

HPLC 同时测定葛根芩连汤中 12 个有效成分的含量

章军¹, 刘宇政^{1,2}, 王跃生¹, 刘安^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医学院, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 建立同时测定葛根芩连汤中葛根素、大豆苷、甘草苷、黄连碱、药根碱、黄芩苷、小檗碱、巴马汀、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵 12 个有效成分含量的 HPLC-DAD 测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, 色谱柱 Merck Chromolith RP-18e(4.6 mm × 100 mm), 流动相为乙腈-0.05% 磷酸(含 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾) 梯度洗脱; 流速 2 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 250 275 345 nm。结果: 12 个成分的方法学考察均合格, 阴性无干扰。结论: 本方法简便、快速、准确可靠, 专属性强, 可用于葛根芩连汤的质量控制。

[关键词] 葛根芩连汤; 同时测定; 黄酮类; 生物碱类; 皂苷类; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)15-0058-05

Simultaneous Determination of 12 Active Components In Gegenqinlian Decoction by HPLC

ZHANG Jun¹, LIU Yu-zheng^{1,2}, WANG Yue-sheng¹, LIU An^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC-DAD method for simultaneous determination of puerarin,

[收稿日期] 2011-03-17

[基金项目] 国家“973 计划”项目(2010CB530602)

[第一作者] 章军, 实习研究员, 从事分析化学, Tel: 010-64014411-2848, E-mail: junzhang654321@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 刘安, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药化学, Tel: 010-64014411-2938, Fax: 010-64013996, E-mail: la62@163.com

材的质量影响较大。

由于野生天麻资源的不断减少, 本实验中仅收集了 3 个产地的野生天麻, 根据野生天麻中天麻苷、天麻苷元的含量来分析, 野生天麻样品中的含量相对于同一产地的天麻来说, 含量较低; 而人工种植的天麻中有效成分的含量普遍较高, 本实验结果为栽培天麻替代野生天麻提供了科学的依据。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005.
- [2] 吴刚, 秦民坚, 康继川, 等. 不同产地天麻质量评价[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(1): 13.
- [3] 国家医药管理局和卫生部. 七十六种药材商品规格标准[S]. 1984.

- [4] 林丽聪, 吴春敏, 陈海滨, 等. RP-HPLC 法测定石仙桃中天麻素和天麻苷元[J]. 中草药, 2008, 39(2): 283.
- [5] 李德勋, 陈桂, 李辅碧, 等. 天麻不同变异类型药材中天麻素含量比较[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(3): 23.
- [6] 梁纪军, 田大丰, 王中彦, 等. HPLC 法测定不同产地天麻中天麻素的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(1): 26.
- [7] 袁胜浩, 王东, 张香兰, 等. 天麻中天麻素含量的影响因素研究[J]. 云南植物研究, 2008, 30(1): 110.
- [8] 关萍, 高玉琼, 石建明, 等. 不同产地野生及栽培天麻中天麻素含量比较[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1698.

[责任编辑 蔡仲德]

daidzin, liquiritin, coptisine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride, baicalin, berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, wogonoside, baicalein, wogonin and ammonium glycyrrhizinate in Gegenqinlian decoction.

Method: A Merck Chromolith RP-18e (4.6 mm × 100 mm) was used; the mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid (contain 0.01 mol · L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate) in gradient elution. The detection wavelength was set at 250, 275, 345 nm, the flow rate was 2.0 mL · min⁻¹ and the column temperature was maintained at 35 °C. **Result:** The accuracy, precision, sensitivity, specificity and linearity of this method met the requirements. The content of the twelve active components was determined simultaneously. **Conclusion:** The method is rapid, simple and accurate, it has a good specificity and it can be suitable for the determination of twelve active components in Gegenqinlian decoction simultaneously.

[Key words] Gegenqinlian decoction; simultaneous determination; flavones; alkaloids; saponins; HPLC

葛根芩连汤出自《伤寒论》,为太阳病误下后形成表邪未解,邪热内陷,出现下利、喘、脉促的太阳阳明合病的表里双解剂^[1]。2010年版《中国药典》一部^[2]收录的葛根芩连制剂有片剂、丸剂和微丸3种剂型,其含量测定方法为HPLC测定葛根素和小檗碱的含量。为了更好的控制葛根芩连汤的质量,本实验采用HPLC同时测定葛根芩连汤中葛根素、大豆苷、甘草苷、黄连碱、药根碱、黄芩苷、小檗碱、巴马汀、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵12个有效成分的含量,方法简便、快速,运行时间仅45 min,大大提高了检测效率,并且测量的种类完全,4味药材中的主要有效成分基本涵盖,能全面评价葛根芩连汤的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20 A 高效液相色谱仪, LC solution 工作站; 舒美 KQ-3200 E 超声清洗器(功率 150 W); Sartorius BP211D 天平。

1.2 试剂 对照品均为含量测定用, 购买单位及批号见表1; 乙腈为 Fisher, HPLC 级; 水为娃哈哈高纯水; 磷酸, 含量 85%, 分析纯; 磷酸二氢钾, 分析纯; 其余试剂均为优级纯。

3批葛根、黄芩、黄连、炙甘草饮片厂家、批号及产地见表2, 经本单位何希荣主管药师鉴定, 分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Wild.) Ohwi 的干燥根; 唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根; 毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Merck Chromolith RP-18e (4.6 mm × 100 mm); 流动相 A 0.05% 磷酸(含0.01

表1 12个对照品信息

名称	生产厂家	批号
葛根素	中国食品药品检定研究院	752-200108
大豆苷	中国食品药品检定研究院	111738-200501
甘草苷	中国食品药品检定研究院	111610-200604
黄连碱	中药固体制剂制造技术 国家工程研究中心	1413-091027
药根碱	中药固体制剂制造技术 国家工程研究中心	1444-091127
黄芩苷	中国食品药品检定研究院	110715-200815
小檗碱	中药固体制剂制造技术 国家工程研究中心	1370-090805
巴马汀	中国食品药品检定研究院	110732-200907
汉黄芩苷	中药固体制剂制造技术 国家工程研究中心	1119-090203
黄芩素	中药固体制剂制造技术 国家工程研究中心	1150-080923
汉黄芩素	中药固体制剂制造技术 国家工程研究中心	1120-091205
甘草酸铵	中国食品药品检定研究院	0731-9704

mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾) -B 乙腈 梯度洗脱, 0 ~ 15 min, 8% ~ 14% B; 15 ~ 25 min, 14% ~ 16% B; 25 ~ 45 min, 16% ~ 38% B, 流速 2 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL; 检测波长, 葛根素、大豆苷、甘草酸铵为 250 nm; 甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素为 275 nm; 黄连碱、药根碱、小檗碱、巴马汀为 345 nm; 理论塔板数均不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取葛根素、大豆苷、甘草苷、黄连碱、药根碱、黄芩苷、小檗碱、巴马汀、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸铵对照品适量, 加 50% 甲醇配制成每 1 mL 分别含 483.6, 36.28, 14.64, 76.32, 16.82, 444.4, 380.0, 77.60, 71.36, 35.80, 15.26, 14.03 μg 的混合对照品溶液。

表 2 3 批饮片厂家、产地和批号

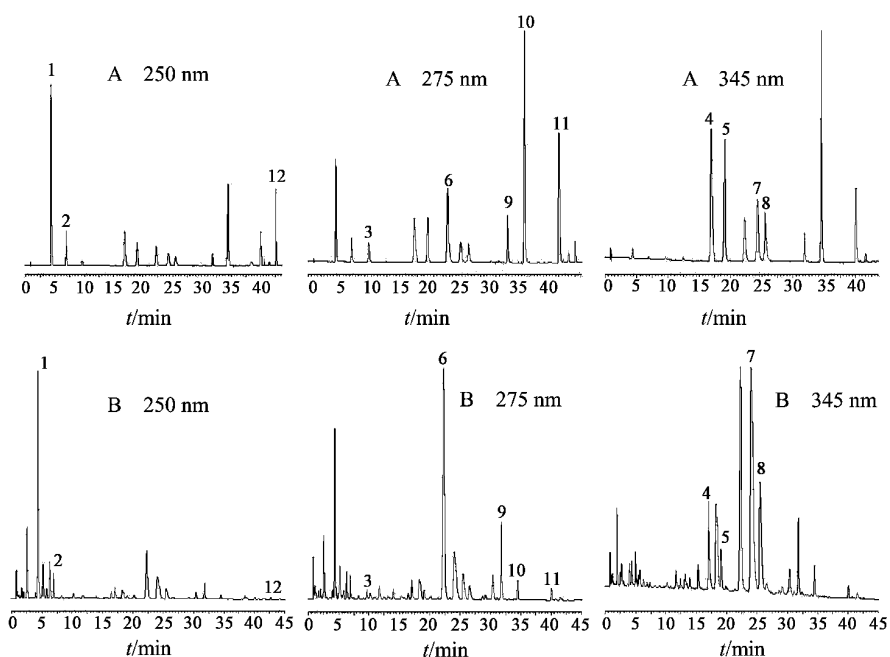
名称	批次	厂家	产地	批号
葛根	1	北京双桥燕京中药饮片厂	河南	912014
	2	北京仟草中药饮片有限公司	河南	090924003
	3	安国市神农中药饮片有限公司	湖南	090501
黄芩	1	北京双桥燕京中药饮片厂	北京	911002
	2	北京仟草中药饮片有限公司	内蒙	090114008
	3	安国市神农中药饮片有限公司	河北	090101
黄连	1	北京双桥燕京中药饮片厂	四川	905024
	2	北京仟草中药饮片有限公司	四川	091010001
	3	安国市神农中药饮片有限公司	四川	090101
炙甘草	1	北京双桥燕京中药饮片厂	内蒙	910018
	2	北京仟草中药饮片有限公司	新疆	091207003
	3	安国市神农中药饮片有限公司	内蒙	090201

2.3 供试品溶液的制备 按 2010 年版《中国药典》一部^[5]葛根芩连处方比例称取葛根 32 g、黄芩 12 g、黄连 12 g、炙甘草 8 g,加水 512 mL,先浸泡 30 min,煎煮 2 h,药渣再加水 512 mL 煎煮 2 h,煎煮液趁热过滤(100 目筛网),放冷,合并两次滤液,用水定容至 2 000 mL,作为饮片水煎液。取饮片水煎液,摇匀,精密量取混悬液 10 mL,置 25 mL 量瓶中,加甲醇 14 mL,超声处理 30 min,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 专属性试验 按 2.3 项下方法分别制备去除葛根、黄芩、黄连和炙甘草的阴性样品溶液。分别精

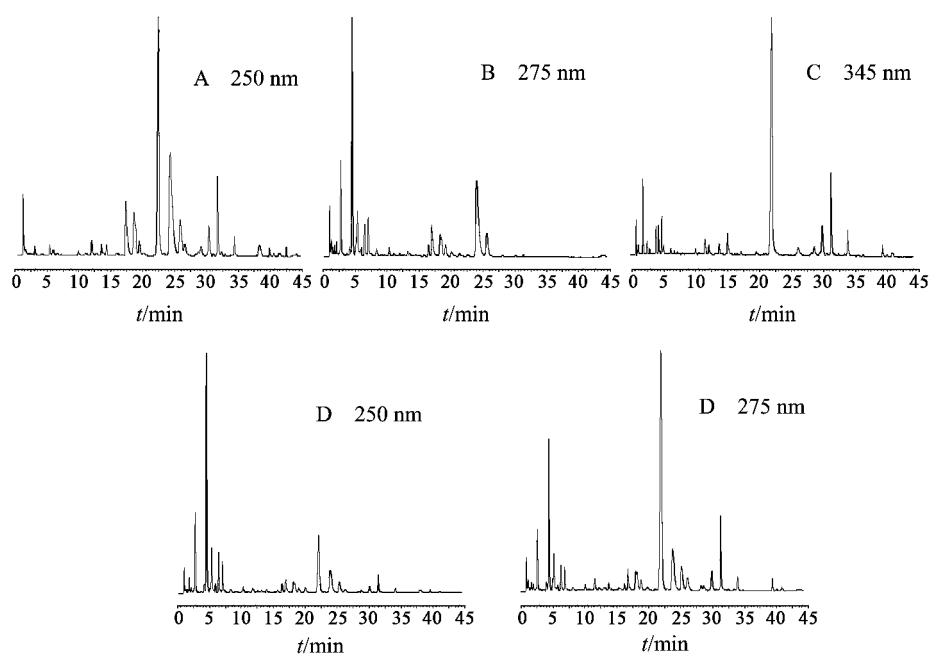
密吸取对照品溶液、供试品溶液与阴性样品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,见图 1,2,12 个成分分离良好,阴性无干扰。

2.5 线性关系考察 取 12 个对照品,分别用 50% 甲醇配制成 5 个不同质量浓度,见表 3,分别精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积,以对照品质量浓度(mg·L⁻¹)为横坐标,峰面积积分为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,标准曲线、相关系数和线性范围见表 4,12 个成分均呈良好的线性关系。



1. 葛根素; 2. 大豆苷; 3. 甘草苷; 4. 黄连碱; 5. 药根碱; 6. 黄芩苷; 7. 小檗碱; 8. 巴马汀; 9. 汉黄芩苷; 10. 黄芩素; 11. 汉黄芩素; 12. 甘草酸铵

图 1 对照品(A)及供试品(B)在 3 个检测波长下 HPLC



A. 葛根阴性; B. 黄芩阴性; C. 黄连阴性; D. 炙甘草阴性

图 2 阴性样品在 3 个检测波长下 HPLC

表 3 12 个成分线性关系考察对照品溶液浓度 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

成分	1	2	3	4	5
葛根素	0.483 6	0.967 2	4.836	48.36	483.6
大豆苷	1.814	3.628	7.256	36.28	181.4
甘草苷	3.660	7.320	14.64	36.60	54.90
黄连碱	4.770	9.540	19.08	38.16	76.32
药根碱	4.205	8.410	16.82	33.64	67.28
黄芩苷	8.888	17.776	44.44	88.88	444.4
小檗碱	7.600	38.00	95.00	190.0	380.0
巴马汀	4.850	9.700	19.40	38.80	77.60
汉黄芩苷	7.136	17.84	35.68	71.36	107.0
黄芩素	3.580	7.160	17.90	35.80	53.71
汉黄芩素	1.526	3.052	7.630	15.26	22.90
甘草酸铵	3.508	7.016	14.03	35.08	52.62

2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,重复进样 6 次,计算 12 个成分峰面积的 RSD,结果见表 5。

2.7 稳定性试验 按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别于 0 2 4 6 8 12 24 h,精密吸取 10 μL ,按 2.1 项下色谱条件测定,计算 12 个成分峰面积的 RSD,结果见表 5。

2.8 重复性试验 按 2.3 项下方法制备 6 份供试

表 4 12 个成分线性关系考察

成分	标准曲线	r	浓度范围 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
葛根素	$Y = 20\ 869.97X - 10\ 940$	0.999 9	0.483 6 ~ 483.6
大豆苷	$Y = 18\ 448.02X + 2\ 277$	0.999 9	1.814 ~ 181.4
甘草苷	$Y = 9\ 020.68X - 1\ 572$	0.999 9	3.660 ~ 54.90
黄连碱	$Y = 16\ 539.10X - 5\ 307$	0.999 9	4.770 ~ 76.32
药根碱	$Y = 17\ 988.15X - 1\ 036$	0.999 9	4.205 ~ 67.28
黄芩苷	$Y = 16\ 391.24X - 9\ 600$	0.999 9	8.888 ~ 444.4
小檗碱	$Y = 14\ 548.89X - 3\ 986$	0.999 9	7.600 ~ 380.0
巴马汀	$Y = 17\ 928.67X - 3\ 120$	0.999 9	4.850 ~ 77.60
汉黄芩苷	$Y = 19\ 448.16X - 3\ 798$	0.999 9	7.136 ~ 107.0
黄芩素	$Y = 25\ 395.13X - 24\ 538$	0.999 9	3.580 ~ 53.71
汉黄芩素	$Y = 28\ 025.75X - 4\ 919$	0.999 9	1.526 ~ 22.90
甘草酸铵	$Y = 3\ 868.89X - 579$	0.999 9	3.508 ~ 52.62

品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定 12 个成分含量,并计算 RSD,结果见表 5。

2.9 加样回收率试验 采用加样回收法(按 1:1 加入)精密量取已知含量的 6 份饮片水煎液各 5 mL,分别置 25 mL 量瓶中,精密加入适量混合对照品溶液,摇匀,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,精密吸取上述供试品溶液 10 μL ,按 2.1 项下色谱条件测

表 5 12 个成分的精密度、稳定性、重复性 RSD 和回收率试验 %

成分	精密度	稳定性	重复性	平均回收率	回收率 RSD
葛根素	0.09	0.2	0.3	99.3	0.4
大豆苷	0.6	1.7	1.1	98.6	0.8
甘草苷	1.0	1.1	1.7	97.8	2.2
黄连碱	0.2	0.9	0.4	96.2	1.1
药根碱	0.4	1.6	1.1	96.7	1.4
黄芩苷	0.05	0.1	0.4	99.3	1.0
小檗碱	0.3	0.7	0.4	98.2	1.8
巴马汀	1.0	2.0	0.9	97.3	2.1
汉黄芩苷	0.3	0.7	0.3	101.0	1.4
黄芩素	1.1	1.8	1.0	97.5	1.6
汉黄芩素	0.3	0.4	0.4	97.4	0.9
甘草酸铵	0.8	0.9	0.7	101.1	2.3

定,计算 12 个成分的平均回收率和 RSD,结果见表 5。

2.10 含量测定 取 3 批葛根、黄芩、黄连、炙甘草饮片按 2.3 项下方法制备成 3 批葛根芩连汤,再分别制备成供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定 12 个成分含量,结果见表 6。

3 讨论

葛根芩连汤中有效成分为黄酮类、生物碱类和皂苷类,最大吸收波长不一样,因此采用各成分的最大吸收波长作为检测波长。

本试验经过多次调整流动相组成、比例,最终得到使 12 个成分能够较好分离的色谱条件。在此条件下,各峰分离度良好(>1.5),理论塔板数均大于 3 000,阴性无干扰。此外,运行时间短,仅需 45 min。比现有文献^[6-12]检测成分多,效率高。

表 6 3 批葛根芩连汤水煎液中 12 个成分

mg·L⁻¹

批次	葛根素	大豆苷	甘草苷	黄连碱	药根碱	黄芩苷	小檗碱	巴马汀	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	甘草酸铵
1	344	52.3	18.16	92.4	15.84	430	326	57.9	75.6	24.9	14.93	16.58
2	343	56.3	16.76	88.8	16.74	439	339	65.5	74.6	28.9	14.76	14.06
3	350	62.0	19.32	90.4	17.28	416	348	65.9	70.4	28.7	14.92	15.36

临床患者服用中药汤剂时采用纱布过滤,滤液中存在大量沉淀物,有文献报导沉淀中含有葛根素、黄芩苷、小檗碱和甘草酸^[3-5],不能将沉淀简单抛弃,因此本试验在制备供试品时没有采用滤纸过滤,而采用 100 目筛网过滤,以贴近临床实际,考察供试品溶液制备方法时发现,加入甲醇可使沉淀溶解,因此采用水煎液甲醇稀释的制备方法,然后考察了甲醇用量和超声时间,最终确定了 2.3 项下的制备方法。该方法操作简单、专属性强、待测成分回收率高。

本试验测定了葛根芩连汤中全部 4 味药材的有效成分,能够全面的控制汤剂的质量。试验结果显示 12 个成分的重复性、稳定性良好,回收率合格。可应用于葛根芩连汤的质量控制。

[参考文献]

[1] 刘渡舟. 伤寒论语译[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 73.
 [2] 中国药典. 一部[S]. 2010: 1146.
 [3] 崔向微, 张贵君, 李慧. 葛根芩连汤中 7 种药效组分分析[J]. 天津中医药, 2008, 25(5): 417.
 [4] 谭晓梅, 吴艳萍, 吴昭晖. 葛根芩连微丸中黄芩苷和小檗碱的含量及其溶出度测定[J]. 中药材, 2006, 29(2): 195.

[5] 吕元琦, 李新民, 袁焯斌. 毛细管胶束电动色谱法快速测定葛根素和大豆甙元[J]. 化学工程师, 2005(1): 28.
 [6] 张科卫, 蔡皓, 池玉梅, 崔小兵, 等. HPLC 双波长法测定葛根芩连微丸中葛根素、黄芩苷的含量[J]. 中成药, 2005, 27(1): 46.
 [7] 罗奇志, 戴开金, 马安德, 等. 葛根芩连汤及微丸中葛根素、大豆苷元的 HPCE 分析[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(1): 11.
 [8] 朱斌. 葛根芩连微丸中小檗碱、巴马汀的含量测定[J]. 中药材, 2000, 23(10): 641.
 [9] Chen Lihong, Wang Qiang, Liu Jining. Simultaneous analysis of nine active components in Gegen Qinlian preparations by high-performance liquid chromatography with diode array detection. J. Sep. Sci. 2006, 29: 2203.
 [10] 罗佳波, 谭晓梅, 余林中, 等. 葛根芩连汤配伍规律的研究[J]. 中草药, 2005, 36(4): 512.
 [11] 陈丽红, 王强. 葛根芩连汤不同配伍对黄芩苷、小檗碱含量的影响[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(4): 147.
 [12] 曹佩雪, 梁光义, 李霞, 等. 葛根芩连汤不同配伍情况下葛根素、黄芩苷、小檗碱的含量比较[J]. 中国医药学报, 2003, 18(8): 459.

[责任编辑 蔡仲德]