

反相离子对-高效液相色谱法同时测定葛根芩连汤中 13 种有效成分及其在配伍机制研究中的应用

张 也, 孙晓祝, 于 淼, 赵云丽, 于治国*

沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘 要: **目的** 研究葛根芩连汤不同组方中活性成分含量的差异, 揭示其药效物质的变化规律, 进而从化学层面探究葛根芩连汤的配伍规律。 **方法** 采用反相离子对-高效液相色谱法测定葛根芩连汤不同组方配伍中 13 种有效成分(葛根素、大豆苷元、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、小檗碱、巴马汀、药根碱、黄连碱、甘草素、异甘草苷、甘草酸和甘草次酸)的含量。色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 3.5 mmol/L 庚烷磺酸钠溶液(含体积分数 0.1%甲酸)-乙腈(含体积分数 0.1%甲酸), 梯度洗脱, 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 270 nm; 柱温 35 ℃; 进样量为 20 μL。 **结果** 葛根芩连汤中 13 种有效成分均基线分离、峰形对称, 经方法学验证各项效能指标均符合定量分析要求。不同组方配伍中活性成分的含量变化规律: 葛根与黄芩、黄连配伍时, 葛根中的葛根素与大豆苷元以及黄芩中的黄芩苷含量均显著增加; 黄芩、黄连与炙甘草配伍时, 其中的黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素和小檗碱等有效成分均有增加, 同时甘草中的甘草酸亦有显著增加; 全方配伍时各有效成分均有不同程度增加。 **结论** 所建立的方法可用于葛根芩连汤及其组方的配伍规律研究。葛根芩连汤全方配伍对葛根与黄芩、黄连及炙甘草中有效成分的溶出均起到促进作用。其中, 臣药黄芩、黄连能显著促进君药葛根中有效成分的溶出, 起到辅佐君药的作用; 而佐使药炙甘草不仅可促进臣药中有效成分的溶出, 同时可在一定程度上增强臣药对君药的辅佐作用, 起到协调全方、增效减毒的作用。

关键词: 葛根芩连汤; 组方配伍; 反相离子对-高效液相色谱法; 葛根; 黄芩; 黄连; 甘草; 葛根素; 大豆苷元; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 汉黄芩素; 小檗碱; 巴马汀; 药根碱; 黄连碱; 甘草素; 异甘草苷; 甘草酸; 甘草次酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-4852-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.010

Simultaneous determination of 13 active components in Gegen Qinlian Decoction by reversed-phase ion pair-high performance liquid chromatography and its application in compatibility mechanism exploration

ZHANG Ye, SUN Xiao-zhu, YU Miao, ZHAO Yun-li, YU Zhi-guo

College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To study the content differences of active ingredients among various formula in Gegen Qinlian Decoction (GQD, 葛根芩连汤) to reveal the change law of pharmacodynamic substance and explore the compatibility rule of GQD based on chemistry level. **Methods** Reversed-phase ion pair-high performance liquid chromatography was established to determinate the content of 13 active components (puerarin, daidzein, baicalin, wogonoside, wogonin, berberine, jatrorrhizine, palmatine, coptisine, liquiritigenin, isoliquiritin, glycyrrhizic acid, glycyrrhetinic acid) in various formula of GQD. Separation was performed on Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Mobile phase consisted of 3.5 mmol/L sodium heptane sulfonate solution (containing 0.1% formic acid by volume) and acetonitrile (containing 0.1% formic acid by volume) and followed by gradient elution at the flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was 270 nm, and the column temperature was 35 ℃; The injection volume was 20 μL. **Results** All the 13 components in GQD were separated from baseline and symmetrical in peak shape. The effectiveness indexes were verified by the methodology to meet the requirements of quantitative analysis. Changes rules for content of active ingredients in different combinations: The contents of puerarin and daidzein in Gegen (*Puerariae Lobatae Radix*, PLR) and baicalin

收稿日期: 2021-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573629)

作者简介: 张 也(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析学。Tel: 18641433969 E-mail: 18641433969@163.com

*通信作者: 于治国, 博士生导师, 教授, 主要从事药品质量控制与药代动力学的研究。E-mail: zhiguo-yu@163.com

in Huangqin (*Scutellariae Radix*, SR) were significantly increased when PLR was compatible with SR and Huanglian (*Coptidis Rhizoma*, CR). When SR and CR were combined with Zhigancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle*, GRRPM), the active components such as baicalin, wogonoside, wogonin and berberine were increased, and the glycyrrhizic acid in GRRPM was also significantly increased. All the active components were increased in different degrees when the formula was combined with the whole formula. **Conclusion** The established method can be used to study the compatibility of GQD and its formulations. The combination of GQD can promote the dissolution of active components in PLR, SR, CR and GRRPM. Among them, SR and CR could significantly promote the dissolution of the effective components in PLR, and play the role of adjuvant to PLR; And assistant medicine GRRPM not only can promote the dissolution of effective components from the minister medicine, at the same time can be enhanced to a certain extent minister medicine adjuvant role of monarch medicine, have the effect of coordination of all parties to improve effect and decrease toxicity.

Key words: Gegen Qinlian Decoction; compatibility rules; reversed-phase ion-pair HPLC; *Puerariae Lobatae Radix*; *Scutellariae Radix*; *Coptidis Rhizoma*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; puerarin; daidzein; baicalin; wogonoside; wogonin; berberine; jatrorrhizine; palmatine; coptisine; liquiritigenin; isoliquiritin; glycyrrhizic acid; glycyrrhetic acid

中药方剂是中药临床应用的主要形式,是其辨证施治的重要环节。方剂的配伍理论是中药复方用药的核心问题,其基本理论包含“七情合和”和“君臣佐使”理论。所谓“君臣佐使”,是从多元用药的角度来论述各药在方剂中的地位及配伍后的性-效变化规律。目前,针对配伍规律的研究已成为中药方剂研究的热点,揭示方剂配伍规律的科学内涵已成为中医药现代化研究的主要构成部分^[1]。深入探究分析方剂配伍规律这一重要环节,有利于中医药学朝着现代化的方向发展并加快中医药学的现代化速度。

方剂治疗各种病症的功效在于其含有进入人体后能发挥疗效的化学成分作为物质基础。不同的方剂配伍存在不同的药效物质,且方剂中的药效物质不等于组成该方所用各单味药的有效物质的简单加和^[2]。这是由于方剂在煎煮等制剂过程中,每种药味的成分会相互影响,产生增溶、助溶或沉淀,甚至水解、氧化等物理或化学作用而改变药效物质的溶出度,组成的各单味药所含的化学成分之间会发生物理或化学作用(如增溶、盐化、络合、氧化、水解和还原),进而导致这些成分量与质的变化,从而影响到方剂临床疗效^[3]。故研究中药方剂组方的配伍变化对其药效物质的影响可从化学层面探索方剂组方的配伍规律。近几年,基于葛根芩连汤(*Gegen Qinlian Decoction*, GQD)的配伍机制研究,主要采用拆方指纹图谱^[4]、药代动力学^[5]、Caco-2细胞模型^[6]、体外肠吸收特征^[7]等研究方法,对于GQD抗腹泻^[8]、抗菌、抗病毒、解热^[9]以及治疗糖尿病等药理作用进行配伍机制研究。针对于煎煮过程中GQD各单味药材中有效成分的溶出差异及相互影响,王钰乐^[11-13]等分别对其主要成分葛根素、

黄芩苷、小檗碱及甘草次酸在不同配伍条件下煎煮液含量的差异,结果显示黄芩与黄连共同煎煮,煎煮液会产生大量沉淀,由于沉淀的夹带与包夹作用可能导致有效成分含量的减少;另外,黄连中的小檗碱等生物碱成分与黄芩中的黄芩苷及甘草中的甘草酸等成分都会在煎煮中生成难溶性盐而形成沉淀。综合已有测定分析方法,对于其不同药味有效成分的测定需采用不同的色谱条件及检测波长,并且不同学者采用不同组方配比及煎煮条件,可导致结果的差异。因此,为探索方剂的配伍规律,建立可同时测定多种有效成分的测定分析方法以及基于体外煎煮过程中GQD有效成分含量的变化规律仍有进一步研究的必要。

本实验采用离子对-反相高效液相色谱法可对GQD中13种有效成分进行同时测定,探讨方剂配伍对其主要有效成分的影响。本研究将方剂拆分为葛根组(君药)、黄芩/黄连组(臣药)、葛根-黄芩/黄连组(君药-臣药)、炙甘草组(佐使药)、黄芩/黄连-炙甘草组(臣药-佐使药)5个组方及GQD全方组,以探索臣药(黄芩/黄连)对君臣药(葛根)以及佐使药(甘草)对君药与臣药的配伍影响,进而从化学层面探索GQD的配伍规律。

1 仪器与材料

LC-10A型高效液相色谱系统、LC-10Avp输液泵、SPD-10Avp紫外检测器、SIL-10AF自动进样器,日本Shimadzu公司;BS110型电子分析天平,北京Sartorius仪器系统有限公司;AB135-S电子天平,瑞士Mettler-Toledo公司;EYEL4型旋转蒸发器,上海爱朗仪器有限公司;FD-1D-50型真空冷冻干燥器,北京博医康实验仪器有限公司;KQ-250E超声波清洗仪,昆山市超声仪器有限公司;GENIUS 3

涡旋混合器,德国 IKA 公司; Research 移液器, 2~20 μL 、20~200 μL 、100~1000 μL , 德国 Eppendorf 公司。

甲酸, 色谱级, 天津科密欧化学试剂有限公司; 乙腈, 色谱级, 天津市康科德科技有限公司; 庚烷磺酸钠, 色谱级, 日本东京化成工业株式会社; 水, 纯化水, 杭州娃哈哈集团有限公司; 对照品葛根素(批号 MUST-16111007)、大豆苷元(批号 MUST-17101202)、黄芩苷(批号 MUST-16111113)、汉黄芩苷(批号 MUST-16111611)、汉黄芩素(批号 MUST-17062507)、小檗碱(批号 MUST-16111115)、巴马汀(批号 MUST-17022604)、药根碱(批号 MUST-17041801)、黄连碱(批号 MUST-17072010), 质量分数均>98.0%, 成都曼思特生物科技有限公司; 对照品甘草素(批号 131127)、异甘草苷(批号 140827)、甘草酸(批号 150328)、甘草次酸(批号 150325), 质量分数均>98.0%, 成都克洛玛生物技术有限公司。葛根、黄芩、黄连、炙甘草均购于国大药房(沈阳), 分别经沈阳药科大学药学院于治国教授鉴定为豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、毛茛科黄连属植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. (味连) 的干燥根茎、豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎的炮制加工品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为 3.5 mmol/L 庚烷磺酸钠溶液(含 0.1%甲酸, A)-乙腈(含 0.1%甲酸, B), 梯度洗脱程序见表 1; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 270 nm; 进样量 20 μL 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

(1) 对照品储备液的制备: 取葛根素、大豆苷元、黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、小檗碱、巴马汀、药根碱、黄连碱、甘草素、异甘草苷、甘草酸

和甘草次酸各约 10 mg, 精密称定, 分置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为 1.00、1.01、1.00、1.00、1.00、1.01、1.00、1.00、1.01、1.00、0.98、0.90 mg/mL 的各对照品储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

(2) 混合对照品溶液的制备: 分别精密吸取上述各对照品储备液 2.00 mL(葛根素)、0.20 mL(大豆苷元)、1.00 mL(黄芩苷)、0.50 mL(汉黄芩苷)、0.20 mL(汉黄芩素)、1.00 mL(小檗碱)、0.50 mL(巴马汀)、0.05 mL(药根碱)、0.50 mL(黄连碱)、0.20 mL(甘草素)、0.20 mL(异甘草苷)、0.50 mL(甘草酸)、0.20 mL(甘草次酸), 置于同一 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度并摇匀, 制成混合对照品溶液。混合对照品溶液中各组分的质量浓度分别为含 200 $\mu\text{g/mL}$ (葛根素)、20.2 $\mu\text{g/mL}$ (大豆苷元)、100 $\mu\text{g/mL}$ (黄芩苷)、50 $\mu\text{g/mL}$ (汉黄芩苷)、20 $\mu\text{g/mL}$ (汉黄芩素)、101 $\mu\text{g/mL}$ (小檗碱)、50 $\mu\text{g/mL}$ (巴马汀)、5 $\mu\text{g/mL}$ (药根碱)、50 $\mu\text{g/mL}$ (黄连碱)、20.2 $\mu\text{g/mL}$ (甘草素)、20 $\mu\text{g/mL}$ (异甘草苷)、49 $\mu\text{g/mL}$ (甘草酸)和 18 $\mu\text{g/mL}$ (甘草次酸)。

2.2.2 GQD 组方提取物及供试品溶液的制备 全方 160 g, 方中各味药材比例(葛根-黄芩-黄连-甘草)为 8:3:3:2。参照《中国药典》2020 年版一部葛根芩连丸^[14]的“制法”操作: 取黄芩、黄连各 30 g, 分别加入 20 倍量的 50%乙醇, 浸泡 24 h 后, 再用 20 倍量 50%乙醇渗漉, 渗漉液减压回收乙醇并适当浓缩, 备用。另取葛根 80 g, 加入 8 倍量水, 煎煮(回流) 30 min; 加入黄芩和黄连渗漉后的药渣及炙甘草 20 g, 再加水至全方 10 倍量, 继续煎煮 1.5 h, 分取煎液; 药渣再加入 10 倍量水, 继续煎煮 1.5 h, 分取煎液; 合并煎液, 滤过, 浓缩, 加入黄芩和黄连的渗漉浓缩液。将浓缩液冷冻干燥成粉末, 得各组方提取物。各组方提取物的产率约为 40%(表 2)。

不同配伍组方煎煮时, 根据各组方所含药材, 同法制备。

精密称取 GQD 各组方提取物约 200 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加入甲醇约 80 mL, 使其溶解, 超声(250 W、40 kHz)处理 30 min, 用甲醇稀释至刻度, 混匀, 静置, 滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 作为 GQD 不同组方的供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 特异性试验 取空白溶剂甲醇, 以及“2.2”项下制备的混合对照品溶液和 GQD 全方(GQLD

表 1 不同配伍的 GQD 含量测定梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedure for content determination of GQD with different compatibility

t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%	t/min	A/%	B/%
0	90	10	52	45	55	58	5	95
32	75	25	56	30	70	60	5	95

表 2 不同配伍的 GQD 组方提取物产率

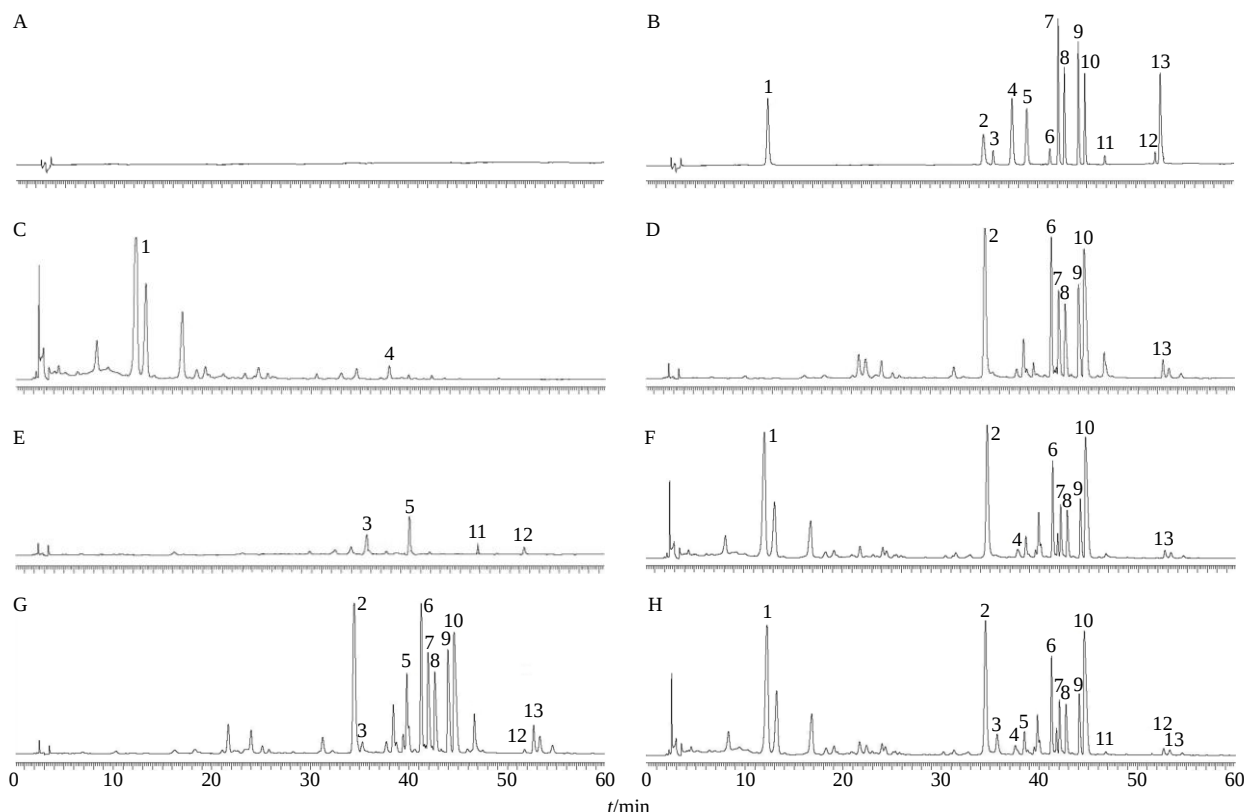
Table 2 Yield rate of freeze-dried powder of GQD with different compatibility

组别	药材	生药量/g	粉末量/g	产率/%
葛根	葛根	80	34.0	42.5
黄芩/黄连	黄芩、黄连	60	23.2	38.7
葛根-黄芩/黄连	葛根、黄芩、黄连	140	55.6	39.7
炙甘草	炙甘草	20	8.4	42.0
黄芩/黄连-炙甘草	黄芩、黄连、炙甘草	80	32.4	40.5
GQD	葛根、黄芩、黄连、炙甘草	160	61.5	38.5

组) 供试品溶液各 20 μ L, 按照“2.1”项下色谱条件进样检测, 记录色谱图见图 1。可见, 13 种成分色谱峰分离度良好, 空白溶剂及方剂中其他组分对测定无干扰。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下制备的混合对照品溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL, 分别

置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得到系列质量浓度的对照品溶液。按照“2.1”项下色谱条件分别进样 20 μ L, 记录色谱图。以各成分进样质量浓度为横坐标 (x)、峰面积为纵坐标 (y), 用最小二乘法进行线性回归, 得回归方程及线性范围见表 3。同时将混合对照品溶液稀释后进样, 根据峰



A-空白溶剂 B-混合对照品溶液 C-葛根组 D-黄芩/黄连组 E-葛根-黄芩/黄连组 F-炙甘草组 G-黄芩/黄连-炙甘草组 H-GQD 组 1-葛根素 2-黄芩苷 3-异甘草苷 4-大豆苷元 5-甘草素 6-汉黄芩苷 7-巴马汀 8-黄连碱 9-药根碱 10-小檗碱 11-甘草酸 12-甘草次酸 13-汉黄芩素

A-blank solution B-mix reference substances C-Puerariae Lobatae Radix group D-Scutellariae Radix/Coptidis Rhizoma group E-Puerariae Lobatae Radix-Scutellariae Radix/Coptidis Rhizoma group F-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle group G-Scutellariae Radix/Coptidis Rhizoma-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle group H-GQD group 1-puerarin 2-baicalin 3-isoliquiritin 4-daidzein 5-liquiritigenin 6-wogonoside 7-palmitine 8-coptisine 9-jatrorrhizine 10-berberine 11-glycyrrhizic acid 12-glycyrrhetic acid 13-wogonin

图 1 GQD 中 13 种成分分析方法系统适用性 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC spectrum of applicability of different compatibility analysis methods for 13 components in GQD

高以信噪比 (S/N) 3 确定检测限 (LOD), S/N 10 确定定量限 (LOQ), 结果如表 3 所示。

2.3.3 精密度试验 取按照“2.2.1”项下方法制备的混合对照品溶液, 按照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算 13 种成分峰面积的 RSD 值, 结果见表 4。13 种成分峰面积的 RSD 值在 0.8%~2.7%, 结果表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取 GQD 全方提取物 6 份, 分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”

项下色谱条件进样, 计算质量分数与 RSD 值, 结果见表 4。13 种成分质量分数的 RSD 值在 0.9%~3.1%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取 GQD 全方提取物, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 置于自动进样室 (4°C) 中, 按照“2.1”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 后进样, 记录色谱图, 计算各成分峰面积的 RSD 值, 结果见表 4。13 种成分峰面积的 RSD 值均在 1.1%~2.8%, 表明供试品溶液在自

表 3 GQD 中 13 种成分线性关系、检测限及定量限

Table 3 Linear relation, limits of detection and limits of quantification of 13 components in GQD

分析物	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOD/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
葛根素	$y=32\,251x+117.9$	0.999 8	4.00~200.00	1.20	4.00
大豆苷元	$y=76\,462x+342.9$	1.000 0	0.40~20.20	0.12	0.40
黄芩苷	$y=38\,192x+343.1$	0.999 9	2.00~100.00	0.60	2.00
汉黄芩苷	$y=51\,502x+229.8$	1.000 0	1.00~50.00	0.30	1.00
汉黄芩素	$y=107\,308x+59.3$	1.000 0	0.40~20.00	0.12	0.40
小檗碱	$y=65\,582x-143.3$	1.000 0	2.02~101.00	0.61	2.02
巴马汀	$y=62\,587x+456.1$	1.000 0	1.00~50.00	0.30	1.00
药根碱	$y=81\,792x+11.6$	1.000 0	0.10~5.00	0.03	0.10
黄连碱	$y=51\,496x-69.1$	1.000 0	1.00~50.00	0.30	1.00
甘草素	$y=51\,392x+109.1$	1.000 0	0.40~20.20	0.12	0.40
异甘草苷	$y=54\,571x+69.8$	1.000 0	0.40~20.00	0.12	0.40
甘草酸	$y=5419x-17.9$	0.999 9	0.98~49.00	0.29	0.98
甘草次酸	$y=4209x+15.0$	0.999 9	0.36~18.00	0.11	0.36

表 4 GQD 中 13 种成分的精密度、重复性与加样回收率实验结果

Table 4 Experimental results of precision, repeatability and recoveries of 13 components in GQD

分析物	精密度	稳定性	重复性		回收率				
	RSD/%	RSD/%	质量分数/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	RSD/%	平均称样量/mg	本底量/mg	加入量/mg	平均回收率/%	RSD/%
葛根素	0.9	1.1	22.94	1.5	200.0	12.16	11.95	99.50	1.32
大豆苷元	1.8	2.4	0.72	1.7	200.0	0.38	0.37	98.20	1.39
黄芩苷	1.5	2.3	15.87	2.1	200.0	8.53	8.32	99.62	0.92
汉黄芩苷	1.4	1.8	4.90	1.9	200.0	2.50	2.45	99.93	1.19
汉黄芩素	0.8	1.8	0.22	3.1	200.0	0.12	0.12	98.61	3.40
小檗碱	1.1	2.8	9.25	1.9	200.0	4.93	4.83	98.86	2.86
巴马汀	1.3	2.7	2.70	0.9	200.0	1.45	1.41	99.17	1.52
药根碱	2.1	2.1	1.76	2.3	200.0	1.00	0.92	99.64	0.89
黄连碱	2.7	1.3	2.79	1.9	200.0	1.49	1.45	98.51	1.02
甘草素	1.4	1.7	5.40	2.5	200.0	1.12	1.09	100.00	1.42
异甘草苷	0.9	1.9	0.42	1.4	200.0	1.10	1.03	100.16	2.07
甘草酸	1.8	2.6	2.34	1.8	200.0	1.49	1.22	99.59	1.13
甘草次酸	1.9	2.4	0.24	2.8	200.0	0.13	0.13	101.28	3.14

动进样室放置 24 h 内的稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 分别精密称取葛根素 119.5 mg、大豆苷元 3.69 mg、黄芩苷 83.24 mg、汉黄芩苷 24.46 mg、汉黄芩素 1.23 mg、小檗碱 48.25 mg、巴马汀 14.12 mg、药根碱 9.18 mg、黄连碱 14.50 mg、甘草素 10.90 mg、异甘草苷 10.25 mg、甘草酸 12.21 mg 和甘草次酸 1.26 mg，置于同一 10 mL 量瓶中，以甲醇溶解并定容至刻度，作为加标溶液。精密称取已测定的 GQD 全方，制备配伍提取物 200 mg，平行取 6 份，置于 100 mL 量瓶中，各加入加标溶液 1 mL。按照“2.2.2”项下方法处理样品，再按照

“2.1”项下色谱条件进样，记录色谱图，用标准曲线法计算 13 种成分的含量，扣除本底量，根据加入量计算回收率，结果见表 4。各成分平均加样回收率为 98.20%~101.28%，RSD 值在 0.89%~3.40%，表明方法准确度良好。

2.4 GQD 各组方提取物的含量测定

取 GQD 不同配伍组方提取物各 3 份，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按照“2.1”项下色谱条件进样分析，得到色谱图。按照“2.3.2”项下回归方程计算含量，并按照全方的生药量折算，计算每克生药量所含有效成分的质量，结果见表 5。

表 5 GQD 各组方提取物中有效成分的含量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Contents of active components in different compatible extracts of GQD ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	葛根素	大豆苷元	黄芩苷	汉黄芩苷	汉黄芩素	小檗碱	巴马汀
葛根	16.23±0.04	0.41±0.02	—	—	—	—	—
黄芩/黄连	—	—	7.27±0.1	2.87±0.04	0.21±0.03	3.79±0.11	2.00±0.08
炙甘草	—	—	—	—	—	—	—
葛根-黄芩/黄连	19.76±0.08**	0.92±0.04**	14.10±0.09**	4.27±0.05**	0.20±0.05	8.50±0.04**	2.50±0.09**
黄芩/黄连-炙甘草	—	—	9.54±0.08***	4.40±0.12**	0.43±0.14***	4.39±0.04***	3.08±0.07***
全方	22.95±0.11***	0.71±0.03***	15.99±0.12***	4.70±0.04***	0.23±0.08**	9.27±0.12***	2.71±0.05***

组别	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	药根碱	黄连碱	甘草素	异甘草苷	甘草酸	甘草次酸
葛根	—	—	—	—	—	—
黄芩/黄连	1.34±0.02	1.82±0.05	—	—	—	—
炙甘草	—	—	0.18±0.01	0.19±0.01	0.98±0.03	0.03±0.01
葛根-黄芩/黄连	1.59±0.12*	2.51±0.06**	—	—	—	—
黄芩/黄连-炙甘草	2.11±0.05***	2.78±0.04***	1.38±0.03**	0.17±0.04	15.05±0.84**	0.04±0.01
全方	1.76±0.13***	2.78±0.11***	5.44±0.32***	0.40±0.01***	2.34±0.02***	0.24±0.03***

与单方组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与葛根-黄芩/黄连组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与黄芩/黄连-炙甘草组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs single herb; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs GG-QL group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs QL-GC group

可见，不同组方配伍中活性成分的含量变化规律：葛根与黄芩、黄连配伍时，葛根中的葛根素与大豆苷元以及黄芩中的黄芩苷含量均显著增加；黄芩、黄连与炙甘草配伍时，其中的黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素和小檗碱等有效成分均有增加，同时甘草中的甘草酸亦有显著增加；全方配伍时各有效成分均有不同程度增加。

3 讨论

本研究建立离子对高效液相色谱法试图从药材的煎煮制备过程中，以 GQD 中的各有效成分的溶出量解释方剂配伍的合理性，为从化学层面揭示方剂“君臣佐使”的配伍规律进行了有意义的尝试。

3.1 分析方法的建立与优化

反相离子对色谱法通过在流动相中加入与待测组分离子电荷相反的离子对试剂以形成离子对，从而改善其保留与分离^[15-16]。对于生物碱类弱碱性的药物，常用烷基磺酸盐阴离子对试剂，本研究对于离子对试剂进行了考察与优化，分别对常用的 3 种离子对试剂戊烷磺酸钠、庚烷磺酸钠、十二烷基磺酸钠进行试验，使用庚烷磺酸钠时，出峰时间适宜且与其他成分可良好分离。而后对其使用浓度进行了优化，考察了 2.5~5.0 mmol/L 的分离效率，结果显示在其浓度为 3.5 mmol/L 时，生物碱之间的可获得基线分离、色谱峰对称性良好、且经方法学验证

各项效能指标均符合定量分析要求。

本研究建立的分析方法-离子对反相液相色谱法不仅能够有效地解决小檗碱、巴马汀、药根碱、黄连碱等生物碱成分色谱峰的拖尾问题,并可同时测定 GQD 中 13 种成分,包括不同种类的化合物,黄酮类、异黄酮类、异喹啉类生物碱、皂苷类等成分,为含有相同药味的中药方剂复杂药效成分的测定提供方法参考。

3.2 GQD 制备方法选择

GQD 出自于张仲景的《伤寒论》,该方由葛根、黄芩、黄连和甘草 4 味中药组成,具有解表清里,升清止痢之功效。其中葛根为君药,其主要成分为葛根素(异黄酮类),既可解表退热,又能升发脾胃清阳之气而止利;以苦寒的黄芩、黄连为臣药,黄芩的主要成分为黄芩苷、汉黄芩苷,汉黄芩素(黄酮类、黄酮苷类及黄酮醇类);黄连的主要成分为小檗碱、巴马汀、药根碱和黄连碱(异喹啉类生物碱),具有清热燥湿、直清里热之功效;甘草为佐使药,其主要成分为甘草素、异甘草苷、甘草酸和甘草次酸(甘草黄酮类、甘草皂苷类),以协调诸药。四药配伍,表里同治,共成清热解肌之剂。

关于 GQD 处方及其煎煮方法,《伤寒论》中记载全方组成为葛根半斤,黄芩三两,黄连三两,炙甘草二两。在现代研究中,方中葛根、黄芩、黄连、炙甘草的配比是 5:3:3:2 还是 8:3:3:2,学术界尚有分歧。据文献考证后认为葛根、黄芩、黄连、甘草的配比为 8:3:3:2 更符合原方^[17-19]。本研究基于临床用药考虑,参考《中国药典》2020 年版中葛根芩连丸制备方法。另对比《伤寒论》记载:“四味,以水八升,先煮葛根,减二升,内诸药,煮取二升,去滓”,药典方法增加了黄芩、黄连于醇中浸泡及渗漉的过程,这一过程可增加药味中脂溶性的成分溶出,也可以防止小檗碱、黄芩苷类等有效成分在长时间煎煮过程中而氧化分解造成损失。综合整体考量,将葛根芩连丸的制备方法用于本研究中方剂及组方的提取制备条件。

综合各学者已有研究,可知黄芩-黄连药对共同煎煮及与方中葛根、甘草等药味煎煮过程中产生沉淀,且沉淀中含有小檗碱、黄芩苷等成分。亦有研究认为该沉淀为黄芩中的黄芩苷与小檗碱等生物碱反应形成的不稳定复合物,在溶液 pH 值改变时能发生沉淀溶解或聚集等现象^[20]。本研究对于黄芩、黄连分别进行浸泡渗漉,而后加水与其他药材共同

煎煮,趁热过滤后,仅可观察到少量沉淀。同时,本实验中采用超声提取法制备不同组方配伍的提取物进一步减少沉淀对于有效成分的含量的影响。超声提取法可利用超声波的空化作用、机械效应和热效应等加速有效物质的释放、扩散和溶解,显著提高提取效率的提取方法。超声提取法已经广泛应用于中药材有效成分的提取及分析方法前处理的过程中^[19]。与已有研究对比,排除煎煮液沉淀影响后,本研究对于不同组方 13 种有效成分的进行同时测定,分析方法简便可行,分析结果平行可比。

3.3 配伍对于方中君药、臣药及佐使药的影响

君药葛根中的葛根素在与臣药及佐使药配伍时均可增加其溶出,在全方中含量最高;大豆苷元在与臣药配伍时含量显著升高,在全方中含量略低与配伍组,但仍高于葛根组。

臣药中黄芩苷、汉黄芩苷在与君药及佐使药配伍时均可增加其溶出,在全方中含量最高;汉黄芩素与甘草配伍时溶出增加。小檗碱、巴马汀和黄连碱在与君药葛根及佐使药甘草配伍时均可增加其溶出,在全方中含量最高;其中,君药对于小檗碱的溶出影响更大,佐使药对于巴马汀、药根碱和黄连碱的溶出影响更大。

佐使药甘草中的甘草素、异甘草苷和甘草次酸均在全方中含量最高,而甘草酸在与臣药配伍组含量最高,说明臣药对于促进其溶出的影响更大。

综上,GQD 全方配伍时对方中有效成分的溶出均有一定的促进的作用。其中,臣药能显著促进君药有效成分的溶出,起到辅佐君药的作用;而佐使药炙不仅可促进臣药中有效成分的溶出,同时也增强了臣药对君药的辅佐作用,起到协调全方以更好发挥药效的作用。

针对不同组方溶出变化的探究,葛根素属于弱酸性化合物,在不同 pH 值背景下溶解度不同,随着臣药中黄芩苷、小檗碱等碱性成分的溶出,使得溶液 pH 值发生改变,促进了葛根素,大豆苷元的溶出。另有研究表明^[21],甘草中的三萜苷类成分(甘草酸等)在结构上,同时存在亲水(2 个葡萄糖醛酸残基)和疏水(三萜配基)部分具有表面活性的作用,当其浓度达到临界胶束浓度时,形成胶束,将难溶性药物包裹于胶束内部,增加了难溶性药物溶解度。这种增溶作用除对于煎煮制备过程的影响,对于药物在体内的吸收的影响以及不同组方有效成分的含量是否引起其于体内的药效变化仍需进一步

探究, 另外, 药味于体内发挥药效的原因是体外含量差异还是体内相互作用的结果仍需进一步探讨, 对于影响药味相互作用及方剂配伍规律的关键因素可开展进一步探究。本研究从药材煎煮制备过程中产生的含量差异进行测定, 为进一步的方剂配伍研究提供了数据支持与研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张滕, 任明, 郭利平. 方剂配伍与组分配伍的理论渊源和相关性分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(2): 267-269.
- [2] 徐砚通. 方剂配伍的现代科学内涵探讨 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 465-469.
- [3] Zhou M M, Hong Y L, Lin X *et al.* Recent pharmaceutical evidence on the compatibility rationality of traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 206: 363-375.
- [4] 任蕾, 孙伟卫, 李亚妮, 等. 葛根芩连汤及其拆方配伍 FTIR 图谱比较研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(4): 830-834.
- [5] 张艺竹, 安歆, 袁瑾, 等. 基于药代动力学参数分析比较葛根芩连汤的不同配伍肠吸收特性 [J]. 药学报, 2013, 48(10): 1611-1617.
- [6] 张伯莎, 安歆, 王跃, 等. 葛根芩连汤有效成分不同配伍的肠吸收 Caco-2 细胞模型研究 [J]. 中药材, 2012, 35(9): 1460-1463.
- [7] 郭友立. 葛根芩连汤沉淀物溶出度及盐酸小檗碱、葛根素配伍肠吸收变化的研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2010.
- [8] Xu B L, Zhang G J, Ji Y B. Active components alignment of Gegenqinlian decoction protects ulcerative colitis by attenuating inflammatory and oxidative stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 253-260.
- [9] Liu T, Li R Y, Cui Y, *et al.* Metabonomic analysis of plasma biochemical changes in pyrexia rats after treatment with Gegenqinlian decoction, aspirin and itraconazole by UHPLC-FT-ICR-MS [J]. *J Pharm Anal*, 2020, 10(6): 581-587.
- [10] 王钰乐, 刘文, 杨道斌, 等. 葛根芩连汤不同配伍对炙甘草指纹图谱中甘草酸的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(11): 2368-2372.
- [11] 戴开金, 罗佳波, 谭晓梅, 等. 葛根芩连汤不同配伍对葛根素含量的影响 [J]. 中草药, 2003, 34(6): 506-508.
- [12] 陈丽红, 王强. 葛根芩连汤不同配伍对黄芩苷、小檗碱含量的影响 [J]. 西北药学杂志, 2005, 20(4): 147-149.
- [13] 谭晓梅, 戴开金, 罗佳波, 等. 葛根芩连汤不同配伍对黄芩苷含量的影响 [J]. 中草药, 2003, 34(7): 598-600.
- [14] 中国药典 [S]. 一部, 2020: 1712-1713.
- [15] Nwokeoji A O, Earll M E, Kilby P M, *et al.* High resolution fingerprinting of single and double-stranded RNA using ion-pair reverse-phase chromatography [J]. *J Chromatograph B*, 2019, 1104: 212-219.
- [16] Kim Y, Na D H. Simultaneous determination of cysteamine and cystamine in cosmetics by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *Toxicol Res*, 2019, 35(2): 161-165.
- [17] 刘宇政, 章军, 王跃生, 等. 葛根芩连汤剂量相关问题探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 216-218.
- [18] 文颖娟, 周永学, 张养生. 葛根芩连汤用剂剂量探析 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(8): 82-83.
- [19] 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.
- [20] Chandra-Hioe M V, Xu H Arcot J. The efficiency of ultrasonic-assisted extraction of cyanocobalamin is greater than heat extraction [J]. *Heliyon*, 2020, 6(1): e03059.
- [21] 雷艳丽, 孙磊, 隋宏, 等. 黄芩苷-小檗碱复合物的形成规律 [J]. 中成药, 2018, 40(3): 577-582.
- [22] 薛禾菲, 张琬靖, 刘沛, 等. 甘草酸的增溶作用探究 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(14): 13-17.

[责任编辑 郑礼胜]