

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01010

· 研究快报 ·

## 高效液相色谱法测定小柴胡汤中黄芩苷、汉黄芩苷的含量

纪松岗<sup>1</sup>, 刘晓帆<sup>2</sup>, 朱臻宇<sup>2</sup>, 梁珊珊<sup>3</sup>, 赵亮<sup>3</sup>, 张海<sup>3</sup>, 柴逸峰<sup>2\*</sup>

1. 解放军 401 医院药剂科, 青岛 266071
2. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433
3. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 采用高效液相色谱法测定小柴胡汤中黄芩苷、汉黄芩苷的含量。**方法** 饮片粉末用水回流提取, 色谱柱: Agilent Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈和水; A 相为 0.2% 磷酸-水, B 相为乙腈, 梯度洗脱; 流速 1 ml/min, 柱温 25℃, 检测波长 275 nm, 进样量 15 μl。**结果** 黄芩苷和汉黄芩苷在 30 min 内基线分离。以峰面积(Y)对浓度(X)的标准曲线分别为: 黄芩苷  $Y=44.16X-36.22$  ( $r=0.9999$ ); 汉黄芩苷  $Y=52.08X-28.69$  ( $r=0.9999$ )。日内及日间精密密度均小于 1%, 黄芩苷和汉黄芩苷的定量限分别为 0.6156 μg/ml 和 0.2208 μg/ml, 黄芩苷和汉黄芩苷加样回收率 ( $n=6$ ) 分别为 95.73% (RSD=0.8%) 及 97.02% (RSD=1.56%)。**结论** 该方法稳定性好, 测定结果准确可靠, 可用于小柴胡汤的质量控制研究。

**[关键词]** 高压液相色谱法; 小柴胡汤; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 含量测定

**[中图分类号]** R 284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)09-1010-04

### High performance liquid chromatography in determination of baicalin and wogonoside contents in *Xiaochaihu* decoction

Ji Song-gang<sup>1</sup>, Liu Xiao-fan<sup>2</sup>, Zhu Zhen-yu<sup>2</sup>, Liang Shan-shan<sup>3</sup>, Zhao Liang<sup>3</sup>, Zhang Hai<sup>3</sup>, Chai Yi-feng<sup>2\*</sup>

1. Department of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, Shangdong, China
2. Department of Drug Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To establish an HPLC method for determination of baicalin and wogonoside contents in *Xiaochaihu* decoction. **Methods** Decoction pieces were mixed and decocted with water. The chromatographic column was Agilent Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 μm); the mobile phase was composed of 0.2% phosphate acid-water(A) and acetonitrile (B) with gradient elution at a flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 275 nm, the temperature of column was 25℃, and the injection volume was 15 μl. **Results** Baicalin and wogonoside were separated at baseline within 30 min with good linearity; the standard curves for baicalin and wogonoside were  $Y=44.16X-36.22$  ( $r=0.999,9$ ) and  $Y=52.08X-28.69$  ( $r=0.999,9$ ), respectively. The intra-day and inter-day precisions were both less than 1%, and the limits of qualification were 0.615,6 μg/ml for baicalin and 0.220,8 μg/ml for wogonoside. The recovery rates ( $n=6$ ) were 95.73% (RSD=0.8%) for baicalin and 97.02% (RSD=1.56%) for wogonoside. **Conclusion** The method is simple, accurate, stable, and reliable in determining the contents of baicalin and wogonoside in *Xiaochaihu* decoction, and it can be used for the quality control of this preparation.

**[Key words]** high performance liquid chromatography; *Xiaochaihu* decoction; baicalin; wogonoside; determination  
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(9):1010-1013]

小柴胡汤出自东汉张仲景的《伤寒论》,由柴胡、黄芩、人参、半夏、炙甘草、生姜、大枣等 7 味药材组成,用于治疗伤寒少阳证。小柴胡汤组方精良,配伍

严谨,在长期的医疗实践中,广泛用于肝胆、消化、内分泌、血液、免疫等系统疾病的治疗<sup>[1-3]</sup>。小柴胡汤中黄芩苷及汉黄芩苷含量较高,且有广泛的药理作

**[收稿日期]** 2010-05-10 **[接受日期]** 2010-06-09

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30873196)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (30873196)。

**[作者简介]** 纪松岗, 博士, 副主任药师。E-mail: shanshan0543401@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81871201, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

用。药理学研究表明黄芩苷可能通过抑制超级抗原激活的信号途径起到抗菌效果,对百日咳杆菌引起的神经细胞损害,预先给予黄芩苷可起到保护作用<sup>[4]</sup>。同时,黄芩苷还具有抗癌、调节免疫系统等作用<sup>[5]</sup>。药理研究发现,汉黄芩苷具有抗氧化作用,能抑制不同体系诱导的线粒体氧化损伤,同时它对黄嘌呤氧化酶有较好的抑制作用<sup>[6]</sup>。由此可见,黄芩苷和汉黄芩苷均为小柴胡汤中的重要化学成分,其含量的多少对小柴胡汤质量影响显著,而2010年版《中华人民共和国药典》(一部)中小柴胡片及小柴胡颗粒均以黄芩苷的含量作为质量控制标准<sup>[7]</sup>,有必要建立一种简便、科学、有效的分析方法测定小柴胡汤中黄芩苷和汉黄芩苷的含量。采用高效液相色谱法测定小柴胡汤剂中黄芩苷的含量已经有多篇文献报道<sup>[8-10]</sup>,赵白云等<sup>[11]</sup>用HPLC-DAD-TOF/MS法测定小柴胡汤中柴胡皂苷a、黄芩苷、甘草酸的含量。本研究采用高效液相色谱紫外检测器建立小柴胡汤中黄芩苷和汉黄芩苷含量测定方法,为更好地提高小柴胡汤及其不同制剂的质量控制标准提供参考。

## 1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),包括在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、VWD 检测器;十万分之一电子天平(德国梅特勒公司);高速离心机(美国雅培公司);DJ-04 药材粉碎机(上海淀久中药机械制造有限公司);SB3200-T 超声发生器(美国必能信公司)。

1.2 试剂 小柴胡汤所用药材饮片柴胡(PD060707,内蒙古)、黄芩(HY2006030204,河北)、炙甘草(XD060826,新疆)、人参(071224,辽宁)、制半夏(060914,四川)及大枣(HP2006070501,山东)购自上海华宇制药有限公司,生姜(2008110431,贵州)购自上海雷允上大药房,所有饮片均经第二军医大学药学院生药学教研室孙莲娜副教授鉴定。黄芩苷、汉黄芩苷购自中国药品生物制品检定所,纯度>98.0%,乙腈为色谱纯(Honeywell,USA),水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法和结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品 0.010 26 g,汉黄芩苷对照品 0.007 36 g,分别置于 10 ml 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度,配

成浓度分别为黄芩苷 1.026 mg/ml、汉黄芩苷 0.736 mg/ml 的对照品储备液。分别精密量取黄芩苷对照品储备液 3 ml,汉黄芩苷对照品储备液 1.5 ml 置 10 ml 容量瓶中,混合,加甲醇定容至刻度,配成浓度为黄芩苷 307.8  $\mu$ g/ml 及汉黄芩苷 110.4  $\mu$ g/ml 的对照品混合溶液,逐步稀释,制得 5 个浓度梯度的对照品混合溶液,黄芩苷浓度分别为 6.156、16.42、102.6、205.2、307.8  $\mu$ g/ml,汉黄芩苷浓度分别为 2.208、5.890、36.80、73.60、110.4  $\mu$ g/ml。

2.1.2 样品溶液的制备 分别取柴胡、黄芩、人参、炙甘草、半夏饮片,粉碎,过 40 目筛,置 50℃ 烘箱烘 1 h。取粉末柴胡 15 g、黄芩 5 g、人参 5 g、炙甘草 5 g、半夏 5 g 混匀备用。分别精密称取混合粉末约 0.5 g、大枣约 0.05 g、生姜约 0.09 g,加水 30 ml,回流 1 h,过滤,残渣重复操作两次,每次 30 min,合并提取液,用少量水洗涤容器及残渣,移至 100 ml 容量瓶中,加水定容至刻度,经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤,取续滤液即得供试品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相为乙腈-水,A 相为 0.2% 磷酸-水,B 相为乙腈,梯度洗脱:0~20 min,15%~23%B;20~35 min,23%~35%B;35~45 min,35%~90%B;45~50 min,保持 90%B 不变。进样 15  $\mu$ l,进样前以流动相梯度初始条件平衡 15 min,流速 1 ml/min,柱温 25℃,检测波长 275 nm,运行时间 50 min。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性实验 分别精密吸取黄芩苷和汉黄芩苷混合对照品溶液及小柴胡汤样品溶液 15  $\mu$ l 进样分析,根据各对照品和样品溶液色谱峰中各成分的保留时间和紫外吸收,可确定小柴胡汤样品色谱图中黄芩苷和汉黄芩苷所对应的色谱峰,如图 1 所示。

2.3.2 标准曲线的制备 分别吸取 5 个浓度梯度的对照品混合溶液 15  $\mu$ l,注入 HPLC 分析,以各对照品溶液的浓度为横坐标,以各成分色谱峰面积为纵坐标,计算被测化合物的线性回归方程。黄芩苷回归方程为  $Y=44.16X-36.22$ ,线性范围 6.156~307.8  $\mu$ g/ml ( $r=0.9999$ );汉黄芩苷回归方程  $Y=52.08X-28.69$ ,线性范围 2.208~110.4  $\mu$ g/ml ( $r=0.9999$ )。结果表明黄芩苷和汉黄芩苷在相应的线性范围内呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度实验 分别精密吸取黄芩苷和汉黄

芩苷低(16.42, 5.89 μg/ml)、中(102.6, 36.8 μg/ml)、高(307.8, 110.4 μg/ml)3个浓度的对照品混合溶液,按上述色谱条件于1 d内连续进样5次,以及连续3 d分别进样,计算各浓度点的相对标准偏差,考察日内精密度和日间精密度的。结果黄芩苷、汉黄芩苷的对照品溶液的低、中、高3个浓度的日内精密密度分别为0.32%、0.15%及0.04%和0.33%、0.15%及0.03%;日间精密密度分别为0.67%、0.18%及0.19%和0.76%、0.37%及0.20%。结果表明方法的精密密度良好。

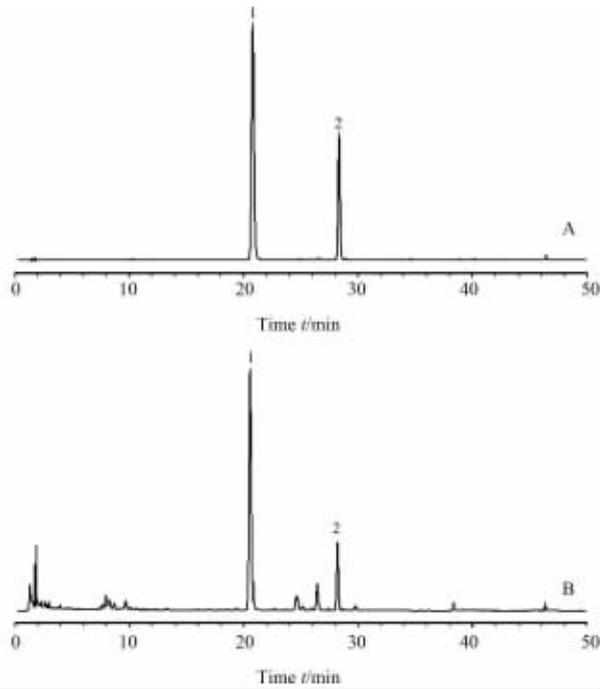


图1 混合对照品溶液(A)及

小柴胡汤样品溶液(B)的HPLC色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed reference substance(A) and sample solution of Xiaochaihu decoction (B)

1: Baicalin; 2: Wogonoside

2.3.4 检测限及定量限 经一系列稀释的标准溶液测定,以信噪比(S/N)3:1计,黄芩苷和汉黄芩苷的最低检测限分别为205.2 ng/ml和73.6 ng/ml。以信噪比(S/N)10:1计,黄芩苷和汉黄芩苷的定量限分别为0.6156 μg/ml和0.2208 μg/ml。

2.3.5 稳定性考察 分别精密称取混合饮片粉末约0.5 g、大枣0.05 g、生姜0.09 g,按照上述样品溶液制备方法操作,分别在0、2、4、6、8、12、24 h测定黄芩苷和汉黄芩苷的峰面积和保留时间,计算相对标准偏差,进行稳定性考察。结果表明被测化合物的保留时间与含量测定的RSD均小于2%,表明两种成分在24 h内稳定。

2.3.6 重复性实验 取混合饮片粉末约0.5 g、大枣0.05 g、生姜0.09 g,精密称定,共5份。按照样品溶液制备方法操作,测定其中黄芩苷和汉黄芩苷的含量和保留时间,计算相对标准偏差。结果表明,各成分保留时间和含量测定结果的RSD均小于2%,表明测定方法的重复性良好。

2.3.7 加样回收率 取混合饮片粉末约0.25 g、大枣0.025 g、生姜0.045 g,精密称定,共6份。分别精密加入黄芩苷和汉黄芩苷对照品,按照样品溶液制备方法操作,测定其中黄芩苷和汉黄芩苷的含量,计算回收率。结果黄芩苷和汉黄芩苷的回收率分别为95.73% (RSD=0.80%, n=6)及97.02% (RSD=1.56%, n=6),见表1。

2.4 样品的测定 取混合饮片粉末约0.5 g、大枣0.05 g、生姜0.09 g,精密称定,按上述样品制备方法操作,按液相色谱条件测定样品中黄芩苷和汉黄芩苷的含量。结果小柴胡汤中含黄芩苷12.77 mg/g,汉黄芩苷2.403 mg/g。

表1 小柴胡汤黄芩苷和汉黄芩苷加样回收率实验结果

Tab 1 Recovery results of baicalin and wogonoside in Xiaochaihu decoction

Compd.	Calculated m/mg	Added m/mg	Determined m/mg	Recovery(%)	Average recovery(%)	RSD (n=6,%)
Baicalin	4.164	4.104	8.105	96.10	95.73	0.80
	4.14	4.147	8.085	95.10		
	4.126 5	4.171	8.07	95.00		
	4.081	4.121 5	8.01	95.40		
	4.059 5	4.105	8.01	96.20		
	4.052 5	4.096 5	8.01	96.60		
Wogonoside	0.786 5	0.736	1.508 5	98.10	97.02	1.56
	0.782	0.731	1.505 5	99.00		
	0.779 5	0.734 5	1.498 5	97.90		
	0.767	0.673 5	1.409	95.30		
	0.759	0.68	1.409	95.60		
	0.763 5	0.683 5	1.420 5	96.20		

### 3 讨论

3.1 小柴胡汤的制备 关于小柴胡汤的制备方法,不同的方剂学教材记载不同。本实验查阅了《伤寒论》中关于小柴胡汤原方的记载,为“柴胡(半斤)、黄芩(三两)、人参(三两)、半夏(半升洗)、炙甘草(三两)、生姜(三两)、大枣(十二枚)组成,上七味以水一斗二升,煮取六升,去滓,再煎取三升,温服一升,日三服”,并查阅药物剂量折算的相关文献<sup>[12]</sup>,得出自制小柴胡汤各味饮片及水的配比,采用回流法制备小柴胡汤。经过3次回流提取后的药渣,再加入适量水如上述方法进行回流提取,提取液过滤后注入HPLC分析。3次回流提取后,在被测化合物保留时间处无明显色谱峰,表明被测化合物基本提取完全。

3.2 柱温的选择 采用 Agilent Zorbax XDB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,通过考察柱温(20、25、30℃)对各成分峰分离度的影响,发现随着温度的降低,分离度增加,但是保留时间也相应延长,综合考虑选择 25℃作为分离柱温。

3.3 流动相的选择 在预实验中,分别采用甲醇-水或乙腈-水系统作为流动相,由于汉黄芩苷色谱峰处总有干扰峰而影响测定,采用乙腈-水系统可以使被测化合物得到较好的分离,分离度符合要求,故使用乙腈-水系统作为流动相。由于黄芩苷和汉黄芩苷偏酸性,加入适当的磷酸可以抑制被分析物的解离,有助于改善黄芩苷和汉黄芩苷的峰型。

本研究建立了采用 HPLC 法同时测定小柴胡汤中黄芩苷和汉黄芩苷的含量测定方法,并对该方法进行了系统的方法学验证,方法学验证结果表明该含量测定方法适合于小柴胡汤中黄芩苷和汉黄芩苷的含量测定。从小柴胡汤液相色谱图中可以看出,小柴胡汤中黄芩苷、汉黄芩苷占有较大比重,对这两个成分含量的测定,有助于提高中药复方小柴

胡汤质量控制水平。HPLC 灵敏度高、稳定性好、价格低廉,通用性强,本方法可以用于小柴胡汤的质量控制研究。

### [参考文献]

- [1] 刘永春,丛培臣. 柴胡的化学成分及药理作用研究概况[J]. 黑龙江医药,2006,19:216-218.
- [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,2006,15:571-572.
- [3] 陆婷婷,赵国平. 小柴胡汤防治肝病机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2008,16:971-974.
- [4] 田宇彬,帅 峰,孙桂荣,张民生. 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,2001,40:224-226.
- [5] 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.
- [6] 马爱团,钟秀会,孟立根,杜 健,许 丽. 黄芩黄酮药理研究概况[J]. 中国兽医杂志,2006,42:39-40.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2010:509-510.
- [8] 牛获山,吴悦涛. HPLC 检测小柴胡汤剂型改良后黄芩苷含量[J]. 黑龙江医药,2008,21:6-7.
- [9] 石 莹. HPLC 测定小柴胡汤丸中黄芩苷的含量[J]. 中成药,2007,29:23-25.
- [10] 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.
- [11] 赵白云,朱臻宇,王 彬,赵 亮,张 海,许 茜,等. 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[J]. 第二军医大学学报,2007,28:527-530. Zhao B Y, Zhu Z Y, Wang B, Zhao L, Zhang H, Xu Q, et al. HPLC-DAD combined with TOF/MS technique in determination of saikosaponin a, baicalin and glycyrrhizic acid in *Xi-aochaihu* Decoction[J]. Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28:527-530.
- [12] 王笑青,林大勇,时红磊,关庆增. 《伤寒论》中药物剂量的折算[J]. 中华中医药学刊,2007,25:591-592.

[本文编辑] 尹 茶