

HPLC 同时测定小柴胡汤乙酸乙酯部位中 5 种成分

原红霞^{1,2*}, 王婷婷¹, 闫艳¹

(1. 山西中医学院, 太原 030024; 2. 山西医科大学, 太原 030001)

[摘要] 目的:建立同时测定小柴胡汤乙酸乙酯部位中甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素含量的方法。方法:采用 Diamonsil C₁₈₍₂₎ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm),以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 276 nm,柱温 30 °C。结果:甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素的线性范围分别为 0.162 ~ 1.62, 0.24 ~ 2.4, 0.206 ~ 2.06, 0.221 ~ 2.21, 0.077 ~ 0.77 μg, 平均加样回收率分别为 98.2%, 103.3%, 97.9%, 100.6%, 103.0%。结论:该方法简便,快速,重复性好,可用于同时测定小柴胡汤乙酸乙酯部位中 5 种有效成分的含量。

[关键词] 小柴胡汤; 乙酸乙酯部位; 甘草苷; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0064-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080064

Simultaneous Determination of Five Components in Ethyl Acetate Extract of Xiao Chaihu Tang by HPLC

YUAN Hong-xia^{1,2*}, WANG Ting-ting¹, YAN Yan¹ (1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan, 030024, China; 2. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneously determining liquiritin, wogonoside, baicalein and wogonin in ethyl acetate extract of Xiaochaihu Tang by HPLC. **Method:** The separation was performed on Diamonsil C₁₈₍₂₎ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% phosphate acid was used as gradient elution, flow rate 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 276 nm. The column temperature was at 30 °C. **Result:** Quantitative analysis of HPLC showed that the linear ranges of liquiritin, baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin were 0.162-1.62, 0.24-2.4, 0.206-2.06, 0.221-2.21, 0.077-0.77 μg respectively. The average recovery was 98.2%, 103.3%, 97.9%, 100.6%, 103.0%. **Conclusion:** The method is simple, fast, reliable, and suitable for the quality control of ethyl acetate extract of Xiao Chaihu Tang.

[Key words] Xiao Chaihu Tang; effective parts; liquiritin; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin

小柴胡汤出自东汉张仲景《伤寒杂病论》,由柴胡、黄芩、半夏、生姜、人参、甘草、大枣 7 味药组成,在中医治疗抑郁症中被广泛应用^[1-3]。本课题组将小柴胡汤复方按极性大小分为几个不同部位,通过经典的抗抑郁模型对其进行筛选小柴胡汤抗抑郁有效部位^[4-5]。在此基础上,本研究对小柴胡汤乙酸乙酯有效部位中的 5 种有效成分进行了含量测定。有关小柴胡汤有效成分的含量测定,多数文献报道是通过 HPLC 测定其复方中的有效成分^[6-8],而本文是针对小柴胡汤乙酸乙酯有效部位中有效成分含量测定的报道,可以更好的控制小柴胡汤乙酸乙酯部

位的质量。

1 材料

515 型高效液相色谱仪(包括 2996 二极管阵列检测器, M32 色谱工作站, 美国 Waters), Diamonsil C₁₈₍₂₎ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

柴胡、黄芩、半夏(姜制)、党参、甘草均购自北京同仁堂,生姜和大枣(市售),所有药材经山西中医学院中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为正品。黄芩苷、汉黄芩苷、甘草苷、黄芩素、汉黄芩素对照品(批号分别为 H-016-111012, H-019-110325, G-009-101124, H-018-110623, H-029-111113, HPLC 分析纯

[收稿日期] 20141215(003)

[基金项目] 山西省科技厅青年科技研究基金项目(2011021007-2)

[通讯作者] *原红霞, 硕士, 讲师, 从事中药药效物质基础研究, Tel: 0351-2272653, E-mail: yuanyhongxia609@163.com

度均≥98%)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈₍₂₎ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水(B)梯度洗脱(0~12 min, 20% A; 12~15 min, 20%~31% A; 15~30 min, 31% A; 30~45 min, 31%~45% A; 45~55 min, 45% A),检测波长 276 nm,柱温 30 °C,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 取干燥至恒重的各对照品适量,精密称定,置于 5 mL 量瓶中,用 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品储备液(甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素质量浓度分别为 0.162, 0.24, 0.206, 0.220 8, 0.077 4 g·L⁻¹)。精密量取混合对照品储备液 0.3 mL 置 1 mL 量瓶中,加 70% 乙醇至刻度,得混合对照品溶液。

2.3 供试品的制备

2.3.1 有效部位的制备 参考小柴胡汤的制备工艺,柴胡 96 g,黄芩 36 g,清半夏 36 g,生姜 36 g,大枣 48 g,人参 36 g,炙甘草 36 g,以 8 倍量水浸泡 30 min,煎煮 1 h,滤过药液,残渣再加 6 倍量水,再煎煮 30 min,合并煎液。滤液分别用石油醚、乙酸乙酯萃取,石油醚层弃去,乙酸乙酯层回收即得有效部位^[5],计算其出膏率大约为 1.43% 左右。

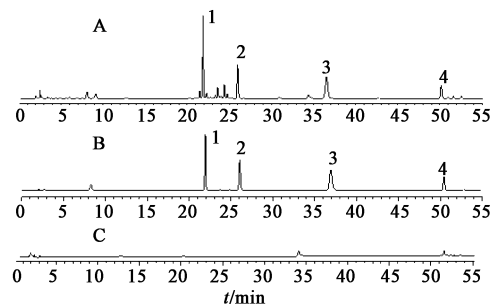
2.3.2 供试品溶液的制备 取有效部位粉末约 0.1 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加 70% 乙醇定容至刻度,超声 30 min,摇匀,过滤,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.3.3 阴性供试品溶液的制备 按处方比例,取缺黄芩、甘草的其他各味药,按制备工艺制成阴性样品,按 2.3.2 项下方法制备阴性供试品溶液。

2.4 专属性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,注入液相色谱仪,记录色谱图,见图 1。理论板数按黄芩苷计不低于 3 000,与相邻峰的分度均 > 1.5,阴性样品溶液在相应对照品出峰位置上无干扰。

2.5 线性关系考察 精密量取 2.2 项下混合对照品混合液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 分别置于 1.0 mL 量瓶中,用 70% 乙醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液,按色谱条件进样测定,测定峰面积值。以峰面积值(Y)对进样量(μg)(X)进行线性回归。各对照品 r 均 > 0.999,线性关系良好。结果见表 1。

2.6 精密度试验 精密吸取 2.2 项下混合对照品



A. 乙酸乙酯部位; B. 混合对照品; C. 阴性样品; 1. 甘草苷; 2. 黄芩苷; 3. 汉黄芩苷; 4. 黄芩素; 5. 汉黄芩素

图 1 小柴胡汤乙酸乙酯部位 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram in ethyl acetate extract of Xiao Chaihu Tang

表 1 5 种成分的回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of the five components

对照品	标准曲线	r	线性范围/μg
甘草苷	$Y = 9.8 \times 10^5 X + 406\ 046$	0.999 0	0.162 ~ 1.62
黄芩苷	$Y = 3.0 \times 10^6 X + 34\ 033$	0.999 3	0.24 ~ 2.40
汉黄芩苷	$Y = 3.0 \times 10^6 X + 365\ 843$	0.999 5	0.206 ~ 2.06
黄芩素	$Y = 4.0 \times 10^6 X - 39\ 786$	0.999 0	0.221 ~ 2.21
汉黄芩素	$Y = 5.0 \times 10^6 X + 72\ 152$	0.999 2	0.077 ~ 0.77

溶液,按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次,每次 10 μL,依法测定。结果甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.1%, 1.2%, 1.4%, 1.6%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按 2.1 项下色谱条件进行测定,计算甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素含量,结果含量的 RSD 分别为 2.0%, 1.1%, 1.5%, 1.8%, 2.1%, 表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取上述供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 进样,测定甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的峰面积。结果峰面积值的 RSD 分别为 2.2%, 1.4%, 1.5%, 1.1%, 1.9%, 表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 准确称取已测知含量的样品约 0.05 g, 6 份,精密称取,每份加入甘草苷对照品溶液(1.22 g·L⁻¹) 0.5 mL、黄芩苷对照品溶液(1.105 g·L⁻¹) 1.2 mL、汉黄芩苷对照品溶液(0.832 g·L⁻¹) 1.0 mL、黄芩素对照品溶液(1.184 g·L⁻¹) 1.0 mL 和汉黄芩素对照品溶液(0.806 g·L⁻¹) 0.35 mL,按 2.3 项下方法制得供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 小柴胡汤乙酸乙酯部位中 5 种成分加样回收试验

Table 2 Recovery of the five components in Xiaochaihu Tang

成分	称样量 /g	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
甘草苷	0.050 1	0.61	1.184	96.5	98.2	2.1
	0.048 9	0.61	1.205	102.2		
	0.049 2	0.61	1.175	96.8		
	0.049 5	0.61	1.183	97.4		
	0.050 9	0.61	1.203	98.0		
	0.048 1	0.61	1.172	98.3		
黄芩苷	0.050 1	1.326	2.666	102.3	103.3	1.6
	0.048 9	1.326	2.663	104.4		
	0.049 2	1.326	2.679	105.0		
	0.049 5	1.326	2.642	101.6		
	0.050 9	1.326	2.723	104.9		
	0.048 1	1.326	2.606	101.7		
汉黄芩苷	0.050 1	0.832	1.659	97.8	97.9	1.5
	0.048 9	0.832	1.646	98.7		
	0.049 2	0.832	1.630	96.1		
	0.049 5	0.832	1.646	97.5		
	0.050 9	0.832	1.665	96.9		
	0.048 1	0.832	1.647	100.2		
黄芩素	0.050 1	1.184	2.420	102.7	100.6	2.6
	0.048 9	1.184	2.330	97.4		
	0.049 2	1.184	2.350	98.5		
	0.049 5	1.184	2.360	98.8		
	0.050 9	1.184	2.440	102.7		
	0.048 1	1.184	2.380	103.3		
汉黄芩素	0.050 1	0.282	0.581	105.0	103.0	2.4
	0.048 9	0.282	0.574	104.9		
	0.049 2	0.282	0.563	100.5		
	0.049 5	0.282	0.572	103.1		
	0.050 9	0.282	0.570	99.5		
	0.048 1	0.282	0.569	104.8		

2.10 样品测定 分别取 3 批样品适量,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录色谱峰面积,按外标法计算甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的含量,结果见表 3。

表 3 小柴胡汤乙酸乙酯有效部位中 5 种成分的测定 (n=3)

Table 3 Contents of the five components in ethyl acetate extract of Xiaochaihu Tang (n=3)

批号	甘草苷	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素
20120420	11.97	26.35	16.98	24.72	5.93
20120425	11.58	26.58	17.25	24.28	5.81
20120509	11.86	26.01	16.49	23.69	5.62

3 讨论

有研究表明,黄芩总黄酮具有抗抑郁作用,其中发挥作用的主要成分为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素^[9]。赵志宇等^[10],认为甘草苷是抗抑郁复方甘麦大枣汤的抗抑郁有效成分。溶解度试验表明黄芩苷在乙酸乙酯溶液和在水中的溶解度相似^[11],所以选择对小柴胡汤中乙酸乙酯有效部位 5 种成分进行含量测定,该方法稳定、可行,可更好的控制小柴胡汤乙酸乙酯有效部位提取物的质量。

对黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素和甘草苷 5 种成分在 200~400 nm 进行全波长扫描,发现黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素和甘草苷 5 种成分在 276 nm 附近都有较大的紫外吸收,我们最后选择了 276 nm。

[参考文献]

- [1] 柴小梅,李英,秦雪梅.小柴胡汤临床应用与药理作用研究进展[J].山西中医学院学报,2007,8(3):59-60.
- [2] 张金茹.小柴胡汤治疗抑郁症 40 例[J].北京中医,2003,22(5):38-39.
- [3] 高建伟,倪亚平.小柴胡汤是治疗抑郁症的良方[J].实用中医内科杂志,2008,22(4):74-75.
- [4] 原红霞,韦采柳,程遥.小柴胡汤抗抑郁作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(15):190-191.
- [5] 原红霞,郑靖婕,闫艳.小柴胡汤的不同萃取部位抗抑郁作用的筛选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(15):211-213.
- [6] 刘青春,赵军宁,鄢良春,等.HPLC 同时测定小柴胡汤中 5 种有效成分[J].中国中药杂志,2010,35(6):708-710.
- [7] 肖林林,温建东,吴坚.RP-HPLC 测定小柴胡汤丸中黄芩苷的含量[J].中国现代药物应用,2011,5(22):66-67.
- [8] 温勇,王德杭,陈端云,等.小柴胡汤的质量标准研究[J].中药新药与临床药理,2009,20(6):562-566.
- [9] 栗俞程,沈继朵,刘亚敏,等.黄芩主要黄酮成分的抗抑郁活性筛选[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):157-160.
- [10] 赵志宇,王卫星,郭洪祝,等.甘草苷对慢性应激抑郁模型大鼠的抗抑郁作用[J].中国临床康复,2006,10(27):69-72.
- [11] 王弘,陈济民,张清民.黄芩苷的物理常数测定[J].沈阳药科大学学报,2000,17(2):105-106.

[责任编辑 顾雪竹]