

四物汤中氨基酸类成分的 HPLC 指纹图谱分析

罗兰¹, 黄月纯², 张素中¹, 梁锦慧¹, 官伊婷¹, 许素云¹

(1. 中山大学新华学院, 广东广州 510520) (2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东广州 510405)

摘要: 建立四物汤中氨基酸类成分的 HPLC 指纹图谱分析方法, 探讨不同配伍对氨基酸类指纹图谱的影响。采用 2,4-二硝基氟苯柱前衍生法, 以精氨酸为参照物。色谱柱 Kromasil C-18 (250×4.6 mm×5 μm); 流动相 A 为乙腈, B 为 N, N-二甲基甲酰胺-0.025 mol/L 醋酸钠 (1:100, 用 36% 乙酸调 pH=6.0), 梯度系统; 柱温 40 °C; 检测波长 360 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10 μL; 分析时间 70 min。结果共标出 17 个共有峰, 鉴定出 13 种对人体有益的氨基酸成分。10 批样品的相似度均大于 0.97。对整方氨基酸指纹图谱的影响从大到小依次是当归、熟地黄、白芍、川芎。所建立的氨基酸类成分指纹图谱特征性强, 可作为四物汤质量控制的手段之一, 并可作为中药复方配伍化学成分变化研究提供一定参考。

关键词: 四物汤; 氨基酸; HPLC; 指纹图谱

文章编号: 1673-9078(2012)5-574-578

Analysis on Fingerprint of Amino Acids Composition of Siwu Decoction by HPLC

LUO Lan¹, HUANG Yue-chun², ZHANG Su-zhong¹, LIANG Jin-hui¹, GUAN Yi-ting¹, XU Su-yun¹

(1. Xinhua College of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510520, China)

(2. The First Filial Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: A fingerprint analysis of amino acids composition of Siwu decoction by HPLC was established and the different combination of HPLC conditions on amino acid composition was explored. The samples was treated by pre-column derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene and then analyzed by gradient elution with N, N-dimethylformamide-0.025 mol/L sodium acetate (1:100, with 36% acetic acid adjust pH=6.0)- acetonitrile at the flow rate of 1.0 mL/min on a Kromasil C-18 (250×4.6 mm×5 μm) column at 40 °C. The UV detection wave length was set at 360 nm and the injection volume of samples was 10 μL. The analysis time was 70 min. 17 Co- possessing peaks were selected as the fingerprint peaks, among which 13 kinds of beneficial amino acid composition were identified. The results showed the similarity for 10 batches was above 0.97. Effect of herb components on fingerprints for the amino acid in decreasing sequence was *Radix angelicae sinensis*, *Radix rehmanniae praeparata*, *paeonia lactiflora pall* and *Rhizoma chuanxion*. The characteristic fingerprint of amino acid components can be used for the quality control of Siwu decoction, providing a reference for the research of the changes of chemical composition of Traditional Chinese medicine compatibility.

Key words: Siwu decoction; amino acid; fingerprint; HPLC

四物汤载于《太平惠民和剂局方》, 由熟地黄、当归、白芍、川芎组成。自古以来就是补血调血的基础方剂, 历来被中医临床用于治疗各种血虚证, 包括冲任虚损、月经不调、崩中漏下及血瘀块硬、时发疼痛等^[1-2], 其中的氨基酸类成分是构成生物体蛋白质并同生命活动有关的最基本的物质, 是生物体内不可缺少的营养成分之一^[3], 也是四物汤有美容健康功效的主

收稿日期: 2012-03-02

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B060401010)

作者简介: 罗兰(1984-), 女, 助理工程师, 从事药物的质量分析

通讯作者: 张素中, (1969-), 女, 副教授, 从事中药质量标准与指纹图谱研究

要物质基础之一。近年, 对四物汤的质量研究方面已有文献报道^[4-8], 但组方中的氨基酸成分研究甚少。因此, 本研究采用柱前衍生法对四物汤中氨基酸类成分进行了指纹图谱的分析, 为四物汤的物质基础研究提供一定参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司, 包括四元梯度泵、柱温箱、二级管阵列检测器、紫外检测器、Chemstation 工作站)。

1.2 试剂

精氨酸(批号:20090719)、L-苏氨酸(批号:20070501)、L-色氨酸(批号:20070802)、L-组氨酸(批号:20080301)、L-丙氨酸(批号:20080303)、DL-丙氨酸(批号:20080701)、甘氨酸(批号:20080803)、亮氨酸(批号:20080901)、胱氨酸(批号:20081003)、脯氨酸(批号:20081103)、苯丙氨酸(批号:20090327)、缬氨酸(批号:20090618)、精氨酸(批号:20090719)、谷氨酸(批号:20091111)、天门冬氨酸(批号:20100121)对照品,购于中国药品生物制品检定所。

10批熟地黄、白芍、当归与川芎饮片,分别购于广东多家药材公司,经中山大学新华学院张素中副教授鉴定,熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* BgeLibisch.的干燥块根的炮制加工品,白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根,当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels的干燥根,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎。

2,4-二硝基氟苯为生化试剂(批号:FIM01,东京化成工业株式会社);乙腈为色谱纯(Merk公司);N,N-二甲基甲酰胺为色谱纯(批号:20100420,天津市瑞金特化学品有限公司);其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

1.3 色谱条件

色谱柱为Kromasil C-18(250×4.6 mm×5 μm);流动相:A为乙腈,B为N,N-二甲基甲酰胺-0.025 mol/L醋酸钠溶液(1:100,用36%乙酸调pH=6.0),洗脱梯度:0~10 min,乙腈为13%→15%,10~25 min,乙腈为15%→18%,25~35 min,乙腈为18%→28%,35~55 min,乙腈为28%→45%,55~70 min,乙腈为45%→13%;柱温:40℃;检测波长:360 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL;检测时间:70 min。

2 方法与结果

2.1 四物汤及单味煎液、不同配伍煎液的制备

按四物汤的处方配比(熟地黄、白芍、当归与川芎为12:12:10:8),取2.5日剂量的饮片,加水800 mL,浸泡30 min,加热煮沸后文火慢煎40 min,取出,趁热滤过,药渣再加水500 mL加热煮沸后文火慢煎30 min,取出,趁热滤过,合并两次煎液,浓缩至50 mL,放冷,即得四物汤浓缩液。另取熟地黄、白芍、当归及川芎不同配伍对照,同法制备单味煎液及不同配伍煎液。

2.2 混合氨基酸对照液及各氨基酸对照液的制备

分别精密称取天门冬氨酸2.5 g、谷氨酸4.2 g、丝

氨酸3.4 g、组氨酸5.0 g、甘氨酸5.9 g、苏氨酸4.2 g、丙氨酸12.2 g、精氨酸8.4 g、酪氨酸0.2 g、胱氨酸0.2 g、缬氨酸5.5 g、甲硫氨酸4.2 g、色氨酸1.4 g、苯丙氨酸5.9 g、异亮氨酸4.2 g、亮氨酸5.9 g、醋酸赖氨酸9.5 g、脯氨酸5.0 g共18种氨基酸对照品,加入焦亚硫酸钠0.04 g、冰醋酸2.5 mL,然后加水到1000 mL制成混合氨基酸对照液。分别精密称取各等量氨基酸,同法制成各氨基酸对照液。

2.3 柱前衍生及测定方法

精密量取氨基酸对照液1 mL、混合氨基酸对照液1 mL及四物汤浓缩煎液0.5 mL,分别置于25 mL的容量瓶中,加入0.5 mol/L的碳酸氢钠溶液2 mL与1%的2,4-二硝基氟苯的乙腈溶液2.5 mL,置于60℃恒温水箱中振荡60 min,取出放冷至室温,加pH 7.0磷酸盐缓冲液至刻度,摇匀,用微孔滤膜滤过,取续滤液作为对照液及供试品溶液,按照“2.1”色谱条件进行测定,记录70 min的色谱图。另取水1 mL同法衍生作试剂空白。混合氨基酸对照液的HPLC图谱见图1,18种混合氨基酸对照液中检出17个特征峰。

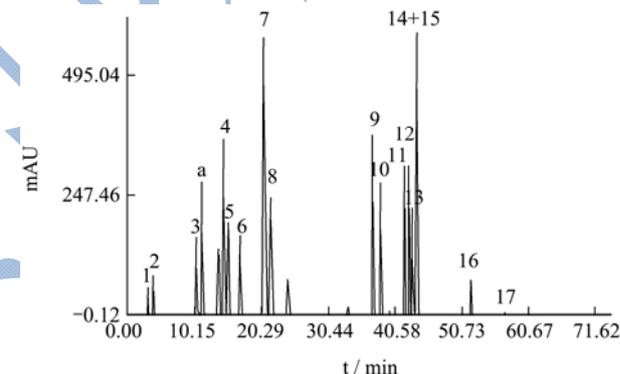


图1 18种混合氨基酸对照液的HPLC指纹图谱

Fig.1 HPLC Chromatographic graphs of 18 kinds of amino acid mixture contrast liquid

注:1.天门冬氨酸(Asp);2.谷氨酸(Glu);3.丝氨酸(Ser);4.甘氨酸(Gly);5.精氨酸(Arg);6.苏氨酸(Thr);7.脯氨酸(Pro);8.丙氨酸(Ala);9.缬氨酸(Val);10.甲硫氨酸(Met);11.异亮氨酸(Ile);12.亮氨酸(Leu);13.色氨酸(Trp);14.组氨酸(His);15.苯丙氨酸(Phe);16.赖氨酸(Lys);17.酪氨酸(Tyr);a.试剂空白峰(Reagent blank peak)。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液,依法连续进样5次,按上述色谱条件测定,记录色谱图。各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.10%~0.23%、0.28%~2.57%,图谱导入相似度软件处理,相似度均在0.998以上,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验

精密吸取同一四物汤浓缩煎液 5 份, 分别按照“2.4”项下方法进行衍生, 分别进样, 记录色谱图。结果各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别 0.49%~2.00%, 0.26%~2.17%, 图谱导入相似度软件处理, 相似度均在 0.986 以上, 表明本方法重复性好。

2.4.3 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 10, 12, 24 h 进样, 记录色谱图。结果各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.58%~2.65%、0.69%~2.39%, 图谱导入相似度软件处理, 相似度均在 0.984 以上, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定, 稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 样品的测定及共有峰的标定

取 10 批样品, 按 2.2 及 2.4 项下操作制备供试品溶液, 并按上述色谱条件进样分析。通过供试品溶液与混合氨基酸对照液、各氨基酸对照液特征峰的紫外光谱, 标示出 17 个氨基酸特征峰, 鉴定了 13 个特征峰 (见表 1), 10 批样品重叠图见图 2。

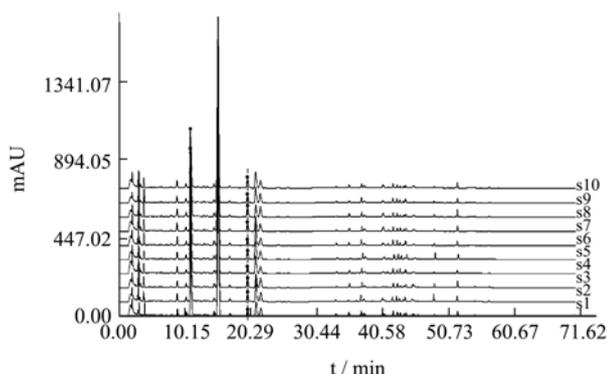


图 2 10 批四物汤氨基酸柱前衍生 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig.2 HPLC fingerprint overlapping of 10 samples of Siwu

Decoction

2.5.2 参照峰的选择

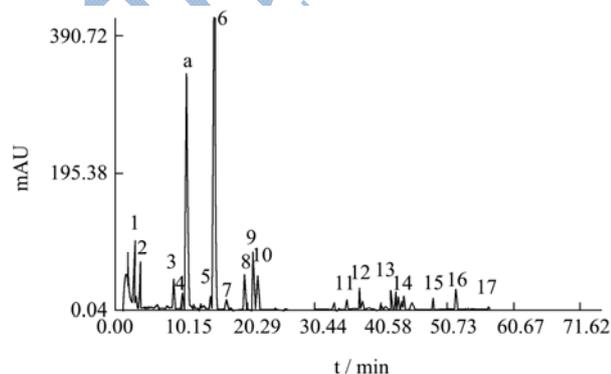


图 3 10 批四物汤柱前衍生氨基酸 HPLC 指纹图谱生成的对照图

Fig.3 Fingerprint of Medicinal materials in 10 batch siwu

decoction (mutual pattern)

注: 1.天冬氨酸(Asp); 2.谷氨酸(Glu); 4.丝氨酸(Ser); 5.甘氨酸(Gly); 6.精氨酸(Arg); 7.苏氨酸(Thr); 9.脯氨酸(Pro); 10.丙氨酸(Ala); 12.缬氨酸(Val); 13.异亮氨酸(Ile); 14.亮氨酸(Leu); 16.赖氨酸(Lys); 17.酪氨酸(Tyr); a.试剂空白峰(Reagent blank peak)。

由图 3 可知, 峰 6 (精氨酸) 为四物汤中主要的氨基酸成分, 在 HPLC 色谱图中分离良好, 含量较高且稳定, 所以选择峰 6 为参照峰。

2.5.3 成分鉴定及峰位归属

通过对四物汤与氨基酸对照液, 单味煎剂, 不同配伍煎剂供试液的分析, 进行了 17 个特征峰的成分鉴定与峰位归属, 结果见表 1。

2.5.4 指纹图谱的建立

采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2004A 版), 生成四物汤柱前衍生氨基酸对照指纹图谱, 见图 3。以峰 6 为参照峰计算 10 批样品各特征峰的相对保留时间与相对峰面积, 结果见表 1。除去溶剂空白峰, 总共有峰面积百分含量达 92.34%±1.06%; 其中峰 3、峰 6 (精氨酸) 及峰 9 (脯氨酸) 为 3 强峰, 3 强峰的峰面积百分含量达 65.09%。

2.5.5 相似度分析

采用中国药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件 (2004A 版) (均值法), 进行相似度评价, 结果相似度均在 0.97 以上, 见表 2。

2.6 配伍对四物汤中氨基酸类成分指纹图谱整体的影响

为了解四物汤中组方四味药对整方中的氨基酸类成分影响大小, 采取正交试验法进行拆方试验, 以四物汤中组分的不同配伍的指纹图谱与四物汤剂的共有模式图谱相似度为评价指标, 运用直观分析方法, 分析其组方当归、熟地、川芎和白芍四种药材对全方氨基酸类成分影响。具体实验方法及结果见表 3、表 4。根据直观分析结果得出, 4 个因素对氨基酸指纹图谱影响的大小顺序为 A (当归) > B (熟地黄) > D (白芍) > C (川芎)。

3 讨论

3.1 衍生供试样的浓度确定

在未浓缩的四物汤溶液 (250 mL) 中精密量取 0.5 mL、1.0 mL、1.5 mL 进行衍生, 进样后所得的图谱与混合氨基酸注射剂图谱对比, 结果显示 3 种不同浓度的四物汤氨基酸指纹图谱出的峰较少, 后改用浓缩四物汤 (0.50 mL/g) 后, 其氨基酸成分出的峰情况改善很多, 其中有 17 种氨基酸是可确定的。故确定以浓缩四物汤 (0.50 mL/g) 为衍生供试样品浓度。

表1 四物汤氨基酸柱前衍生 HPLC 指纹图谱分析结果

Table 1 Fingerprint analysis results of 10 samples of Siwu Decoction

峰号	相对平均保留时间($\bar{x} \pm s$)	相对峰面积($\bar{x} \pm s$)	成分	峰位归属
1	0.2004±0.0017	0.0327±0.0051	天冬氨酸	白芍、当归、川芎、熟地黄
2	0.2513±0.0024	0.0336±0.0063	谷氨酸	白芍、当归
3	0.5864±0.0016	0.0298±0.0036	未知	白芍、当归
4	0.6767±0.0014	0.0173±0.0056	丝氨酸	当归
5	0.9582±0.0010	0.0197±0.0034	甘氨酸	当归、川芎
6(s)	1.0000	1.0000	精氨酸	当归、白芍、川芎、熟地黄
7	1.1154±0.0054	0.0146±0.0024	苏氨酸	当归、川芎、白芍
8	1.2934±0.0016	0.0598±0.0103	未知	当归、白芍、川芎
9	1.3767±0.0023	0.1186±0.0304	脯氨酸	当归、川芎、白芍
10	1.4237±0.0019	0.0707±0.0077	丙氨酸	当归、川芎、熟地黄、白芍
11	2.3173±0.0182	0.0102±0.0036	未知	当归、川芎
12	2.4420±0.0206	0.0197±0.0035	缬氨酸	白芍
13	2.7579±0.0239	0.0168±0.0027	异亮氨酸	当归、川芎
14	2.8003±0.0244	0.0148±0.0036	亮氨酸	当归
15	3.1772±0.0227	0.0112±0.0083	未知	当归、川芎
16	3.4091±0.0289	0.0195±0.0040	赖氨酸	当归、白芍、川芎
17	3.7270±0.0365	0.0028±0.0006	酪氨酸	当归、白芍、川芎、熟地黄

表2 10 批样品的相似度结果

Table 2 Similarity results of 10 samples of Siwu Decoction

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1	0.995	0.999	0.996	0.997	0.998	0.998	0.997	0.99	0.998	0.999
S2	0.995	1	0.995	0.989	0.999	0.996	0.998	0.995	0.996	0.998	0.998
S3	0.999	0.995	1	0.995	0.996	0.998	0.997	0.999	0.99	0.999	0.999
S4	0.996	0.989	0.995	1	0.993	0.997	0.992	0.991	0.979	0.994	0.994
S5	0.997	0.999	0.996	0.993	1	0.998	0.997	0.995	0.993	0.998	0.999
S6	0.998	0.996	0.998	0.997	0.998	1	0.998	0.996	0.991	0.998	0.999
S7	0.998	0.998	0.997	0.992	0.997	0.998	1	0.998	0.996	0.999	0.999
S8	0.997	0.995	0.999	0.991	0.995	0.996	0.998	1	0.993	0.998	0.998
S9	0.99	0.996	0.99	0.979	0.993	0.991	0.996	0.993	1	0.994	0.995
S10	0.998	0.998	0.999	0.994	0.998	0.998	0.999	0.998	0.994	1	1
R	0.999	0.998	0.999	0.994	0.999	0.999	0.999	0.998	0.995	1	1

表3 因素水平表

Table 3 Factors level table

水平因素	A(当归)	B(熟地)	C(川芎)	D(白芍)
1	用药	用药	用药	用药
2	不用药	不用药	不用药	不用药

3.2 衍生条件的优化

氨基酸衍生化试剂主要有邻苯二甲醛、氨基苯甲酸酯类、异硫氰酸苯酯、6-氨基喹啉-N=羟基琥珀酰亚胺基及2,4-二硝基氟苯等^[9]。本文采用2,4-二硝基氟苯柱前衍生化法建立四物汤中氨基酸指纹图谱,通过参

考文献资料^[10-12],对衍生剂用量(1.0、2.0、2.5、3.0、4.0 mL)、衍生温度(40、50、60、70 °C)、衍生时间(30、60、90、120 min)等条件进行试验比较及优化,结果表明,当衍生剂用量为2.5 mL、温度60 °C及衍生时间60 min时,各色谱峰分离度较好,保留时间适中。因此最终确定“2.3”项下衍生方法。

3.3 四物汤中共有峰的选择

四物汤中虽能检出色氨酸、组氨酸、苯丙氨酸峰,但在保留时间范围内,易受试剂空白峰的干扰,峰面积不稳定,故不作为共有峰。

表4 配伍对全方汤剂指纹图谱影响直观分析结果

Table 4 Decoction of compatibility on fingerprint of the whole visual side analysis

配伍组/因素	A	B	C	D	不同配伍与全方相似度
1(ABCD)	1	1	1	1	1
2(ABC)	1	1	1	2	0.977
3(ABD)	1	1	2	1	0.975
4(A)	1	2	2	2	0.946
5(ACD)	1	2	1	1	0.955
6(B)	2	1	2	2	0.916
7(BCD)	2	1	1	1	0.854
8(空白)	2	2	2	2	0
9(C)	2	2	1	2	0.862
10(D)	2	2	2	1	0.909
均值1	0.97	0.94	0.93	0.94	
均值2	0.71	0.73	0.75	0.75	
极差	0.26	0.21	0.18	0.19	

4 结论

4.1 本文对四物汤中氨基酸类成分进行指纹图谱分析,共标出17个共有峰,鉴定出13种对人体有益的氨基酸成分。计算10批样品的相似度在0.97以上。结果显示,此方法简便可靠、分离效果好,所建立的指纹图谱特征性强,具有较好的稳定性和可控性,可以作为四物汤的质量控制和评价指标之一。

4.2 通过对不同配伍煎剂的分析,结果对整方氨基酸指纹图谱的影响从大到小依次是当归、熟地黄、白芍、川芎。提示君药当归在组方中可能占主要地位,臣佐使药起辅助作用,与传统的四物汤中医理论具有一致性。本研究亦可为中药复方配伍化学成分变化研究提

供一定参考。

参考文献

- [1] 金卫,晏菊妓.古方四物汤的药理研究进展[J].广东药学,2004,14(1):64-67
- [2] 唐昆,吴希.四物汤的现代药理作用和临床应用[J].中国中医急症,2006,15(12):1397-1399
- [3] 王彩理,郭晓华,苑德顺,等.不同生长阶段大菱鲆的氨基酸评价分析[J].现代食品科技,2012,28(1):104-107
- [4] 雷鹏,流韶,李新中,等.四物汤传统饮片汤剂、现代颗粒汤剂的特征色谱比较[J].中国医院药学杂志,2003,23(12):743-744
- [5] 李媛,鲁定国,雷艳青,等.四物汤传统饮片汤剂与配方颗粒汤剂中阿魏酸、芍药苷含量比较[J].中药材,2008,31(1):125-128
- [6] 黄月纯,刘翠玲,张琼丹,等.四物汤中四种成分的含量测定研究[J].现代中药研究与实践,2010,24(4):64-67
- [7] 何娟,何秀英.黄芪四物汤颗粒的质量标准研究[J].中国中医药科技,2009,16(3):217-219
- [8] 黄月纯,魏刚,刘翠玲,等.四物汤的HPLC指纹图谱研究[J].中成药,2011,33(3):379-382
- [9] 瞿其曙,汤晓庆,胡效亚,等.柱前衍生法在氨基酸分析测定中的应用[J].化学进展,2006,18(6):789-793
- [10] 张昌伟,徐庆阳,刘淑,等.2,4-二硝基氟苯衍生法测定发酵液中组氨酸方法的优化[J].现代化工,2007,27(2):347-349
- [11] 付宜和,杨国庆,龚道芬,等.2,4-二硝基氟苯柱前衍生法测定复方氨基酸注射液HPLC色谱条件的优化[J].药物分析,2005,25(7):762-764
- [12] 张宏杰,周建军,李新生,等.2,4-二硝基氟苯衍生法测定游离氨基酸方法的优化[J].氨基酸和生物资源,2000,22(4):59-62