研究[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(6):728-730.
- [5]吕银娟,张智华,吴建红. 从四神丸探析脾阳根于肾阳[J]. 中医研究,2012,25(5):10-12.
- [6]周璐,徐婷婷,金若敏,等. 吴茱萸水煎液对大、小鼠肝药酶亚型影响的比较研究[J]. 中国药理学通报,2014,30(2):279-282.
- [7]高长玉,李冀,柴剑波,等. 四神丸止泻作用的实验研究[J]. 中医药学报,2005,33(2):40-41.
- [8]周枫,刘端勇,赵海梅. 四神丸治疗消化道疾病研究概述[J]. 江西中医药,2011,42(11):61-63.
- [9]张秋方,杨奕樱. 吴茱萸碱药理作用的研究近况[J]. 贵阳中医学院学报,2013,34(1):36-38.
- [10]龚慕辛,王智民,张启伟,等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(2):183-187.
- [11]史艳财,邹蓉,唐辉,等. 吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱提取工艺及含量测定[J]. 江苏农业科学,2011,39(3):419-421.
- [12]王晖,张丽艳,杨卫平,等. 正交实验法优化疏毛吴茱萸提取工

- 艺[J]. 中国民族民间医药,2010,19(23):52-53.
- [13]甄攀,白雪梅,王治宝. 四神丸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的 HPLC 分析[J]. 中草药,2004,35(11):1249-1251.
- [14]甄攀,张利民,王治宝,等. 四神丸质量标准研究[J]. 中成药,2004,26(9):713-716.
- [15]谭生建,胡文祥,杨成勇,等. 梯度洗脱变换波长 HPLC 测定四神丸中有效成分[J]. 中国药理学杂志,1999,40(12):47-49.
- [16]姚兰,王运军,刘晓英,等. RP-HPLC 法同时测定四神丸中补骨脂素、异补骨脂素、五味子醇甲和吴茱萸碱的含量[J]. 中国药房,2010,21(43):4095-4097.
- [17]李冬梅,袁浩,刘永利,等. 肉蔻四神丸定性定量方法研究[J]. 药物分析杂志,2012,29(11):2038-2042.
- [18]苏建,刘永利,郭毅,等. 多波长 HPLC 法同时测定四神丸中 7 个有效成分的含量[J]. 药物分析杂志,2013,34(9):1531-1537.
- [19]刘岩. 四神滴丸的开发研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2008.

(2017-06-20 收稿 责任编辑:王明)