

黄连解毒汤高效液相色谱指纹图谱研究及 指标成分的含量测定

彭娟, 郭娜, 范斌, 闫寒, 聂颖兰, 于友华*

(中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立黄连解毒汤高效液相色谱指纹图谱及指标成分含量测定的方法, 用于黄连解毒汤提取液的质量控制。
方法: 应用高效液相色谱法-DAD 检测器, C₁₈ 色谱柱系统, 采用梯度洗脱方法, 建立了黄连解毒汤高效液相色谱指纹图谱。并对指标成分的含量测定方法进行了方法学考察。
结果: 建立了含有 18 个色谱峰高效液相色谱图, 分离度 > 1.0, 测得了 7 种指标成分的含量。
结论: 该方法准确、简便、快速, 可用于黄连解毒汤提取液的质量控制。

[关键词] 黄连解毒汤; 指纹图谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0067-04

Studies on HPLC Fingerprint of Huanglian Jiedu Decoction and Quantitative Analysis of Index Components

PENG Juan, GUO Na, FAN Bin, YAN Han, NIE Ying-lan, YU You-hua*

(Experimental Research Centre, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for HPLC fingerprint of Huanglian Jiedu decoction and quantitative analysis of index components. It will be used for quality control of Huanglian Jiedu decoction. **Method:** HPLC-DAD was applied on an C₁₈ HPLC column and a gradient elution program to develop a HPLC fingerprint of Huanglian Jiedu decoction. The method validation of quantitative analysis of index components was fulfilled. **Result:** HPLC fingerprint of Huanglian Jiedu decoction was developed including 18 compound peaks whose resolution was beyond 1.0 and 7 index components concentration in Huanglian Jiedu decoction was determined. **Conclusion:** The method accurate, convenient and rapid has been applied for quality control of Huanglian Jiedu decoction.

[Key words] Huanglian Jiedu decoction; fingerprint chromatograms; quantitative analysis

黄连解毒汤出自《外台秘要》由 4 味药组成(黄连、黄芩、黄柏和栀子), 是清热解毒的代表方剂, 主治一切实火热毒, 三焦热盛之证。现代研究证明黄连解毒汤具有抗衰老、改善脑缺血和缺氧、降血糖、

调血脂、抗炎、抑菌、抗内毒素、逆转细菌及抑制细胞耐药性、保护心肌、保护肠黏膜、保护功能障碍脏器、增强免疫、抗肿瘤、镇痛等多方面药效作用^[1-5]。黄连解毒汤复方中成分复杂, 其化学成分有多种异喹啉类生物碱, 黄酮类成分及环烯醚萜苷类成分等等。复方中药的药效是由其所包含的成分群的数以及各成分的量及量的比决定的, 指纹图谱能比较全面的反映复方的化学成分体系。因此, 我们希望建立黄连解毒汤的指纹图谱, 并对复方中各药材的主要成分, 如栀子的主要成分栀子苷, 黄连及黄柏的主要成分小檗碱、巴马汀, 黄芩的主要成分黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素及汉黄芩苷进行定量分析^[6-8]。

[收稿日期] 2010-04-19

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30873358); 中国中医科学院医学实验中心自主选题(2006-002)

[第一作者] 彭娟, 助理研究员, 硕士, 中药药物分析 Tel: 010-64014411-3324, E-mail: lillejuan@163.com

[通讯作者] * 于友华, 研究员, 博士, 从事中药复方基础研究, Tel: 010-64014411-3320, E-mail: yuyh@mail.caems.ac.cn

1 材料

1.1 药物及试剂 栀子苷、黄芩苷、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、黄芩素、汉黄芩素对照品均购于中国药品生物制品检定所,汉黄芩苷购于(上海同田生物技术有限公司)。无水乙醇(分析纯),乙腈(色谱纯),乙酸铵(色谱纯),冰醋酸(色谱纯)均购于北京迪科马科技有限公司。超纯水为自制。

1.2 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪、安捷伦化学工作站、赛多利斯 arium® 61316/611VF 超纯水处理器、赛多利斯 BT25S, BT423S 分析天平、Anke TGL-16G 离心机,上海安亭科学仪器厂,ACS-6 型电子计价秤,多功能提取罐。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈ (2) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A 12 mmol 乙酸铵-0.5% 冰醋酸水溶液, B 乙腈(0.1% 甲酸), 梯度洗脱, 0 ~ 3.0 min, 15% B; 3 ~ 7.5 min, 15% ~ 22% B; 7.5 ~ 20 min, 22% B; 20 ~ 24 min, 22% ~ 28% B; 24 ~ 26 min, 28% ~ 32% B; 26 ~ 30 min, 32% B; 30 ~ 32 min, 32% ~ 38% B; 32 ~ 40 min, 38% B; 40 ~ 41 min, 38% ~ 45% B, 41 ~ 55, 45% B。流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样体积 2 μL, 定量波长栀子苷 254 nm, 其余均为 275 nm。在 254 nm 检测波长下得到 18 个色谱峰, 各化合物的分离度基本达到 1.0 以上, 并对 8 个化合物进行了指认。对照品及样品液相色谱图分别见图 1。运用安捷伦化学工作站对样品色谱图性能进行评估, 结果见表 1。

表 1 样品色谱图性能评估

峰号	t _R /min	分离度	峰号	t _R /min	分离度
1	4.813	-	10	20.501	1.54
2	7.137	8.54	11	21.148	1.36
3	7.689	1.93	12	21.677	1.04
4	8.513	3.77	13	22.986	2.49
5	11.596	17.11	14	26.846	9.09
6	12.732	6.33	15	28.484	5.68
7	14.262	6.23	16	29.200	2.73
8	15.730	4.85	17	38.409	27.62
9	19.825	11.12	18	48.475	24.64

2.2 黄连解毒汤复方制备 黄连、黄芩、黄柏及栀子苷按原方比例(3:2:2:3)煎煮 3 遍, 每次 10 倍量水煎

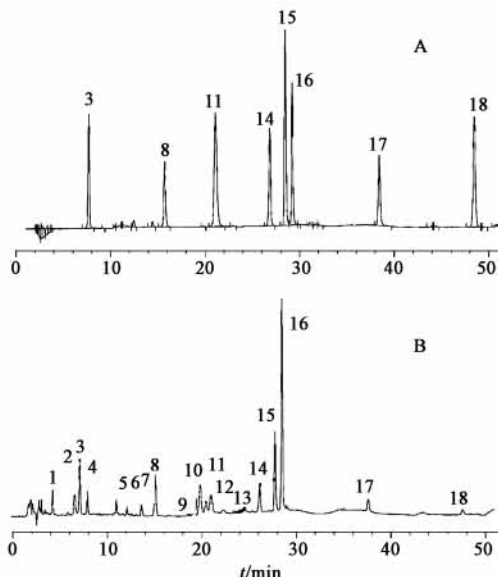


图 1 黄连解毒汤液相色谱

A. 对照品; B. 黄连解毒汤; 3. 栀子苷; 8. 黄芩苷; 11. 盐酸药根碱; 14. 汉黄芩苷; 15. 盐酸巴马汀; 16. 盐酸小檗碱; 17. 黄芩素; 18. 汉黄芩素; 1, 2, 4 ~ 7, 9 ~ 10, 12 ~ 13. 未知化合物

煮 1 h, 合并煎煮液, 减压浓缩, 最后得生药量为 1.15 g · mL⁻¹ 的黄连解毒汤复方药液, 于 -25 °C 保存。含量测定时, 取出室温融化, 精密吸取黄连解毒汤复方药液 5 mL 至 100 mL 量瓶中, 以水为溶剂定容。

2.3 供试品溶液的制备 精取黄连解毒汤复方药液稀释液 2 mL, 精密加入 4 mL 无水乙醇, 涡旋, 超声 5 min, 离心 10 min, 3 000 r · min⁻¹, 将上清液全部转移至 10 mL 量瓶中, 无水乙醇定容, 过滤, 即得样品。

2.4 线性关系 分别称量对照品栀子苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素及汉黄芩素 5 mg, 盐酸巴马汀 2 mg、盐酸小檗碱 10 mg, 精密称定, 至 10 mL 量瓶中, 以甲醇定容。以该溶液为母液, 依次 5 倍梯度稀释, 得到 5 个质量浓度水平的对照品溶液, 按 2.1 的色谱条件进样分析。以进样量(μg)对色谱峰峰面积作线性回归, 标准曲线及线性范围见表 2。

2.5 方法的精密度 按 2.3 制得的样品连续进样 6 次, 记录各组分的峰面积, 计算 6 次的 RSD, 各化合物的 RSD 在 0.4% ~ 1.2%, 具体结果见表 3。

2.6 方法的重复性 按 2.3 平行制备 6 份样品, 按 2.1 的色谱条件进样分析, 记录各组分的峰面积, 计算 6 份平行样品间的 RSD, 各化合物的 RSD 在 0.6% ~ 2.1%, 具体结果见表 3。

表2 标准曲线与线性范围

色谱峰号	对照品	线性方程	r	线性范围/ μg
3	栀子苷	$Y = 867.7X + 1.1005$	0.99998	0.0017 ~ 1.106
8	黄芩苷	$Y = 3489.8X + 0.5345$	0.99999	0.00169 ~ 1.056
14	汉黄芩苷	$Y = 4102.85X + 4.4004$	0.99999	0.00161 ~ 1.006
15	盐酸巴马汀	$Y = 4056.85X - 0.9771$	0.99998	0.000644 ~ 0.402
16	盐酸小檗碱	$Y = 3683.1X - 0.1309$	0.99999	0.00326 ~ 2.038
17	黄芩素	$Y = 5658.5X - 74.287$	0.99998	0.00164 ~ 1.024
18	汉黄芩素	$Y = 6169.5X + 6.5489$	0.99999	0.00164 ~ 1.012

表3 精密度及重复性考察的RSD($n=6$)

峰号	对照品	精密度	重复性	峰号	对照品	精密度	重复性
3	栀子苷	0.9	2.1	16	盐酸小檗碱	0.6	1.4
8	黄芩苷	0.5	1.5	17	黄芩素	1.2	1.0
14	汉黄芩苷	0.4	0.6	18	汉黄芩素	1.2	0.7
15	盐酸巴马汀	1.1	0.8				

2.7 样品稳定性 将制备好的供试品溶液于0,3,6,9,12 h进样分析,考察供试品溶液当天的稳定性,并于第2天、第14天考察进样分析,考察供试品溶液一段时间内的稳定性。考察表明供试品溶液在当天稳定。其中黄芩素峰于第2天不稳定,峰面积就明显下降了18%,其余化合物在14 d内峰面积都变化不明显。故供试品溶液应在测试当天制备并进行含量测定。

2.8 加样回收率 精取黄连解毒汤复方药液5 mL至100 mL量瓶中,以水为溶剂定容。精取该溶液2 mL,平行8份,其中6份精密加入一定体积的混合对照品溶液,按2.3项下操作,2.1项下的色谱条件进样分析。计算加样回收率,并求得RSD,结果见表4。

表4 黄连解毒汤复方中各成分回收率考察

峰号	对照品	加入量/ μg	回收率/%	RSD/%
3	栀子苷	372.4	96.24	2.2
8	黄芩苷	215.2	93.11	3.4
14	汉黄芩苷	223.2	95.41	2.8
15	盐酸巴马汀	484.4	96.79	2.6
16	盐酸小檗碱	374	97.69	2.7
17	黄芩素	248	101.7	2.4
18	汉黄芩素	221.6	98.66	2.4

2.9 黄连解毒汤提取液的含量测定 对黄连解毒汤提取液按2.3项下制备,测得栀子苷 $1.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,黄芩苷 $1.98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,汉黄芩苷 $0.54 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,盐酸巴马汀 $0.82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,盐酸小檗碱 $2.64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,黄芩素 $0.27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,汉黄芩素 $0.099 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备条件考察 比较了无水乙醇的用量,分别加入体积为2,3,4倍于黄连解毒汤提取液的无水乙醇,三者目标成分的HPLC分析的峰面积无区别,故选择2倍体积的无水乙醇。考察了超声时间的影响,分别超声5,10,20,30 min,目标成分的HPLC分析的峰面积无区别,故选择超声5 min。

3.2 液相色谱条件考察 考察缓冲盐乙酸铵8,10,12及15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$;乙酸(体积比)0.5%,1.0%及1.5%对各化合物的分离,以12 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵、0.5%乙酸系统最佳,考察了多种不同的梯度洗脱条件,最后确定本实验的色谱条件。

3.3 检测波长的确定 除栀子苷最大吸收波长在254 nm,其余化合物均在275 nm有最大吸收,故确定栀子苷的检测波长在254 nm,其余化合物为275 nm。

[参考文献]

- [1] 郑越,冯端浩,程肖蕊,等. 黄连解毒汤对快速老化小鼠皮层基因表达的影响[J]. 药物研究,2008,17(7):6.
- [2] 刘煜德,吴辉,吴伟,等. 黄连解毒汤对高胆固醇兔血液流变学和动脉粥样硬化干预作用[J]. 中国中药杂志,2009,34(5):600.
- [3] 田文红,路波,胡筱娟. 黄连解毒汤合增液汤治疗糖尿病32例[J]. 陕西中医,2008,29(12):1603.

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110321. 1133. 006

DPPH 法测定九州虫草不同极性部位抗氧化活性

董秀英^{1,2}, 吕青涛², 张国英^{1,2}, 凌建亚^{1*}, 张长铠¹

(1. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 济南 250100; 2. 山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 研究九州虫草体外不同极性部位的抗氧化作用。方法: 采用 DPPH 法测定九州虫草石油醚(EVP)、乙酸乙酯(EVE)、正丁醇(EVB)和水(EVW)不同提取部位的抗氧化活性。结果: EVP, EVE, EVB, EVW 均有 DPPH 自由基的清除能力, 测得 EVP, EVE, EVB 和 EVW 清除 DPPH 的 EC_{50} 值分别为 190.2, 141.4, 151.6, 195.4 $mg \cdot L^{-1}$ 。结论: 九州虫草具有很强的抗氧化性, 为进一步研究其抗氧化活性成分提供了科学依据。

[关键词] 九州虫草; 1,1-二苯基-2-苦基苯肼自由基法; 体外抗氧化作用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0070-04

Determination of the Antioxidant Capacity of *Cordyceps Kyushuensis* with DPPH Assay *in vitro*

DONG Xiu-ying^{1,2}, LV Qing-tao², ZHANG Guo-ying^{1,2}, LING Jian-ya^{1*}, ZHANG Chang-kai¹

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology of Shandong University, Jinan 250100, China;

2. College of Pharmacology of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antioxidant effect *in vitro* of *Cordyceps kyushuensis*. **Method:** Antioxidant capacity of the petroleum ether fraction (EVP); acetic ether fraction (EVE); n-butanol fraction (EVB) and water fraction (EVW) were determined using the DPPH assay *in vitro*. **Result:** EVP, EVE, EVB and EVW showed antioxidant capacity of eliminating DPPH free radicals, and the scavenging efficiency increase with the concentration increase. EC_{50} values of the EVP, EVE, EVB and EVW are 190.2, 141.4, 151.6, 195.4 $mg \cdot L^{-1}$ respectively. **Conclusion:** *C. kyushuensis* shows great oxidation resistance, and the results of the antioxidant effect of the EVP, EVE, EVB, EVW provide a scientific basis to the research of active constituent and the exploitation of *C. kyushuensis*.

[Key words] *Cordyceps kyushuensis*; DPPH; antioxidant capacity

[收稿日期] 20110112(013)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30970012, 30770041), 山东省优秀中青年科学家奖励基金(2006BS02015)

[第一作者] 董秀英, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学及化学分析, Tel: 13537310806, E-mail: dongxiuying1984@163.com

[通讯作者] * 凌建亚, 副教授, 硕导, 从事药用真菌分子系统学、种质资源及其组合生物学研究, E-mail: lingjian-ya@sdu.edu.cn

[网络出版时间] 2011-03-21 11:33

- [4] 张保国, 程铁锋, 郝锦锦. 黄连解毒汤药效学研究概况 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(16): 1204.
- [5] 杨彬, 马景, 俞恒桑, 等. 凉膈散与黄连解毒汤对 2 型糖尿病小鼠血糖、血脂及胰岛素水平的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2009, 19(6): 337.
- [6] 沈嘉, 曹现峰, 刘九飞. 几种黄连解毒汤的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2003, 25(6): 433.
- [7] 吴晓霞, 彭娟, 范斌, 等. LC-MS-MS 测定黄连解毒汤中 3 种生物碱在大鼠血清的含量及其药代动力学研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(10): 1276.
- [8] 孙健等. 黄连解毒汤各成分的 HPLC-UV-MS 定性及定量的测定方法研究 [J]. 药学学报, 2006, 41(4): 380.

[责任编辑 蔡仲德]