

HPLC同时测定二黄汤 $\leq 1\ 000$ Da提取液中 6种成分的含量

王京龙¹, 王英姿^{2*}, 孙秀梅³, 张兆旺³, 张超³

(1. 枣庄学院, 山东 枣庄 277101; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;
3. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 优化 HPLC 条件, 建立同时测定二黄汤 $\leq 1\ 000$ Da 提取液中 6 种有效成分(黄芩苷、黄芩素、巴马汀、小檗碱、甘草苷、甘草酸)含量的方法。方法: 采用 RP-HPLC, Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈-乙酸铵溶液(0.02 mol \cdot L⁻¹, 冰乙酸调 pH 4.0) 梯度洗脱, 流速 0.5 mL \cdot min⁻¹, 检测波长 280, 265, 250 nm, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 进样量 20 μ L。结果: 黄芩苷、黄芩素、巴马汀、小檗碱、甘草苷、甘草酸在各自的线性范围内与色谱峰面积呈良好的线性关系, 回收率在 95% ~ 105%, 精密性、稳定性的 RSD 均 < 2.0%。结论: 该方法可快速简便的测定二黄汤中 6 种有效成分的含量, 可为控制二黄汤方药制剂质量标准评价提供依据。

[关键词] 二黄汤; 黄芩苷; 黄芩素; 巴马汀; 小檗碱; 甘草苷; 甘草酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0052-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170052

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1340.014.html>

[网络出版时间] 2014-07-15 13:40

Simultaneous Determination of Six Components in the $\leq 1\ 000$ Da Extract of Erhuang Decoction by HPLC

WANG Jing-long¹, WANG Ying-zi^{2*}, SUN Xiu-mei³, ZHANG Zhao-wang³, ZHANG Chao³

(1. Zaozhuang University, Zaozhuang 277101, China;

2. Beijing University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Beijing 100029, China;

3. Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** The study was performed optimize the HPLC conditions and to establish a method to determine content of six effective components in the $\leq 1\ 000$ Da extract of Erhuang decoction (baicalin, baicalein, palmatine, berberine, liquiritin, glycyrrhizic acid) simultaneously. **Method:** The RP-HPLC method used for the determination, on a chromatographic column of Diamonsil, C₁₈ column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); with the was used mobile phase composed of acetonitrile: ammonium acetate solution (0.02 mol \cdot L⁻¹, acetic acid pH 4.0), in gradient elution; the flow rate was fixed at 0.5 mL \cdot min⁻¹; the detection wavelength was set at 280, 265, 250 nm; the column temperature: was maintained at 25 $^{\circ}$ C; the injection volume was 20 μ L. **Result:** There is a good linear relationship between the chromatographic peak area and concentration of baicalin, baicalein, palmatine, berberine, liquiritin, glycyrrhizic acid in the linear range, and the recovery are all in the range of 95% - 105%, with all the RSD of the recovery rate less than 2%. **Conclusion:** The method is rapid and simple for the

[收稿日期] 20131213(016)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2010ZX09401)

[第一作者] 王京龙, 讲师, 从事中药新药研究与中药炮制原理研究, Tel: 0531-89623310, E-mail: wangjinglong121181@163.com

[通讯作者] * 王英姿, 教授, 硕士生导师, 从事中药制剂新剂型与新技术研究, Tel: 010-84738615, E-mail: wangyingzi@sina.com

content determination of six components content determination in the $\leq 1\ 000$ Da extract of Erhuang decoction.

[Key words] Erhuang decoction; baicalin; baicalein; palmatine; berberine; liquiritin; glycyrrhizic acid

二黄汤源于《医宗金鉴》,由黄芩、黄连、甘草组成,主治上焦火旺、头面大肿、目赤肿痛、心胸咽喉口舌耳鼻热盛及生疮毒者^[1]。方中化学成分复杂,主要包括黄酮类、生物碱类和三萜皂苷类成分,如黄芩苷、黄芩素、甘草苷、巴马汀、小檗碱、甘草酸等。现代药理研究表明,该方具有抑菌、抗炎、抗氧化、提高机体免疫功能、保肝、抗肿瘤等方面的作用^[2-5]。随着人们对中药复方作用的多成分、多角度、多靶点特点认识的加深,在对中药复方进行质量控制时,应尽可能全面的对代表性成分进行控制。本文采用HPLC-DAD技术,同时对方中的6种主要成分进行了含量测定,可为控制二黄汤方药制剂质量标准评价提供依据。

1 仪器与试剂

1200系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),DH-系列中空纤维超滤膜(上海德宏生物医学科技发展有限公司),pHS-3C型精密pH计(上海雷磁仪器厂),MA110型电子分析天平(上海第二分析仪器厂),KQ-250E型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),HSC-12A氮吹仪(北京卓信伟业科技有限公司),氮气(济南德辉气体有限公司)。

方中黄芩、黄连、甘草饮片经山东中医药大学张兆旺教授鉴定,分别为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi,毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.,豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.加工成的饮片,且符合2010年版《中国药典》相关规定。

对照品黄芩苷(批号110715-200815)购于山东省食品药品检验所,黄芩素(批号110715-200815)、盐酸小檗碱(批号111595-200604)、甘草酸铵(批号110731-201116)、甘草苷(批号111610-201106)均购于中国食品药品检定研究院,盐酸巴马汀(批号10493-201106)购于南昌贝塔生物科技有限公司。

乙酸铵、冰乙酸为分析纯,甲醇、乙腈为色谱纯,均购于天津市科密欧化学试剂有限公司,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 样品液的制备 按处方比例(1:1:1)称取方药粗粉(10~20目之间)45 g,按优选出的药材组合方式^[6],即黄芩和甘草合提,黄连单提,然后合并提取液。常压下加热回流提取3次(加水量依次为药

量的10,8,8倍)。分别将3煎提取液粗滤,离心($3\ 500\ r \cdot \min^{-1}$,25 min),一定规格的中空纤维膜滤过,浓缩,合并,定容至250 mL,即得二黄汤 $\leq 1\ 000$ Da提取液(质量浓度为 $1.8 \times 10^2\ g \cdot L^{-1}$)。照上述方法,分别制备方药缺黄芩、方药缺黄连、方药缺甘草的阴性样品液。

2.2 供试品溶液的制备 精密吸取2.1项下的样品溶液5 mL,加硅藻土1 g,蒸干、研匀,精密加入甲醇25 mL,称重,超声30 min,放冷,补足失重,滤过,滤液过 $0.45\ \mu m$ 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液(质量浓度为 $36\ g \cdot L^{-1}$)。同法制得方药缺黄芩、方药缺黄连、方药缺甘草的阴性供试液(质量浓度为 $24\ g \cdot L^{-1}$)。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷5.47 mg,黄芩素1.98 mg,甘草苷2.6 mg,盐酸巴马汀2.64 mg,盐酸小檗碱2.56 mg,甘草酸铵5.02 mg,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解,稀释至刻度,得各对照品溶液母液。

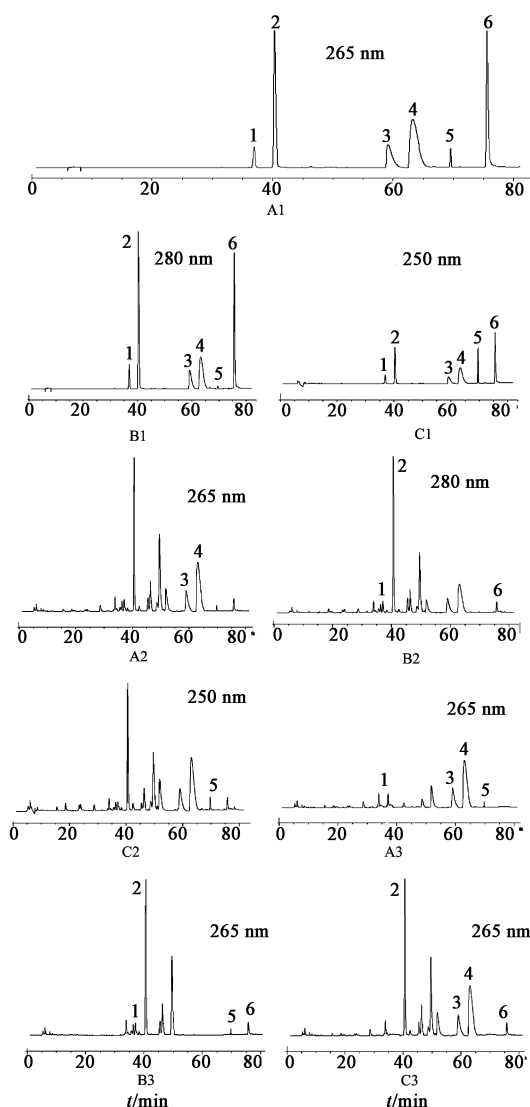
精密吸取各对照品母液适量,置于EP管中,常温氮气吹干,残渣用甲醇溶解,转移至1 mL量瓶中,定容,即得6种成分混合对照品溶液,黄芩苷 $0.547\ g \cdot L^{-1}$,黄芩素 $0.297\ g \cdot L^{-1}$,盐酸小檗碱 $0.384\ g \cdot L^{-1}$,盐酸巴马汀 $0.132\ g \cdot L^{-1}$,甘草酸铵 $0.251\ g \cdot L^{-1}$,甘草苷 $0.078\ g \cdot L^{-1}$ 。

2.4 6种成分含量测定

2.4.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-乙酸铵溶液(B)($0.02\ mol \cdot L^{-1}$,冰乙酸调pH 4.0)梯度洗脱(0~30 min,10%~25% A;30~42 min,25%~30% A;42~55 min,30% A;55~70 min,30%~50% A;70~90 min,50%~100% A),流速 $0.5\ mL \cdot \min^{-1}$,检测波长280,265,250 nm,柱温25 $^{\circ}C$,进样量20 μL 。

2.4.2 专属性考察 按2.4.1项下的色谱条件,分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性供试液各10 μL 进样。结果甘草苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、甘草酸、黄芩素、保留时间分别为36.837,40.250,59.161,63.203,69.463,75.551 min;与杂质峰能达到基线分离,理论踏板数均不低于10 000。见图1。

2.4.3 标准曲线的绘制 取适量混合对照品溶液,按1,0.5,0.375,0.25,0.125,0.075,0.025倍比例



A1, B1, C1. 265, 280, 250 nm 波长下混合对照品溶液;
A2, B2, C2. 265, 280, 250 nm 波长下供试品溶液;
A3, B3, C3. 265 nm 波长下缺黄芩、缺黄连、缺甘草的阴性溶液;

1. 甘草苷; 2. 黄芩苷; 3. 盐酸巴马汀;
4. 盐酸小檗碱; 5. 甘草酸; 6. 黄芩素

图 1 二黄汤提取液中 6 种成分含量测定 HPLC

稀释成不同浓度的系列混合对照品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件,进样 20 μL 。以峰面积积分值(Y)对相应的混合对照品溶液浓度(X)进行回归,得到各对照品的回归方程及线性范围,见表 1。

2.4.4 精密度试验 精密吸取 2.3 项下混合对照品溶液 20 μL ,按 2.4.1 项下色谱条件,连续进样 6 次,测定甘草苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、甘草酸、黄芩素的峰面积,计算各被测成分的峰面积 RSD 分别为 0.63%, 0.76%, 1.12%, 1.26%, 0.57%, 0.42%, 表明精密度良好。

2.4.5 稳定性试验 精密吸取 2.2 项下供试品溶

表 1 各对照品的回归方程及线性范围

| 成分 | 回归方程 | 相关系数 | 线性范围 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|-----|------------------------|---------|---|
| 甘草苷 | $Y = 127.20X + 89.11$ | 0.999 8 | 1.95 ~ 78.0 |
| 黄芩苷 | $Y = 116.03X + 311.35$ | 0.999 9 | 13.675 ~ 547.0 |
| 巴马汀 | $Y = 140.95X + 55.47$ | 0.999 9 | 3.3 ~ 132.0 |
| 小檗碱 | $Y = 149.20X - 564.34$ | 0.999 9 | 9.6 ~ 384.0 |
| 甘草酸 | $Y = 21.21X + 62.49$ | 0.999 9 | 6.275 ~ 251.0 |
| 黄芩素 | $Y = 158.35X - 103.68$ | 0.999 8 | 7.425 ~ 297.0 |

液,按 2.4.1 项下色谱条件,分别在 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样 20 μL ,测定甘草苷、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、甘草酸、黄芩素的峰面积,计算各被测成分峰面积 RSD 分别为 1.06%, 0.95%, 0.88%, 0.98%, 0.91%, 1.56%, 结果表明各被测成分在 0 ~ 24 h 稳定性良好。

2.4.6 加样回收试验 精密吸取 2.1 项下样品液 1 mL, 6 份,分别加入甘草苷对照品母液 0.05 mL、黄芩苷对照品母液 0.4 mL、巴马汀对照品母液 0.5 mL、小檗碱对照品母液 1.2 mL、甘草酸对照品母液 0.2 mL、黄芩素对照品母液 0.1 mL,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件,测定各成分含量,计算各成分的回收率分别为 97.69%, 100.10%, 99.92%, 99.52%, 99.29%, 98.46%; RSD 分别为 1.68%, 1.16%, 0.56%, 1.31%, 0.93%, 1.77%, 结果表明各被测成分加样回收率良好。

2.4.7 样品含量测定 按 2.1 项下方法,制备 3 批二黄汤样品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,各取 20 μL 进样检测,计算各批次供试液中 6 种有效成分的含量,结果见表 2。

表 2 二黄汤中 6 种成分的含量测定 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

| 批次 | 甘草苷 | 黄芩苷 | 盐酸 巴马汀 | 盐酸 小檗碱 | 甘草酸 | 黄芩素 |
|-----|---------|---------|-----------|-----------|---------|---------|
| 1 | 0.372 8 | 6.272 5 | 3.332 8 | 8.319 8 | 2.270 6 | 0.415 3 |
| 2 | 0.368 1 | 6.203 7 | 3.269 9 | 8.418 3 | 2.255 1 | 0.410 2 |
| 3 | 0.377 3 | 6.361 7 | 3.390 4 | 8.301 | 2.295 9 | 0.420 7 |
| 平均值 | 0.372 7 | 6.279 3 | 3.331 0 | 8.346 4 | 2.273 9 | 0.415 4 |

3 小结与讨论

3.1 二黄汤样品溶液的制备 二黄汤传统的煎煮方法易产生大量的沉淀,导致有效成分的损失^[7-8]。本实验采用优选的组合方式^[6]黄芩和甘草合煎,黄连单煎,然后分别粗滤,离心,一定规格的中空纤维膜滤

过,合并,制得 $\leq 1\ 000$ Da提取液,能较大程度的减少黄酮类、生物碱类和三萜皂苷类的成分损失,而且对粗提物进行了超滤精制,提取物得率大大降低,有效成分得到了更大程度的富集。

3.2 流动相的选择 对流动相进行了选择,对比乙腈-水、乙腈-甲酸水、乙腈-乙酸水、乙腈-甲酸铵溶液(甲酸调整 pH 4.0)、乙腈-乙酸铵溶液(乙酸调整 pH 4.0)进行了优选,发现加酸可以改善分离度和峰型,但单纯加酸分离效果不理想,又对比了甲酸铵(甲酸调整 pH 4.0)、乙酸铵(乙酸调整 pH 4.0)两种盐溶液,发现乙酸铵(乙酸调整 pH 4.0)分离效果最好;确定乙酸铵盐溶液后,又对 pH 进行了考察,发现冰乙酸调整 pH 4.0 时效果最好。二黄汤中富含生物碱、黄酮类和三萜皂苷类成分,流动相中加酸有利于改善峰型,当流动相 pH 在酸性成分的 $pK_a \pm 1$ 的范围内时,还能起到调整保留时间的作用;加盐一方面是为了保证生物碱成分分离时所需的离子强度,另一方面可以形成缓冲离子对,发挥离子交换色谱的分离效果。

3.3 检测波长的选择 由6种对照品的 UV 光谱图可知,黄芩苷、黄芩素、甘草苷的最大吸收波长为 280 nm,巴马汀、小檗碱的最大吸收波长为 265 nm,甘草酸、甘草次酸的最大吸收波长为 250 nm,为减少误差,提高准确度,本实验采用多波长检测模式,分别选取 280,265,250 nm 为检测波长,分别在各自最大检测波长处对6种成分进行测定。而且,在 265 nm 波长下,本实验优选的色谱条件,可作为考察二黄汤方药供试品溶液指纹图谱的条件,所获得图谱,符合指纹图谱整体性、模糊性、特征性特点。

通过对 380 余种常用中药中已知活性成分分子量的统计,绝大多数相对分子质量 $< 1\ 000$ Da,只有极少数 $> 1\ 000$ Da,如人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rb_2 、人参皂苷 Rc 、天花粉蛋白等。这也与“中药活性成分分子量表”对 245 种成分的统计结果相符合^[9]。因为多数蛋白质(5 000 ~ 500 000 Da)、淀粉

(50 000 ~ 500 000 Da)、多糖(5 000 ~ 500 000 Da)、树脂(15 000 ~ 300 000 Da)等大分子物质没有药理活性,故选择相对分子质量 $\leq 1\ 000$ Da的提取物为指标。

以二黄汤 $\leq 1\ 000$ Da提取物为最终产物,较通常以粗提物为最终产物,不仅提取物得率大大降低,可缩小服用剂量,而且为选用现代药物新剂型提供了可能,同时提高了技术含量。也能体现中药整体、综合、客观、模糊的特点,这是中药药效物质提取研究设计中一种新思路^[10],对中药现代化研究很有借鉴意义。

[参考文献]

- [1] 王京龙,孙秀梅,张兆旺,等.二黄汤方药半仿生提取法工艺条件的优选[J].世界中西医结合杂志,2011,6(1):56.
- [2] 高雪岩,王文全,魏胜利,等.甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2009,34(21):2695.
- [3] 田庆来,官月平,张波,等.甘草有效成分的药理作用研究进展[J].天然产物研究与开发,2006,18(2):343.
- [4] 兰进,杨世林,郑玉权,等.黄连的研究进展[J].中草药,2001,32(12):1139.
- [5] 辛文好,宋俊科,何国荣,等.黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(6):647.
- [6] 王京龙,孙秀梅,王英姿,等.二黄汤半仿生提取药材组合方式的优选[J].中成药,2013,35(7):1432.
- [7] 谭晓梅,戴开金,罗佳波,等.葛根芩连汤不同配伍对黄芩苷含量的影响[J].中草药,2003,34(7):598.
- [8] 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.
- [9] 季宇彬.中药活性成分与药理应用[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,2004:604.
- [10] 张兆旺.中药药剂学专论[M].北京:人民卫生出版社,2009:68.

[责任编辑 顾雪竹]