



# HPLC 同时测定小柴胡汤中 5 种有效成分

刘青春<sup>1,2</sup>, 赵军宁<sup>1\*</sup>, 鄢良春<sup>1</sup>, 易进海<sup>1</sup>, 宋军<sup>1</sup>

(1. 四川省中医药科学院, 四川 成都 610041

2. 成都华西海圻医药科技有限公司, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的:建立小柴胡汤中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素和甘草酸的 HPLC-PDA 测定方法。方法:采用反相高效液相色谱法, Symmetry Shield™ RP<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm);流动相乙腈-0.01% 磷酸溶液梯度洗脱;流速 0.45 mL · min<sup>-1</sup>;检测波长 251 nm;柱温 30 ℃。结果:本方法的准确度、精密性、重复性、专属性和定量线性范围均符合要求,同时测定了小柴胡汤中黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素和甘草酸的含量。结论:该方法简便快速、准确可靠,可用于同时测定小柴胡汤中 5 种有效成分的含量。

**[关键词]** 小柴胡汤;黄芩苷;黄芩素;汉黄芩苷;汉黄芩素;甘草酸;高效液相色谱法

小柴胡汤是汉代张仲景《伤寒论》少阳病症的主方,也是八法中“和”法的代表方。具有解表散热,疏肝和胃的功能,临床上以寒热往来、口苦咽干、胸胁苦满、舌苔薄白、弦脉为辨证要点,为和解少阳之代表方剂。

根据 2005 年版《中国药典》一部,小柴胡汤由柴胡、黄芩、党参、半夏、甘草、生姜、大枣 7 味药组成<sup>[1]</sup>。有关小柴胡汤中有效成分的含量测定,目前多数文献报道是通过 HPLC 测定其中单个有效成分的含量<sup>[2-6]</sup>,或者是测定其中黄芩苷和甘草酸的含量<sup>[7]</sup>。要科学、客观地评价小柴胡汤的质量和深入地研究小柴胡汤药效物质基础,应尽可能多的测定其中有效成分的含量。

本研究建立起了利用 HPLC 同时测定小柴胡汤中黄芩苷(baicalin, BCN)、黄芩素(baicalein, BCE)、汉黄芩苷(wogonoside, WGS)、汉黄芩素(wogonin, WGN)、甘草酸(glycyrrhizic acid, GA) 5 种有效成分含量的方法。

## 1 材料

Waters 高效液相色谱仪(2695-2996), Empower Pro 色谱数据工作站。超纯水系统(Millipore), CP-

225D 型精密电子天平(Sartorius), PB-10 酸度计(Sartorius)。

BCN(批号 110715-200815), BCE(批号 111595-200604), WGN(批号 111514-200403)和甘草酸单铵盐(ammonium glycyrrhizinate, AG, 批号 110731-200615)对照品均购自中国药品生物制品检定所, WGS(四川维克奇生物科技有限公司, 批号 20081215), 乙腈为色谱纯(美国, fisher); 甲醇为色谱纯(德国, Merck); 磷酸为分析纯(成都市科龙化工试剂厂); 水为 Millipore 系统生产的超纯去离子水(18.2 MΩ)。柴胡、黄芩、半夏(姜制)、党参、生姜、甘草和大枣购自四川省中药饮片有限公司, 经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件及系统适应性试验

Symmetry Shield™ RP<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm); 柱温 30 ℃; 流速 0.45 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长 251 nm; 流动相乙腈(A)-0.01% 磷酸(B), 梯度洗脱, 0 ~ 20 min, A-B(35:65), 20 ~ 60 min, 35% ~ 65% A; 进样量 10 μL, 各对照品的平均理论塔板数均大于 3 000。

### 2.2 供试品和对照品溶液的制备

**2.2.1 供试品的制备** 参考《中国药典》小柴胡汤颗粒的制备工艺, 柴胡 360 g、黄芩 135 g、半夏(姜制) 135 g、党参 135 g、生姜 135 g、甘草 135 g 和大枣 135 g, 以水煎煮 3 次, 第 1 次加 10 倍量水, 煎煮 2 h, 第 2, 3 次各加水 8 倍量水, 煎煮 1 h, 合并煎液,

[收稿日期] 2009-11-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30672651)

[通信作者] \* 赵军宁, 研究员, Tel: (028) 85226120/85231378, E-mail: zarmy@189. cn

[作者简介] 刘青春, 硕士, 研究方为药物代谢动力学, E-mail: abc\_23@126. com



滤过,滤液过大孔吸附树脂柱,以 70% 乙醇洗脱,收集乙醇洗脱液,减压回收乙醇,浓缩干燥,备用。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取 BCN, WGS, BCE, WGN 和 AG 对照品适量,以甲醇配制成质量浓度分别为 170, 75, 50, 46, 86 mg · L<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液,作为标准储备液。4 °C 冰箱冷藏保存。

### 2.3 线性关系考察

取混合标准储备液,用甲醇稀释成 6 个不同的浓度,按测定条件进样测定,测定峰面积积分值,以紫外峰面积 *Y* 对浓度 *X* 进行线性回归。各对照品 *r* 均大于 0.999,线性关系良好。结果见表 1。

表 1 标准曲线与线性范围

对照品	标准曲线	<i>r</i>	线性范围 /mg · L <sup>-1</sup>
BCN	$Y = 65\ 818X - 98\ 496$	0.999 7	3.40 ~ 170
WGS	$Y = 83\ 388X - 67\ 617$	0.999 6	1.50 ~ 75
BCE	$Y = 104\ 068X - 58\ 063$	0.999 6	1.00 ~ 50
WGN	$Y = 125\ 607X - 20\ 763$	0.999 7	0.23 ~ 23
AG	$Y = 15\ 671X - 10\ 282$	0.999 8	0.86 ~ 86

### 2.4 精密度试验

取混合标准储备液,稀释 10 倍,进样 10 μL,重复测定 6 次,记录色谱峰面积,BCN, WGS, BCE, WGN, AG 的 RSD 分别为 1.9%, 0.62%, 0.85%, 1.9%, 0.08%。

### 2.5 重复性试验

精密称取组成小柴胡汤的各药材,按照 2.2.1 项下方法制备供试品,取适量供试品甲醇溶解测定其中 BCN, WGS, BCE, WGN, AG 的含量。进行重复性考察,结果 BCN, WGS, BCE, WGN, AG 的 RSD 分别为 0.98%, 0.49%, 1.2%, 2.4%, 1.4%。

### 2.6 稳定性试验

取小柴胡汤提取物,用甲醇配制成供试品溶液,分别在 1, 3, 24, 48 h, 进样 10 μL, 测定峰面积积分值。结果表明,供试品溶液在 48 h 内稳定,BCN, WGS, BCE, WGN, AG 的 RSD 分别为 2.5%, 1.5%, 0.92%, 0.92%, 1.1%。

### 2.7 加样回收率试验

精密称取已知含量的小柴胡汤供试品适量(6 份),分别加入混合对照品溶液适量,超声 30 min。按含量测定方法测定,计算加样回收率,结果 BCN, WGS, BCE, WGN, AG 的平均加样回收率分别为

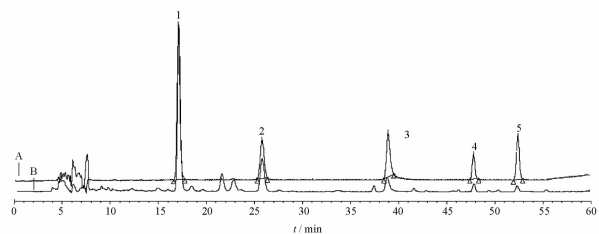
99.41%, 100.67%, 98.73%, 101.67%, 100.08%, 其 RSD 分别为 1.9%, 1.6%, 0.80%, 1.8%, 2.7%。

### 2.8 含量测定

取按照 2.2.2 项下方法制备的供试品 3 份,置于 100 mL 量瓶,加甲醇至刻度,超声 30 min, 0.22 μm 滤膜过滤,滤液作为供试品溶液,进样 10 μL,测定 BCN, WGS, BCE, WGN, GA 含量。结果见表 2, 图 1。

表 2 小柴胡汤样品中 5 种成分质量分数(*n* = 3)

成分	平均值/mg · g <sup>-1</sup>	RSD/%
BCN	315.70	0.09
WGS	68.46	0.51
BCE	18.76	0.88
WGN	5.66	0.67
GA	19.05	1.06



A. 混合对照品溶液; B. 小柴胡汤样品;  
1. BCN; 2. WGS; 3. BCE; 4. AG; 5. WGN。

图 1 对照品和小柴胡汤样品 HPLC 图

### 3 讨论

中药复方制剂的成分复杂、含量微少,一般的分离仪器与方法难以对复方中药成分进行分离和检测。高效液相色谱-二极管阵列检测器(PDA),能对每个洗脱组分进行光谱扫描,经计算机处理后,得到光谱和色谱结合的三维图谱。其中吸收光谱用于定性(确证是否是单一纯物质),色谱用于定量,常用于复杂样品(如生物样品、中药)的定性定量分析。本试验选用 HPLC-PDA 法首次同时测定了小柴胡汤中 5 种有效成分,方法简便,灵敏度高,重复性好,便于推广。

小柴胡汤含 7 种生药,成分复杂,主要成分包括多糖类、黄酮类、皂苷类、苯烷烃及氨基酸等。黄芩是方中的臣药,具有清热燥湿,泻火解毒的功效,其有效成分是黄酮类成分<sup>[8]</sup>。甘草是方中的佐药,具有补脾益气,清热解毒,祛痰止咳,缓急止痛,调和诸



药的功效,其最重要的有效成分之一是甘草酸。研究显示这些成分具有抗菌消炎、抗过敏、抗氧化、抗病毒、护肝利胆、降血脂、抗肿瘤等多种生物活性<sup>[9-10]</sup>。

笔者通过对方中 BCN, WGS, BCE, WGN, AG 5种成分在 200 800 nm 进行全波长扫描,发现 BCN, WGS, BCE, WGN 在 275 nm 附近都有较大的紫外吸收,AG 在 251 nm 附近有最大紫外吸收,同时发现 BCN, WGS, BCE, WGN 在 251 nm 的检测波长下也有较强的响应信号,因此,本试验选择 251 nm 作为小柴胡汤 5 种有效成分的检测波长。

小柴胡汤中多种黄酮类化合物的极性相近,本实验经过多次调整梯度洗脱时流动相比例,流速,柱温,最终筛选出使各成分能够较好分离的色谱条件,在本试验系统条件下,各成分的理论塔板数均大于 3 000,各峰分离度大于 1.5,试验时间短,各成分在 55 min 内就能够实现良好的分离。该方法简便准确,专属性强,为控制小柴胡汤质量和深入研究小柴胡汤的药效物质基础提

供了参考。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:357.
- [2] 王永梅,王雪峰,沙明. HPLC 法定量分析小柴胡汤中黄芩苷的研究[J]. 辽宁中医杂志,2003,30(11):882.
- [3] 石莹. HPLC 测定小柴胡汤丸中黄芩苷的含量[J]. 中成药,2007,29(7):附23.
- [4] 赵丽众,杨雁. HPLC 法测定小柴胡颗粒剂黄芩苷的含量[J]. 齐鲁药事,2005,24(8):470.
- [5] 王雪峰,刘芳,王永梅,等. 小柴胡汤中黄芩苷在大鼠体内的代谢动力学研究[J]. 中药新药与临床药理,2001,12(2):84.
- [6] 李成网,李清华,童玉新. HPLC 法测定小柴胡汤滴丸中柴胡皂苷 A 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(5):19.
- [7] 朱臻宇,刘宇,赵白云,等. HPLC/DAD 法同时测定小柴胡汤中黄芩苷和甘草酸的含量[J]. 药学实践杂志,2006,24(6):331.
- [8] 高中洪,黄开勋,徐辉碧,等. 黄酮类生物活性的研究进展[J]. 中国药学杂志,1998(33):705.
- [9] 梁英,韩鲁佳. 黄酮类化合物的药理学作用研究进展[J]. 中国农业大学学报,2003(8):9.
- [10] 李斌霞,佟杰. 甘草酸药理作用及机制的研究进展[J]. 数理医药学杂志,2007,20(2):228.

## Simultaneous determination of five active constituents in Xiaochaihu Tang by HPLC

LIU Qingchun<sup>2</sup>, ZHAO Juning<sup>1\*</sup>, YAN Liangchun<sup>1</sup>, YI Jinhai<sup>1</sup>, SONG Jun<sup>1</sup>  
(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China;  
China; 2. WestChina-Frontier Pharma Tech Co, Ltd, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC-PDA method for the determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin and glycyrrhizic acid in Xiaochaihu Tang. **Method:** A Symmetry Shield<sup>TM</sup> RP<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-0.01% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in gradient elution. The detection wavelength was 251 nm, the flow rate was 0.45 mL · min<sup>-1</sup> and the column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** The accuracy, precision, sensitivity, specificity and linearity of this method met the requirements. The contents of the five effective fractions were determined simultaneously. **Conclusion:** The method is rapid, simple and accurate and it can be suitable for the determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin and glycyrrhizic acid in Xiaochaihu Tang simultaneously.

[Key words] Xiaochaihu Tang; baicalin; baicalein; wogonoside; wogonin; glycyrrhizic acid; HPLC

doi: 10.4268/cjcmm20100610

[责任编辑 周驰]