

HPLC/DAD 法同时测定小柴胡汤中黄芩苷和甘草酸的含量

朱臻宇, 刘宇, 赵白云, 张海, 李翔, 柴逸峰* (第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 目的: 建立一种反相高效液相色谱分析方法, 同时测定小柴胡汤中黄芩苷和甘草酸的含量。方法: 采用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱 (4.6mm × 250mm, 5μm), 以乙腈 - 0.01% 磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0mL/min, 柱温 25℃, 检测波长为 250nm。结果: 黄芩苷和甘草酸单铵盐在 50min 内即实现良好分离, 黄芩苷浓度在 12.66 ~ 405.0 g/mL 线性范围内呈良好的线性关系, 其回归方程为: $Y = 19.726X + 13.972$, $r = 0.9998$ 。甘草酸在 1.988 ~ 63.60 g/mL 的线性范围内呈良好的线性关系, 其回归方程为: $Y = 10.765X + 6.6433$, $r = 0.9997$ 。两种成分精密度试验 $RSD < 1\%$; 48h 内稳定性试验 $RSD < 1\%$; 加样回收率试验 $RSD < 2\%$ 。结论: 该方法简便快速、准确可靠, 能同时测定小柴胡汤中黄芩苷及甘草酸两种有效成分的含量, 为有效控制小柴胡汤的质量提供参考。

关键词 小柴胡汤; 黄芩苷; 甘草酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2006)06-0331-04

Simultaneous determination of two effective components in Xiaochaihu decoction by HPLC/DAD

ZHU Zhen-yu, LIU Yu, ZHAO Bai-yun, ZHANG Hai, LI Xiang, CHAI Yi-feng* (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method for simultaneous determination of baicalin, glycyrrhizic acid in Xiaochaihu decoction by RP-HPLC. **Methods:** A Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6mm × 250mm, 5μm) was used with a mobile phase of acetonitrile - 0.01% H₃PO₄ in gradient elution, The flow rate was 1.0mL/min and the detection wavelength was set at 250nm. **Results:** The two constituents were separated within 50 min. The linearity was obtained over 12.66 ~ 405.0 g/mL ($r = 0.9998$) for baicalin, 1.988 ~ 63.60 g/mL ($r = 0.9997$) for glycyrrhizic acid respectively. The RSD of precision and stability of the sample was less than 1% in 48 hours. The RSD of the average recovery was less than 2%. **Conclusion:** The method is rapid, simple and accurate, and it can be suitable for the simultaneous determination of baicalin, glycyrrhizic acid in Xiaochaihu decoction and the quality control of Xiaochaihu decoction.

KEY WORDS Xiaochaihu decoction; baicalin; glycyrrhizic acid; HPLC

小柴胡汤源于东汉时期张仲景《伤寒论》中经典方剂。具有和解少阳、疏利三焦气机之功。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, 具有有效调节机体免疫的作用^[1]。目前, 小柴胡汤在临床上应用十分广泛, 国内已有多种以小柴胡汤为基础的中成药剂。

小柴胡汤由柴胡、黄芩、半夏、生姜、党参、甘草、大枣七味药组成^[2], 其中黄芩是方中主药之一。黄芩是唇形科植物, 其根味苦性寒, 含数种黄酮苷类, 黄芩苷是其主要有效成分, 含量约占黄芩生药的 4.0% ~ 5.2%, 黄芩苷具有清热解毒、利胆、降低转氨酶、抑菌、抗炎、抗变态反应等药理作用^[3]; 甘草

是豆科植物甘草的干燥根及根茎, 具有清热解毒、止咳祛痰、补脾和胃、调和诸药的功效, 历代皆视其为重要药物, 甘草提取物中的主要有效成分为甘草酸。以往在控制小柴胡汤及其制剂的质量方面, 大多是通过测定其中黄芩苷含量的方法^[4-6], 要全面控制小柴胡汤的含量不应只测定其中一种成分, 而应通过测定其中多种成分的含量来控制其质量, 甘草中甘草酸在小柴胡汤的药理药效方面起了很重要的作用, 因此有必要测定其中甘草酸的含量, 从而达到控制小柴胡汤质量的目的, 对于测定甘草中甘草酸含量的方法, 以往文献多有报道^[7-9], 但没有采用同一分析方法同时测定小柴胡汤中多种有效成分含量的方法。

本研究应用 HPLC/DAD 法同时测定小柴胡汤中两味中药的主要有效成分黄芩苷及甘草酸的含

作者简介: 朱臻宇 (1974-), 男, 博士, 讲师。

通讯作者: 柴逸峰 (1965-), 男 (汉族), 教授, 博士生导师。

Tel: (021) 25070373, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn.

量。现报告如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100LC 高效液相色谱仪: 低压四元梯度泵, 在线脱气机, 自动进样器, 柱温箱, ChemStation 色谱工作站。上海淀久 DJ-04 药材粉碎机; METTLER AE240 电子天平。

1.2 试剂 黄芩苷对照品、甘草酸单铵盐对照品均购自中国药品生物制品检定所, 乙腈为色谱纯(购自 Fisher 公司), 磷酸为分析纯(购自上海精细科技研究所), 水为重蒸水。柴胡, 制半夏, 红枣, 炙甘草, 购自上海康桥中药饮片有限公司; 黄芩, 购自上海德华国药制品有限公司; 人参, 购自上海信德中药公司饮片厂; 生姜, 购于市场。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱 (4.6mm × 250mm, 5μm), 柱号: 880975-902; 流动相: A 相为 0.01% 磷酸溶液, B 相为乙腈, 梯度洗脱; 检测波长为 250nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25℃; 进样量 20μL。进样前以流动相梯度初始条件平衡 15min, 程序见表 1。

表 1 小柴胡汤梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
10	28	72
15	30	70
40	40	60
50	50	50

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 黄芩苷对照品溶液的制备: 精密称取黄芩苷对照品 20.26mg, 置 10mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得黄芩苷对照品贮备液(每 1mL 含黄芩苷 2.025mg)。

甘草酸单铵盐对照品溶液的制备: 精密称取甘草酸单铵盐对照品 16.25mg, 置 50mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得甘草酸单铵盐对照品贮备液(每 1mL 含甘草酸 0.318mg)。

黄芩苷和甘草酸单铵盐对照品混合溶液的制备: 精密吸取已配制好的黄芩苷和甘草酸单铵盐对照品贮备液各 0.5mL, 置 10mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度即得。

2.2.2 试品的制备 精密称取柴胡 6g, 黄芩 4.5g, 半夏 4.5g, 人参 3g, 炙甘草 2.5g, 红枣 3g, 生姜 4.5g, 加 10 倍量的水 280mL, 大火沸腾后, 于小火微

沸煎煮 1h, 收集第 1 次煎液, 用 4 层纱布滤过, 得第 1 次滤液; 剩余药渣加 8 倍量的水 220mL, 同前述提取方法, 收集第 2 次煎液, 过滤得第 2 次滤液, 将两次滤液合并, 加热浓缩至 140mL, 经 0.45μm 的微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液, 即得样品溶液。

2.3 系统适用性考察 在“2.1”项的色谱条件下, 精密吸取对照品混合溶液和样品溶液各 20μL 注入液相色谱仪, 根据色谱参数计算系统适应性。黄芩苷和甘草酸的理论塔板数分别为 232622, 130026; 分离度分别为 4.564 和 3.836; 拖尾因子分别为 1.125 和 1.016。

2.4 线性关系考察 按 2.2.1 项操作依次配制 6 个浓度的对照品混合溶液, 照“2.1”项下色谱条件进样测定, 以溶液的浓度为横坐标 (X), 以峰面积值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 黄芩苷的回归方程为: $Y = 19.726X + 13.972$, $r = 0.9998$, 线性范围: 12.66 ~ 405.0 g/mL。甘草酸的回归方程为: $Y = 10.765X + 6.6433$, $r = 0.9997$, 线性范围: 1.988 ~ 63.60 g/mL。

2.5 精密度试验 在 2.1 项色谱条件下, 分别取高、中、低 3 种浓度的对照品溶液, 于同一日内和不同日间 (5 日内每日一次) 连续进样 5 次, 计算其峰面积的相对标准偏差 (RSD), 考察日内精密度和日间精密度, 结果黄芩苷和甘草酸的峰面积积分值的日内精密度 RSD 分别为 0.26%、0.46%, 日间精密度 RSD 分别为 0.50%、0.68%。

2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 20μL, 注入液相色谱仪, 照 2.1 项下的色谱条件, 分别于 0、3、6、12、18、24、36、48h 测定 4 种有效成分的峰面积, 进行稳定性考察, 结果黄芩苷和甘草酸的峰面积积分值 RSD 分别为 0.12%、0.22%, 样品溶液稳定。

2.7 重复性试验 精密称取组成小柴胡汤的各药材, 照“2.2.2”项方法制备样品溶液, 测定其中黄芩苷和甘草酸的含量, 进行重复性考察, 结果黄芩苷和甘草酸含量 RSD 分别为 1.05%、0.97%。

2.8 加样回收率试验 精密称取小柴胡汤各药材 5 份, 分别加入黄芩苷和甘草酸单铵盐对照品贮备液各 7mL, 照 2.2.2 项下样品溶液制备方法制备供试品溶液, 照“2.1”项下色谱条件进样测定, 进行加样回收率考察, 结果其平均回收率分别为 98.42%、98.05%, 其 RSD 分别为 1.08%、1.44%。

2.9 含量测定 按小柴胡汤组方, 精密称取其中各药材 3 份, 分别按 2.2.2 项方法制备样品溶液, 测定 3 份样品溶液中黄芩苷和甘草酸的含量, 结果见表 2, 对照品及样品色谱图见图 1。

表2 小柴胡汤中黄芩苷和甘草酸的含量测定结果(n=3)

黄芩苷含量(mg/mL)		平均值	RSD(%)	甘草酸含量(mg/mL)		平均值	RSD(%)
1	14.62	14.61	0.77	2.28	2.28	0.96	
2	14.50			2.26			
3	14.72			2.30			

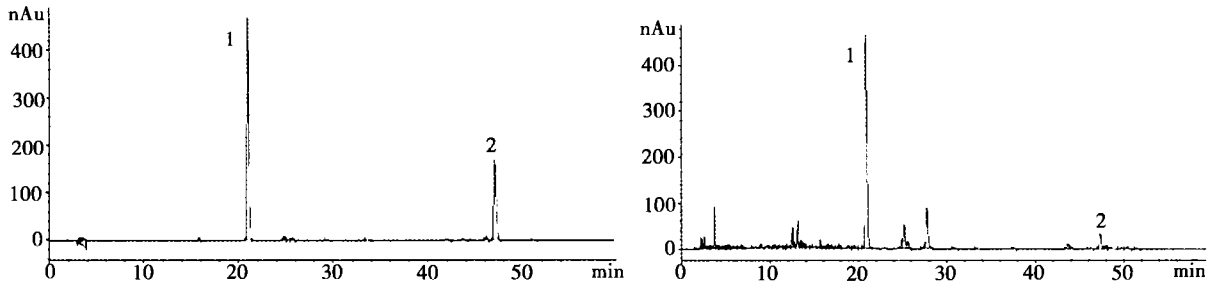


图1 对照品及样品溶液 HPLC 色谱图
1 - 黄芩苷; 2 - 甘草酸

3 讨论

3.1 检测波长的选择 实验中使用的高效液相色谱仪的检测器为二极管阵列检测器,可以同时在线检测多个紫外吸收波长并对各成分进行全波长扫描。中国药典2005版一部甘草的含量测定中,对甘草酸采用的检测波长为250nm,黄芩药材的含量测定中,对黄芩苷的检测波长为280nm。经在线紫外

检测及对两种成分的全波长扫描,甘草酸的最大检测波长为250nm,黄芩苷在280nm、320nm附近有较大吸收,其响应信号要比甘草酸的响应信号强得多,且其含量远高于甘草酸在小柴胡汤中的含量,权衡各个方面,选择250nm为检测波长,经实验证明,采用250nm为检测波长,黄芩苷和甘草酸均可被检出,且能达到较好的分离。

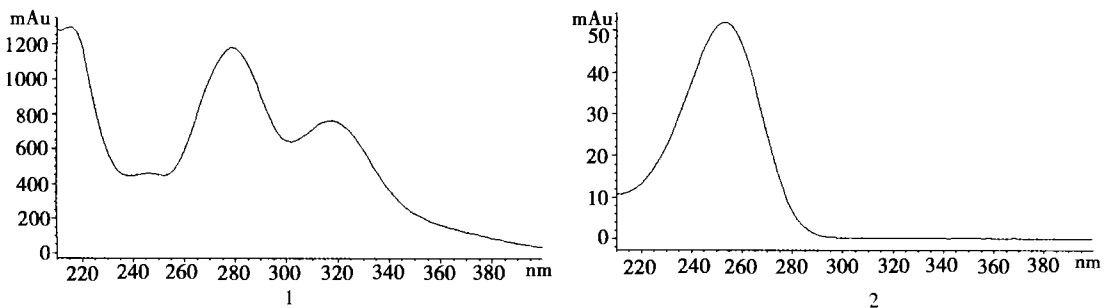


图2 各对照品溶液紫外吸收图
1 - 黄芩苷; 2 - 甘草酸

3.2 流动相的选择 经过14种梯度洗脱,实验中分别采用了甲醇-水、乙腈-水、酸性环境下乙腈-水的不同洗脱方法进行梯度洗脱,结果表明采用甲醇-水进行梯度洗脱的色谱图在待测成分附近杂峰较多,且不能实现较好的分离,采用乙腈-水进行梯度洗脱虽能进行分离,但色谱峰拖尾较严重,采用乙腈-0.01% H₃PO₄进行梯度洗脱不仅能使各色谱峰达到较好的分离,且色谱峰不存在拖尾现象,最后确定采用乙腈-0.01% H₃PO₄进行梯度洗脱,经实验证明此色谱条件可以较好地分离黄芩苷和甘草酸,分离效果好。

能同时测定小柴胡汤中两味中药中主要有效成分黄芩苷及甘草酸的含量,为有效控制小柴胡汤的质量提供参考。

参考文献:

- [1] 安部英. 小柴胡汤对免疫系统的作用[J]. 国外医学·中医中药分册, 1988, 10(2): 45.
- [2] 刘渡舟. 小柴胡汤的理解与应用探微[J]. 北京中医药大学学报, 1988, 6(1): 42.
- [3] 杨云, 冯卫生. 中药化学成分提取分离手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 295.
- [4] 潘雪英. 高效液相色谱法测定小柴胡颗粒中黄芩苷的含量[J]. 江西中医学院学报, 2005, 17(3): 42.

该高效液相色谱分析方法简便快速、准确可靠,

- [5] 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.
- [6] Ohtake N, Nakai Y, Yamamoto M, *et al.* Separation and isolation methods for analysis of the active principles of Sho-saiko-to (SST) oriental medicine [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 812: 135.
- [7] 吕凤莲,方彬,张宇. 高效液相色谱法测定炙甘草中甘草酸的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2004,18(4):25.
- [8] 施超欧,栾绍嵘. 离子色谱法测定甘草提取物中甘草酸的含量[J]. 化学分析计量, 2005,14(3):38.
- [9] 贾晓光,倪慧,波拉提,等. HPLC法测定种植甘草中甘草酸含量[J]. 新疆中医药, 2003,21(4):9

收稿日期:2006-07-14

酸性染料比色法测定复方颠茄合剂中莨菪碱含量

傅翔,范尚坦,李金兰,张一帆,谢宝英(南京军区福州总医院,福建福州 350025)

摘要 目的:研究复方颠茄合剂中莨菪碱的含量测定方法。方法:采用酸性染料比色法在 pH 6.6 磷酸盐缓冲液条件下测定莨菪碱的含量,检测波长(589 ± 1) nm。结果:莨菪碱在 1.2 ~ 7.2 μg/mL 浓度范围内呈线性, $r = 0.9991$, 平均回收率为 100.02%, ($RSD = 0.69\%$, $n = 4$)。结论:该法准确、方便、灵敏,可供该制剂的含量测定。该法关键在于调准 pH, 以免处方中其它组分干扰测定结果。

关键词 酸性染料比色法;复方颠茄合剂;莨菪碱;含量

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2006)06-0334-03

Determination of content of hyoscyamine in compound belladonna mixture by acid dye colorimetry

FU Xiang, FAN Shang-tan, LI Jin-lan, ZHANG Yi-fan, XIE Bao-ying (Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, China)

ABSTRACT **Objective:** To determine hyoscyamine in compound belladonna mixture. **Method:** Acid dye colorimetry was used in pH 6.6 with the detection wavelength at (589 ± 1) nm. **Results:** The linear ranges of the standard curve was 1.2 ~ 7.2 μg/mL ($r = 0.9991$). The average recovery of the assay was 100.02% ($RSD = 0.69\%$, $n = 4$). **Conclusions:** This method is accurate, convenient and sensitive for the quality control of hyoscyamine in compound belladonna mixture. The key of this method is exactly control of pH in order to avoid the disturbance.

KEY WORDS acid dye colorimetry; compound belladonna mixture; hyoscyamine; content

复方颠茄合剂为含有剧毒药物成分的口服标准制剂。但 1991 年版和 2003 年版的《中国人民解放军医疗单位制剂规范》^[1] 中的质量标准仅有对其性状、鉴别反应和检查作出规定,而无含量测定。迄今为止对该制剂中的剧毒有效成分莨菪碱尚无定量分析的报道。因此对该制剂建立保证质控和用药安全的定量分析方法是本院乃至全军医疗单位急待解决的问题。作者就这一问题进行研究,寻找出准确、灵敏的定量分析法,现报道如下:

1 仪器与材料

UV-2501PC 紫外可见分光光度计(日本岛津);电子分析天平;硫酸阿托品(标准品,中国药品

生物制品检验所);复方颠茄合剂(本院制剂);溴甲酚紫(上海试剂二厂);磷酸二氢钠 AR 级(上海试剂二厂);磷酸氢二钠 AR 级(上海新华化工厂);氯化钠(江苏南通勤奋制药厂);氢氧化钠 AR 级(广东汕头西陇化工厂)。

2 测定方法与结果

2.1 计算 1M 的硫酸阿托品 ($C_{17}H_{23}NO_3$)₂ · H₂SO₄ 相当于 2M 的莨菪碱,即 1 μg 的硫酸阿托品相当于 0.855 3 μg 的莨菪碱,可用标准曲线计算复方颠茄合剂中莨菪碱的含量^[2]。

2.2 溶液的配制

2.2.1 复方颠茄合剂的配制 50mL 颠茄酊,50mL 复方樟脑酊,5mL 聚山梨酯 80 置于配制桶混合均匀,再缓缓加入适量蒸馏水至 1 000mL,搅拌均匀^[1]。

作者简介:傅翔(1972-),男,硕士,主管药师。Tel:(0591)22859458, E-mail:fuxiangmai@china.com.