·论 著·

HPLC-DAD-TOF/MS 法测定小柴胡汤中柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸的含量

赵白云[1],朱臻宇[1],王 彬[2],赵 亮[1],张 海[1],许 茜[1],柴逸峰[1*]
(1.第二军医大学药学院药物分析学教研室,上海 200433;2.第二军医大学东方肝胆外科医院药材科,上海 200438)

[摘要] **目的**:建立小柴胡汤药材中柴胡皂苷 a 、黄芩苷和甘草酸含量测定的方法。**方法**:采用 HPLC-DAD-TOF/MS,Agilent Zorbax XDB-C18 柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm),水(0.025%甲酸)-甲醇(0.025%甲酸)为流动相,梯度洗脱,流速为 0.15 ml·min^{-1},柱温为 25℃ ,进样量 0.25 μl;质谱条件为电喷雾电离源(ESI),正离子监测,毛细管电压为 4 000 V,干燥气流速为 10.0 L·min^{-1},干燥气温度为 350℃ ,雾化器压力为 40 psi(275 792 Pa),裂解器电压为 200 V,用于定量分析的柴胡皂苷 a 离子为 m/z 803.420 0～803.490 0。黄芩苷和甘草酸检测波长分别是 275 nm 和 250 nm。**结果**:柴胡皂苷 a 线性范围为 0.211 6～127.3 μg·ml^{-1}, 线性方程为 Y=461 182 X+2 000 000(r=0.999 0)。黄芩苷线性范围为 0.758～455 μg·ml^{-1},线性方程 Y=5.978 9X−27.418(r=0.999 5)。甘草酸单铵盐线性范围为 2.268-136.8 μg·ml^{-1},线性方程 Y=0.949 9X−1.046 4(r=0.999 5)。高、中、低浓度的柴胡皂苷 a 平均回收率分别为(95.54±1.60)%、(99.39±3.97)%、(103.8±1.97)%和黄芩苷平均回收率分别为(102.3±0.47)%、(100.9±1.32)%、(97.15±2.10)%及甘草酸单铵盐平均回收率分别为(102.6±1.96)%、(100.3±3.12)%、(97.75±1.25)%。日内、日间 RSD 均<5%,21 d 内稳定性试验结果表明 RSD 均<5%。小柴胡汤中柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸的含量分别为 0.750 0、10.65 和 2.572 mg/g。**结论**:该方法简便、灵敏、快速、准确,适用于小柴胡汤的质量控制。

[关键词] 色谱法,高压液相;柴胡皂苷 a;黄芩苷;甘草酸;小柴胡汤
[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2007)05-0527-04

HPLC-DAD combined with TOF/MS technique in determination of saikosaponin a, baicalin and glycyrrhizic acid in *Xiaochaihu* Decoction

ZHAO Bai-yun[1], ZHU Zhen-yu[1], WANG Bin[2], ZHAO Liang[1], ZHANG Hai[1], XU Qian[1], CHAI Yi-feng[1*] (1. Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438)

[**ABSTRACT**] **Objective**: To establish a method for determination of saikosaponin a, baicalin and glycyrrhizic acid in *Xiaochaihu* Decoction. **Methods**: A combined method of HPLC-DAD and time of flight mass spectrometry (TOF/MS) was used; the chromatography condition was as following: Agilent Zorbax XDB C18 column (25℃, 2.1 mm×50 mm, 1.8 μm); mobile phase: methanol (0.025%, V/V, formic acid)-water 0.025%, V/V, formic acid) with gradient elution at a flow rate of 0.15 ml·min^{-1}. The injection volume was 0.25 μl. Atomospheric pressure electronic spray ionization was used to quantify saikosaponin a at the capillary voltage of 4 000 V, the flow and temperature of drying gas were 10.0 L·min^{-1} and 350℃, respectively; nebulizer pressure was 40 psi (275 792 Pa), and the fragment voltage was 200 V; the m/z of saikosaponin a was 803.420 0-803.490 0 for quantitative analysis. The wavelengths for detection of baicalin and glycyrrhizic acid were 275 nm and 250 nm, respectively. **Results**: The calibration curves were Y=461 182X+2 000 000(r=0.999 0), Y=0.949 9X−1.046 4(r=0.999 5) and Y=5.978 9X−27.418(r=0.999 5) for saikosaponin a (0.211 6-127.3 μg·ml^{-1}), baicalin (0.758-455 μg·ml^{-1}) and ammonium glycyrrhizinate (2.268-136.8 μg·ml^{-1}), respectively. The recovery rates of the low, medium and high concentrations were (95.54±1.60)%, (99.39±3.97)% and (103.8±1.97)% for saikosaponin a, (102.3±0.47)%, (100.9±1.32)% and (97.15±2.10)% for baicalin, and (102.6±1.96)%, (100.3±3.12)% and (97.75±1.25)% for ammonium glycyrrhizinate, respectively. The intra-day and inter-day RSD was both less than 5% and the RSD was less than 5% for 21 days. **Conclusion**: The method in the present study is simple, sensitive, rapid, and accurate for quality control of *Xiaochaihu* Decoction.

[**KEY WORDS**] chromatography, high pressure liquid; saikosaponin a; baicalin; glycyrrhizic acid; *Xiaochaihu* Decoction
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 527-530]

小柴胡汤(*Xiaochaihu* Decoction)为传统复方经典方剂,在临床上应用广泛,始见于张仲景《伤寒论》,具有和解少阳、疏利三焦气机之功效,由柴胡、

[基金项目] 全军医药科研基金(06MB205). Supported by Foundation of Medical Research of PLA (06MB205).
[作者简介] 赵白云,硕士生. E-mail: baiyunyaofen@yahoo.com.cn
* Corresponding author. E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

黄芩、炙甘草、人参、制半夏、生姜和大枣组成。现代研究证实，小柴胡汤具有调节细胞免疫、诱生多种细胞因子及保肝作用[1-4]。柴胡在小柴胡汤中位居君药，黄芩位居臣药，甘草位居佐药，其主要有效成分分别是柴胡皂苷 A、黄芩苷和甘草酸[5]。目前，国内已有多种以小柴胡汤配方为基础的中成药制剂，其质量标准各不相同，多以黄芩苷或柴胡皂苷 a 的含量测定为主[6-8]，同时检测柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸的方法尚无报道。故本研究建立的同时测定小柴胡汤中柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸的方法对以小柴胡汤配方为基础的中药复方的质量标准制定有重要意义。

1　仪器和试药

Agilent 1100（在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器），G1969A TOF/MS，Agilent 色谱数据工作站，Analyst QS 分析软件，十万分之一 AE240 型电子天平（梅特勒，美国）。

饮片柴胡（PD060707）、黄芩（HY2006030204）、炙甘草（XD060826）、人参（060804）、制半夏（060914）和大枣（HP2006070501）由上海华宇药业有限公司提供，经第二军医大学药学院生药学教研室孙连娜副教授鉴定。柴胡皂苷 A、黄芩苷和甘草酸单铵盐对照品购自上海药品检定所；甲醇为色谱纯，购自 Fisher 公司；水为娃哈哈纯净水。

2　方法和结果

2.1　*测定条件*　色谱柱为 Agilent Zorbax XDB-C18，（2.1 mm×50 mm，1.8 μm），流动相为水（0.025%甲酸，A 液）-甲醇（0.025%甲酸，B 液），梯度洗脱程序如下：0～1 min：70%A-30%B；1～45 min：25%A-75%B；45～55 min：20%A-80%B；55～65 min：100%B。流速 0.15 ml/min，柱温：25℃，进样量：0.25 μl，运行时间 75 min，离子源为 APCI-ESI 源，正离子方式监测，用于定量分析的离子 m/z 803.420 0～803.490 0，干燥气温度为 350℃，雾化气压力为 275 792 Pa，雾化气流速为 10 L/min，碰撞碎片电压 200 V。

2.2　*标准溶液的配制*　分别精密称取柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸单铵盐对照品 3.819 mg、13.65 mg 和 4.083 mg，置于 10 ml 量瓶中，用甲醇溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，作为标准储备液。取储备液各 5.0 ml 于 25 ml 量瓶中，经稀释，配成标准溶液，柴胡皂苷 a 浓度为 127.3、84.67、42.33、21.16、10.58、2.116、0.211 6 $\mu g \cdot ml^{-1}$；黄芩苷浓度为 455.0、303.3、151.6、75.80、37.90、7.58、0.758 $\mu g \cdot ml^{-1}$；甘草酸单铵盐浓度为 136.1、90.73、45.36、22.68、11.34、2.268 $\mu g \cdot ml^{-1}$。

2.3　*小柴胡汤的制备*　取饮片柴胡 180 g、黄芩 135 g、炙甘草 75 g、人参 90 g、制半夏 135 g、大枣 90 g 和生姜 135 g，混匀，粉碎，过 40 目筛，置 50℃烘箱 1 h，密封储藏，备用。

2.4　*方法学考察*

2.4.1　*标准曲线的制备*　分别取上述不同浓度标准溶液，依 2.1 项下条件进样测定，分别以质谱峰（柴胡皂苷 a）和紫外峰面积（黄芩苷和甘草酸单铵盐）对浓度进行线性回归，柴胡皂苷 a 线性方程：$Y=461\ 182X+2\ 000\ 000$（$r=0.999\ 0$），线性范围：0.211 6～127.3 $\mu g \cdot ml^{-1}$；黄芩苷线性方程：$Y=5.978\ 9X-27.418$（$r=0.999\ 5$），线性范围：0.758～455 $\mu g \cdot ml^{-1}$；甘草酸单铵盐线性方程：$Y=0.949\ 9X-1.046\ 4$（$r=0.999\ 5$），线性范围为 2.268～136.8 $\mu g \cdot ml^{-1}$。

2.4.2　*精密度试验*　在 2.1 项条件下，分别取柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸单铵盐高、中、低（127.3、21.16、2.116；455.0、75.80、7.580 和 136.1、22.68、2.268 $\mu g \cdot ml^{-1}$）3 种浓度的标准液，在 1 d 之内连续进样 5 次，考察日内精密度，RSD 分别为 1.07%、4.05%、1.25%；0.36%、1.52%、4.51%和 0.68%、2.51%、1.04%（$n=5$）。连续测定 5 d，考察日间精密度，RSD 分别为 1.32%、3.52%、1.63%；0.68%、1.86%、1.21%和 0.35%、1.29%、4.17%（$n=5$）。

2.4.3　*稳定性考察*　分别配制高、中、低 3 种浓度的柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸单铵盐标准液（127.3、21.16、2.116；455.0、75.80、7.580 和 136.1、22.68、2.268 $\mu g \cdot ml^{-1}$）200 μl，置 2℃冰箱冷藏，分别在 1、7、14、21 d 按 2.1 项下条件检测，结果表明样品在 21 d 内基本稳定（RSD<5%）。

2.4.4　*最低检测限*　经一系列稀释的标准溶液测定，以信噪比（S/N）为 3∶1 计，柴胡皂苷 a，黄芩苷和甘草酸单铵盐的最低检测限分别为 19.10、189.5 $ng \cdot ml^{-1}$ 和 1.02 $\mu g \cdot ml^{-1}$。以信噪比（S/N）为 10∶1 计，柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸单铵盐的定量限分别为 69.5、689.1 $ng \cdot ml^{-1}$ 和 3.71 $\mu g \cdot ml^{-1}$。甘草酸单铵盐的最低定量限高于线性范围下限。

2.4.5 加样回收率试验 取已测定含量的小柴胡汤样品 3 份,各 0.5 g,精密称定,分别准确加入高、中、低浓度的柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸单铵盐对照品,按 2.4.6 项下样品测定方法操作,平行操作 3 份,计算平均回收率。结果高、中、低浓度的柴胡皂苷 a 平均回收率分别为(95.54±1.60)%、(99.39±3.97)%、(103.8±2.0)%,黄芩苷为(102.3±0.5)%、(100.9±1.3)%、(97.15±2.10)%,甘草酸单铵盐为(102.6±2.0)%、(100.3±3.1)%、(97.75±1.25)%。

2.4.6 样品含量测定 分别取按 2.3 项下条件自制的 3 份小柴胡汤 0.5 g,精密称定,置 100 ml 平底烧瓶中,加 70%乙醇 10 ml,回流 40 min,放冷至室温,过滤,收集滤液,重复提取 3 次,合并滤液,挥干,甲醇定容至 10 ml,进样前用 0.22 μm 滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液进样测定。计算各样品中柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸的含量,结果分别为 0.762 5、0.773 8、0.713 6 mg/g;10.72、10.32、10.92 mg/g和 2.579、2.477、2.659 mg/g;RSD 分别为4.01%、3.27%、2.92%;1.76%、2.33%、2.93%和 2.76%、3.21%、2.81%。HPLC 图谱见图 1。

3 讨 论

3.1 前处理条件的考察

3.1.1 提取方式 称取同一批样品 0.5 g,精密称定,置 100 ml 平底烧瓶中,加 10 ml 70%乙醇,分别用超声、回流和索氏前处理,提取 60 min,过滤,挥干,定容 10 ml 容量瓶。按上述色谱条件,进样,记录峰面积,计算柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸含量,结果表明,回流处理的提取效果优于超声处理,而超声处理优于索氏处理,因此选用回流处理。

3.1.2 正交实验考察提取参数 采用正交设计法表 1 考察提取溶剂乙醇的比例(A)、提取时间(B)以及提取次数(C)对样品中柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸的提取效果的影响。按正交实验计算柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸含量,极差和方差分析结果表明,采用 $A_1B_2C_3$ 对样品中柴胡皂苷 a 提取效果最好。采用 $A_1B_3C_3$ 对样品中黄芩苷和甘草酸提取效果最好,但与 $A_1B_2C_3$ 提取效果无显著性差异。综合考虑柴胡皂苷 a 含量相对较低,最终选择 70%乙醇溶液回流 40 min,重复提取 3 次为前处理条件。

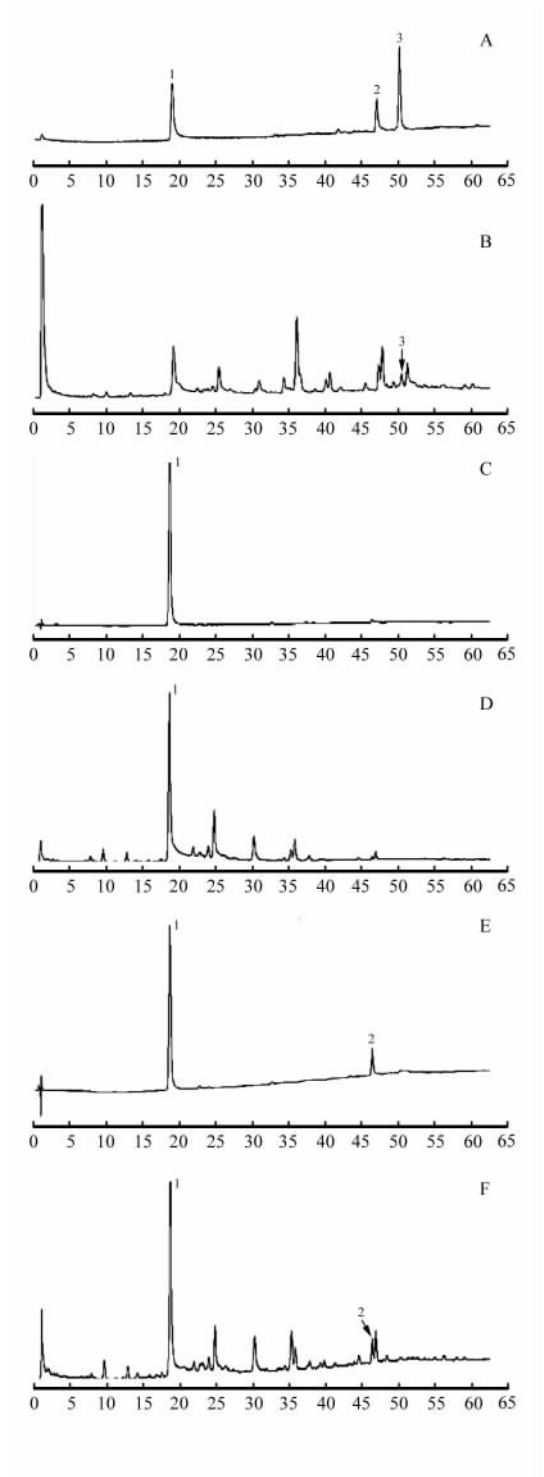

图 1 柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸单铵盐标准品和样品谱图

Fig 1 Chromatograms of saikosaponin a, baicalin and ammonium glycyrrhizinate standard and sample

A: TOF-MS of saikosaponin a standard; B: TOF-MS of *Xiaochaihu* Decoction; C: UV(275 nm) of baicalin standard; D: UV(275 nm) of *Xiaochaihu* Decoction; E: UV(250 nm) of Monoammonium glycyrrhizinate standard; F: UV(250 nm) of *Xiaochaihu* Decoction; 1: Baicalin; 2: Monoammonium glycyrrhizinate; 3: Saikosaponin a

表 1　回流提取的因素与水平表

Tab 1　Factors and levels of reflux extraction in decoction

Levels	Factors		
	Ethanol：Water (*V*/*V*，A)	Reflux time (*t*/min，B)	Extraction times(C)
1	70：30	20	1
2	50：50	40	2
3	0：100	60	3

3.2　色谱条件的优化

3.2.1　*流动相*　流动相有机溶剂选择质子化能力相对较强的甲醇，有利于待测物的质谱响应。考察流动相的有机添加剂，发现酸性条件（甲酸，乙酸）和缓冲盐（乙酸铵，三乙胺）有助于改善黄芩苷和甘草酸峰形，但缓冲盐严重抑制柴胡皂苷 a 质谱信号（图 2）。实验表明，在 0.025%甲酸添加剂条件下，检测灵敏度均能达到令人满意的结果，且结果稳定可靠。

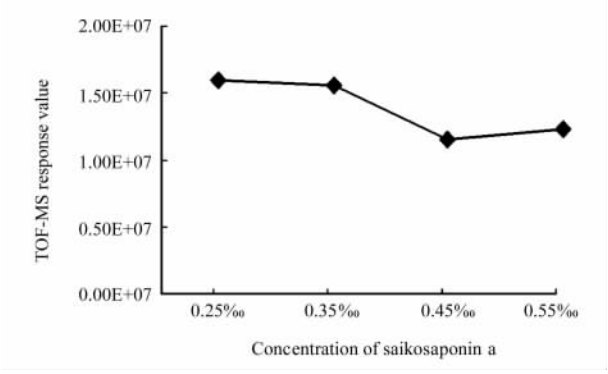

图 2　不同浓度甲酸条件下柴胡皂苷 a 的质谱响应值

Fig 2　TOF-MS response value of saikosaponin a standard in different concentrations formic acid

3.2.2　*洗脱程序*　小柴胡汤中成分很多，极性较大，梯度洗脱时流速过高或流动相中甲醇比例上升过快均会使柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸等中极性成分保留时间缩短，导致分离度不佳，因此流动相中甲醇的比例应该是缓慢地上升，经多次实验，确定了 0.15 ml·min^{-1}的流速及 2.1 项下洗脱程序，柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸峰形良好且分离度大于 1.5，满足定量分析要求。

3.3　*质谱条件*　考察大气压电喷雾电离源（APCI-ESI）、大气压化学电离源（APCI）和混合离子源（MMI），分别在正负离子条件下的监测，发现 APCI-ESI 源正离子模式下柴胡皂苷 a 质谱信号最好；同时比较不同干燥气流速（6、8、10 L/min）和毛细管碎片电压（180、200、220 V）时的质谱信号，实验结果表明，采用 10 L/min 的氮气和 200 V 碎片电压，质谱响应最好。

3.4　*DAD-TOF/MS 联用*　由于小柴胡汤是复方方剂，成分复杂，紫外检测不能满足多成分分析需要，其中柴胡皂苷 a 只有末端吸收，采用紫外法检测，会遇到灵敏度低、基线易漂移及溶剂的干扰等问题，飞行时间质谱 TOF/MS 对此类成分的分析具有明显优势，尤其是微量成分的分析。本研究采用 DAD 和 TOF/MS 联用测定和分析 SST 中柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸，获得满意结果。

中华人民共和国药典中对小柴胡汤的质量控制方法比较简单，并不能有效地控制其质量。本研究试验结果表明，采用 HPLC-DAD-TOF/MS 方法，能方便准确地测定柴胡皂苷 a、黄芩苷和甘草酸的含量，适用于小柴胡汤的质量控制。

[参 考 文 献]

[1]　金方明，方泰惠，周玲玲. 小柴胡汤的免疫药理学研究进展[J]. 陕西中医，2004，25：92-93.

[2]　吴　斌. 小柴胡汤治疗慢性肝病研究现状[J]. 中国医学理论与实践，2005，15：571-572.

[3]　张希东，于清欣，刘中景. 拉米夫定联合小柴胡汤抗 HBV 及调节免疫的临床观察[J]. 中西医结合肝病杂志，2004，14：170-171.

[4]　田字彬，帅　峰，孙桂荣，等. 小柴胡汤对实验性肝纤维化大鼠 TIMP-1 mRNA 表达的影响[J]. 青岛大学医学院学报，2004，40：224-226.

[5]　雨谷荣，获原幸夫. 从药理和药化探讨小柴胡汤(1)[J]. 国外医学·中医中药分册，1990，12：77-80.

[6]　刘　岱，杨立新，崔淑莲. 高效液相色谱法测定柴贯冲剂中柴胡皂甙 A 的含量[J]. 中国中药杂志，1998，23：92-93.

[7]　马振山，仝　燕，王　琳，等. 复方柴胡汤提取分离的研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2002，8：1-3.

[8]　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，2003，30：882-883.

[收稿日期]　2007-03-19　　[修回日期]　2007-04-12

[本文编辑]　尹　荼