

HPLC 同时测定黄连阿胶汤合煎液中 芍药苷黄芩苷小檗碱的含量

张振凌^{1*}, 冯晟楠², 贾利利¹

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473000)

〔摘要〕 目的:建立高效液相色谱法同时测定黄连阿胶汤中芍药苷、黄芩苷、小檗碱 3 种成分的含量。方法:采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm),流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm,柱温 25 ℃。结果:黄连阿胶汤中芍药苷、黄芩苷、小檗碱平均质量分数分别为 1.64%,7.51%,3.30%。结论:该法操作简便、准确且精密度和重复性良好,可用于黄连阿胶汤的质量控制。

〔关键词〕 高效液相色谱法; 黄连阿胶汤; 芍药苷; 黄芩苷; 小檗碱

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2014)05-0075-03

〔doi〕 10.11653/syfy2014050075

Simultaneous Determination of Paeoniflorin, Baicalin and Berberine in the Mixed Decoction of Huanglian Ejiaotang by HPLC

ZHANG Zhen-ling^{1*}, FENG Sheng-nan², JIA Li-li¹

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Nanyang Medical College, Nanyang 473000, China)

〔Abstract〕 **Objective:** A simple and rapid HPLC method was established for simultaneously determining of paeoniflorin, baicalin and berberine in the mixed decoction of Huanglian Ejiaotang. **Method:** Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm) chromatographic column, acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution gradient elution were applied. Analyses were performed at 35 ℃ with a flowrate of 1.0 mL·min⁻¹ and UV detection at 240 nm, **Result:** The content of paeoniflorin, baicalin and berberine were 1.64%, 7.51%, 3.30% respectively. **Conclusion:** The developed method can be applied to the intrinsic quality control of Huanglian Ejiaotang.

〔Key words〕 HPLC; Huanglian Ejiaotang; paeoniflorin; baicalin; berberine

黄连阿胶汤出自“医圣”张仲景所著《伤寒杂病论》^[1],组成为“黄连四两,黄芩二两,芍药二两,鸡子黄二枚,阿胶三两”,主治不寐、痢疾、血证、温病等。方中各单味药的化学成分及药理作用研究较为深入^[2-5],但对于其中黄芩、黄连、白芍的合煎液现代并没有明确的含量测定及质量控制方法。本实验建立 HPLC 同时测定黄连阿胶汤合煎液中芍药苷、黄芩苷、小檗碱 3 种成分含量的方法。

1 材料

1.1 仪器 LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津),CLASS-VP 数据处理系统,Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm),BS210S 型 1/万电子天平(北京 SARTORIUS 有限公司,max210 g,d 0.1 mg),AE240 型 1/10 万电子分析天平(瑞士)。

1.2 试剂 盐酸小檗碱(中国药品生物制品检定所,批号 110713-200911),黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110715-200212),芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110736-201035),无水乙醇(天津市富裕精细化工有限公司,分析纯,批号 20090820),乙腈(Dikmapure, DIKMA TECHNOLOGIES INC. LOT. NO. 74112),色

〔收稿日期〕 20130802(005)

〔基金项目〕 2010 年中医药行业科研专项(201007010)

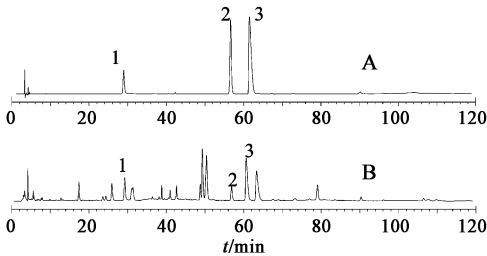
〔通讯作者〕 * 张振凌,从事中药炮制研究,E-mail: zhangzl6758@163.com

谱甲醇(天津四友精细化学品有限公司,一级色谱纯,批号 334002-07224),磷酸(天津市凯通化学试剂有限公司,分析纯,批号 100723),双蒸水(自制)。

1.3 药材饮片 黄连饮片(南京海源饮片公司,批号 110523),黄芩饮片(南京海源饮片公司,批号 110217),白芍饮片(安徽万珍中药饮片厂,批号 101107),三味饮片经河南中医学院生药学科董诚明教授鉴定分别为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎、唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根加工制成的饮片。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 以十八烷基键合硅胶为填充剂;以 A 乙腈-B0.1% 磷酸溶液为流动相,梯度洗脱(0 ~ 28 min, 90% ~ 86% B; 28 ~ 32 min, 86% ~ 80.6% B; 32 ~ 42 min, 80.6% ~ 77.4% B; 42 ~ 62 min, 77.4% ~ 77% B; 62 ~ 72 min, 77% ~ 74% B; 72 ~ 100 min, 74% ~ 60% B; 100 ~ 120 min, 60% B),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 240 nm,柱温 25 ℃,进样量 20 μL。见图 1。



A. 混合对照品;B. 合煎液样品;1. 芍药苷;2. 黄芩苷;3. 小檗碱
图 1 黄连阿胶汤 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取芍药苷对照品 0.84 mg,黄芩苷对照品 1.98 mg,小檗碱对照品 1.82 mg,置于 10 mL 量瓶中,加色谱甲醇至刻度,摇匀,制得芍药苷 0.084 g·L⁻¹,黄芩苷 0.198 g·L⁻¹,小檗碱 0.182 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 供试品溶液的制备根据黄连阿胶汤原方中的煎煮条件并参考相关文献^[6-8],确定黄连阿胶汤合煎液的制备方法为:取复方用量的 3 种饮片黄连 12 g,黄芩 6 g,白芍 6 g,加水 400 mL,自煮沸开始计时煎煮 30 min,煎煮 2 次,4 层纱布过滤,合并滤液,将上述煎煮过程得到的滤液定容于 1 000 mL 量瓶中,再吸取 1 mL 用甲醇定容至 5 mL,即得供试品溶液。

2.4 线性关系的考察 将 2.3 项下配制的混合对照品溶液注入高效液相色谱仪,进样量依次为 2,4,6,8,

10,12 μL 测定其峰面积积分值并进行回归分析。

其回归方程分别为 $Y_{\text{芍药苷}} = 651\,265X - 9\,485.8$ ($r = 0.999\,9$); $Y_{\text{黄芩苷}} = 1\,465\,793.506\,5X + 45\,762.2$ ($r = 0.999\,9$); $Y_{\text{小檗碱}} = 3\,979\,782.81X + 124\,073.2$ ($r = 0.999\,9$)。

结果表明芍药苷在 0.168 ~ 1.008 μg,黄芩苷在 0.396 ~ 2.376 μg,小檗碱在 0.364 ~ 2.184 μg 峰面积与进样量呈良好的线性关系。

2.5 重复性 取同一批样品,按供试品溶液的制备方法平行制备 5 份,分别进样,结果证明重复性良好,RSD 分别为芍药苷 1.6%、黄芩苷 2.8%、小檗碱 1.2%。

2.6 精密度与稳定性 取同一样品重复进样 5 次,测得峰面积的 RSD 分别为芍药苷 0.09%、黄芩苷 0.02%、小檗碱 0.2%。取同一样品每隔一段时间进样 1 次,测得供试品在 24 h 内稳定,RSD 分别为芍药苷 2.1%、黄芩苷 1.5%、小檗碱 1.1%

2.7 加样回收率试验 设计 3 组不同浓度样品进行加样回收实验,按表 1 分别精密量取 3 组合煎样品液和不同对照品溶液加入 5 mL 量瓶中,每组 3 份,用甲醇定容于至刻度线,进样量 20 μL,注入液相色谱仪测定计算,回收率结果良好,结果见表 1 ~ 3。

表 1 芍药苷加样回收率试验

No.	对照品 加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.041 0	0.088 5	99.715		
2	0.041 0	0.092 2	105.599		
3	0.041 0	0.088 5	99.602		
4	0.051 2	0.099 6	101.473		
5	0.051 2	0.099 6	101.388	99.37	3.14
6	0.051 2	0.097 0	96.295		
7	0.061 5	0.105 5	97.040		
8	0.061 5	0.107 4	97.147		
9	0.061 5	0.106 7	96.110		

注:取样量均为 0.5 mL(表 2,3 同)。

2.8 样品测定 按供试品溶液方法制备 3 份黄连阿胶汤合煎液样品,每次进样 20 μL,测得峰面积积分值,求得样品中芍药苷、黄芩苷、小檗碱含量,结果见表 4。

3 讨论

《中国药典》规定三味饮片单独测定时的检测波长分别为黄连 345nm,黄芩 280 nm,白芍 230 nm,通过预试验进行 190 ~ 370 nm 扫描发现,波长 200 ~ 230 nm 时基线漂移严重,3 种成分峰形较小,250 nm

表 2 黄芩苷回收率试验

No.	对照品 加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.172 6	0.382 3	96.734		
2	0.172 6	0.385 1	98.385		
3	0.172 6	0.384 7	98.109		
4	0.215 7	0.424 2	96.828		
5	0.215 7	0.426 0	97.654	99.20	2.28
6	0.215 7	0.433 9	101.287		
7	0.258 9	0.481 7	102.886		
8	0.258 9	0.479 0	101.854		
9	0.258 9	0.471 8	99.044		

表 3 小檗碱回收率试验

No.	对照品 加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.162 4	0.351 3	93.423		
2	0.162 4	0.353 4	94.720		
3	0.162 4	0.356 6	96.673		
4	0.203 0	0.393 9	95.719		
5	0.203 0	0.399 3	98.402	96.77	2.22
6	0.203 0	0.399 8	98.641		
7	0.243 6	0.434 6	96.472		
8	0.243 6	0.434 3	96.355		
9	0.243 6	0.444 4	100.502		

表 4 黄连阿胶汤中芍药苷黄芩苷小檗碱含量测定 %

样品	芍药苷	黄芩苷	小檗碱
1	1.68	7.45	3.37
2	1.64	7.58	3.21
3	1.61	7.49	3.32

以后芍药苷峰形逐渐变小,至 280 nm 几乎完全消失,240 nm 处基线平稳,3 种成分峰形峰面积以及分离度均较为理想,所以最终确定 240 nm 为试验选用的检测波长。考察了甲醇-磷酸水,乙腈-磷酸水,乙腈-磷酸二氢钾溶液^[9-10],其中乙腈-磷酸水和乙腈-磷酸二氢钾溶液流动相系统峰形以及分离度较理想,但考虑到以盐溶液作为流动相容易堵塞色谱柱,冲洗较为麻烦,最终选择乙腈-0.1% 磷酸水作为流动相进行梯度洗脱。

HPLC 图谱中 240 nm 检测波长条件下 70 min 后并无明显色谱峰出现,但是通过全波长扫描该部分有其他组分溶出,连续进针测定情况下若不洗脱

完全,会对后续进针的图谱造成干扰,所以洗脱程序设定为 120 min。

黄连、黄芩合煎液放置后会产生大量沉淀^[11],沉淀成分经实验测定初步分析以黄芩苷和小檗碱为主,产生沉淀的原因是黄连中含有的异喹啉型生物碱为碱性化合物与黄芩中含有的多酚类成分黄芩苷等酸性化合物相互结合,生成了分子量较大的水不溶性化合物。合煎液的有效成分虽然有可能相互结合生成沉淀,但是口服后在胃液和肠液的作用下均能被分解^[12],因此若仅测定合煎液中上清液的成分含量是不科学的,测定成分时应待合煎液冷却沉淀完全后,摇匀,然后取样进行测定,才能保证测定结果准确反映合煎液中的成分含量。

[参考文献]

[1] 张仲景. 伤寒论. 第 6 卷[M]. 北京:学院出版社, 2009:107.

[2] 王琦,李志峰,陈刚,等. 黄连的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):74.

[3] 钱智磊,李欢,朱华旭,等. 黄连解毒汤中指标性成分药动学与药效学相关性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):122.

[4] 徐丹洋,陈佩东,张丽,等. 黄芩的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):78.

[5] 王甫成,时维鹏,汪翠妮. 不同加工方法对亳白芍中芍药苷及水溶性浸出物含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):75.

[6] 张学慧,徐国文. 中药煎煮方法浅析[J]. 中国民族民间医药, 2009,18(6):118.

[7] 穆兰澄,曹京梅,牟继征,等. 中药煮散与自动煎药机煎煮液的煎出率比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(18):39.

[8] 穆兰澄,仝小林,刘峰,等. 中药饮片煎煮过程中吸水量的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):7.

[9] 李新中,雷鹏,刘韶. 多波长高效液相色谱法同时测定黄连解毒汤中 3 类成分[J]. 中国中药杂志,2006, 31(20):1686.

[10] 韩凤梅,郭小龙,蔡敏,等. 液相色谱法同时测定芩连片中芍药苷、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量[J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2007, 29(4):417.

[11] 乔梁,彭嘉柔,濮训生. 黄连、黄芩药对煎煮液沉淀物的分析[J]. 中国中药杂志,1999,24(6):352.

[12] 李建荣. 中药沉淀性配伍的研究[C]. 北京:2002 中药研究论文集,2002:491.

[责任编辑 顾雪竹]