

HPLC 同时测定白虎汤中 4 种有效成分的含量

李春来, 李伟东, 吴育, 蔡宝昌*

(南京中医药大学 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 国家科技部
中药饮片标准化研究平台, 国家中医药管理局中药炮制标准重点实验室, 江苏省中药
炮制重点实验室, 江苏省中药质量控制工程技术研究中心, 南京 210029)

〔摘要〕 目的:建立白虎汤中 4 种有效成分含量的同时测定方法。方法:利用 HPLC 同时测定白虎汤中新芒果苷、芒果苷、甘草苷和甘草酸铵的含量,Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为乙腈-25 mmol·L⁻¹的 KH₂PO₄ 溶液,梯度洗脱,检测波长为 256 nm,柱温 25 ℃,流速 1 mL·min⁻¹。结果:新芒果苷、芒果苷、甘草苷和甘草酸铵的线性范围分别为 0.15~3.00 μg(*r*=0.999 9),0.10~2.00 μg(*r*=0.999 9),0.04~0.80 μg(*r*=0.999 9),0.04~0.80 μg(*r*=0.999 9),平均加样回收率在 95.0%~104.5%。结论:该方法方便、稳定、可靠,适用于白虎汤的质量控制。

〔关键词〕 白虎汤; 含量测定; 高效液相色谱

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)12-0078-03

Simultaneous Determination of Four Active Components in Baihu Decoction by HPLC

LI Chun-lai, LI Wei-dong, WU Yu, CAI Bao-chang*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Platform of State Ministry of Science and Technology for Standardization of Traditional Chinese Medicine (TCM) Yin Pian, Key Laboratory of State Administration of TCM for Standardization of Chinese Medicine Processing, Jiangsu Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Jiangsu Provincial Research Center for Chinese Medicine Quality Control, Nanjing 210029, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To establish the method for simultaneous determination of four active components in Baihu Decoction. **Method:** Simultaneous determination of neomangiferin, mangiferin, liquiritin and ammonium glycyrrhizinate in Baihu Decoction by HPLC. An Alltima C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was used, the mobile phase was acetonitrile and 25 mmol·L⁻¹ of KH₂PO₄ solution in gradient elution, the detection wavelength was set at 256 nm, the column temperature was kept at 25 ℃ and the flow rate was 1 mL·min⁻¹. **Result:** The linear range of neomangiferin, mangiferin, liquiritin and ammonium glycyrrhizinate was 0.15-3.00 μg (*r* = 0.999 9), 0.10-2.00 μg (*r*=0.999 9), 0.04-0.80 μg (*r*=0.999 9), 0.04-0.80 μg (*r*=0.999 9) separately. The average recovery was between 95.0%-104.5% for four ingredients. **Conclusion:** The method is convenient, stable, reliable and suitable for quality control of Baihu decoction.

〔Key words〕 Baihu decoction; determination; HPLC

白虎汤方出自汉代张仲景的《伤寒论》,原方组 成为知母六两,石膏一斤碎(棉裹),甘草二两(炙),

〔收稿日期〕 20111019(019)
〔基金项目〕 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201007010)
〔第一作者〕 李春来,硕士研究生,从事中药炮制及质量标准研究,Tel: 025-86798281, E-mail: lchl111@ yahoo. com. cn
〔通讯作者〕 * 蔡宝昌,教授,博士生导师,Tel: 025-85811112 ,E-mail: becai@ 126. com

粳米六合。用法用量右四味,以水一斗,煮米熟汤成,去滓,温服一升,日三服。功能主治清热生津,主治阳明气分热盛证,症见壮热、面赤、大汗出,脉洪大。现代临床常用于治疗高热、流行性出血热、肺炎、病毒性脑炎等症^[1]。有文献报道^[2-3]采用高效液相法测定白虎汤中的一个或者两个成分的含量。也有学者采用超高效液相色谱法研究不同配伍对白虎汤中某一种成分的影响^[4-5],采用 ICP-AES 法研究不同配伍条件下白虎汤中主要成分钙离子的溶出规律^[6]。本文采用高效液相法对白虎汤中 4 个有效成分进行同时含量测定,为白虎汤的质量控制和相关研究进一步提供依据。

1 材料

1.1 药物 石膏(批号 110220)、知母(批号 110214)、炙甘草(批号 110304)均购自南京海源中药饮片有限公司,经南京中医药大学陈建伟教授鉴定均为正品,符合 2010 年版一部《中国药典》规定,粳米为市售双兔牌粳米。

1.2 样品制备 根据古今单位换算^[7]和原文得煎煮工艺,分别称取生石膏 222 g(打碎,纱布包煎),知母 82.5 g,炙甘草 27.5 g 投入砂锅中,加水 1 000 mL,浸泡 30 min,再加水 1 000 mL,加粳米约 105 g,调整适当火力至武火,加热至爆沸,文火加热至煮米熟,中间适当搅拌,四层纱布(用前润湿)趁热过滤至 2 000 mL 烧杯中,浓缩至 600 mL。

1.3 仪器 岛津 2010A 型高效液相色谱仪(包括四元泵,DAD 检测器,柱温箱,自动进样器,工作站),KQ2200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Mettler AG285 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多集团),Anke TGL80-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.4 试药 新芒果苷对照品(批号 110120),芒果苷对照品(批号 101209),甘草苷对照品(批号 101116),甘草酸铵对照品(批号 100927),所用对照品均购自上海融禾医药科技发展有限公司,纯度均 < 98%;甲醇和乙腈均为色谱纯,液相用水为娃哈哈纯净水,KH₂PO₄ 为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性 色谱柱为 Alltima C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温 25 ℃,流动相 A 乙腈-B 25 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄,梯度洗脱(0~10 min,15% A;10~12 min,15%~20% A;12~22 min,20% A;22~24 min,20%~25% A;24~34 min,25% A;34~48 min,25%~49% A),流速 1 mL·min⁻¹,检

测波长 256 nm,进样量 10 μL,采样时间 48 min,理论塔板数按新芒果苷计算不低于 5 000。

2.2 对照品溶液的制备 用甲醇配制供定量用的含 4 个对照品的混合对照品母液(g·L⁻¹),新芒果苷(0.75 g·L⁻¹)、芒果苷(0.5 g·L⁻¹)、甘草酸(0.2 g·L⁻¹)、甘草酸铵(0.2 g·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 精密量取药液 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇至近刻度处,超声 10 min,取出放冷,甲醇定容至刻度,振摇,取适量至 1.5 mL 离心管中,4 000 r·min⁻¹,离心 10 min,取上清液,过 0.45 μm 膜,即得。

2.4 线性关系考察 将含 4 个对照品的混合对照品母液稀释为 6 个梯度浓度。其中,新芒果苷质量浓度为 300,225,150,75,30,15 mg·L⁻¹;芒果苷质量浓度为 200,150,100,50,20,10 mg·L⁻¹;甘草苷质量浓度为 80,60,40,20,8,4 mg·L⁻¹;甘草酸铵质量浓度为 80,60,40,20,8,4 mg·L⁻¹。每个梯度质量浓度进样 10 μL,以进样量 X(μg)为横坐标,对照品峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线。建立色谱峰面积对进样量的回归方程(表 1),结果表明,各成分在检测的浓度范围内线性关系良好。

表 1 4 种成分的线性关系表

标准品	标准曲线	r	线性范围/μg
新芒果苷	Y=3 000 000X+6 320.1	0.999 9	0.15~3.00
芒果苷	Y=5 000 000X+4 983.4	0.999 9	0.10~2.00
甘草苷	Y=685 142X-1 096.0	0.999 9	0.04~0.80
甘草酸铵	Y=554 273X-1 011.2	0.999 9	0.04~0.80

2.5 精密度考察 精密吸取对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,记录峰面积。结果新芒果苷,芒果苷,甘草苷和甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.50%,0.40%,0.55%,0.50%,表明仪器精密度好。

2.6 重复性考察 取样品 6 份,分别按样品处理方法进行处理并进样,记录峰面积,计算含量。结果新芒果苷,芒果苷,甘草苷和甘草酸铵平均含量分别为 64.39,47.46,14.71,19.43 mg·L⁻¹;RSD 分别为 1.1%,1.6%,1.3%,1.9%,2.4%,1.7%。表明重复性良好。

2.7 稳定性考察 取同一样品,分别于 0,3,6,9,12 h 进样测定。结果新芒果苷,芒果苷,甘草苷和甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.47%,1.47%,2.00%,0.89%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取已制备的样品 6 份,每份 0.5 mL,精密加入混合对照品溶液各 0.5 mL,按照

2.3 项下方法制得供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,测得各成分的量,计算各成分的加样回收率和 RSD,结果见表 2~5。

表 2 新芒果苷的加样回收率试验 (n = 6)

No.	样品中 含量/ μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	21.32	25.00	46.55	100.92	100.08	1.99
2	21.87	25.00	46.46	98.36		
3	20.81	25.00	45.48	98.68		
4	20.69	25.00	45.93	100.96		
5	21.43	25.00	47.25	103.28		
6	21.21	25.00	45.78	98.28		

表 3 芒果苷的加样回收率试验 (n = 6)

No.	样品中 含量/ μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	42.37	50.00	93.15	101.56	100.89	1.38
2	42.54	50.00	93.87	102.66		
3	41.38	50.00	91.85	100.94		
4	42.65	50.00	92.25	99.20		
5	41.69	50.00	91.33	99.28		
6	42.73	50.00	93.58	101.70		

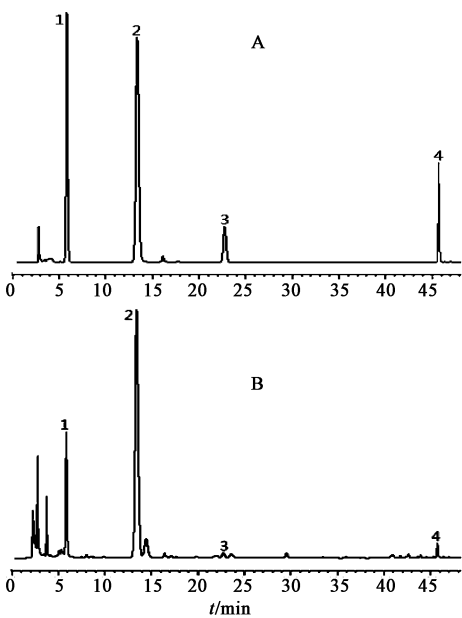
表 4 甘草苷的加样回收率试验 (n = 6)

No.	样品中 含量/ μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	4.32	5.00	9.27	99.00	100.80	2.83
2	4.67	5.00	9.68	100.20		
3	4.25	5.00	9.18	98.60		
4	4.80	5.00	10.12	106.40		
5	4.96	5.00	9.95	99.80		
6	4.13	5.00	9.17	100.80		

表 5 甘草酸铵的加样回收率试验 (n = 6)

No.	样品中 含量/ μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	9.40	10.00	19.32	99.20	100.83	1.81
2	9.77	10.00	19.97	102.00		
3	9.21	10.00	19.54	103.30		
4	9.83	10.00	19.73	99.00		
5	9.43	10.00	19.38	99.50		
6	9.55	10.00	19.75	102.00		

2.9 样品测定 混合对照品溶液和供试品溶液各取 10 μL ,分别注入液相色谱仪,测得样品中新芒果苷 41.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,芒果苷 84.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,甘草苷 8.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,甘草酸铵 18.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,见图 1。



A. 混合对照品;B. 样品; 1. 新芒果苷;
2. 芒果苷;3. 甘草苷;4. 甘草酸铵

图 1 混合标准品和样品 HPLC 图谱

3 讨论

考察不同的测定波长,256,278 nm 较为理想,在 278 nm 时虽然甘草苷的吸收很好,但甘草酸铵的峰低很多,而 256 nm 波长处,甘草苷和甘草酸铵的峰面积近似,故选择 256 nm 为测定波长;考察醋酸和不同浓度的磷酸流动相系统,峰 2 的分离效果都不好,最终选用的 KH_2PO_4 盐溶液分离效果较好。

[参考文献]

[1] 张保国,程铁锋,刘庆芳. 白虎汤药效及现代临床研究[J]. 中成药, 2009, 31(8):1272.
[2] 陈卫卫,邓超澄,冯看,等. 正交试验优选白虎汤的提取工艺[J]. 中药材, 2007, 30(5): 611.
[3] 王娅,冯芳,孙丽丽. 白虎汤配伍谱效关系研究[J]. 药学与临床研究, 2010, 18(3): 226.
[4] 卢林,吴君金,马强,等. UPLC 研究白虎汤不同配伍对芒果苷含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9):35.
[5] 吴君金,卢林,马强,等. UPLC 研究不同配伍对白虎汤中甘草酸含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12):21.
[6] 马强,苏琨,盛振华,等. ICP-AES 法研究不同配伍条件下白虎汤中钙离子溶出规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):86.
[7] 王竹兰,肖相如.《伤寒论》汤剂煎煮法与汤剂制备规范化研究[D]. 北京:北京中医药大学,2010.

[责任编辑 顾雪竹]