

基于指纹图谱评价葛根芩连汤中药物的成分分析研究

李 红 田 洁 李 妍 王 艳 张 颖

(河北省唐山市中医医院药学部,唐山,063000)

摘要 目的:采用 HPLC(高效液相)指纹图谱分析研究葛根芩连汤中药物的成分。方法:在指纹图谱研究方法中采用 HPLC-DAD(高效液相-二极管阵列检测器),HPLC 指纹图谱试验色谱条件:进样量为 20 μ L,色谱柱选择直径 5 μ m 的 Ultimate AQ C₁₈ 柱,柱温 30 $^{\circ}$ C,流动相 A 是 0.02 mol/L 醋酸铵 + 0.3% 三乙胺 + 1% 冰醋酸混合而成,最终 PH 值为 4.3;流动相 B 是乙腈,流速统一为 0.7 mL/min。检测波长通过预实验不断调整,最终葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木素、甘草酸铵和甘草次酸的检查波长为 250 nm;黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草苷检测波长为 280 nm;余下对照品检测波长为 346 nm;并对 HPLC 精密度试验、重复性试验、稳定性试验、专属性试验、加样回收率试验、线性回归试验等方法学进行严谨性考察,通过比较混合对照品溶液指纹图谱,葛根芩连汤单味药材指纹图谱和葛根芩连汤指纹图谱,分析研究葛根芩连汤中的 14 个药物成分。结果:1)精密度试验平均相对峰面积 *RSD* 为 0.38%,重复性试验平均相对峰面积 *RSD* 为 1.14%,稳定性试验平均相对峰面积 *RSD* 为 1.03%,专属性试验结果良好。2)14 个药物成分线性回归良好,且加样回收试验中平均回收率的范围是 96.45%~104.69%,*RSD* 的范围是为 0.65%~2.11%。3)本研究根据不同的检测波长 250 nm、280 nm 和 346 nm,将混合对照品指纹图谱分为 3 张图,便于后续分析,同时标注 14 个对照品成分的峰号。4)在检测波长为 250 nm 时,葛根指纹图谱有 11 个特征峰,而甘草有 2 个特征峰;在检测波长 280 nm 时,黄芩有 6 个特征峰,而在检测波长 346 nm 时,黄连有 4 个特征峰。5)在葛根芩连汤的指纹图谱中显示波长 250 nm 时有 12 个特征峰,其中 1~11 主要体现葛根的药物成分特征,而 12 主要体现甘草的药物成分特征;波长 280 nm 时有 7 个特征峰,主要体现甘草和黄芩的药物成分特征;波长 346 nm 时有 4 个特征峰,主要体现黄连的药物成分特征。结论:从整体性解析葛根芩连汤剂 HPLC 指纹图谱的药物成分来源,为葛根芩连汤中含有的药物成分等物质基础、药理相关性研究提供实验基础。

关键词 葛根芩连汤;高效液相;二极管阵列检测器;指纹图谱;成分分析;精密度;稳定性;重复性

Study on the Composition Analysis of the Drugs in Gegen Baicalin Decoction Based on Fingerprint

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

(Department of pharmacy, Tangshan City traditional Chinese medicine hospital, Tangshan 063000, China)

Abstract **Objective:** To study the composition of the drugs in Gegen Qin Lian Decoction by HPLC (high performance liquid) fingerprint. **Methods:** HPLC-DAD was used in the fingerprint research method (high performance liquid chromatography with diode array detector), HPLC fingerprint chromatography test conditions: sample volume of 20 μ L, Ultimate AQ C₁₈ column with diameter of 5 μ m column, the column temperature was 30 degrees, the mobile phase is A 0.02 mol/L + 0.3% three + 1% ammonium acetate ethylamine acetic acid mixture, the final pH was 4.3; the mobile phase is B acetonitrile, 0.7 mL/min uniform velocity. The detection wavelength by constantly adjusting the final pre experiment, puerarin, daidzin, daidzein, genistein, ammonium glycyrrhizinate and glycyrrhetic acid test wavelength was 250 nm; baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin and liquiritin detection wavelength was 280 nm; the remaining standard detection wavelength was 346 nm; and the HPLC precision test, repeatability test, stability test, specificity test, recovery test, linear regression test methodology for rigorous investigation, through the comparison of mixed standard solution of fingerprint, gegenqinlian tang single fingerprint and gegenqinlian tang fingerprint analysis of Radix Puerariae Qinlian Decoction of 14 ingredients. **Results:** 1) The average relative peak area *RSD* of precision test was 0.38%, the average relative peak area *RSD* of repeatability test was 1.14%, the average relative peak area *RSD* of stability test was 1.03%, and the specificity test result was good. 2) The linear regression of 14 drug components is good, and the range of average recovery in the sample recovery test is 96.45%~104.69%, and the range of *RSD* is 0.65%~2.11%. 3) According to different detection wavelengths 250 nm, 280 nm and 346 nm, the fingerprint of mixed reference products was divided into 3 diagrams, which was convenient for subsequent analysis, and 14 peaks of reference compounds were also labeled. 4) At the detection wavelength of 250 nm, there were 11 characteristic peaks in the fingerprint of radix puerariae, while 2 characteristic peaks in Glycyrrhiza uralensis Fisch. There were 6 charac-

teristic peaks in *Scutellaria baicalensis* Georgi at the detection wavelength 280, while there were 4 characteristic peaks in *Rhizoma Coptidis* at the detection wavelength of 346 nm. 5) There are 12 characteristic peaks in Gegenqinlian Decoction fingerprint displayed in the wavelength of 250 nm, characteristics of the 1 ~ 11 drug ingredients mainly puerarin and 12 among them, mainly licorice ingredient characteristics; 280 nm wavelength of 7 peaks, mainly reflected the drug composition characteristics of liquorice and *Radix Scutellariae*; wavelength 346 nm there are 4 characteristic peaks, mainly reflected the drug composition characteristics of *Coptis chinensis*. **Conclusion:** The source of drug composition of Gegen Qin Lian Decoction HPLC fingerprint is analyzed integrally, providing experimental basis for the material basis and pharmacological correlation research of Gegen Qin Lian decoction.

Key Words Gegen Qinlian Decoction; High performance liquid phase; Diode array detector; Fingerprint; Component analysis; Precision; Stability; Repeatability

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.10.060

葛根芩连汤是出自张仲景的代表作《伤寒论》中的表里双解的代表方,该方全方共4味药物,分别为葛根、黄连、黄芩、甘草;《伤寒论》中原文描述“太阳病,桂枝证,医反下之,利遂不止,脉促者,表未解也,喘而汗出者,葛根黄连黄芩汤主之”。说明患者表证未除,邪陷入里,肠热下利,而葛根芩连汤治之以解表清里、升清止利^[1]。葛根芩连汤现代应用主要为热性传染病、以腹泻为主诉的疾病等^[2-3],而在现代药物分析中有关该方物质基础和质量控制等方面的研究报道质量参差不齐,目前中药分析多采用中药指纹图谱这一研究手段,对中药(复方)成分进行质量评价体系分析;然目前的多数研究大多数以个别几个成分入手进行研究^[4],因此所获得的指纹图谱仅有色谱峰的图谱信息,或特征性色谱峰与复方药物成分的相关性信息研究有限^[5]。基于此,本课题组从整体角度采用HPLC指纹图谱的方法分析葛根芩连汤10种以上多种药物成分的深入研究,为葛根芩连汤中含有的药物成分等物质基础、药理相关性研究提供实验基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 购于安捷伦科技(中国)有限公司的HPLC(高效液相色谱仪,型号:Agilent-1100)和DAD(二极管阵列检测器,型号:G1315DAD)。

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)、大豆苷对照品(111738-200501)、大豆苷元对照品(486-66-8)、黄芩苷对照品(110715-200514)、汉黄芩苷对照品(51059-44-0)、黄芩素对照品(111514-200403)、汉黄芩素对照品(111514-200403)、小檗碱对照品(110713 200208)、盐酸巴马汀对照品(0732 200005)、盐酸药根碱对照品(0733 200005)、甘草酸铵对照品(110731-200614)、甘草次酸对照品

(110723-200612)、甘草苷对照品(111610-200604)、染料木素对照品(111704-200501)。

1.3 分析样品 葛根芩连汤:葛根、黄连、黄芩、甘草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 HPLC 指纹图谱试验进样量为 20 μL,色谱柱选择直径 5 μm 的 Ultimate AQ C₁₈ 柱(青岛君道生物技术有限公司),柱温 30 ℃,流动相 A 是 0.02 mol/L 醋酸铵 + 0.3% 三乙胺 + 1% 冰醋酸混合而成,最终 PH 值为 4.3;流动相 B 是乙腈,流速统一为 0.7 mL/min,具体洗脱程序见表 1。检测波长通过预实验不断调整,最终葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木素、甘草酸铵和甘草次酸的检查波长为 250 nm;黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草苷检测波长为 280 nm;余下对照品检测波长为 346 nm。本研究中 HPLC 方法考察和指纹图谱等均采用此色谱条件。

表 1 梯度洗脱表

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0 ~ 10	85	15
10 ~ 20	75	25
20 ~ 30	70	30
30 ~ 45	60	40
45 ~ 55	50	50
55 ~ 65	35	65
65 ~ 75	35	65
75 ~ 90	25	75

2.2 对照品溶液的制备 精密称量各个对照品,分别加入 60% 的甲醇制作对照品溶液,将 1.029 g/L 葛根素对照品、0.201 g/L 大豆苷对照品、0.049 g/L 大豆苷元对照品、0.384 g/L 黄芩苷对照品、0.062 g/L 汉黄芩苷对照品、0.106 g/L 黄芩素对照品、0.036 g/L 汉黄芩素对照品、0.059 g/L 小檗碱对照品、0.043 g/L 盐酸巴马汀对照品、0.060 g/L 盐酸药根碱对照品、0.392 g/L 甘草酸铵对照品、

0.038 g/L 甘草次酸对照品、0.303 g/L 甘草苷对照品和 0.0132 染料木素对照品等不同质量浓度的单一对照品混合均匀,过滤得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:葛根芩连汤的药物饮片分析样品为葛根 30 g、黄芩 20 g、炙甘草 6 g、黄连 6 g,均由河北伊康药业有限公司提供。单一药物的供试品溶液均分别以 400 mL 水浸泡 20 min 后煎煮 30 min,以 0.45 μm 过滤膜过滤后获得葛根、黄芩、黄连、甘草供试品溶液;葛根芩连汤的供试品溶液,同上法浸泡药物,葛根先煎 20 min 后纳入余下几味药物继续煎 30 min,以 0.45 μm 过滤膜过滤后获得葛根芩连汤供试品溶液。

2.4 专属性试验 通过专属性试验检测葛根芩连汤各味药物的专属性,相互间是否存在干扰因素,结果显示在相对保留时间内各个峰之间不存在杂质峰,专属性良好。

2.5 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.6 mL,分别置 2 mL 量瓶中,加 60% 甲醇稀释至刻度,摇匀后制得不同质量浓度的混合对照品溶液,采用 HPLC 色谱法,记录峰面积;以对照品进样量(μg)为横坐标(X,峰面积积分为纵坐标(Y),绘制标准曲线,结果显示 14 个对照品线性关系均良好。

2.6 中间精密度试验 精密称取同一葛根芩连汤供试品溶液,连续进样 6 次,结果显示共有峰的平均相对峰面积 RSD 为 0.38%,表面高效液相色谱仪的精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 将葛根芩连汤室温放置 0、2、4、12、24 h 分别常规进样测定 HPLC 色谱图,结果显示平均相对峰面积 RSD 为 1.03%,表明葛根芩连汤供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 以同一批药材,根据 2.2 配制 6 份葛根芩连汤供试品溶液,常规进样测定 HPLC 色谱图,结果显示平均相对峰面积 RSD 为 1.14%,表明供试品溶液提取方法具有良好重复性,且高效液相色谱仪重复性良好。

2.9 回收率试验 精密称取 6 份已知含量的同一批葛根芩连汤样品各约 4.75 g,分别精密加入 10 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的范围是 96.45%~104.69%,RSD 的范围是为 0.65%~2.11%,表明 HPLC 方法的准确度良好。见表 2。

2.10 样品测定结果

2.10.1 混合对照品溶液的指纹图谱 本研究根据

不同的检测波长 250 nm、280 nm 和 346 nm,将混合对照品指纹图谱分为 3 张图,便于后续分析,同时标注 14 个对照品成分的峰号。见图 1。

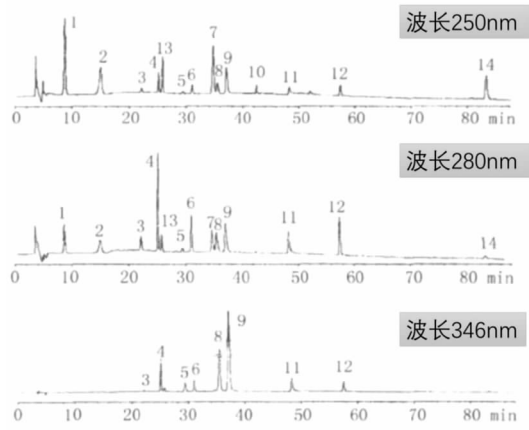


图 1 混合对照品溶液的指纹图谱

注:1 葛根素,2 大豆苷,3 甘草苷,4 黄芩苷,5 盐酸药根碱,6 汉黄芩苷,7 大豆苷元,8 盐酸巴马汀,9 小檗碱,10 甘草酸铵,11 黄芩素,12 汉黄芩素,13 染料木苷,14 甘草次酸

表 2 加样回收试验结果

成分	样品中量 (mg)	加样量 (mg)	测得量 (mg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
葛根素	18.99	18.47	37.46	100.31	0.68
大豆苷	4.43	4.46	8.99	102.56	1.23
大豆苷元	0.41	0.51	0.94	104.69	1.47
黄芩苷	1.53	1.63	3.09	96.45	1.16
汉黄芩苷	0.66	0.71	1.37	101.95	1.94
黄芩素	1.82	1.84	3.65	100.08	1.52
汉黄芩素	0.71	0.82	1.53	100.75	0.65
小檗碱	0.72	0.83	1.54	100.76	0.66
盐酸巴马汀	1.82	1.83	3.65	100.08	1.52
盐酸药根碱	0.96	1.00	1.98	100.11	2.04
甘草酸铵	9.74	8.59	19.34	100.11	1.52
甘草次酸	0.01	0.01	0.03	101.06	2.03
甘草苷	5.13	5.02	10.09	99.05	2.11
染料木素	0.03	0.03	0.05	98.06	2.10

2.10.2 单一药物供试品溶液的指纹图谱 在检测波长为 250 nm 时,葛根指纹图谱有 11 个特征峰,而甘草有 2 个特征峰;在检测波长 280 nm 时,黄芩有 6 个特征峰,而在检测波长 346 nm 时,黄连有 4 个特征峰。见图 2。

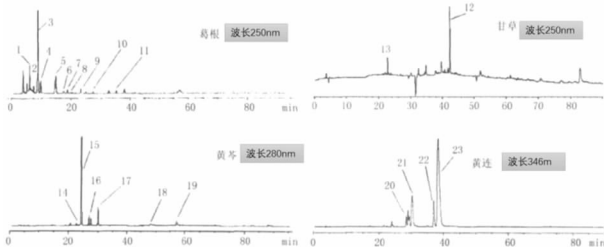


图 2 葛根、黄芩、黄连、甘草单一药物的指纹图谱

2.10.3 葛根芩连汤药物成分分析 在葛根芩连汤的指纹图谱中显示波长 250 nm 时有 12 个特征峰,其中 1~11 主要体现葛根的药物成分特征,而 12 主要体现甘草的药物成分特征;波长 280 nm 时有 7 个特征峰,主要体现甘草和黄芩的药物成分特征;波长 346 nm 时有 4 个特征峰,主要体现黄连的药物成分特征,在与混合对照品指纹图谱比较分析后,由图 3 及其注解中可见葛根芩连汤指纹图谱各个峰号对应的药物成分,我们发现葛根芩连汤未检测出甘草次酸和染料木苷成分色谱峰。

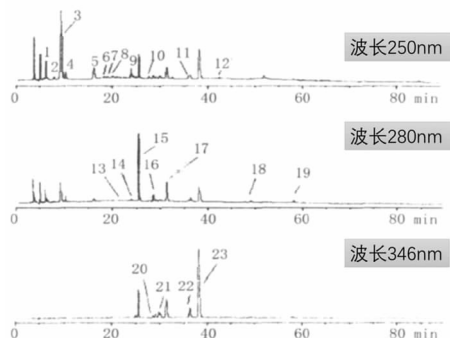


图 3 葛根芩连汤不同检测波长的指纹图谱

注:3. 葛根素,5 大豆苷,11 大豆苷元,12 甘草酸胺,13 甘草苷,15 黄芩苷,17 汉黄芩苷,18 黄芩素,19 汉黄芩素,20 盐酸药根碱,22 盐酸巴马汀,23 小檗碱

3 讨论

3.1 指纹图谱的建立 中药指纹图谱研究目前多采用 HPLC 的研究手段,以作为一种多指标的质量控制模式,通过指纹图谱结合多成分分析,相对全面体现复方中所含化学成分,这一中药指纹图谱研究已成为广泛被国内外研究人员认可的中药质量评价模式^[6-7]。本研究在 3 个不同波长里(250、280、346 nm)考察了葛根芩连汤供试品溶液、葛根芩连汤单一药物供试品溶液和 14 种混合对照品溶液,因为葛根芩连汤中的药物成分较复杂,若只选择一个波长来检测,可能或漏掉很大一部分的药物成分,而对结果造成一定的误差,因此本研究选择 3 个不同波长进行检测,并为了方便不同波长间指纹图谱的比较分析,在结果呈现时将指纹图谱根据波长切成 3 张图片。葛根芩连汤供试品溶液指纹图谱经多点校正法标定了 23 个共有峰,通过比较混合对照品指纹图谱、单味药材指纹图谱和葛根芩连汤供试品指纹图谱出峰位置,23 个共有峰得到归属,12 个共有峰确定了化学成分,其中染料木苷和甘草次酸未检测出来,可能与这 2 个药物成分的含量比较低有关,需要后续进一步研究探讨。本实验结果也表明,葛根芩连汤提取方法稳定且药物成分较多。

3.2 指标成分的选择 中药复方药效的发挥与其中的化学成分密不可分,而其中具体的化学成分,以及各药物成分间含量的高低、药物成分的稳定性等都与药效的强弱有至关重要的关系^[8-11]。通过与多指标成分定量相结合,中药指纹图谱能够相对全面且有效的控制中药质量,这一研究通经被大量研究运用。大量文献报道显示^[12-13],葛根中的葛根素、大豆苷、大豆苷元是被普遍认可的植物类雌激素,葛根素具有抗炎和改善血液流变等作用;大豆苷、大豆苷元具有镇痛、松弛肌肉等作用缓解腹泻引起的腹痛。黄芩中的黄芩苷和汉黄芩苷具有抗炎活性,黄芩素和汉黄芩素可增加血流,改善血液循环。黄连中的盐酸药根碱、小檗碱和盐酸巴马汀具有抗氧化、抗炎活性。甘草中的甘草苷、甘草酸铵具有抗炎、抗变态反应等作用。本研究所选取的 14 个成分,均与腹泻为主的疾病的发病环节有着密切的关系,从有效成分角度将其作为质量控制的指标成分,对葛根芩连汤的内在质量作出了更为科学的评价。

参考文献

- [1] 周贤,刘松林,梅国强葛根芩连汤拓展运用思路[J]. 中医杂志, 2015,56(19):1639-1640.
- [2] 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,(6):629-631,632.
- [3] 陈丽红,唐于平,王强. 葛根芩连汤的现代研究进展[J]. 中草药, 2010,41(4):附 8-12.
- [4] 刘洋,朱美玲,孙慧娟,等. 葛根芩连汤中小檗碱的中药生物药剂学分类系统属性研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(8):1545-1550.
- [5] 李建锋,荀丽英,李航,等. 中药成分的生物学活性评价及筛选[J]. 中草药,2015,46(4):588-594.
- [6] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [7] 李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药,2013,44(22):3095-3104.
- [8] 陈修平,寻克丽,王一涛. 中药复方药效物质基础的系统药理学评价[J]. 中草药,2010,41(1):1-5.
- [9] 郭丽丽,王阶. 论中药复方药效研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(7):851-853.
- [10] 姜鹏,窦圣姍,柳润辉,等. 中药复方药效物质基础研究思路与方法[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2008,10(1):11-16.
- [11] 彭苗苗,方芸. 中药复方药效物质基础研究进展[J]. 中国药房, 2010,15(7):659-661.
- [12] 杨锦生. 葛根芩连汤治疗腹泻的临床用量分析[J]. 医药前沿, 2015,5(17):345-346.
- [13] 余林中,伍杰勇,罗佳波,等. 葛根芩连汤配伍抗腹泻药效实验研究[J]. 中成药,2005,27(3):300-304.