

HPLC 同时测定葛根芩连微丸中葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱的含量

宋亚芳¹, 苏春梅¹, 杨红^{1*}, 谭桂莲¹, 毛娜², 龚慕辛³

(1. 首都医科大学燕京医学院, 北京 101300; 2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102;
3. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的:建立同时测定葛根芩连微丸中葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱含量的方法。方法:采用 RP-HPLC 方法,色谱柱为 Kromasil-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相选用甲醇-磷酸盐缓冲液系统,梯度系统,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 275 nm。结果:4 个成分的方法学考察均合格,阴性供试品无干扰。结论:该方法方便、准确、专属性强,可作为葛根芩连微丸质量控制的进一步补充。

[关键词] 葛根芩连微丸; 葛根素; 甘草苷; 黄芩苷; 盐酸小檗碱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0064-04

Simultaneous Determination of Puerarin, Liquiritin, Baicalin and Berberine Hydrochloride in Gegenqinlian Micropills by RP-HPLC

SONG Ya-fang¹, SU Chun-mei¹, YANG Hong^{1*}, TAN Gui-lian¹, MAO Na², GONG Mu-xin³

(1. Yan Jing Medical College, Capital Medical University, Beijing 101300, China;
2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;
3. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneous determination of puerarin, liquiritin, baicalin and berberine hydrochloride in Gegenqinlian Micropills. **Method:** RP-HPLC was applied on a Kromasil-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with methanol-phosphate buffer as mobile phase by gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 275 nm. **Result:** The methodology of 4 components met the requirements with no interference of negatives. **Conclusion:** The method established is easy, accurate with high specificity, which can provide the base for the quality control of Gegenqinlian Micropills.

[Key words] Gegenqinlian Micropills; puerarin; liquiritin; baicalin; berberine hydrochloride

葛根芩连微丸具有解肌透表,清热解毒利湿止泻,用于湿热蕴结所致的泄泻腹痛、便黄而黏、肛门灼热及风热感冒所致的发热恶风、头痛身疼^[1]。在现代医疗体系中,此方剂被赋予了很多新的适应病

症,其中治疗糖尿病及其并发症的临床作用^[2]最有价值,方中各药味降糖作用的有效成分,葛根为葛根素,黄连为小檗碱,黄芩为黄芩苷,甘草主要为甘草苷,2010 年版《中国药典》该方制剂项下只测定了葛根素的含量。本研究建立了采用反相高效液相色谱法同时测定上述 4 种成分含量的分析方法,可为该传统方降糖作用的药效学检测提供参考。

1 试药与仪器

1.1 仪器 岛津 LC-20AT 高效液相色谱系统, AE240 电子分析天平 (METTLER), KQ-100 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司, 100 W, 40 kHz)。

[收稿日期] 20120511(339)
[基金项目] 首都医科大学燕京医学院 2011 年度科研启动基金项目(11QD010)
[第一作者] 宋亚芳, 硕士, 从事分析化学研究, Tel: 15810037453, E-mail: songyafang883@126.com
[通讯作者] * 杨红, 副教授, 从事药物分析研究, Tel: 010-69424558, E-mail: yh_7108@126.com

1.2 试药 甲醇为 HPLC 级 (Fisher 公司),水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。葛根芩连微丸为市售品 (广西花红药业)。对照品:葛根素 (批号 110752-2010)、甘草苷 (批号 111610-201005)、黄芩苷 (批号 110715-201015)、盐酸小檗碱 (批号 110713-201010),均购于中国药品生物制品检定所,供含量测定用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 (A) 甲醇-(B) 磷酸盐缓冲液 [0.05 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液和 0.05 mol · L⁻¹ 庚烷磺酸钠溶液 (1:1)], 梯度洗脱 (0 ~ 15 min, 30 ~ 35% A; 15 ~ 20 min, 35 ~ 45% A; 20 ~ 30 min, 45 ~ 50% A; 30 ~ 40 min, 50 ~ 62% A)。流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 275 nm, 理论塔板数按葛根素色谱峰计应不低于 3 000。见图 1。

2.2 样品的制备

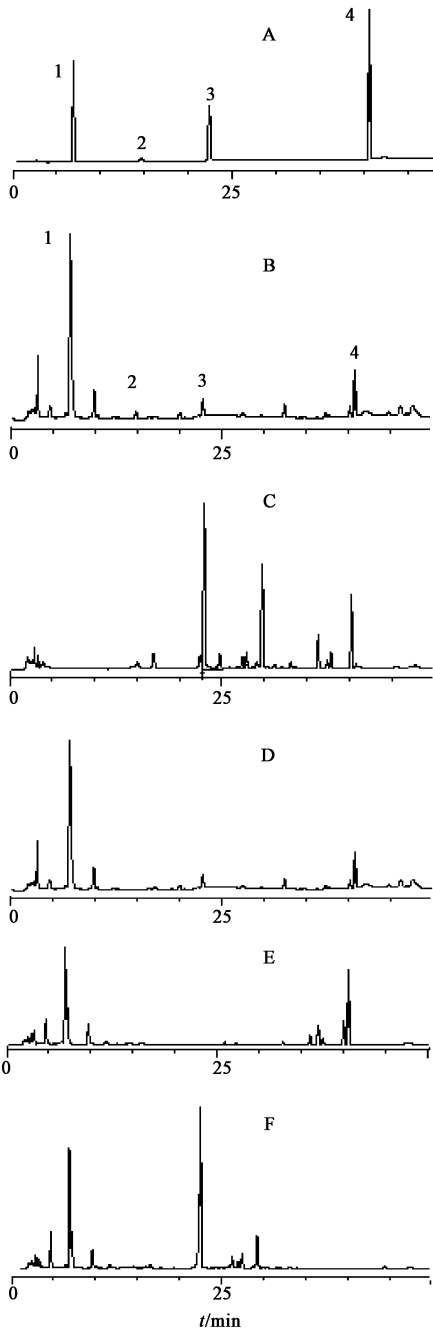
2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱对照品适量, 分别用甲醇稀释成 78.0, 0.53, 3.64, 5.30 g · L⁻¹ 的溶液, 保存于 4 °C 冰箱中, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取葛根芩连微丸 20 粒, 研细, 过 40 目筛, 取约 0.2 g, 精密称定, 置 250 mL 锥形瓶中, 精密加入 100 mL 50% 乙醇溶液, 称定质量, 浸泡 30 min 后超声提取 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 弃去初滤液, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.3 专属性试验 按葛根芩连微丸的制备工艺, 分别制备缺葛根、黄芩、黄连、炙甘草的阴性样品, 按 2.2.2 项下方法分别制备上述阴性样品的供试品溶液。按确定的色谱条件, 分别进样, 记录色谱图, 结果表明阴性供试品无干扰。见图 1。

2.4 线性关系考察 取 2.2.1 项下的对照品溶液等倍稀释 5 次, 分别精密吸取稀释后的对照品溶液各 6 μL, 按上述色谱条件分别进样, 测定葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱的峰面积, 以各成分峰面积为纵坐标, 进样量 (μg) 为横坐标进行线性回归, 见表 1。

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品 (批号 20101026) 溶液, 连续进样 6 次, 测定葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱的峰面积。结果供试品溶液中上述 4 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.26%, 1.29%, 0.72%, 0.51%, 表明仪器的精密度良好。



A. 对照品; B. 供试品; C ~ F. 阴性供试品 (分别为葛根、甘草、黄芩、黄连) 1. 葛根素; 2. 甘草苷; 3. 黄芩苷; 4. 盐酸小檗碱

图 1 HPLC 图谱

2.6 稳定性试验 取葛根芩连微丸 (批号 20101026), 研细, 取约 0.2 g, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 记录峰面积, 葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱的 RSD 分别为 0.85%, 1.2%, 0.62%, 0.53%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取葛根芩连微丸 (批号 20101026), 研细, 取约 0.2 g, 按 2.2.2 项下方法制

表 1 线性关系考察

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
葛根素	$Y = 47\,347.89X + 77\,881.93$	0.999 8	14.6 ~ 468
甘草苷	$Y = 199\,090.18X + 2\,343.01$	0.999 8	0.099 4 ~ 3.18
黄芩苷	$Y = 370\,797.01X + 25\,613.29$	0.999 7	0.683 ~ 21.8
盐酸小檗碱	$Y = 536\,257.61X - 288\,383.68$	0.999 6	0.994 ~ 31.8

备供试品溶液,平行 6 份,分别进样测定。结果葛根
芩连微丸中,葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱的
含量分别为 5.21,0.015 1,0.183,0.196 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,
RSD 分别为 0.91% ,1.06% ,0.59% ,0.46% ,表明
该方法的重复性良好。

2.8 加样回收试验 取浓度为 0.620 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葛根
素、0.002 2 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘草苷、0.015 0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芩
苷、0.017 0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸小檗碱对照品溶液各 1
mL,分别置 250 mL 锥形瓶中,蒸干;分别加入已知
含量的葛根芩连微丸(批号 20081201)约 0.1 g,精
密称定,照 **2.2.2** 项下方法制备供试品溶液,平行 6
份,按确定的色谱条件分别进样,测定葛根素、甘草
苷、黄芩苷、盐酸小檗碱的含量,计算加样回收率及
RSD。见表 2。

2.7 样品测定 取 3 批葛根芩连微丸,按 **2.2.2** 项
下方法制成供试品溶液,按照上述色谱条件进样,测

定结果见表 3。

表 3 葛根芩连微丸中 ■■含量测定 ($n = 10$) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

批号	葛根素	甘草苷	黄芩苷	盐酸小檗碱
20081201	5.2	0.014	0.17	0.18
20090521	5.4	0.014	0.20	0.18
20090916	5.2	0.017	0.18	0.20

3 讨论

3.1 提取条件的选择 用超声提取考察不同浓度
的甲醇、乙醇提取效率,结果 50% 乙醇提取效率最
高^[3];又以 50% 乙醇作为提取溶剂比较了回流与超
声两种提取方法,发现回流与超声提取效率差别不
大,由于超声提取方便,所以选择超声提取。

3.2 RP-HPLC 条件的建立 分别以甲醇-水-磷酸
系统、甲醇-水-冰醋酸及甲醇-磷酸盐缓冲液系统为
流动相^[4-12],对葛根芩连微丸供试品溶液中待测成
分的分离情况进行了考察,结果以甲醇-磷酸盐缓冲

表 2 5 种成分加样回收试验

化学成分	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
葛根素	0.112 3	0.590	0.620	1.199	98.23	98.39	1.19
	0.102 7	0.539	0.620	1.154	99.19		
	0.099 7	0.524	0.620	1.123	96.61		
	0.102 1	0.536	0.620	1.141	97.58		
	0.114 7	0.603	0.620	1.216	98.87		
	0.099 6	0.523	0.620	1.142	99.84		
甘草素	0.112 3	0.001 90	0.002 20	0.004 100	101.5	101.3	1.14
	0.102 7	0.001 70	0.002 20	0.003 900	100.9		
	0.099 7	0.001 50	0.002 20	0.003 700	101.1		
	0.102 1	0.001 70	0.002 20	0.003 900	100.4		
	0.114 7	0.002 10	0.002 20	0.004 300	102.0		
	0.099 6	0.001 60	0.002 20	0.003 800	101.3		
黄芩苷	0.112 3	0.019 8	0.015 0	0.035 10	102.1	100.6	1.42
	0.102 7	0.018 1	0.015 0	0.033 00	99.00		
	0.099 7	0.017 2	0.015 0	0.032 30	100.9		
	0.102 1	0.018 0	0.015 0	0.032 90	99.30		
	0.114 7	0.020 3	0.015 0	0.035 30	100.0		
	0.099 6	0.017 2	0.015 0	0.032 60	102.4		
盐酸小檗碱	0.11 23	0.020 1	0.017 0	0.037 10	100.1	100.5	1.02
	0.102 7	0.018 8	0.017 0	0.035 90	100.7		
	0.099 7	0.017 9	0.017 0	0.034 70	99.10		
	0.102 1	0.018 9	0.017 0	0.036 20	101.5		
	0.114 7	0.020 9	0.017 0	0.037 80	99.60		
	0.099 60	0.018 1	0.017 0	0.035 40	101.7		

秦艽花液质联用的指纹图谱研究

胡一晨^{1,2}, 吉琅¹, 廖晴¹, 曹纪亮¹, 万丽^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137;
2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的:建立秦艽花的液质联用指纹图谱检测方法,为最终实现秦艽花真伪品的鉴别提供参考。方法:以 Agilent ZORBAX ECLIPSE XDB-C₁₈ (2.1 mm×50 mm,1.8 μm) 为分析用色谱柱,0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱,在正离子模式下,分析 11 批秦艽花药材,并利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行了相似度计算。结果:建立了秦艽花液质联用指纹图谱的共有模式,标定了指纹图谱中的 23 个共有峰,11 批药材的相似度均>0.90,并用 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 技术对 7 个共有峰进行了指认。结论:方法精密度、稳定性和重复性良好,为提高秦艽花的质量标准提供了依据。

[关键词] 秦艽花; 指纹图谱; 液质联用; 龙胆苦苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)02-0067-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121107.1339.007.html>

[网络出版时间] 2012-11-7 13:39

Liquid Chromatography-Mass Spectrography Fingerprinting Analysis
of Flos Gentianae Stramienae

[收稿日期] 20120808(002)
[第一作者] 胡一晨,在读硕士,从事中药有效成分分析研究,Tel:18810801157, E-mail: huyichen0323@126.com
[通讯作者] * 万丽,教授,博士生导师,从事药物分析研究,Tel: 028-66174295, E-mail: wanli8801@163.com

液系统分离效果好。

3.3 检测波长的选择 对葛根芩连微丸中的待测成分葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱进行了全波长扫描,结果各成分在 275 nm 处均有较大的吸收,且该波长处待测成分无干扰。因此选用 275 nm 作为检测波长。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:1146.

[2] 潘竞锵,韩超,刘惠纯,等. 葛根芩连汤降血糖作用的实验研究[J]. 中国新药杂志,2000, 9(3):167.

[3] 王芬,何华亮. 张发荣运用葛根芩连汤治疗糖尿病经验[J]. 中医杂志,2005,46(2):103.

[4] 夏宏. 葛根芩连微丸中葛根素的含量测定[J]. 中国医院药学杂志,2002,22(1):681.

[5] 吴昭晖,谭晓梅,罗佳波. 高效液相色谱法测定葛根芩连微丸中葛根素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,1999,5(6):10.

[6] 崔向微,张贵君,李慧. 葛根芩连汤中 7 种药效成分分析[J]. 天津中医药,2008,25(5):417.

[7] 章军,刘宇政,王跃生,等. HPLC 同时测定葛根芩连微丸中 12 个有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):58.

[8] 陈月凤,龙晓英,江涛,等. HPLC 法同时测定大鼠灌胃给予葛根芩连微丸血浆中 3 种有效成分的含量[J]. 广东药学院学报,2012,28(3):246.

[9] 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 分析药物分析杂志[J]. 2004,24(1):11.

[10] 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.

[11] 王立,赵瑛. 煎煮方式对葛根芩连汤中黄芩苷和小檗碱家犬体内药动学影响[J]. 中成药, 2011, 33(8):1326.

[12] 陈丽红,王强. 葛根芩连汤中不同配伍对黄芩苷、小檗碱含量的影响[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(4):147.

[责任编辑 顾雪竹]