

HPLC 法测定小柴胡颗粒中 7 种指标成分

张 慧, 闫 磊, 林龙飞, 董晓旭, 申明睿, 曲昌海, 倪 健*

北京中医药大学 中药学院, 北京 100102

摘 要: **目的** 建立同时测定小柴胡颗粒中甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素的 HPLC 方法, 并评价不同厂家及同一厂家不同批次的差异。**方法** 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱, 检测波长为 210 nm, 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温为 30 ℃。**结果** 7 种指标成分的线性关系均良好。不同厂家样品质量差异较大, 同一厂家不同批次样品质量差异相对较小。**结论** 该方法科学合理, 能相对较全面地反映小柴胡颗粒的质量, 为客观评价其质量提供科学依据。

关键词: 小柴胡颗粒; 甘草苷; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 甘草酸铵; 柴胡皂苷 a; 汉黄芩素; 高效液相色谱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)02-0162-04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.013

Determination of seven index components in Xiaochaihu Granules by HPLC

ZHANG Hui, YAN Lei, LIN Long-fei, DONG Xiao-xu, SHEN Ming-rui, QU Chang-hai, NI Jian

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: **Objective** To establish a method for the simultaneous determination of liquiritin, baicalin, wogonoside, baicalein, ammonium glycyrrhizinate, saikosaponin a and wogonin in Xiaochaihu Granules, and to compare the qualities of the seven components in Xiaochaihu Granules from different manufacturers and different batches in a single manufacturer. **Methods** The HPLC analysis was performed on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was set at 210 nm. The flow rate was 0.8 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃. **Results** Seven index components showed a good linearity. There were great differences in the quality of the seven components in Xiaochaihu Granules from different manufacturers, while the qualities of different batches in a single manufacturer were relatively stable. **Conclusion** The method is scientific and reasonable, which could reflect the quality of Xiaochaihu Granules comprehensively and provide the scientific basis for the quality control of Xiaochaihu Granules.

Key words: Xiaochaihu Granules; liquiritin; baicalin; wogonoside; baicalein; ammonium glycyrrhizinate; saikosaponin a; wogonin; HPLC

小柴胡颗粒是根据东汉张仲景《伤寒论》中少阳病症主方小柴胡汤制成的中成药, 其中柴胡为君药, 黄芩为臣药, 党参、半夏、生姜、大枣为佐药, 甘草为使药, 具有解表散热、疏肝和胃的功效^[1]。现代药理研究表明小柴胡汤具有较好的解热、抗炎、抗抑郁^[2]、抗病毒等作用, 体外对多种细菌的抑制作用明显^[3], 对肝脏、胰腺、肺脏和胃肠功能有调节和保护作用, 临床应用较为广泛^[4]。《中国药典》2010 年版一部中小柴胡颗粒项下仅规定对样品中柴胡、黄芩、甘草进行定性鉴别, 含量测定仅要求

黄芩苷不得少于 20.0 mg/袋。本实验采用 HPLC 法同时测定其中的 7 个指标成分甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素, 并比较不同厂家及同一厂家不同批次小柴胡颗粒中指标成分的质量差异, 为更全面控制小柴胡颗粒的质量提供参考依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪、G1314B VL 泵 (美国安捷伦公司); BT-125D 十万分之一电子天平 (赛多利斯公司); KH5200E 型超声波清洗器 (昆

收稿日期: 2013-07-10

基金项目: 北京中医药大学复方中药制药创新团队 (2011-CXTD-13)

作者简介: 张 慧 (1988—), 女, 山东威海人, 在读硕士研究生, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: 15811413689 E-mail: linda47@yeah.net

*通信作者 倪 健 (1964—), 男, 教授, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)84738607 E-mail: njtcm@263.net

山禾创超声仪器有限公司)。黄芩苷(批号 110715-201117)、黄芩素(批号 111595-201105)、汉黄芩素(批号 111514-201016)、甘草苷(批号 111610-201106)、甘草酸铵(批号 110731-201116)、柴胡皂苷 a(批号 110777-201108)对照品均购自中国食品药品检定研究院;汉黄芩苷对照品购自四川省维克奇生物科技有限公司,批号 111014,质量分数大于 98.0%。乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

本研究收集了市售 11 个不同厂家和部分厂家不同批次的小柴胡颗粒,购自全国各地零售药店,并将 11 个不同厂家的样品随机编号,依次为 S1~S11,见表 1。同一厂家(S11)的样品批号分别为 110903、120202、120401、120301、111102。

表 1 不同厂家的小柴胡颗粒样品

Table 1 Samples of Xiaochaihu Granules from different manufacturers

编号	厂家	批号
S1	广州白云山光华制药股份有限公司	K12025
S2	太极集团四川南充制药有限公司	2012030
S3	云南白药集团股份有限公司	ZD12010
S4	江西济民可信药业有限公司	120202
S5	湖北虎泉药业有限公司	111102
S6	北京九龙制药有限公司	120230
S7	江西汪氏药业有限公司	20111206
S8	福建省泉州罗裳山制药厂	20120402
S9	北京亚东生物制药有限公司	1202012
S10	江西禹欣药业有限公司	120405
S11	江西南昌桑海制药厂	111249

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B);梯度洗脱,0~10 min, 5%~17%A;10~20 min, 17%~19%A;20~55 min, 19%A;55~80 min, 19%~21%A;80~100 min, 21%~41%A;100~115 min, 41%~43%A;115~120 min, 43~55%A;体积流量:0.8 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素对照品适量,精密

称定,用甲醇配制成质量浓度分别为 0.075 0、0.524 0、0.260 0、0.028 2、0.051 0、0.116 0、0.029 4 mg/mL 的混合对照品溶液;再精密吸取 1 mL 该溶液,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得混合对照品溶液,过 0.22 μm 的微孔滤膜,取续滤液作为对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液的制备

取不同厂家及同一厂家不同批次小柴胡颗粒适量,研成细粉,取约 5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.4 专属性试验

分别吸取混合对照品溶液和供试品溶液,按照上述色谱条件进样,记录色谱图,见图 1。

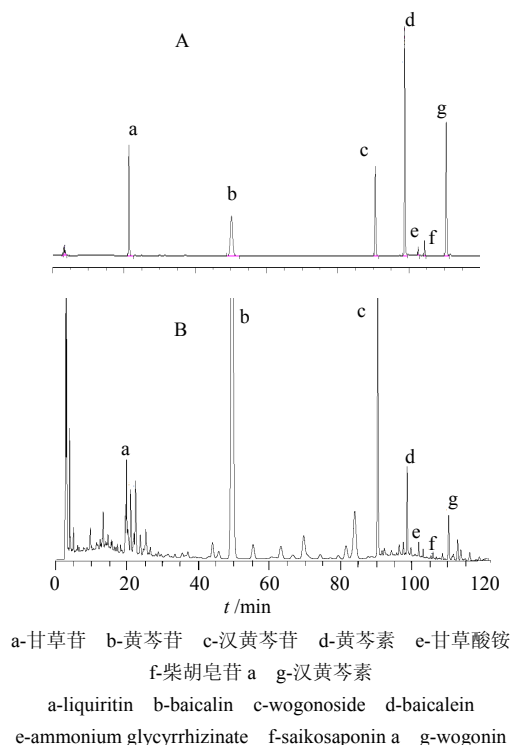


图 1 混合对照品(A)和小柴胡颗粒(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and Xiaochaihu Granules (B)

结果表明甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素与其他组分均能达到较好的分离,且分离度均大于 1.5,理论塔板数均大于 5 000。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2、4、6、8、10、16、18 μL,依次注入高效液

相色谱仪,记录峰面积。以进样质量为横坐标,峰面积为纵坐标,制定标准曲线,得回归方程及线性范围,见表 2。结果表明各成分在各自质量浓度范围内线性关系均良好。

表 2 不同成分的回归方程、相关系数及线性范围

Table 2 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of different components

成 分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μg
甘草苷	$Y=4\ 191.6 X+47.504$	0.999 9	0.012~1.200
黄芩苷	$Y=4\ 725.1 X+31.720$	0.999 9	1.014~13.182
汉黄芩苷	$Y=5\ 117.9 X+6.899$	0.999 9	0.208~2.496
黄芩素	$Y=7\ 775.6 X-55.952$	0.999 9	0.043~0.559
甘草酸铵	$Y=197.6 X+0.247$	0.999 9	0.101~1.316
柴胡皂苷 a	$Y=339.8 X+2.358$	0.999 9	0.024~0.283
汉黄芩素	$Y=7\ 017.3 X-14.712$	0.999 9	0.023~0.299

2.5.2 精密度试验 精确吸取混合对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,测定峰面积,结果甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素峰面积的 RSD 值分别为 0.70%、0.90%、0.81%、0.70%、0.79%、1.11%、0.26% ($n=6$)。

2.5.3 稳定性试验 取批号 K12025 的小柴胡颗粒样品 1 份,制备供试品溶液,分别在 0、3、6、12、24、48 h 进样,按上述色谱条件测定峰面积,结果甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素峰面积的 RSD 值分别为 1.85%、0.16%、2.05%、2.90%、1.86%、2.18%、2.46%。表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.5.4 重复性试验 取批号 K12025 的小柴胡颗粒样品 6 份,制备供试品溶液,各吸取 10 μL ,按上述色谱条件测定峰面积,结果甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素质量分数的 RSD 值分别为 2.61%、0.80%、1.76%、2.40%、1.19%、2.53%、2.75% ($n=6$)。

2.5.5 回收率试验 精密称取批号 K12025 的小柴胡颗粒样品 6 份,每份约 5 g,加入甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素对照品的质量分别为 0.47、10.21、2.21、0.55、1.14、0.32、0.34 mg,制备供试品溶液,按上述色谱条件测定峰面积,计算各指标成分回收率,结果平均回收率分别为 99.13%、99.60%、98.89%、99.65%、97.95%、100.37%、98.69%,RSD 值分别为 2.02%、1.59%、1.85%、2.27%、1.77%、1.49%、2.72% ($n=6$)。

2.6 样品测定

取不同厂家和同一厂家(S11)不同批次的小柴胡颗粒制备供试品溶液,按上述色谱条件进样测定,所得峰面积代入标准曲线计算,结果见表 3~4。

根据各厂家包装规格折算,不同厂家小柴胡颗粒样品中黄芩苷的质量分数为 10.821~32.305 mg/袋,差异较大。根据《中国药典》2010 年版规定本品含黄芩苷不得少于 20.0 mg/袋,因此,除了 S2 和 S10 厂家的样品未能达到规定外,其他厂家的样品均符合要求。除黄芩苷外,各厂家样品中其他几种指标成分的差异也较大,甘草苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素的质量分数

表 3 不同厂家小柴胡颗粒中指标成分的测定结果 ($n=3$)

Table 3 Determination of index components in Xiaochaihu Granules from different manufacturers ($n=3$)

编 号	甘草苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	黄芩苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	汉黄芩苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	黄芩素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	甘草酸铵/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	柴胡皂苷 a/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	汉黄芩素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
S1	0.095	2.043	0.443	0.109	0.228	0.064	0.067
S2	0.024	1.915	0.386	0.083	0.242	0.091	0.070
S3	0.053	2.973	0.108	0.116	0.400	0.031	0.030
S4	0.024	2.561	0.150	0.089	0.089	0.031	0.024
S5	0.157	2.224	0.468	0.086	0.487	0.094	0.063
S6	0.041	2.192	0.360	0.104	0.074	0.037	0.053
S7	0.156	2.024	0.491	0.074	0.387	0.113	0.060
S8	0.269	2.443	0.497	0.175	0.419	0.074	0.088
S9	0.038	2.158	0.446	0.148	0.088	0.028	0.092
S10	0.066	3.607	0.725	0.488	0.312	0.045	0.141
S11 (120202)	0.019	6.461	0.402	0.304	0.610	0.084	0.133

表 4 同一厂家 (S11) 不同批次小柴胡颗粒中指标成分的测定结果 ($n=3$)

Table 4 Determination of index components in Xiaochaihu Granules from different batches of a single manufacturer (S11) ($n=3$)

批号	甘草苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	黄芩苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	汉黄芩苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	黄芩素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	甘草酸铵/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	柴胡皂苷 a / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	汉黄芩素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
110903	0.059	6.116	0.476	0.300	0.627	0.089	0.154
111102	0.061	6.322	0.579	0.284	0.653	0.097	0.164
120202	0.019	6.461	0.402	0.304	0.610	0.084	0.133
120301	0.026	6.966	0.400	0.297	0.656	0.077	0.131
120401	0.026	6.348	0.396	0.319	0.568	0.076	0.127

分别为 0.095~2.690、1.080~4.970、0.740~1.750、0.740~4.870、0.135~1.130、0.240~0.920 mg/袋,不同厂家的样品差异较明显。同一厂家 (S11) 不同批次小柴胡颗粒样品中,甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素质量分别为 0.095~0.305、30.580~34.830、1.980~2.859、1.420~1.595、2.840~3.280、0.380~0.485、0.635~0.820 mg/袋。与不同厂家样品相比,同一厂家不同批次样品的质量差异相对较小。

3 讨论

为了尽可能多地体现小柴胡颗粒所含化学成分的特征,并结合其大多数成分为水提物的特点,本实验考察了提取溶剂为无水甲醇、无水乙醇、甲醇-水 (7:3)、甲醇-水 (1:1) [5-7] 的情况,其中无水甲醇提取物的色谱峰最多,故选择无水甲醇溶液提取。采用了十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的反相柱,分别对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水和乙腈-0.1%磷酸水等 [7-8] 体系进行了梯度洗脱试验,结果表明,乙腈-0.1%磷酸水系统有助于各色谱峰的分离,色谱峰最多,分离度最好。考察了 0.5、0.8、1.0 mL/min 3 种体积流量,结果表明最佳体积流量为 0.8 mL/min。依次考察了 203、210、220、248、254 nm 等 [9-10] 几种不同的波长对图谱的影响,结果在 210 nm 波长下,色谱峰较多,兼顾了多种成分,各峰分离度良好,基线平稳,且 210 nm 是小柴胡颗粒中主要成分柴胡皂苷的最大吸收波长,故选择 210 nm 为检测波长。

本实验建立了同时测定小柴胡颗粒中 7 种指标成分甘草苷、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、甘草酸铵、柴胡皂苷 a 和汉黄芩素的 HPLC 方法,该方法科学合理,能相对较全面地反映小柴胡颗粒的内在质量,为客观评价其质量提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 509.
- [2] 杨杰, 黄丹雪, 鹿秀梅, 等. 小柴胡汤化学成分及其在抑郁模型大鼠体内代谢成分的分析 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1691-1698.
- [3] 袁长津, 卢芳国, 朱应武. 小柴胡汤及其加减方体外抗菌作用的实验研究 [J]. 中医药导报, 2005, 11(10): 54-55.
- [4] 张保国, 李昌勤, 刘庆芳. 小柴胡汤现代药效学研究 [J]. 中成药, 2010, 32(4): 648-651.
- [5] 沈静, 刘峰. RP-HPLC 法测定小柴胡颗粒中黄芩苷含量 [J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(1): 48-49.
- [6] 姜春玲, 李大伟. 小柴胡颗粒中黄芩苷的含量测定 [J]. 黑龙江科技信息, 2011(14): 26.
- [7] 李春红, 梅志强, 何兵, 等. HPLC 同时测定小柴胡颗粒中四种成分的含量 [J]. 泸州医学院学报, 2012, 35(4): 399-401.
- [8] 庄延双, 蔡皓, 刘晓, 等. 小柴胡颗粒中 5 种指标性成分的同时含量测定及其特征图谱研究 [J]. 药学报, 2012, 47(1): 84-87.
- [9] 赵丽, 钟巧妮, 雷玉霞, 等. 柴胡总苷高效液相色谱指纹图谱与主成分含量测定 [J]. 医药导报, 2008, 27(3): 323-325.
- [10] 王一飞, 王广基, 佟玲, 等. 北柴胡药材的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(23): 11558-11559.