

HPLC 法同时测定葛根芩连汤中 8 种有效成分的含量^{*}

张启云,徐良辉,李冰涛,汤喜兰,徐国良^{**}

(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室,南昌,330006)

摘要 目的:建立运用 HPLC 法同时测定葛根芩连汤中 8 种有效成分(葛根素、甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素)的含量。方法:采用反相高效液相色谱法测定,色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:甲酸铵(pH 3.0、10 mmol·L⁻¹)-乙腈,梯度洗脱;流速:1 mL·min⁻¹;检测波长:270、360 nm;柱温:25℃;进样量:20 μL。结果:葛根素、甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素的质量浓度分别在 1.12~22.3 μg·mL⁻¹(*r*=0.9990),1.08~21.7 μg·mL⁻¹(*r*=0.9991),4.10~82.0 μg·mL⁻¹(*r*=0.9990),1.23~24.6 μg·mL⁻¹(*r*=0.9993),1.99~39.8 μg·mL⁻¹(*r*=0.9991),4.05~81.0 μg·mL⁻¹(*r*=0.9993),2.40~48.0 μg·mL⁻¹(*r*=0.9994),1.11~22.1 μg·mL⁻¹(*r*=0.9993) 范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系。平均回收率(*n*=5)均在 95%~105% 范围内,RSD 均小于 3.0%。结论:本方法可快速简便测定葛根芩连汤中 8 个有效成分的含量。

关键词:中药;葛根芩连汤;高效液相色谱;葛根素;甘草苷;黄芩苷;汉黄芩苷;巴马汀;小檗碱;黄芩素;汉黄芩素;含量测定
中图分类号:R917 **文献标识码:**A **文章编号:**0254-1793(2011)07-1425-05

HPLC simultaneous determination of eight active components in Gegen Qinlian Decoction^{*}

ZHANG Qi-yun, XU Liang-hui, LI Bing-tao, TANG Xi-lan, XU Guo-liang^{**}

(Key Laboratory of Modern Preparation, Ministry of Education Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract Objective:To establish an HPLC method to determine eight active components in Gegen Qinlian Decoction simultaneously. **Methods:**HPLC, column: Agilent ZORBAX Eclipse SB-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase: HCOONH₃(pH 3.0, 10 mmol·L⁻¹)-CH₃CN, flow rate: 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength: 270 nm and 360 nm, temperature: 25℃, injection volume: 20 μL. **Results:**The method has a good linearity in the ranges of 1.12-22.3 μg·mL⁻¹(*r*=0.9990) for puerarin, 1.08-21.7 μg·mL⁻¹(*r*=0.9991) for liquiritin, 4.10-82.0 μg·mL⁻¹(*r*=0.9990) for baicalin, 1.23-24.6 μg·mL⁻¹(*r*=0.9993) for wogonoside, 1.99-39.8 μg·mL⁻¹(*r*=0.9991) for palmatine, 4.05-81.0 μg·mL⁻¹(*r*=0.9993) for berberine, 2.40-48.0 μg·mL⁻¹(*r*=0.9994) for baicalein, 1.11-22.1 μg·mL⁻¹(*r*=0.9993) for wogonin. The average recoveries(*n*=5) of eight active compounds were 95%-105% with RSDs of recoveries(*n*=5) were less than 3.0%. **Conclusion:**The method for determination of 8 active compounds in Gegen Qinlian Decoction, this method can be used for rapid and convenient evaluation of the quality of Gegen Qinlian Decoction.

Key words: Gegen Qinlian decoction; HPLC; puerarin; liquiritin; baicalin; wogonoside; palmatine; berberine; baicalein; wogonin; determination; traditional Chinese medicine

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。主要具有止泻、抗缺氧、解热、

抑菌和抗心律失常、降糖药理作用。临床上用于治疗急性肠炎、细菌性痢疾、肠伤寒、胃肠型感冒,慢性前列腺炎急性发作^[1]、糖尿病^[2]等疾病。该方由葛根、

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)基金资助项目(2010CB530603)

** 通讯作者: Tel: (0791) 7118657; E-mail: xuguoliang6606@126.com

黄芩、黄连、甘草四味药组成,其化学成分众多,主要生物活性成分为黄酮及黄酮苷类和生物碱类成分,如葛根素、黄芩素、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷、小檗碱、巴马汀等。文献报道葛根芩连汤及其制剂含量测定,一般测定葛根素^[3,4]的含量,或利用 HPLC 在不同条件下测定葛根芩连汤中 7 个有效成分葛根素、黄芩苷、小檗碱、巴马汀、药根碱、甘草酸、甘草苷的含量^[5],以及利用 UPLC-MS 同时检测葛根芩连片中葛根素、大豆苷元、汉黄芩苷、黄芩苷、小檗碱、巴马汀、药根碱等 8 个有效成分的含量^[6]。本实验利用 HPLC 同时检测葛根芩连汤中 8 种有效成分的含量,方法快速简便,结果准确可靠,可为控制葛根芩连汤制剂质量标准评价方法提供科学依据。

1 仪器与试药

BT225-S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司), KQ-250VDB 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), DZF-6050 真空干燥器(上海新苗医疗器械制造有限公司), RE-5205 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂), Thermo(626998) 台式高速冷冻离心机(德国), PHS-3C PH 计(上海虹益仪器仪表有限公司), XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂), Agilent1200 G1311A 液相色谱仪、Agilent1100 G1365B MWD 多波长检测器、Agilent1200 工作站(美国 Agilent 公司)。

药材葛根(批号 0911005,江西汇仁药业有限公司,广西产)、甘草(批号 0912002,亳州市中信中药饮片厂,内蒙产)、黄芩(批号 1003001,亳州中信中药饮片厂,河北产)、黄连(批号 1001001,江西樟树天齐堂中药饮片有限公司,四川产)。对照品葛根素(批号 1111-081021)、黄芩素(批号 1150-080815)、盐酸小檗碱(批号 1370-090701)、甘草苷(批号 1105-090913)、汉黄芩素(批号 1120-080810)、汉黄芩苷(批号 1119-081114),均购自中药固体制剂制造技术国家工程研究中心;黄芩苷(110715-200514)购自中国药品生物制品检定所;巴马汀(批号 z120090817bmt)购自南京泽朗医药科技有限公司。甲醇、乙腈均为色谱纯,二甲基亚砜、甲酸、甲酸铵均为分析纯,三重蒸馏水(实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 葛根芩连汤供试品的制备 参考文献^[7],制备葛根芩连汤供试品,按《伤寒论》处方组成与比例,分别称取葛根 250 g,甘草 100 g(炙),黄芩 150 g,黄连 150 g。各用 500 mL 蒸馏水浸泡 60 min,先将葛根用 4500 mL 水沸腾煎煮 30 min,再加入其它

诸味药材及浸泡液沸腾煎煮 60 min,趁热用纱布滤过;残渣加 5000 mL 水,再煎煮 60 min,趁热用纱布滤过;合并两次滤液,用减压旋转蒸发仪在 55-65 °C 浓缩,冷却至室温,加水至总体积为 1000 mL,即制备得每毫升含 0.65 g 生药的葛根芩连汤。精密吸取 1.0 mL 汤液于 50 mL 容量瓶,加入 40 mL 甲醇,25 °C 超声(功率 250 W,频率 28、45 kHz 切换,各 35 秒) 20 min,放冷,补足甲醇至刻度线。取适量按 0.5 倍稀释后,过 0.22 μm 滤膜,得供试品溶液。

2.2 阴性样品的制备 按处方比例制备分别不含葛根、甘草、黄芩、黄连的阴性样品及同时不含 4 味中药的阴性样品,按“2.1”项下方法操作,即得。

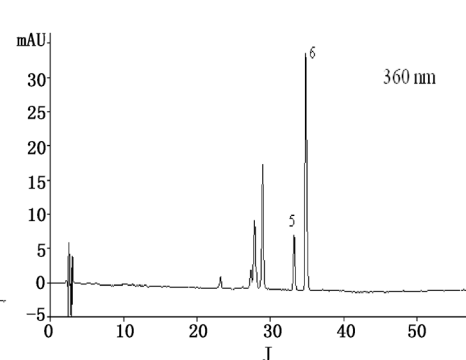
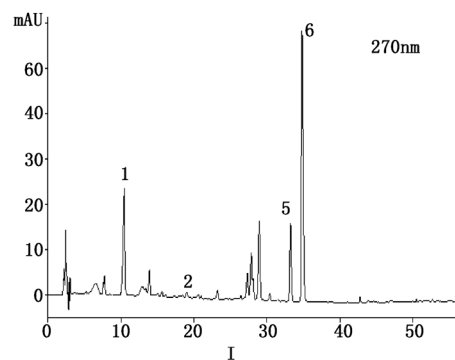
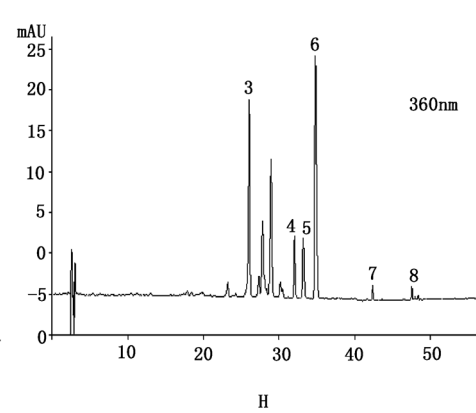
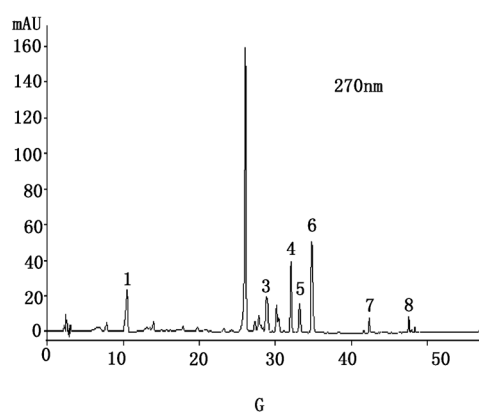
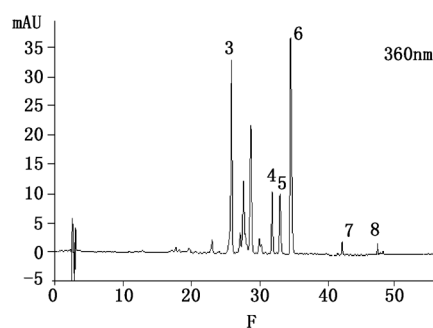
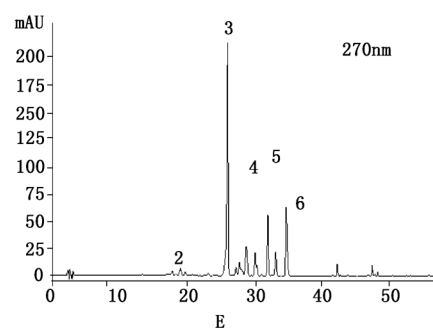
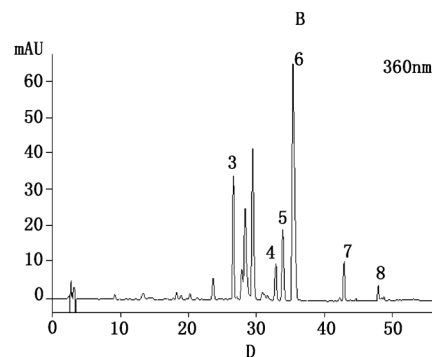
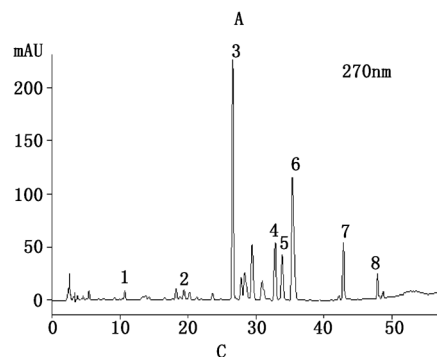
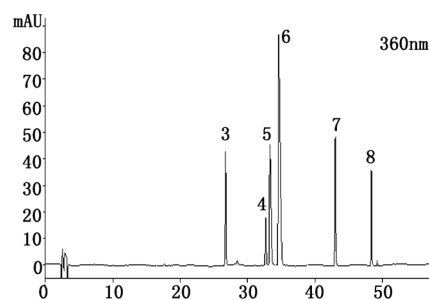
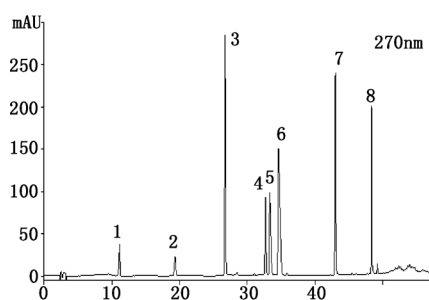
2.3 对照母液的配制 精密称取各对照品葛根素 4.47 mg、黄芩苷 4.10 mg、黄芩素 4.08 mg、甘草苷 4.35 mg、汉黄芩素 4.43 mg、盐酸小檗碱 4.05 mg、巴马汀 3.98 mg 分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解;另称取汉黄芩苷 4.10 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入 4 滴二甲基亚砜及甲醇溶解,分别用甲醇定容至刻度,配制成各对照品母液。

2.4 混合对照品标准溶液的配制 精密移取各对照品母液适量于 10 mL 量瓶,加甲醇定容至刻度,配制成混合对照品储备液,其中含有葛根素 22.35 μg·mL⁻¹、黄芩苷 82.00 μg·mL⁻¹、黄芩素 40.80 μg·mL⁻¹、甘草苷 21.75 μg·mL⁻¹、汉黄芩素 22.15 μg·mL⁻¹、汉黄芩苷 24.60 μg·mL⁻¹、盐酸小檗碱 81.00 μg·mL⁻¹、巴马汀 39.80 μg·mL⁻¹。

2.5 色谱条件与方法学考察

2.5.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵(用甲酸调 pH 3.0) (A)—乙腈(B), 梯度洗脱 时间 *t*: 0~7 min, B: 10→15% (体积分数,下同); *t*: 0~7 min, B: 10→15%; *t*: 7~17 min, B: 15→20%; *t*: 17~22 min, B: 20→25%; *t*: 22~37 min, B: 25→33%; *t*: 37~50 min, B: 33→70%; *t*: 50~55 min, B: 70→85%; 流速: 1 mL·min⁻¹, 检测波长: 270, 360 nm, 柱温: 25 °C, 进样量: 20 μL。

2.5.2 专属性考察 按“3.1”项下的色谱条件,分别取混合对照品稀释液、葛根芩连汤供试品及不含任何药材的阴性对照品各 20 μL 进样。结果葛根素、甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素各被测定成分的保留时间分别为 10.7, 18.8, 26.1, 32.2, 33.4, 34.8, 42.4, 47.7 min; 与杂质皆能达到基线分离(*R*≥1.5); 理论塔板数均不低于 20000。表明各被测成分的测定无干扰。见图 1。



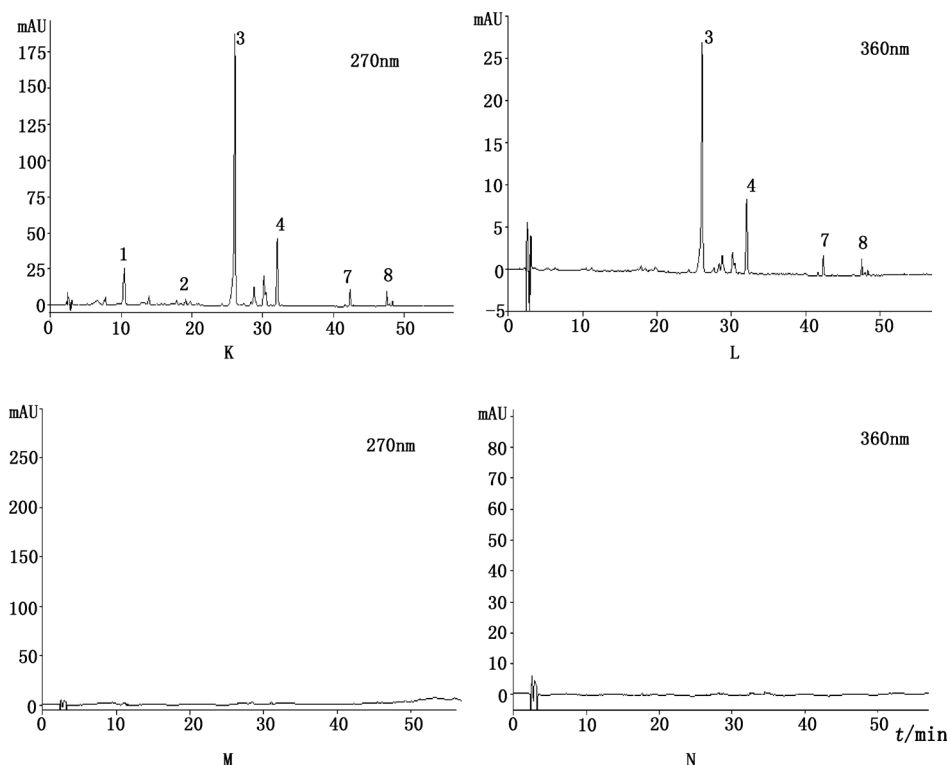


图1 对照品、样品及阴性样品分别在 270,360nm 处色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference of standards, sample and negative samples at 270, 360 nm, respectively

A, B. 混合对照品(refence of standards) C, D. 样品(sample) E, F. 缺葛根阴性样品(negative sample without Radix Puerariae) G, H. 缺甘草阴性样品(negative sample without Radix Glycythizae) I, J. 缺黄芩阴性样品(negative sample without Radix Scutellariae) K, L. 缺黄连阴性样品(negative sample without Rhizoma Coptidis) M, N. 缺葛根、甘草、黄芩、黄连阴性样品(negative sample without Radix Puerariae, Radix Glycythizae, Radix Scutellariae, Rhizoma Coptidis)

1. 葛根素(puerarin) 2. 甘草苷(liquiritin) 3. 黄芩苷(baicalin) 4. 汉黄芩苷(wogonoside) 5. 巴马汀(palmatine) 6. 小檗碱(berberine) 7. 黄芩素(baicalein) 8. 汉黄芩素(wogonin)

2.5.3 回归方程及线性范围 取适量混合对照品储备液,按 1,0.8,0.6,0.4,0.2,0.1,0.05 倍比例稀释成不同浓度的一系列混合对照品溶液,取 20 μ L 进样。以峰面积积分值(Y) 对相应的混合标准溶液浓度(X) 进行回归,得到各对照品的回归方程及线性范围,各对照品在相应线性范围内线性关系良好,见表 1。

表 1 各对照品的回归方程及线性范围

Tab 1 The regression equations and linear ranges of the reference substances

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (μ g $\cdot$ mL $^{-1}$) (linear range)
葛根素(puerarin)	$Y = 28.797X + 2.8173$ ($R^2 = 0.9990$)	1.12 ~ 22.3
甘草苷(liquiritin)	$Y = 25.015X + 9.3970$ ($R^2 = 0.9991$)	1.08 ~ 21.7
黄芩苷(baicalin)	$Y = 45.451X + 23.499$ ($R^2 = 0.9990$)	4.10 ~ 82.0
汉黄芩苷(wogonoside)	$Y = 54.395X + 32.196$ ($R^2 = 0.9993$)	1.23 ~ 24.6
巴马汀(palmatine)	$Y = 58.950X + 59.930$ ($R^2 = 0.9991$)	1.99 ~ 39.8
小檗碱(berberine)	$Y = 54.867X - 20.791$ ($R^2 = 0.9993$)	4.05 ~ 81.0
黄芩素(baicalein)	$Y = 12.899X - 8.7470$ ($R^2 = 0.9994$)	2.40 ~ 48.0
汉黄芩素(wogonin)	$Y = 85.300X + 118.69$ ($R^2 = 0.9993$)	1.11 ~ 22.1

2.5.4 精密度试验 按“2.1”项下制备葛根芩连汤供试品溶液 1 份,以“3.1”项下的色谱条件,取 20 μ L 连续进样 5 次,测定葛根素、甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素色谱峰峰面积,计算各被测成分峰面积 RSD($n = 5$) 值分别为 2.8%,2.2%,2.2%,0.8%,1.9%,1.9%,1.1%,2.6%,表明精密度良好。

2.5.5 稳定性试验 按“2.1”项下制备葛根芩连汤供试品溶液 1 份,以“3.1”项下的色谱条件,分别在 0,6,12,24,48 h 时间点取 20 μ L 进样,测定葛根素、甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素色谱峰峰面积,计算各被测成分峰面积 RSD($n = 5$) 值分别为 2.4%,1.9%,2.6%,1.7%,2.4%,2.4%,2.2%,2.0%,结果表明各被测成分在 0 ~ 48 h 稳定性良好。

2.5.6 重现性试验 按“2.1”项下制备同一批葛根芩连汤供试品溶液 5 份,以“3.1”项下的色谱条

件,分别进样 20 μL ,计算葛根素、甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素在供试品中的浓度分别为 4.63 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (RSD = 2.9%), 6.79 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (RSD = 2.7%), 73.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (RSD = 1.7%), 18.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (RSD = 1.7%), 13.1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (RSD = 2.7%), 50.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (RSD = 2.4%), 13.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (RSD = 1.9%), 2.36 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (RSD = 2.7%), 结果表明各被测成分重现性良好。

2.5.7 加样回收试验 精密吸取“2.3.6”项下制备的 5 份已知浓度的供试品溶液适量,加入等体积混合对照品(含葛根素 4.47 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、甘草苷 6.53 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、黄芩苷 82.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、汉黄芩苷 16.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、巴马汀 13.3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、小檗碱 48.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、黄芩素 12.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、汉黄芩素 2.22 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),涡旋 1min 混合均匀,取 20 μL ,以“3.1”项下的色谱条件进样,计算葛根素、甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、汉黄芩素的平均加样回收率及 RSD 值,分别为 102.3% (RSD = 1.8%), 103.2% (RSD = 1.8%), 101.4% (RSD = 2.8%), 98.1% (RSD = 1.5%), 102.9% (RSD = 2.5%), 101.9% (RSD = 2.5%), 98.9% (RSD = 2.8%), 101.4% (RSD = 2.6%), 结果表明各被测成分加样回收率良好。

2.5.8 样品含量测定 按“2.1”项下,煎煮 3 批葛根芩连汤,每批按供试品的制备方法制备 3 份,各取 20 μL 进样检测,并计算各批次制备的每毫升汤剂中 8 种有效成分的质量占 0.65 g 生药(相当于每毫升汤剂)的质量比含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),结果见表 2。

表 2 葛根芩连汤剂中各成分的质量比含量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab 2 The content of each component in

Gegenqinlian decoction

成分(component)	批次 1 (lot No. 1)	批次 2 (lot No. 2)	批次 3 (lot No. 3)
葛根素(puerarin)	0.668	0.697	0.726
甘草苷(liquiritin)	1.02	1.08	1.07
黄芩苷(baicalin)	11.3	11.9	11.1
汉黄芩苷(wogonoside)	2.93	3.02	2.89
巴马汀(palmatine)	1.99	2.14	2.02
小檗碱(berberine)	7.85	8.24	7.65
黄芩素(baicalin)	2.13	2.36	2.31
汉黄芩素(wogonin)	0.386	0.322	0.287

3 讨论

3.1 葛根芩连汤的制备 按传统剂量配伍提取,浓缩葛根芩连汤,由于黄酮及其苷类与生物碱类物质形成络合物^[1]成粘稠混悬液,取样前充分涡旋,以便取样均匀。

3.2 流动相选择 高效液相色谱测定葛根芩连汤中有效成分的含量,选择 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵并用甲酸调 pH 3.0 与乙腈组成流动相在一定的梯度洗脱条件下分离,黄酮及其苷类和生物碱类成分均能达到很好分离。

3.3 检测波长选择 文献报道^[8],270 nm 波长下检测的色谱峰高低比例比较均匀、基线平稳,因此确定 270 nm 为主要检测波长,并以 360 nm 为辅助检测波长。本实验结果表明 270 nm 波长下除黄芩素外各物质分离良好,含量均在此波长下测定,而黄芩素在 360 nm 下分离较好,其含量在此波长下测得。

3.4 小结 本实验采用 HPLC 同时测定复方葛根芩连汤中 8 种有效成分的含量,方法简便,结果准确可靠,可为控制葛根芩连汤制剂质量标准评价方法提供科学依据。

参考文献

- XU Cun-zhi(徐存志). Treatment of the acute episode of chronic prostatitis with Gegen Qinlian decoction(葛根芩连汤治疗慢性前列腺炎急性发作). *China Naturopathy* (中国民间疗法), 1998, (1): 42
- WANG Fen(王芬), HE Hua-liang(何华亮). The Zhang Fa rong's experiences of using Gegen Qinlian decoction to cure diabetes(张发荣运用葛根芩连汤治疗糖尿病经验). *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2005, 46(2): 103
- ChP(中国药典). 2005. Vol I (一部): 626
- LUO Qi-zhi(罗奇志), DAI Kai-jin(戴开金), MA An-de(马安德), et al. Analysis of puerarin and Daidzein in Gegen Qinlian Preparations by high performance capillary electrophoresis(葛根芩连汤及微丸中葛根素、大豆苷元的 HPCE 分析). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2004, 24(1): 11
- CUI Xiang-wei(崔向微), ZHANG Gui-jun(张贵君), LI Hui(李慧). Analysis of seven drug active compositions in puerariae decoction(葛根芩连汤中 7 种药效组分分析). *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2008, 25(5): 417
- An R, Wang Y, You LS, et al. UPLC-MS Analysis for simultaneous determination of eight components in the “Ge-Gen-Qin-Lian” Tablets. *Chromatographia*, 2009, 69: 969
- TAN Xiao-mei(谭晓梅), YAN Yan(闫琰), LUO Jia-bo(罗加波), et al. Investigation of the osajin components' finger printing in the supernatant solution and precipitation of Gegen Qinlian decoction (葛根芩连汤上清液与沉淀中异黄酮类成分指纹图谱的研究). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2007, 18(2): 321
- DENG Yuan-xiong(邓远雄), LIU Li(刘李), YU Sen(俞森), et al. Simultaneous determination of geniposide and 4 flavonoids in the traditional Chinese medicinal preparation Huanglian Jiedu decoction by HPLC with programmed wavelength UV detection (HPLC 程序波长法同时测定黄连解毒汤中梔子苷和 4 种黄酮类成分的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 28(2): 182

(本文于 2010 年 7 月 21 日收到)