

[质 量]

## 葛根芩连丸 UPLC 指纹图谱建立及 7 种成分测定

吴亿晗<sup>1</sup>, 王 迪<sup>2</sup>, 杨晓琴<sup>1</sup>, 李 维<sup>2</sup>, 傅超美<sup>1</sup>, 章津铭<sup>1\*</sup>, 邹 亮<sup>2\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 成都大学医学院, 四川 成都 610106)

**摘要:** 目的 建立葛根芩连丸(葛根、黄芩、黄连、炙甘草) UPLC 指纹图谱, 并测定葛根素、黄芩素、巴马汀、汉黄芩素、大豆苷、大豆苷元、药根碱的含有量。方法 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 甲醇-0.1% 冰醋酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 检测波长 260 nm; 柱温 30 °C。结果 10 批样品指纹图谱中有 25 个共有峰, 相似度大于 0.98。7 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $r > 0.999 0$ ), 平均加样回收率 98.99% ~ 103.6%, RSD 1.13% ~ 2.03%。结论 该方法简便可靠, 重复性好, 可用于葛根芩连丸的质量控制。

**关键词:** 葛根芩连丸; 指纹图谱; 化学成分; UPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1083-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.015

## Establishment of UPLC fingerprints of Gegen Qinlian Pills and determination of seven constituents

WU Yi-han<sup>1</sup>, WANG Di<sup>2</sup>, YANG Xiao-qin<sup>1</sup>, LI Wei<sup>2</sup>, FU Chao-mei<sup>1</sup>, ZHANG Jin-ming<sup>1\*</sup>, ZOU Liang<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. College of Medicine, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish the UPLC fingerprints of Gegen Qinlian Pills (*Puerariae lobatae Radix*, *Scutellariae Radix*, *Coptidis Rhizoma* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle*) and to determine the contents of puerarin, baicalein, palmatine, wogonin, daidzin, daidzein and jateorhizine. **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> column, with the mobile phase comprising of methanol - 0.1% glacial acetic acid flowing at 0.3 mL/min in a gradient manner, and the detection wavelength was set at 260 nm. **RESULTS** There were twenty-five common peaks in the fingerprints of ten batches of samples with the similarities of more than 0.98. Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ( $r > 0.999 0$ ), whose average recoveries were 98.99% - 103.6% with the RSDs of 1.13% - 2.03%. **CONCLUSION** This simple, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Gegen Qinlian Pills.

**KEY WORDS:** Gegen Qinlian Pills; fingerprints; chemical constituents; UPLC

葛根芩连丸是 2015 年版《中国药典》一部收录的中药成方制剂品种, 其源自张仲景《伤寒论》中的葛根芩连汤, 云“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, 葛根黄芩黄连汤主之”, 由葛根、黄芩、黄连、炙甘草 4 味药材组成, 具有解肌透表、清热解毒、利湿

收稿日期: 2017-09-19

基金项目: 四川省教育厅高校科研创新团队 (17TD0010)

作者简介: 吴亿晗 (1994—), 女, 硕士生, 从事中药新制剂研究与开发。Tel: 15680803903, E-mail: yihanwuone@126.com

\* 通信作者: 章津铭 (1987—), 男, 博士, 从事中药新剂型与新制剂研究。Tel: 13551043885, E-mail: cduetcmzjm@126.com

邹 亮 (1979—), 男, 教授, 从事中药药剂学与药代动力学研究。Tel: (028) 84617082, E-mail: zouliang@cd

止泻之功效，常用于湿热所致腹泻痢疾等症，为治疗急性腹泻的经典名方制剂<sup>[1-3]</sup>。由于中药产地分散，以及生长环境、采收期、加工炮制方法、制剂生产工艺等因素<sup>[4-5]</sup>，易造成不同厂家同一产品或同一厂家不同批次产品的内在质量出现差异，难以保证中药成方制剂质量一致性。

目前，2015年版《中国药典》中葛根芩连丸的质量控制项目为葛根素、盐酸小檗碱 HPLC 定量测定，相关文献也仅对葛根素、黄芩苷、小檗碱等指标成分的含有量进行测定，质量控制成分较单一，难以全面评价葛根芩连丸的质量<sup>[6-8]</sup>。

中药指纹图谱作为一种综合、可量化的手段，可较全面地反映中药所含成分的种类与数量，进而反映其质量和整体疗效<sup>[9-10]</sup>，在中药质量标准控制中得到广泛应用<sup>[11-12]</sup>。2015年版《中国药典》一部共收载28个特征图谱和9个指纹图谱的中药品种，以中药注射剂为主，而在中药固体制剂中的应用较少<sup>[13]</sup>，同时还规定了葛根芩连片的 HPLC 特征图谱。但特征图谱是选择图谱中某些重要特征信息，适用于中药品种鉴别<sup>[14]</sup>，而指纹图谱是基于图谱整体信息，更适用于中药制剂质量的整体评价，以确保其内在质量的均一和稳定。因此，为全面提升葛根芩连丸的质量控制水平，缩短质控分析时间，提高分析效率，本实验首次采用 UPLC 法建立其指纹图谱<sup>[15]</sup>，并测定其中葛根素、黄芩素、巴马汀、汉黄芩素、大豆苷、大豆苷元、药根碱的含有量，以期将宏观定性和多成分定量相结合，为该制剂质量评价提供依据。

## 1 仪器与材料

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪，配置 QSM 四元泵、SM-FTN 进样器、CH-A 柱温箱、PDA 检测器（美国 Waters 公司）；KQ5200DE 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；CP224C 电子分析天平（十万分之一，上海奥豪斯仪器有限公司）。

葛根素（批号 MUST-16111007，含有量 $\geq 98\%$ ）、盐酸药根碱（批号 MUST-16040702，含有量 $\geq 94\%$ ）、大豆苷（批号 MUST-16092710，含有量 $\geq 98\%$ ）、黄芩素（批号 MUST-16031618，含有量 $\geq 98\%$ ）、汉黄芩素（批号 MUST-16062507，含有量 $\geq 98\%$ ）、大豆苷元（批号 MUST-16022713，含有量 $\geq 98\%$ ）对照品均购于成都曼斯特生物科技有限公司；巴马汀对照品（批号 MUST-16062814，含有量 $\geq 98\%$ ）购于四川省维克奇生物

科技有限公司。甲醇为色谱纯（安徽天地高纯溶剂有限公司）；其余试剂均为分析纯；水为 Milli-Q 超纯水。

葛根芩连丸由广西花红药业股份有限公司生产，批号 160403、141201、150401、151001、151101、151102、160402、160701、161001、160801（S1 ~ S10）。葛根、黄芩、黄连、甘草均购于成都市大丰中药材市场，经成都中医药大学蒋桂华教授鉴定为正品。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱（2.1 mm × 50 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ）；流动相 0.1% 冰醋酸（A）-甲醇（B），梯度洗脱（0 ~ 1.5 min，10% ~ 12% B；1.5 ~ 2.5 min，12% ~ 13% B；2.5 ~ 4 min，13% ~ 16% B；4 ~ 8 min，16% ~ 20% B；8 ~ 9 min，20% ~ 21% B；9 ~ 10 min，21% B；10 ~ 19 min，21% ~ 40% B；19 ~ 25 min，40% ~ 50% B；25 ~ 27 min，50% ~ 51% B；27 ~ 30 min，51% ~ 90% B）；体积流量 0.3 mL/min；检测波长 260 nm；柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 1  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取干燥至恒重的葛根素、黄芩素、巴马汀、汉黄芩素、大豆苷、大豆苷元、药根碱对照品适量，置于同一棕色量瓶中，甲醇溶解稀释并定容，制成各成分质量浓度分别为 250、142、247.2、87.2、93.8、79.8、129.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，即得。

2.2.2 供试品溶液 丸剂充分研磨至细粉，精密称取 0.1 g，置于具塞锥形瓶中，加入 70% 甲醇 25 mL，称定质量，超声提取（40 kHz、200 W）30 min，放冷，70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 重复性试验 取同一供试品（批号 160403），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，平行 6 份，在“2.1”项色谱条件下测定，以葛根素为参照峰，测得 25 个共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 2%。以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照，测得后 5 次进样所得指纹图谱的相似度均大于 0.96，表明该方法重复性良好。

2.3.2 精密度试验 取同一供试品（批号 160403），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，以葛根素为参照峰，测得 25 个共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 2%。以第 1 次进样所得指纹图

谱作为参照,测得后5次进样所得指纹图谱的相似  
度均大于0.96,表明仪器精密良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品(批号  
160403),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,  
于0、2、4、8、16、24 h在“2.1”项色谱条件  
下进样测定6次,以葛根素为参照峰,测得25个  
共有峰相对保留时间和相对峰面积RSD均小于2%。  
以第1次进样所得指纹图谱作为参照,测得后5  
次进样所得指纹图谱的相似度均大于0.96,表  
明溶液在24 h内稳定性良好。

2.4 指纹图谱建立 取10批样品,按“2.2.2”  
项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条  
件下进样测定,建立指纹图谱(图1)。再采用“中  
药色谱指纹图谱相似度评价系统2012版”软件,  
设定S1为参照图谱,将S2~S10与其进行自动匹  
配,时间窗宽度0.10 min,采用多点校正法对参  
照谱进行指纹匹配,并采用中位数法生成葛根  
苓连汤指纹图谱(图2),计算相似度,发现均在  
0.98以上,具体见表1。

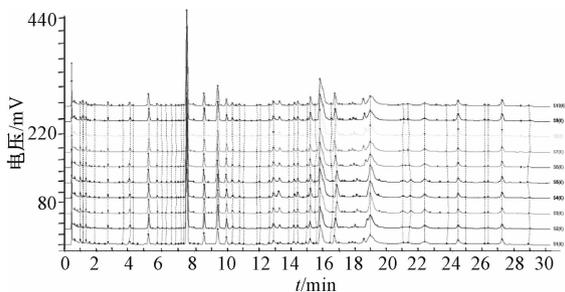
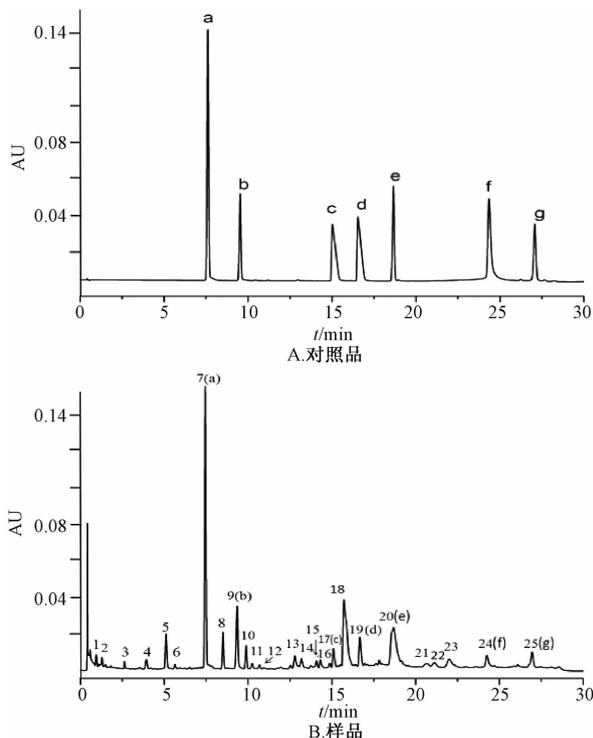


图1 10批样品指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of ten batches of samples

2.5 共有峰归属和指认 取葛根、黄芩、黄连、  
甘草粉末(过3号筛)各0.1 g,置于具塞锥形瓶



- a. 葛根素 b. 大豆苷 c. 药根碱 d. 巴马汀 e. 大豆苷元  
f. 黄芩素 g. 汉黄芩素  
a. puerarin b. daidzin c. jateorhizine d. baicalein e. daidzein  
f. palmatine g. wogonin

图2 各成分UPLC色谱图

Fig. 2 UPLC chromatograms of various constituents

中,加入70%甲醇20 mL,称定质量,超声提取  
30 min,放冷,70%甲醇补足缺失的质量,摇匀,  
0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,在“2.1”项  
色谱条件下分析,结果见图3。由图可知,4、15、  
21、22、23、24、25号峰主要来自黄芩,2、6、  
14、16、17、18、19号峰主要来自黄连,1、5、  
7、9、10、11、13、20号峰主要来自葛根,3、8、  
12号峰主要来自甘草。

表1 10批样品相似度

Tab. 1 Similarities of ten batches of samples

批次	S1	S2	S3	S4	S5	S5	S7	S8	S9	S10	相似度
S1	1.000	0.984	0.990	0.976	0.991	0.994	0.989	0.973	0.973	0.973	0.990
S2	0.984	1.000	0.988	0.964	0.983	0.984	0.983	0.962	0.964	0.965	0.984
S3	0.990	0.988	1.000	0.986	0.998	0.996	0.995	0.981	0.982	0.984	0.996
S4	0.976	0.964	0.986	1.000	0.991	0.989	0.986	0.987	0.987	0.990	0.992
S5	0.991	0.983	0.998	0.991	1.000	0.997	0.993	0.985	0.985	0.987	0.997
S6	0.994	0.984	0.996	0.989	0.997	1.000	0.995	0.988	0.988	0.989	0.998
S7	0.989	0.983	0.995	0.986	0.993	0.995	1.000	0.985	0.987	0.989	0.997
S8	0.973	0.962	0.981	0.987	0.985	0.988	0.985	1.000	1.000	0.999	0.993
S9	0.973	0.964	0.982	0.987	0.985	0.988	0.987	1.000	1.000	0.999	0.993
S10	0.973	0.965	0.984	0.99	0.987	0.989	0.989	0.999	0.999	1.000	0.994
R	0.990	0.984	0.996	0.992	0.997	0.998	0.997	0.993	0.993	0.994	1.000

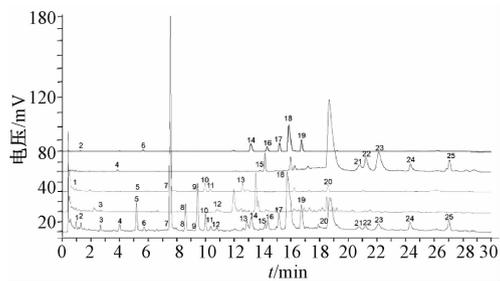


图3 共有峰 UPLC 色谱图

Fig. 3 UPLC chromatograms of common peaks

## 2.6 7种成分含有量测定

### 2.6.1 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下

表2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	检测限/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	定量限/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
葛根素	$Y=1.3853X-3.7396$	0.9992	7.81~250	1.942	5.957
药根碱	$Y=1.2741X+0.7278$	0.9999	4.04~129.4	1.120	3.670
巴马汀	$Y=1.2665X+0.8742$	0.9999	4.43~142	1.110	3.450
大豆苷	$Y=1.1565X+0.3599$	0.9999	2.93~93.8	0.723	2.190
大豆苷元	$Y=1.6388X-0.9048$	0.9997	2.4~79.8	0.600	1.950
黄芩素	$Y=0.793X-5.0029$	0.9998	7.7~247	1.920	5.890
汉黄芩素	$Y=1.168X+0.278$	1.0000	2.7~87.2	0.650	2.120

2.6.3 重复性试验 取批号 160403 的样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，平行 6 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得 7 种成分相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 2%，表明该方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 取批号 160403 的样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、16、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得 7 种成分相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取批号 160403 的样品 6 份，每份约 0.1 g，置于具塞锥形瓶中，按各成分已知含有量的 100% 水平精密加入对照品葛根素 1.545 0 mg、药根碱 0.265 0 mg、巴马汀 0.273 0 mg、大豆苷 0.456 0 mg、大豆苷元 0.912 0 mg、黄芩素 0.512 0 mg、汉黄芩素 0.125 0 mg，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，7 种成分平均加样回收率分别为 102.4%、100.5%、103.6%、101.2%、99.02%、98.99%、101.8%，RSD 分别为 1.36%、1.42%、1.71%、1.94%、2.03%、1.13%、1.57%。

2.6.6 样品含有量测定 取 10 批样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项

对照品溶液，甲醇稀释成 6 个质量浓度，在“2.1”项色谱条件下测定。以对照品峰面积为纵坐标 (Y)，质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归，同时分别以信噪比 3:1 和 10:1 计算检测限和定量限，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.6.2 精密度试验 取批号 160403 的样品，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得 7 种成分相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 2%，表明仪器精密度良好。

色谱条件下进样测定，外标法计算含有量，结果见表 3。

表3 各成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/g)

批号	葛根素	大豆苷	药根碱	巴马汀	大豆苷元	汉黄芩素	黄芩素
141201	15.69	4.504	1.171	1.149	5.994	2.059	4.478
150401	24.10	7.531	1.564	1.544	7.108	1.567	4.351
151001	21.50	7.336	1.897	1.880	9.228	1.802	4.603
151101	21.90	7.142	2.486	2.472	9.243	1.995	4.918
151102	20.70	6.904	1.860	1.842	8.679	2.059	4.887
160402	21.20	6.990	1.858	1.840	8.038	2.016	4.950
160403	14.84	4.396	2.780	2.768	8.984	1.460	4.918
160701	20.10	5.910	2.123	2.107	6.787	3.429	5.770
160801	19.90	5.866	2.111	2.095	6.680	3.322	5.738
161001	20.00	6.039	2.149	2.132	6.986	2.358	5.234

## 3 讨论

3.1 样品提取方法选择 本实验考察了不同体积分数甲醇 (100%、70%、50%)、乙醇 (50%、70%) 的提取效果，发现前者优于后者，而且以 70% 甲醇为提取溶剂时能兼顾各极性成分的提取，故选择其作为提取溶剂。然后，对超声、回流提取进行比较，发现 2 种提取方法下色谱峰数量、峰面积等均无明显差异，鉴于前者操作简单、省时，故选择超声提取。

3.2 色谱条件、检测波长选择 本实验考察了乙

腈-0.1%冰醋酸、乙腈-0.1%磷酸、甲醇-0.1%冰醋酸3种流动相系统对液相色谱分离效果的影响,发现甲醇对葛根芩连丸色谱峰的分离效果较好;冰醋酸和磷酸均能优化峰形,但是后者易形成磷酸盐,为避免其对色谱柱的损坏,最终选择甲醇-0.1%冰醋酸作为流动相。然后,筛选了检测波长,通过UPLC全波长扫描发现,在260 nm处可兼顾大部分成分色谱峰的检测。

3.3 指纹图谱及药材配伍比例关系 葛根芩连丸中葛根、黄芩、黄连、甘草的配伍比例是100:37.5:37.5:25,其指纹图谱也显示,25个共有峰中来自葛根的最多,其次是黄芩、黄连,来自甘草的最少。同时在含有量测定时发现,来自葛根中的葛根素、大豆苷元、大豆苷含有量较高,其次是黄芩、黄连中的成分,符合传统配伍比例。

#### 4 结论

葛根芩连丸是广西花红药业股份有限公司独家生产品种,本实验建立了10批样品的指纹图谱,发现其相似度除了有1批为0.98外,其余均大于0.99,25个共有峰分别来自葛根、黄芩、黄连、甘草,表明不同批次样品质量稳定性良好。然后,通过UPLC法测定葛根芩连丸中葛根素、黄芩素、巴马汀、汉黄芩素、大豆苷、大豆苷元、药根碱的含有量,该方法简便准确、重复性好。综上所述,本实验从成分组成定性分析和指标成分定量测定2个方面实现葛根芩连丸的质量一致性评价,可为其质量控制提供新的方法与依据。

#### 参考文献:

[1] 罗奇志,戴开金,马安德,等. 葛根芩连汤及微丸中葛根素、大豆苷元的HPCE分析[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(1): 11-13.

[2] 宋亚芳,苏春梅,杨红,等. HPLC同时测定葛根芩连微丸中葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 64-67.

[3] 董宏然,程琪庆,段丽颖,等. 丹七软胶囊UPLC指纹图谱研究及组分鉴别[J]. 中成药, 2016, 38(1): 117-122.

[4] 贺祝英,吕海涛,曹佩雪,等. 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.

[5] 文谨,刘起华,章军,等. 葛根芩连汤煮散煎煮工艺优化[J]. 中成药, 2016, 38(9): 2070-2073.

[6] 吴永芹,冯凯,周慧,等. HPLC法同时测定葛根芩连片中葛根素和黄芩苷的含量[J]. 中国药事, 2012, 26(3): 282-284.

[7] An R, Wang Y, You L S, et al. UPLC-MS analysis for simultaneous determination of eight components in the 'Ge-Gen-Qin-Lian' tablets[J]. *Chromatographia*, 2009, 69(9-10): 969-975.

[8] 崔向微,张贵君,李慧,等. 葛根芩连汤两种配伍比例的化学药效组分比较分析[J]. 中成药, 2009, 31(2): 263-266.

[9] 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.

[10] 冯伟红,李春,吉丽娜,等. 基于高分离度和高色谱峰纯度的红参UPLC指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3798-3804.

[11] 石俊敏,管佳,张庆文,等. 超高效液相色谱在药物分析中的应用[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(9): 1583-1588.

[12] 曹进,饶毅,沈群,等. 中药注射剂指纹图谱分析[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2001, 3(4): 20-24, 82.

[13] 屠鹏飞,高效液相色谱法制定中药材和中药注射剂特征指纹图谱的探讨[J]. 中成药, 2000, 22(7): 516.

[14] 陈佳,王钢力,姚令文,等. 超高效液相色谱(UPLC)在药物分析领域中的应用[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11): 1976-1981.

[15] 吴莎,王雪,吴亚男,等. UPLC用于热毒宁注射液中11种成分测定及其指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4804-4810.