

# 葛根芩连注射剂中 3 种有效成分的 HPLC 法测定及其优化

何 敏<sup>1</sup>, 舒 刚<sup>2</sup>, 杨 乐<sup>2</sup>, 张 伟<sup>2</sup>, 符华林<sup>2\*</sup>

(1. 信阳农林学院 动物科学系, 河南 信阳 464000; 2. 四川农业大学 动物医学院, 四川 雅安 625014)

**摘要:** 为了优化和验证葛根芩连注射剂中葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱 3 种成分的高效液相色谱 (HPLC) 测定方法, 选用 Kromsil ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相分别为甲醇-水 (30 : 70, V/V)、甲醇-水-磷酸 (40 : 60 : 0.2, V/V)、乙腈-水-磷酸二氢钾 (32 : 68 : 0.3, V/V), 检测波长分别为 251、280、348 nm, 柱温 25 ℃, 流速 1.0 mL/min。结果显示, 葛根素在 0.7~4.2 μg/mL 有良好的线性关系, 平均回收率为 98.8%; 黄芩苷在 4.3~25.8 μg/mL 有良好的线性关系, 平均回收率为 95.3%; 盐酸小檗碱在 4.0~24.0 μg/mL 有良好的线性关系, 平均回收率为 96.4%。葛根芩连注射剂中葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱含量分别为 2.086、2.573、6.836 mg/mL, 且批内变异系数均小于 2%, 批间变异系数均小于 3%, 符合检测要求。表明优化后的 HPLC 法准确、简便、快速, 可用于葛根芩连注射剂的质量控制和评价。

**关键词:** 葛根芩连注射剂; 有效成分; 测定; 高效液相色谱法; 优化

中图分类号: S853.74 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)06-0152-05

## The Content Determination and Optimization of Three Virtual Components in Gegenqinlian Injection by HPLC

HE Min<sup>1</sup>, SHU Gang<sup>2</sup>, YANG Le<sup>2</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, FU Hua-lin<sup>2\*</sup>

(1. College of Animal Science of Xinyang College of Agriculture and Forestry, Xinyang 464000, China;

2. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** In order to establish a simple HPLC method for determining the content of three virtual components in Gegenqinlian injection, Kromsil ODS column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The HPLC system for puerarin, baicalin, berberine used the mobile phase composed of methanol-water(30 : 70, V/V), methanol-water-phosphoric acid(40 : 60 : 0.2, V/V) and acetonitrile-water-potassium dihydrogen phosphate(32 : 68 : 0.3, V/V), respectively, with a flow rate of 1.0 mL/min and the column temperature was maintained at 25 ℃. The detection wavelength was set at 251 nm, 280 nm and 348 nm, respectively. The results showed that the puerarin calibration curve was linear in the range of 0.7—4.2 μg/mL with the average recoveries was 98.8%. The calibration curve of baicalin was linear in the range of 4.3—25.8 μg/mL with the average recoveries was 95.3%. The calibration curve of berberine was linear in the range of 4.0—24.0 μg/mL with the average recoveries is 96.4%. The content of puerarin, baicalin and berberine was controlled as qualified more than 2.086 mg/mL, 2.573 mg/mL and 6.836 mg/mL, with CV for within-run

收稿日期: 2013-11-07

基金项目: 四川省教育厅重点项目(11ZA085)

作者简介: 何 敏(1978-), 女, 四川蓬溪人, 讲师, 硕士, 主要从事兽医药理及药物制剂研究。E-mail: hemin1978@163.com

\* 通讯作者: 符华林(1972-), 男, 四川广安人, 教授, 博士, 主要从事药剂学研究。E-mail: fhl2005@163.com

assays was less than 2% and CV for between-run assays was 3%, respectively. This method was accurate, convenient and quick. It can be used for Gegenqinlian injection quality control.

**Key words:** Gegenqinlian injection; virtual components; determination; HPLC; optimization

葛根芩连汤来源于《伤寒论》中葛根黄芩黄连汤<sup>[1]</sup>(葛根、炙甘草、黄芩、黄连),具有清泄里热、解肌散邪的功效,主治表证未解、热邪入里证。在兽医临床上,其主要用于家畜湿热证的治疗,治疗牛痢疾、仔猪黄白痢及畜禽吐泻、下痢等症效果良好<sup>[2-5]</sup>。该方治疗湿热证疗效确切,已被制成结肠柱塞胶囊、巴布剂、分散片、微丸等多种剂型<sup>[6]</sup>。为提高疗效,易于施治,笔者所在课题组将其制备成可供肌注的葛根芩连注射剂,葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱为该制剂的主要有效成分。目前,中药复方制剂中葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱的含量测定有高效毛细管电泳法、紫外-可见分光光度法、薄层扫描法等<sup>[7-9]</sup>。以上这些方法操作复杂,而高效液相色谱(HPLC)法灵敏度高、简便易操作,鉴于此,对葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱含量的HPLC测定方法进行优化和验证,以期建立简单快速、定量准确、重现性好的测定方法,为葛根芩连注射剂的质量控制和评价提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品与试剂

葛根、黄芩、黄连、甘草均购自四川雅安市三九中药材公司,葛根素(110752-200511)、黄芩苷(110715-200815)、盐酸小檗碱(110713-200515)均购自中国药品生物制品检定所,葛根芩连注射剂自制。

孔径0.22 μm 偏氟滤膜购自上海亚东核级树脂有限公司,磷酸二氢钾(分析纯)购自成都科龙化工试剂厂,甲醇、乙腈(色谱纯)购自上海陆都化学试剂厂,磷酸(分析纯)购自广东光华化学试剂厂。

### 1.2 仪器

LC-2010HT 高效液相色谱仪购自岛津公司,S-120D 超声波清洗机购自上海新芝生物技术研究, Sartorius-BS110S 电子天平购自深圳市朗普电子科技有限公司,KEN-012-TY6112 冷冻离心机购自美国科峻仪器公司,H2S-H 水浴振荡器购自哈尔滨东明医疗仪器厂。

### 1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱为 Kromsil ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

葛根素:流动相为甲醇-水(30:70,V/V),流

速1.0 mL/min,检测波长251 nm,柱温25℃,进样量10 μL。

黄芩苷:流动相为甲醇-水-磷酸(40:60:0.2,V/V),流速1.0 mL/min,检测波长280 nm,柱温25℃,进样量10 μL。

盐酸小檗碱:流动相为乙腈-水-磷酸二氢钾(32:68:0.3,V/V),流速1.0 mL/min,检测波长348 nm,柱温25℃,进样量10 μL。

#### 1.3.2 溶液配制

1.3.2.1 标准品溶液的配制 精密称取葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱标准品适量,无水甲醇溶解,配制含葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱质量浓度分别为0.07、0.43、0.40 mg/mL的贮备液。

1.3.2.2 供试溶液的制备 分别取葛根15 g、黄芩9 g、黄连9 g、甘草6 g,粉碎成粗粉,加药材11倍量的水,煎煮2次,每次1.5 h。加无水乙醇至终体积分数为80%,于4℃冰箱静置沉淀2次。过滤后收集滤液,用旋转蒸发仪(75℃)将滤液浓缩至25 mL。

1.3.2.3 阴性对照供试品溶液的制备 按处方比例分别精密称取黄芩9 g、黄连9 g、甘草6 g;葛根15 g、黄连9 g、甘草6 g;葛根15 g、黄芩9 g、甘草6 g,按1.3.2.2方法制备。

1.3.3 标准曲线的绘制 精密吸取上述葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱贮备液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL,分别置于100 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度。摇匀,制备0.7、1.4、2.1、2.8、3.5、4.2 μg/mL的葛根素系列标准溶液,含黄芩苷为4.3、8.6、12.9、17.2、21.5、25.8 μg/mL的系列标准溶液,含盐酸小檗碱为4.0、8.0、12.0、16.0、20.0、24.0 μg/mL的系列标准溶液,按上述色谱条件分别进样10 μL测定。以峰面积(Y)为纵坐标,分别以葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱的质量浓度(X, μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程。

1.3.4 回收率及精密度试验 准确吸取上述葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱贮备液适量,用无水甲醇配制含葛根素质量浓度为0.7、2.1、3.5 μg/mL溶液;黄芩苷质量浓度为4.3、12.9、21.5 μg/mL溶液;盐酸小檗碱质量浓度为4.0、12.0、20.0 μg/mL溶液,按上述色谱条件测定,各质量浓度每批重复测定

5 次,共做 3 个批次,计算回收率、批内及批间的变异系数。

1.3.5 稳定性试验 准确吸取上述葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱贮备液适量,用无水甲醇配制含葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱质量浓度分别为 2.1、12.9、12.0  $\mu\text{g/mL}$  的样品,按上述色谱条件于 0、2、4、8、16、24 h 进行测定。

1.3.6 样品含量测定 精密量取葛根芩连注射剂 1 mL,于 100 mL 容量瓶中,无水甲醇定容,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,以孔径 0.22  $\mu\text{m}$  的偏氟微孔滤膜过滤,取滤液 10  $\mu\text{L}$  于进样管按上述色谱条件测定,平行测定 3 次,计算注射液中葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱的含量。

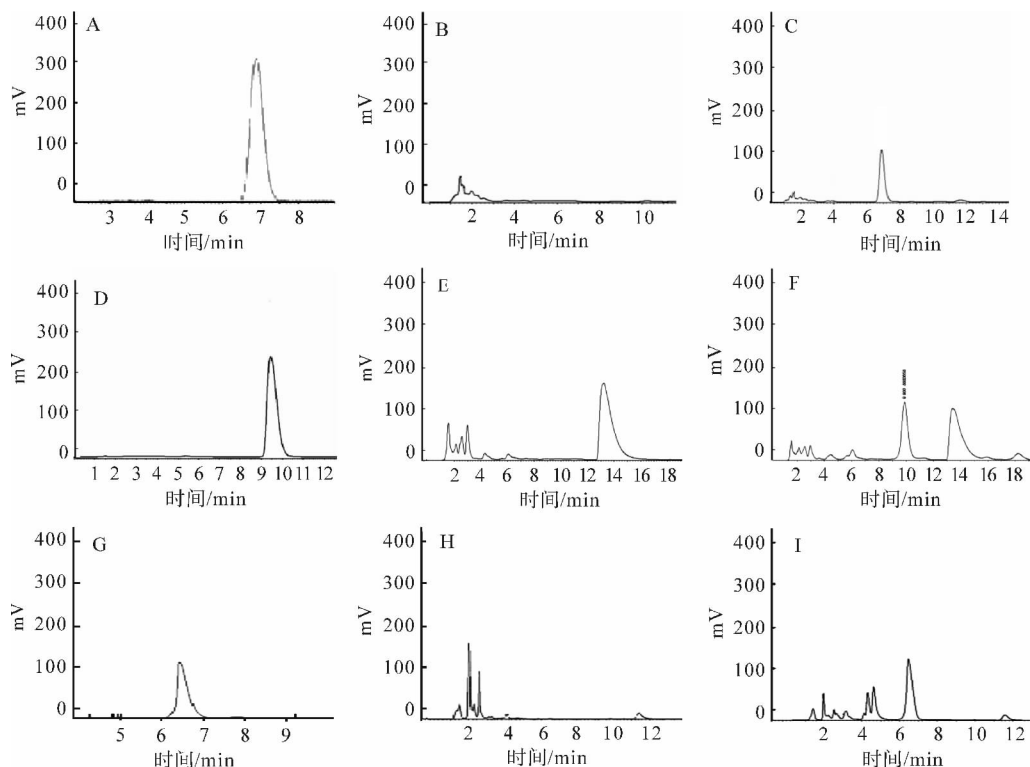
## 2 结果与分析

### 2.1 3 种有效成分的色谱分析

葛根素测定中流动相的选择参照文献[10]的方法,分别在甲醇-0.5%冰醋酸溶液、甲醇-0.5%磷酸溶液、甲醇-水溶液 3 种溶剂系统下进行试验,结果表明,在甲醇-水溶剂(30:70, V/V)系统下,样品中待测成分分离较好且峰形最好(图 1A—C);参照文献[11—13]的方法,分别以甲醇-水-磷酸、甲醇-三

氟乙酸水溶液、乙腈-磷酸为流动相检测黄芩苷的含量发现,以甲醇-水-磷酸为流动相的分离效果最好,此外,根据进样后色谱图的具体情况调整流动相中各组分比例得出,黄芩苷适宜的流动相是甲醇:水:磷酸为 40:60:0.2 (V/V) (图 1D—F);参照文献[14—16]的方法,分别以甲醇-乙腈、磷酸二氢钠溶液-乙腈、磷酸二氢钾溶液、乙腈与-磷酸为流动相检测不同中药复方制剂中盐酸小檗碱的含量,调整流动相中各试剂的比例发现,以乙腈:水:磷酸二氢钾(32:68:0.3, V/V)为流动相,得到的盐酸小檗碱色谱图峰同制剂中其他峰分离效果最好,且盐酸小檗碱峰型对称(图 1G—I)。此外,葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱的最大吸收波长分别为 251、280、348 nm,故分别选定 251、280、348 nm 为这 3 种物质的检测波长。

从图 1 中可以看出,葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱的标准溶液及葛根芩连注射剂的色谱峰对称性良好,供试品与对照品色谱峰保留时间一致,并与其他共存成分分离度 $>1.5$ ,且阴性样品在相应的位置上无色谱峰干扰。这表明本试验所优化并建立的 HPLC 检测条件可用于葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱标准品及葛根芩连注射剂的 HPLC 检测。



A. 葛根素标准品; B. 无葛根对照样品; C. 葛根芩连注射剂中葛根素; D. 黄芩苷标准品; E. 无黄芩对照样品; F. 葛根芩连注射剂中黄芩苷; G. 盐酸小檗碱标准品; H. 无黄连对照样品; I. 葛根芩连注射剂中盐酸小檗碱

图 1 样品色谱分析

2.2 3 种有效成分的标准曲线绘制

葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱的标准曲线见图 2。由线性回归结果可以看出,葛根素在 0.7~4.2 μg/mL 线性关系良好,回归方程为  $Y=4.7303\times10^4X+2.4455\times10^4$ ;黄芩苷在 4.3~

25.8 μg/mL 线性关系良好,回归方程为  $Y=3.3471\times10^4X+2.5156\times10^5$ ;盐酸小檗碱在 4.0~24.0 μg/mL 线性关系良好,回归方程为  $Y=1.2012\times10^4X+2.6244\times10^5$ 。其相关系数(R)均为 0.999 9。

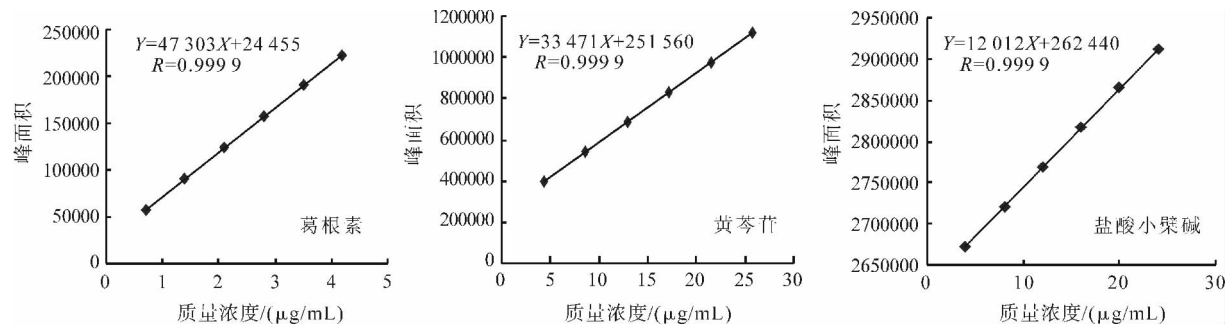


图 2 3 种有效成分的标准曲线

2.3 3 种有效成分的回收率及精密度试验结果

由表 2 可以看出,采用本试验建立的方法,葛根素、黄芩苷、酸小檗碱萃的回收率分别为

97.8%~99.8%、94.7%~96.5%、95.0%~97.8%。各批内变异系数均小于 2%,批间变异系数均小于 3%,符合检测要求。

表 2 3 种有效成分回收率试验结果

样品	质量浓度/(μg/mL)	回收率/%	批内变异系数/%	批间变异系数/%
葛根素	0.7	98.7±2.03	1.57	2.09
	2.1	99.8±1.06	0.53	1.17
	4.2	97.8±1.62	0.91	1.63
黄芩苷	4.3	94.8±0.85	0.89	2.14
	12.9	96.5±1.59	1.42	2.45
	25.8	94.7±0.49	0.78	1.87
盐酸小檗碱	4.0	97.8±1.02	1.21	1.92
	12.0	96.5±1.95	1.45	2.09
	24.0	95.0±1.73	0.97	1.83

2.4 3 种有效成分 HPLC 法测定的稳定性试验结果

由表 3 可以看出,供试品溶液葛根素、黄芩苷、

盐酸小檗碱在 24 h 内的变异系数分别为 0.45%、1.02%、0.98%。表明,该测定方法稳定性良好。

表 3 3 种有效成分 HPLC 法测定的稳定性试验结果

时间/h	葛根素		黄芩苷		盐酸小檗碱	
	质量浓度/(μg/mL)	变异系数/%	质量浓度/(μg/mL)	变异系数/%	质量浓度/(μg/mL)	变异系数/%
0	2.09	0.45	12.95	1.02	12.04	0.98
2	2.10		12.85		12.00	
4	2.10		12.91		12.10	
6	2.11		12.89		11.97	
8	2.08		12.90		12.03	
16	2.11		12.92		11.98	
24	2.11		12.84		11.99	

## 2.5 3 种有效成分的含量分析

测定结果表明,葛根芩连注射剂中葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱的含量分别为 2.086、2.573、6.836 mg/mL,且变异系数较小。表明该测定方法准确,稳定,偏差小,可以用于葛根芩连注射剂中的有效成分含量测定。

## 3 结论与讨论

复方中药制剂发挥药效主要是各味药中多种组分共同作用的结果,其含量直接影响制剂的质量。因此,在评价、控制复方中药制剂质量时,多种指标成分同时测定比单一指标成分测定科学,且能体现药品的质量。本研究建立了测定复方葛根芩连制剂中 3 种药材主要有效成分含量测定的 HPLC 法,各峰分离度良好,杂质无干扰,运行时间短,与前人<sup>[17-19]</sup>研究相比,检测成分多,效率高。方法学考察表明,本研究所建立的测定方法具有良好的准确性和重复性,可用于葛根芩连注射液中 3 种有效成分的质量控制和评价。

在本研究的基础上,下一步可考虑建立梯度洗脱法测定葛根芩连注射液中各有效成分的含量,以进一步缩短测定时间,节约检测成本。

### 参考文献:

- [1] 李培生,刘渡舟. 伤寒论[M]. 北京:人民卫生出版社,1985:114-116.
- [2] 胡海元. 葛根黄芩黄连汤加味治疗牛痢疾[J]. 中兽医医药杂志,1997(6):27-28.
- [3] 李秀芳. 葛根芩连汤治疗湿热泻痢初探[J]. 中兽医医药杂志,2012,31(3):30.
- [4] 王明. 葛根芩连汤加味治疗仔猪白痢[J]. 中兽医医药杂志,2012,31(3):27-28.
- [5] 卢天运. 葛根芩连汤加味治疗耕牛血痢有特效[J]. 中兽医医药杂志,2002,21(4):27.
- [6] 王立. 经典方剂葛根芩连汤研究现状[J]. 黑龙江医药,2009,22(2):172-173.
- [7] 刘荔贞,冯锋,双少敏. 高效毛细管电泳法测定葛根及其制剂脑得生片中葛根素和大豆苷元含量[J]. 山西大同大学学报:自然科学版,2012,28(2):28-31.
- [8] 韩秋伟. 紫外-可见分光光度法测定双黄连颗粒中黄芩苷的含量[J]. 牡丹江医学院学报,2012,33(2):21-23.
- [9] 彭小冰,梁光义,李智龙. 薄层扫描法测定栀子柏皮汤不同剂型中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国民族医药杂志,2012,18(7):48-50.
- [10] 张金阁. HPLC 法测定丹灯通脑片中葛根素的含量[J]. 黑龙江医药,2012,25(3):350-351.
- [11] 李学强,李维强,贺金华. HPLC 法测定芩榆烧伤液中黄芩苷的含量[J]. 解放军药学学报,2012,28(3):250-251.
- [12] 路玫,谢东,冼银丽. RP-HPLC 法同时测定蓝芩口服液中栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学,2008,9(14):7-9.
- [13] 纪松岗,刘晓帆,朱臻宇. 高效液相色谱法测定小柴胡汤中黄芩苷、汉黄芩苷的含量[J]. 第二军医大学学报,2010,9(31):1010-1014.
- [14] 陈玲,敖利. RP-HPLC 测定通络解毒凝胶剂中土的宁和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国中医急症,2012,2(8):1259-1268.
- [15] 金杏芳. 高效液相色谱法测定复方黄连胶囊中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业,2012,21(11):21-22.
- [16] 周振旗,李丽. 高效液相色谱法测定妇科止带片中盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业,2012,21(13):32-33.
- [17] 谭晓梅,戴开金. 高效液相色谱法测定葛根芩连微丸中黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2001,7(4):4-5.
- [18] 贺祝英,吕海涛. 葛根芩连汤不同制法对葛根素含量的影响[J]. 中国医院药学杂志,2002,22(9):518-519.
- [19] 梁光义,曹佩雪. 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(4):371-373.