

葛根芩连汤配方颗粒和传统汤剂的 HPLC 的指纹图谱对比研究

李 红 李 妍 田 杰 王 艳 张 颖

(唐山市中医医院药学部,唐山,063000)

摘要 目的:采用高效液相(HPLC)比较研究葛根芩连汤配方颗粒剂和传统汤剂的指纹图谱差异。方法:首先选择3家不同医院A、B、C的葛根芩连汤配方颗粒剂和传统汤剂,配制对照品溶液和供试品溶液后,以优化的色谱条件进行HPLC指纹图谱研究。结果:HPLC中间精密度试验、重复性试验和稳定性试验均显示良好。葛根芩连汤颗粒剂HPLC指纹图谱发现前5 min K1、K2和K3的谱图差异较大,5 min后3家不同医院葛根芩连汤颗粒剂HPLC指纹图谱有10个相似的特征峰,其中K3特征峰的成分含量与K1和K2存在较大差异,尤其是1号峰和4号峰。K1和T1、K2和T2、K3和T3颗粒剂和传统汤剂的比较中,颗粒剂特征峰的含量较传统汤剂高。结论:葛根芩连汤配方不同医院颗粒剂和传统汤剂的HPLC指纹图谱存在一定差异。

关键词 高效液相;指纹图谱;葛根芩连汤;精密度;重复性;加样回收;稳定性;专属性

Comparative Study on HPLC Fingerprint of Gegen Qinlian Formula Granules and Its Traditional Decoction

Li Hong, Li Yan, Tian Jie, Wang Yan, Zhang Ying

(Department of Pharmacy, Tangshan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tangshan 063000, China)

Abstract Objective: To compare the fingerprints of Gegen Qinlian Formula granules and its traditional decoction by high performance liquid phase (HPLC). **Methods:** Gegen Qinlian Decoction Formula granules and traditional decoctions from 3 different hospitals A, B, C, were selected. After preparing the control solution and test solution, the HPLC fingerprint analysis was carried out under the optimized chromatographic conditions. **Results:** The results of HPLC intermediate precision test, repeatability test and stability test were all good. Gegen Qinlian Decoction granules HPLC fingerprint showed that the spectra of K1, K2 and K3 differed greatly during the first 5 min. Then after the 5 min, HPLC fingerprint of Gegen Qinlian Decoction Formula granules from 3 different hospitals had 10 similar characteristic peaks, the content of K3 characteristic peak was quite different from K1 and K2, especially No. 1 and No. 4 peaks. In comparison of K1 and T1, K2 and T2, K3 and T3 of granules and traditional decoctions, the content of the characteristic peak of granules was higher than that of traditional decoctions. **Conclusion:** There are certain differences in the HPLC fingerprints of Gegen Qinlian Decoction granules and traditional decoction from different hospitals.

Key Words High performance liquid phase; Fingerprint; Gegen Qinlian Decoction; Precision; Repeatability; Sample recovery; Stability; Specificity

中图分类号:R283.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.09.051

葛根芩连汤是由葛根、黄芩、黄连和甘草组成的经典方,该方出自中医经典《伤寒论》,属于表里双解剂,即可清解卫表,又可清里泻热,适用于伤寒表证未解,邪入阳明而致的邪热下利证,即现代医学的腹泻、痢疾等^[1-2]。全方以葛根为君,辛甘凉入脾胃经,对因表证未解,里热已炽而引起的身热口渴、胸闷口干等症状行解表退热之功,对因热邪内迫,大肠传导失司致下利臭秽和肛门灼热等症状行升阳止利之效;黄芩、黄连助君药解表清里,燥湿止利,其中黄芩“主治诸经实热……泻肺火,清痰利气”,对肺之里热上蒸致咳致喘,具有解肌汗出而解之功;甘草调

和诸药而为佐使。传统的中药汤剂具有不方便携带,熬药时间较长等不足,而生活节奏较快又想服用中药的患者则感到不便。近年来出现的中药配方颗粒剂,以其配方的全成分提取而制成,使患者服用中药更加省时便捷,携带方便^[3-5]。对于配方颗粒剂与传统汤剂中指纹图谱是否存在差异,目前研究较少。本研究基于葛根芩连汤,采用HPLC指纹图谱比较的方法研究其配方颗粒和传统汤剂的差异,报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 购于安捷伦科技(中国)有限公司的高

表 1 葛根芩连汤样品信息

医院	颗粒剂编号	汤剂编号	生产企业	饮片来源
A	K1	T1	河北博圣药业有限公司	葛根(云南)、黄芩(甘肃)、黄连(峨眉)、甘草(甘肃)
B	K2	T2	河北伊康药业有限公司	葛根(四川)、黄芩(四川)、黄连(四川)、甘草(宁夏)
C	K3	T3	北京柏林药业有限公司	葛根(贵州)、黄芩(四川)、黄连(贵州)、甘草(山西)

效液相色谱仪(型号 Agilent-1100)、四元泵(型号 G1321)和二极管阵列检测器(型号 G1315DAD)等;购于青岛君道生物技术有限公司的 Ultimate AQ C₁₈柱。

1.2 试剂 购于上海展云化工有限公司色谱 HPLC 乙腈和色谱 HPLC 甲醇;中国食品药品检定研究院提供的超纯水和葛根素对照品(110752-200410)。

1.3 分析样品 随机选取 A、B、C 3 家不同医院的葛根芩连汤颗粒剂和汤剂进行比较研究,其中 A 医院葛根芩连汤配方颗粒剂 K1 为神威药业集团有限公司,葛根 17050211,每袋 1.5 g 相当于饮片 15 g;黄芩 17062171,每袋 0.9 g 相当于饮片 10 g;炙甘草 17062321,每袋 0.6 g 相当于饮片 3 g;黄连 17052811,每袋 0.5 相当于饮片 3 g;B 医院颗粒剂 K2 为广东一方制药有限公司,葛根 7095323,每袋 200 g 相当于饮片 2 000 g;黄芩 7105893,每袋 200 g 相当于饮片 1 120 g;炙甘草 7120593,每袋 200 g 相当于饮片 1 000 g;黄连 7092273,每袋 200 g 相当于饮片 1 200 g;C 医院颗粒剂 K3 为东营诺康生物技术有限公司,葛根 990207,每袋 200 g 相当于饮片 2 000 g;黄芩 981104,每袋 100 g 相当于饮片 510 g;炙甘草 990209,每袋 100 g 相当于饮片 500 g;黄连 990210,每袋 100 g 相当于饮片 600 g。配方颗粒剂药物组成均相当于中药饮片葛根 30 g,黄芩 20 g,炙甘草 6 g,黄连 6 g,这 3 家医院对应的中药饮片厂家各不同。见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 4.6 mm×250 mm 的 C₁₈保护柱(5 μm),以室内温度为柱温,进样量为 20 μL 以乙腈为流动相 A,甲醇为流动相 B,流速 1.0 mL/min;检测波长为 280 nm。

2.2 对照品溶液的制备 首先将葛根素对照品放置于 60 ℃ 真空干燥至恒重,然后分别精密称取 10.3、5.3 mg 于 50 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇适量并超声溶解,混合均匀后制成葛根素对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 根据葛根芩连汤的配伍比例,即葛根 15 g、黄连 9 g、甘草 6 g、黄芩 9 g。根据 3 家不同医院提供的药材,采用传统汤剂煎煮方

法,先煮葛根后入诸药得 200 mL 浓缩混合药液,采用 0.45 μm 微孔滤膜过滤混合药液制成供试品溶液。葛根芩连汤同对比对应颗粒剂以水溶解,直至完全无可见沉淀物即为颗粒剂供试品溶液。

2.4 专属性试验 取同一供试品溶液根据 2.3 制备的供试品溶液,采用 HPLC 色谱法对葛根芩连汤进行专属性试验,结果显示葛根芩连汤专属性良好。

2.5 线性关系考察 精密量取葛根素对照品的甲醇溶液 3.0、6.0、12.0、18.0、24.0 mL,分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀后分别精密吸取 10 μL,采用 HPLC 色谱法,记录峰面积;以对照品进样量(μg)为横坐标(X,峰面积积分值为纵坐标(Y),绘制标准曲线,葛根素回归方程 $y = 2.2693X + 29028$, $r = 0.9991$ ($n = 5$),结果表明,葛根素对照品在 5.03 ~ 504.06 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.6 中间精密度试验 精密取同一 2.3 制备的供试品溶液,在一组相同的测量程序、相同地点等测量条件下,对被测对象在一长段时间内重复测量进行中间精密度试验,本研究重复测量 5 次,大于总峰面积 5% 的色谱峰相对峰面积精密度结果最终取平均值,研究结果显示葛根芩连汤供试品溶液中间精密度良好。见表 2。

表 2 大于总峰面积 5% 的色谱峰相对峰面积精密度结果

峰号(S)	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	平均值	RSD(%)
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
3	0.367	0.372	0.369	0.386	0.373	0.375	2.042
4	0.459	0.445	0.452	0.427	0.431	0.446	2.759
9	0.507	0.502	0.505	0.496	0.515	0.509	1.568
10	0.408	0.382	0.378	0.409	0.426	0.410	4.691

2.7 供试品溶液稳定性试验 由于固定相的稳定性都是有限的,因此的 HPLC 试验开始前,需要确定供试品溶液的稳定性,以保障后续研究结果的误差最小,可靠性最高。本研究采用同一供试品溶液重复进行 5 次试验,研究结果显示葛根芩连汤供试品溶液稳定性良好,平均 RSD 为 1.8%。见表 3。

2.8 重复性试验 采用同一供试品溶液,连续进样 5 次进行短时间内的连续重复性测试,以保证 HPLC 方法学的可重复性,本研究结果显示葛根芩连汤的重复性良好,平均 RSD 为 1.9%。见表 4。

表 3 稳定性相似度评价结果

	稳定性 1	稳定性 2	稳定性 3	稳定性 4	稳定性 5	平均值	RSD(%)
稳定性 1	1.000	0.997	0.997	0.997	0.997	0.998	1.823
稳定性 2	0.997	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999	1.835
稳定性 3	0.997	0.999	1.000	0.999	1.000	0.999	1.840
稳定性 4	0.997	0.999	0.999	0.999	1.000	0.999	1.836
稳定性 5	0.998	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	1.839

表 4 重复试验相似度评价结果

	重复度 1	重复度 2	重复度 3	重复度 4	重复度 5	平均值	RSD(%)
重复度 1	1.000	0.994	0.992	0.995	0.990	0.997	1.902
重复度 2	0.994	1.000	0.996	1.000	0.992	0.997	1.904
重复度 3	0.992	0.996	1.000	0.992	0.997	0.996	1.898
重复度 4	0.995	0.996	0.992	1.000	0.992	0.997	1.901
重复度 5	0.990	0.997	0.997	0.992	1.000	0.998	1.906

2.9 回收率试验 精密称取 5 份已知含量的同一批葛根芩连汤样品各约 0.5 g,分别精密加入 20 mL 混合对照品甲醇溶液,采用加样回收法测定,计算结果显示平均回收率为 99.09%,RSD 为 0.78%。

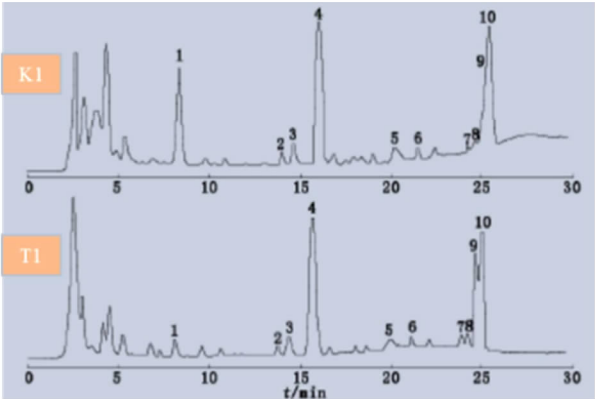


图 1 A 医院葛根芩连汤配方颗粒和传统汤剂的 HPLC 指纹图谱比较图

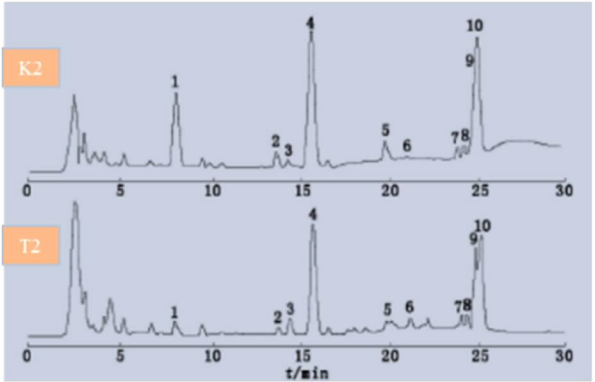


图 2 B 医院葛根芩连汤配方颗粒和传统汤剂的 HPLC 指纹图谱比较图

2.10 样品测定结果 由图 1、图 2 和图 3 中葛根芩连汤颗粒剂 HPLC 指纹图谱发现前 5 min K1、K2 和 K3 的谱图差异较大,然后 5 min 后 3 个不同医院葛根芩连汤颗粒剂 HPLC 指纹图谱有 10 个相似的特征峰,其中 K3 特征峰的成分含量与 K1 和 K2 存

在较大差异,尤其是 1 号峰和 4 号峰。K1 和 T1、K2 和 T2、K3 和 T3 颗粒剂和传统汤剂的比较中,颗粒剂特征峰的含量较传统汤剂高。

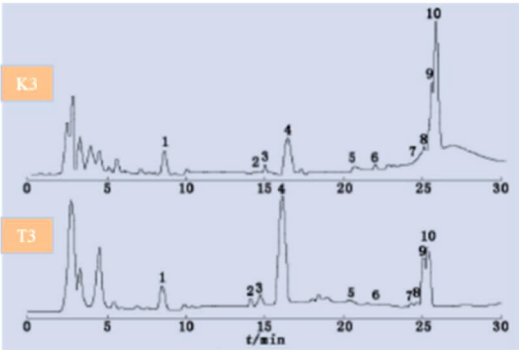


图 3 C 医院葛根芩连汤配方颗粒和传统汤剂的 HPLC 指纹图谱比较图

3 讨论

随着现代科学技术对中药复方研究的不断深入发掘,中药复方的制剂工艺和制剂质量等都有所提高,因此不断致力于将中药推向现代化具有重要的意义。20 世纪末对中药复方研究制备方法分为分煎和合煎^[6],本研究中葛根芩连汤配方颗粒剂属于分煎的范畴^[7-8],而传统汤剂属于合煎的范畴^[9]。而中药复方无论是药物分煎后混合和传统汤剂合煎,与单味药物比较,其化学成分含量均会产生变化,研究者就半夏和生姜,单味药物分煎与合煎进行比较,HPLC 指纹图谱结果显示,合煎后存在色谱峰含量变化^[10]。本研究结果显示,颗粒剂指纹图谱 K3 与 K1、K2 存在一定差异,T1、T2 和 T3 指纹图谱未见明显差异,可能与不同医院对应的药材及相应的制作设备、工艺流程等存在差异有关^[11]。有研究^[12]以指纹图谱层方式研究补肾方配方颗粒剂和传统汤剂,通过 HPLC 的研究方法考察最佳的检查波长,并结合不同品牌的 C₁₈ 色谱柱不断的优化其 HPLC 的色谱条件后,研究结果显示补肾方配方颗粒剂和传统汤剂提取物中指纹图谱存在差异,其中配方颗粒剂的主要化学成分提取率大于传统汤剂。本研究结果显示,K1 和 T1、K2 和 T2、K3 和 T3 颗粒剂和传统汤剂的比较,颗粒剂特征峰的含量较传统汤剂高,提示葛根芩连汤配方颗粒剂和传统汤剂的指纹图谱存在差异,而这种差异可能是由于复方合煎与分煎时化学成分的差异而导致的。如果葛根芩连汤配方颗粒剂和传统汤剂在化学成分上存在差异^[13-14],则两者间在药效上也必然存在差异。近年来,中药复方的配方颗粒剂与传统汤剂在药效学上的差异受到了广泛关注,而在研究配方颗粒剂与传

统汤剂的问题时,应该结合药效学从复方整体分析评价配方颗粒剂与传统汤剂的优劣^[15-18];具体差异的化学成分和药效比较,本研究并未展开,后续可配合质谱、红外光谱等进行深入研究。

参考文献

- [1] 续畅,钟萌,马致洁,等. 葛根芩连汤的现代研究进展[J]. 吉林中医药,2015,35(6):629-632.
- [2] 徐蓓蕾,张贵君,崔向微,等. 葛根芩连汤药效组分抑菌生物效价测定[J]. 中华中医药杂志,2013,33(1):230-233.
- [3] 胡耶芳,颜剑. 麻黄汤配方颗粒剂与传统汤剂的疗效比较研究[J]. 实用药物与临床,2017,20(12):1365-1367.
- [4] 张志勇,夏定兵,李伟. 临床应用中药配方颗粒的优劣分析[J]. 湖北中医杂志,2011,33(8):75-76.
- [5] 殷佳,潘晔,蔡雪朦,等. 中药传统汤剂、浸膏剂和配方颗粒剂的比较[J]. 中草药,2017,48(18):3871-3875.
- [6] 艾广凤. 中药复方合煎与分煎的差异性研究进展[J]. 中国卫生产业,2013(24):170-171.
- [7] 杨金团,沈国平. 对中药饮片颗粒剂的应用分析与建议[J]. 中国药业,2003,12(3):66.
- [8] 陈彬,赵爱光. 中药汤剂及主要新剂型的研究现状[J]. 世界中医药,2014,9(3):396-399.

- [9] 邓轶渊,高文远,陈海霞,等. 中药复方合煎与分煎的差异性研究进展[J]. 中草药,2005,36(12):1909-1911.
- [10] 石维,魏飞,魏睦新. 中药药对半夏生姜分煎、合煎 HPLC 组分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(3):4-5.
- [11] 梁光义,曹佩雪,徐必学,等. HPLC 测定葛根芩连汤不同煎液中葛根素的含量[J]. 华西药学杂志,2001,16(5):371-373.
- [12] 史万忠,徐德生,刘力,等. 补肾方分煎和合煎提取物的指纹图谱比较[J]. 中成药,2004,26(1):9-11.
- [13] 章军,刘宇政,王跃生,等. HPLC 同时测定葛根芩连汤中 12 个有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):58-62.
- [14] 张启云,徐良辉,李冰涛,等. HPLC 法同时测定葛根芩连汤中 8 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志,2011,31(7):1425-1429.
- [15] 刘培勋. 中药汤剂制备过程中的化学变化[J]. 中国药房,2000(2):47-48.
- [16] 李艳敏,范颖. 药物的合煎与分煎对方剂治疗作用的影响[J]. 现代中医药,2013,33(5):103-105.
- [17] 李松林,宋景政,徐宏喜. 中药配方颗粒研究浅析[J]. 中草药,2009,40(S1):1-7.
- [18] 黄建平,胡恩. 对免煎中药颗粒临床应用存在问题的探讨[J]. 海峡药学,2008,20(10):207-208.

(2018-05-07 收稿 责任编辑:张雄杰)

(上接第 2303 页)

导下,以经典方剂为研究对象,研究煎煮时间对药效组分的影响,对汤剂的质量控制和临床应用具有重大意义。

参考文献

- [1] 梁锦芬. 中药汤剂疗效的影响因素探讨[J]. 临床合理用药杂志,2016,9(4):179-181.
- [2] 王竹兰,肖相如.《伤寒论》中汤剂的煎煮工艺研究[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(5):906-908.
- [3] 边艳琴,刘平,孙明瑜. 基于方证相关理论解析肝硬化湿热内蕴病机[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2016,18(9):1477-1482.
- [4] 肖旭,朱继孝,罗光明,等. 栀子柏皮汤及其拆方保肝利胆作用实验研究[J]. 中药材,2013,36(7):1132-1135.
- [5] 罗容,张贵君. 中药药效组分的理论与实践(一)[J]. 天津中医药,2013,30(12):759-760.
- [6] 朱广伟,张贵君,汪萌. 配伍组分、配伍比例对芍药甘草汤抗炎镇痛作用的影响[J]. 药学与临床研究,2014,22(4):323-325.
- [7] 朱广伟,张贵君,王晶娟,等. 单因素配伍剂量对经方芍药甘草汤药效组分的影响[J]. 实用药物与临床,2015,18(2):168-173.
- [8] 王国富. 栀子的化学成份及其药理活性[J]. 广东化工,2016,43(20):141-142,132.
- [9] 王亭. 中药栀子有效成分及药理作用的研究进展[J]. 中国药师,

2015,18(10):1782-1784.

- [10] 兰天,曾志,陈颖华. 栀子苷改善 CCl_4 引起的小鼠肝纤维化损伤的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2013,35(16):1752-1755.
- [11] 张博,张婷,王树春. 黄柏的化学成分、质量分析方法及药理作用研究[J]. 现代医药卫生,2013,29(10):1505-1507.
- [12] 孙森凤,张颖颖,褚万春. 黄柏药理作用的研究进展[J]. 山东化工,2017,46(14):99-100.
- [13] 陈兴文. 黄柏的化学成分分析和药理作用研究[J]. 内蒙古中医药,2014,33(31):69-69.
- [14] 姚必瑜,黄智铭. 黄连素对四氯化碳诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学,2016,33(4):424-427.
- [15] 茆玲,冯彩云,刘学燕. 甘草酸制剂治疗病毒性肝炎疗效观察[J]. 湖北中医药大学学报,2016,18(1):67-69.
- [16] 戴应和,龙小琴,张娟,等. 甘草黄酮的抗炎作用及其机制的研究进展[J]. 江西中医药,2017,48(2):68-71.
- [17] 王茅,徐祉君,郑文博. 甘草的临床运用浅析[J]. 光明中医,2017,32(11):1669-1671.
- [18] 卢芳国,张世鹰,吴治谚,等. 中药煎煮的容器、溶媒、时间、火候因素[J]. 中医杂志,2016,57(1):78-80.

(2017-07-03 收稿 责任编辑:杨觉雄)