

· 药剂与工艺 ·

葛根芩连汤不同配伍对黄芩苷含量的影响

谭晓梅,戴开金,罗佳波,吴朝晖*

(第一军医大学 中药制剂重点实验室,广东 广州 510515)

摘要:目的 建立 RP-HPLC法测定葛根芩连汤各配伍组合中的黄芩苷的含量测定方法,研究配伍对黄芩苷含量的影响。方法 采用 $L_8(2^7)$ 正交设计及统计方法(统计软件 SPSS10.0),以 HPLC法测定黄芩苷的含量。结果 葛根、黄连对方中黄芩苷含量的影响差异具有显著性($P < 0.05$),甘草对黄芩苷含量的影响差异无显著性($P > 0.05$),葛根、黄连、甘草对黄芩苷含量的影响不存在两两交互作用。凡是黄连与黄芩的配伍组合皆有沉淀产生,并且沉淀中含有较多的黄芩苷。结论 葛根芩连汤配伍中葛根、黄连能降低黄芩苷的含量,甘草没有增加黄芩苷的溶出的作用。 pH 值的改变可能是含黄连和黄芩配伍煎液产生沉淀的主要原因之一。

关键词: 葛根芩连汤;配伍;黄芩苷;高效液相色谱

中图分类号: R283.2; R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)07-0598-03

Influence of compatibility on content of baicalin in Gegen Qinlian Decoction

TAN Xiao-mei, DAI Kai-jin, LUO Jia-bo, WU Zhao-hui

(Key Laboratory of Pharmaceutics of Chinese Materia Medica,

First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract **Object** To set up the quantitative method of baicalin in Gegen Qinlian Decoction (GQD) by RP-HPLC and to determine the change of baicalin contents in decoctions prepared from various combinations of GQD. **Methods** By $L_8(2^7)$ orthogonal design and statistics analysis (SPSS10.0), eight decoctions with *Radix Scutellariae* either alone or in combination with one or more of the other three components were prepared or analyzed. Contents of baicalin in them were determined by RP-HPLC. **Results** It was significant ($P < 0.05$) to the difference on the content of baicalin caused by *Radix Puerariae* and *Rhizoma Coptidis*, but for *Radix Glycyrrhizae Preparata*, the difference was insignificant ($P > 0.05$) and interactions between two of three were insignificant either. In this experiment, the sedimentation was found in the decoctions contained *Radix Scutellariae* and *Rhizoma Coptidis*. **Conclusion** The content of baicalin is reduced by *Radix Puerariae* and *Rhizoma Coptidis*, The resolution of baicalin is not increased by *Radix Glycyrrhizae Preparata*. Maybe the change of pH leads to the sedimentation in decoctions contained *Radix Scutellariae* and *Rhizoma Coptidis*.

Key words Gegen Qinlian Decoction (GQD); compatibility; baicalin; HPLC

葛根芩连汤由葛根、黄连、黄芩、甘草 4味中药组成,出自《伤寒论·太阳篇》,有解表清里、升清止利之功。该方主要化学成分的变化及配伍的影响研究报道较少。本实验研究了配伍对黄芩苷含量的影响,对黄连与黄芩产生的沉淀及其原因进行了分析,为该方的研究提供参考。

1 仪器与试剂

美国惠普 HP-1100高效液相色谱仪, G1315A 紫外-可见光二级管阵列检测器; 410A型 pH 计(美国 ORION); 甲醇(分析纯、色谱纯), 磷酸(分析纯); 黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所); 葛

根、黄芩、黄连、甘草药材由广东省药材公司提供,经本校中药鉴定教研室刘传明讲师鉴定,分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi,唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi干燥根茎,毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.干燥根茎,豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.干燥根茎(经蜜制)。

2 方法与结果

2.1 葛根芩连汤中黄芩苷的含量测定^[1,2]

2.1.1 色谱条件: 色谱柱: Zorbax ODS C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-0.2% 磷酸

* 收稿日期: 2002-09-23

基金项目: 国家自然科学基金面上重点项目: 葛根芩连汤的配伍规律研究 (39970886)

(48: 52);流速: 1.0 mL/min;柱温: 室温;检测波长: 280 nm 色谱图见图 1

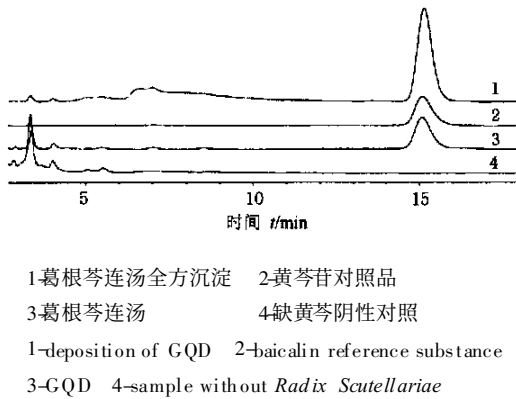


图 1 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms

2.1.2 标准曲线:精密称取黄芩苷对照品约 6 mg,置 50 mL 容量瓶中,流动相溶解,定容制成对照品溶液。精确吸取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8 mL 于 10 mL 量瓶中,流动相定容。各精密吸取 5 μL 进样,测定峰面积。以浓度对峰面积进行线性回归,得回归方程: $Y = 15.867236X - 4.534687$, $r = 0.99995$ 。结果表明黄芩苷在 12.04~96.32 μg/mL 与峰面积线性关系良好。

2.1.3 供试品溶液及缺黄芩阴性对照液的制备:按处方配比取葛根芩连汤各味药(葛根 15 g,黄芩 9 g,黄连 9 g,甘草 6 g)饮片 3 份及缺黄芩方 3 份,加水 400 mL,先煎葛根 20 min,余药共煎 30 min,煎两次,合并,90℃ 水浴中定容至 1 000 mL。取 10 mL,用 70 mL 甲醇超声提取 30 min,过滤,洗涤,用甲醇定容至 100 mL。取 5 mL 吹干,流动相定容至 10 mL,即得。进样,测定浓度,计算得供试品中黄芩苷含量为 0.751 g/剂, $RSD = 2.62\%$ ($n = 3$)。

2.1.4 精密度试验:取黄芩苷对照品溶液。全方供试品溶液重复进样 5 次,每次 10 μL,黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 0.45% 和 1.28%。

2.1.5 稳定性考察:取黄芩苷对照品溶液和供试品液各一份,在配制后 4, 8, 12, 16, 24 h 进样,测定黄芩苷浓度, RSD 分别为 0.54% 和 0.28%。结果表明 24 h 内溶液稳定。

2.1.6 加样回收率试验:精密量取葛根芩连汤水煎液 10 mL (90℃),置 100 mL 量瓶中,加入黄芩苷对照品约 6 mg,按 2.1.3 项下从“用 70 mL 甲醇超声提取……”起,制得加样供试溶液,进样,测定浓度,计算含量。求得黄芩苷平均回收率为 100.8%, $RSD = 1.075\%$ ($n = 4$)。

2.2 配伍对葛根芩连汤中黄芩苷含量的影响
2.2.1 正交设计:选葛根、黄连、甘草作为 3 个因素,选用药和不用药为 2 个水平,并考虑两两交互作用。因素水平表见表 1。

表 1 因素水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平	因 素		
	A 葛根	B 黄连	C 甘草
1	用药	用药	用药
2	不用药	不用药	不用药

2.2.2 试验安排:供试品溶液的制备按 2.1.3 项下方法,试验安排及测定结果见表 2。

表 2 $L_8(2^7)$ 正交设计及结果
Table 2 $L_8(2^7)$ orthogonal design and result

试验号	A	B	A×B	C	A×C	B×C	C 空白	黄芩苷/(g·剂 ⁻¹)
1	1	1	1	1	1	1	1	0.748
2	1	1	1	2	2	2	2	0.754
3	1	2	2	1	1	2	2	0.943
4	1	2	2	2	2	1	1	0.893
5	2	1	2	1	2	1	2	0.790
6	2	1	2	2	1	2	1	0.908
7	2	2	1	1	2	2	1	1.032
8	2	2	1	2	1	1	2	1.123

2.2.3 统计分析:采用 SPSS10.0 统计分析软件,结果黄连、葛根对黄芩苷含量的影响差异具有显著性 ($P < 0.05$),甘草对其影响的差异无显著性 ($P > 0.05$),三者的两两交互作用的差异无显著性。

2.3 含黄连、黄芩各煎液 pH 及沉淀中黄芩苷含量的测定:药液的煎法按 2.1.3 项下至“……合并滤液”,加热至近沸,热过滤,滤液放冷,离心,上清液用 pH 计测 pH,沉淀用水洗 3 次,60℃ 干燥至恒重。精确称取约 0.05 g,加 70% 甲醇 40 mL 超声提取 30 min,过滤,洗涤 3 次,定容至 50 mL。取 5 mL 吹干,流动相溶解,定容至 10 mL,测定,结果见表 3。从表 3 中可以看出含黄连、黄芩的配伍煎液中产生的沉淀中含有大量的黄芩苷。各配伍煎液的 pH 值比单煎液不同程度地降低。

表 3 产生沉淀的各煎液 pH 及沉淀中黄芩苷含量

Table 3 pH of decoctions and content of baicalin in sedimentation

配伍组合	pH	黄芩苷含量/(g·剂 ⁻¹)
黄芩	5.45	0.014 0
黄连	3.73	-
黄芩+ 黄连	4.14	0.610 8
黄芩+ 黄连+ 葛根	4.36	0.131 6
黄芩+ 黄连+ 甘草	4.31	0.179 7
葛根芩连汤	4.48	0.119 5

3 讨论

3.1 本实验采用正交设计及统计软件对葛根芩连汤方进行分析,结果表明,在 0.05 水平下,葛根、黄连对黄芩苷的含量的影响差异具有显著性,这说明葛根、黄连在该汤中使黄芩苷含量降低。甘草对黄芩苷的含量的影响差异无显著性,黄连、葛根、甘草三者两两交互作用影响差异不显著。

3.2 黄连使黄芩苷的含量降低,有一些文献报道认为降低的原因系小檗碱与黄芩苷形成复合物所致。鉴于目前没有人真正获取复合物并确定其结构,因此是否产生了复合物还有待进一步的研究证实。实验中发现含黄连、黄芩煎液 pH 值低于黄芩单煎液。由于黄芩苷在较低 pH 值下由盐的形式转化为酸的形式导致溶解度降低,因此导致黄芩苷含量降低的原因也有可能是 pH 值的降低之故。

3.3 在本实验色谱条件下没有发现新的色谱峰。

3.4 实验中发现凡是含黄连、黄芩的配伍煎液在放

冷的过程中均产生大量的沉淀,而单煎液在同样的条件下沉淀很少。对含黄连、黄芩各配伍产生沉淀的分析表明,沉淀中所含的主要成分之一为黄芩苷(约占沉淀物的 30%~40%),其原因可能是由于黄连中小檗碱主要以盐酸盐的形式存在,煎液为酸性,而黄芩中的黄芩苷也有部分以盐的形式存在,在 pH 值较低的情况下转化为黄芩苷而析出。

3.5 葛根能降低方中黄芩苷的含量,其原因可能是葛根中含有和黄芩苷结构相似的成分,与黄芩苷存在竞争溶剂的作用,其机制有待进一步的研究证实。

References

- [1] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol II.
- [2] Tan X M, Dai K J, Liu H H. Determination of baicalin in Gegen Qinlian Micropill by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2001, 7(4): 4-5.
- [3] Informaion Center of Chinese Herbal Medicine, State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Constituent in Phytomedicine* (植物药有效成分手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.

蜂毒素的 SDS-PAGE 质控方法研究

翟东霞,刘 岭,张亚妮,凌昌全*

(第二军医大学附属长海医院 中医科,上海 200433)

摘要:目的 建立以 SDS-PAGE 进行蜂毒素质量控制的方法。方法 将通过凝胶色谱法从蜜蜂毒中分离纯化所得到的蜂毒素,以 SDS-PAGE 法测定其相对分子质量,并通过凝胶成像扫描测定蜂毒素纯度。结果 蜂毒素样品电泳后在凝胶块上显示为均一条带,相对分子质量约为 2 800,含量为 (90.59±0.85)%,与 HPLC 测定结果平行。结论 SDS-PAGE 法作为蜂毒素的质控方法,结果准确、可靠、简便。

关键词: 蜂毒素; SDS-PAGE; 银染; 凝胶扫描

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2003)07-0600-03

Study on quality control of melittin by SDS-PAGE method

ZHAI Dong-xia, LIU Ling, ZHANG Ya-ni, LIN G Chang-quan

(Department of TCM, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract **Object** To establish a SDS-PAGE method on quality control of melittin. **Methods** Melittin was extracted and purified from bee venom by gel chromatography. Purity and molecular mass of melittin were determined by SDS-PAGE. **Results** In the gelatinous board, the sample was a single peptide-chain with a molecular mass of about 2 800 dalton as revealed by SDS-PAGE. The purity was (90.59±0.85)%, which was in parallel with the result tested by HPLC. **Conclusion** SDS-PAGE is accurate, reliable and simple for the determination of melittin.

Key words melittin; SDS-PAGE; silver-dyed gel image scanning

蜜蜂毒是中华蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius 或意大利蜜蜂 *A. mellifera* Linnaeus 尾部蛰刺腺内分泌

的有毒液体,含有多钟不同化学结构的活性物质。蜂毒素 (melittin) 是蜜蜂毒中的主要成分,约占蜂毒含

* 收稿日期: 2002-09-26

基金项目: 军队“九五”重点课题 (98JD-3269); 上海市科学技术委员会资助项目 (02DE19109)

作者简介: 翟东霞 (1977-), 女, 江苏扬州人, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合。Tel (021) 25070720 E-mail: zhaidongxia@163.net