

HPLC 法同时测定柴胡桂枝汤中 6 种成分

张 静， 李壮壮， 杜宝香， 丁富娟， 容 蓉， 吕青涛*
(山东中医药大学, 山东 济南 250355)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定柴胡桂枝汤(柴胡、桂枝、黄芩等)中肉桂酸、芍药苷、黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷、甘草酸的含量。**方法** 该药物水提液的分析采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 磷酸-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 27 ℃; 检测波长 230、260、280 nm。**结果** 6 种成分在各自范围内线性关系良好($r>0.999\ 0$), 平均加样回收率 99.06%~100.37%, RSD 1.75%~2.26%。**结论** 该方法稳定可靠, 可用于柴胡桂枝汤的质量控制。

关键词: 柴胡桂枝汤; 肉桂酸; 芍药苷; 黄芩苷; 汉黄芩素; 甘草苷; 甘草酸; HPLC

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)10-2202-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.10.017

Simultaneous determination of six constituents in Chaihu Guizhi Decoction by HPLC

ZHANG Jing, LI Zhuang-zhuang, DU Bao-xiang, DING Fu-juan, RONG Rong, LÜ Qing-tao*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of cinnamic acid, paeoniflorin, baicalin, wogonin, liguiritin and glycyrrhizic acid in Chaihu Guizhi Decoction (*Bupleuri Radix*, *Cinnamomi Ramulus*, *Scutellariae Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of aqueous extract of this drug was performed on a 27 ℃ thermostatic Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of 0.1% phosphoric acid-acetonitrile flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 230, 260, 280 nm. **RESULTS** Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r>0.999\ 0$), whose average recoveries were 99.06%–100.37% with the RSDs of 1.75%–2.26%. **CONCLUSION** This stable and reliable method can be used for the quality control of Chaihu Guizhi Decoction.

KEY WORDS: Chaihu Guizhi Decoction; cinnamic acid; paeoniflorin; baicalin; wogonin; liguiritin; glycyrrhizic acid; HPLC

柴胡桂枝汤源自《伤寒论》，为小柴胡汤和桂枝汤的合方，以前者和解枢机治少阳，后者调和营卫治太阳，从而达到太、少双解，临床上主要用于太阳少阳合病引起的发热恶寒、肢体疼痛等症^[1-2]，也可治疗发热^[3-4]、循环系统病症^[5]、消化系统病症^[6]、内分泌系统病症^[7]、植物神经功能紊乱及妇科疾病^[8-9]。

目前，对柴胡桂枝汤指标性成分含量测定的研究尚不全面。为了全面考察及评价该方内在质量，本实验在中药质量标志物^[10]的基础上，选择

收稿日期: 2017-12-23

基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX09101003-003-004); 山东省重点产业关键技术创新工程(2016CYJS08A01-5)

作者简介: 张 静(1990—), 女, 硕士生, 从事天然药物化学成分及化学分析研究。Tel: 18364166078, E-mail: 18364166078@163.com

* 通信作者: 吕青涛(1965—), 男, 博士, 教授, 从事天然药物化学成分及化学分析研究。Tel: 13905316839, E-mail: luqingtao9@163.com

2202

桂枝(君)、白芍(臣)、黄芩(臣)、甘草(佐)作为代表性药材,其代表性成分肉桂酸、芍药苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草苷、甘草酸作为检测指标,建立 HPLC 法同时测定上述成分的含有量,为相关复方颗粒研制及质量控制奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 HPLC 色谱仪(配置四元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器);AE240 型电子天平(十万分之一,瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试药 肉桂酸(AA0807DA14)、芍药苷(27F8C0162)、黄芩苷(D23S7F21640)、汉黄芩苷(P04A7F18933)、甘草苷(D25J7F18328)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司;甘草酸铵(110731-201619)对照品购自中国食品药品检定研究院,含有量均 $\geq 98\%$ 。桂枝、黄芩、党参、甘草、半夏、白芍、大枣、生姜、柴胡均购自山东省中医院,由山东中医药大学李峰教授鉴定均符合 2015 年版《中国药典》规定。乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

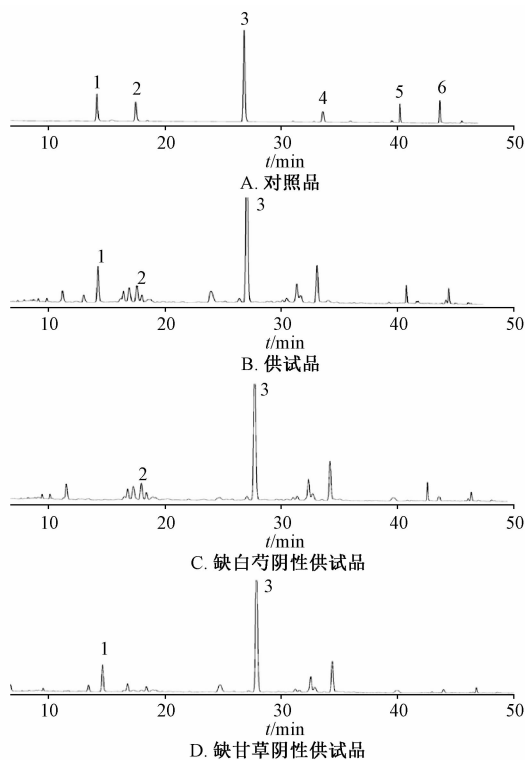
2.1.1 对照品溶液 精密称取对照品肉桂酸 1.39 mg、芍药苷 2.00 mg、黄芩苷 15.76 mg、汉黄芩苷 0.87 mg、甘草苷 0.68 mg、甘草酸铵 1.68 mg,置于 6 个 1 mL 量瓶中,甲醇定容至 1 mL(质量浓度分别为 1.39、2.00、15.76、0.87、0.68、1.68 mg/mL),各精密吸取 0.5 mL,置于同一 5 mL 量瓶中,混匀后甲醇定容得贮备液(质量浓度分别为 0.139、0.200、1.576、0.078、0.068、0.168 mg/mL),各精密吸取适量,甲醇稀释成不同质量浓度,即得(编号①~⑤),分别含肉桂酸 0.174、0.035、0.070、0.104、0.139 mg/mL,芍药苷 0.025、0.050、0.100、0.150、0.200 mg/mL、黄芩苷 0.197、0.394、0.788、1.182、1.576 mg/mL,汉黄芩素 0.011、0.022、0.044、0.065、0.087 mg/mL,甘草苷 0.009、0.017、0.034、0.051、0.068 mg/mL,甘草酸铵 0.021、0.042、0.084、0.126、0.168 mg/mL)。

2.1.2 供试品溶液 根据汤剂处方称取桂枝 4.5 g、黄芩 4.5 g、党参 4.5 g、甘草 3 g、半夏(法半夏)7.5 g、白芍 4.5 g、大枣 6 枚(擎)4.5 g、干姜 4.5 g、柴胡 12 g,加入 10 倍量水浸泡 30 min 后煎煮 40 min,滤过,同法共煎煮 3 次,合并滤液,浓缩并定容至 500 mL,平行 5 份,即

得(编号①~⑤),使用前过 0.45 μm 微孔滤膜。

2.1.3 阴性供试品溶液 按“2.1.2”项下方法,制备缺白芍、桂枝、黄芩、甘草的阴性供试品溶液。

2.2 色谱条件与专属性考察 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm);流动相 0.1% 磷酸-乙腈,梯度洗脱(0~5 min, 2%~12% 乙腈;5~20 min, 12%~24% 乙腈;20~25 min, 24%~27% 乙腈;25~38 min, 27%~38% 乙腈;38~48 min, 38%~74% 乙腈;48~50 min, 74%~100% 乙腈);体积流量 1.0 mL/min;柱温 27 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 230 nm(芍药苷和甘草苷)、260 nm(甘草酸)、280 nm(肉桂酸、黄芩素和汉黄芩素);进样量 10 μL 。取“2.1.1”项下对照品溶液②、“2.1.2”项下供试品溶液①、“2.1.3”项下阴性供试品溶液,在上述色谱条件下进样测定,结果见图 1~3,可知各成分分离度理想,不受其他组分干扰,表明该方法专属性良好。



1. 芍药苷 2. 甘草苷 3. 黄芩苷 4. 肉桂酸 5. 甘草酸
6. 汉黄芩素

1. paeoniflorin 2. liguitrin 3. baicalin 4. cinnamic acid
5. glycyrrhizic acid 6. wogonin

图 1 各成分 HPLC 色谱图 (230 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents (230 nm)

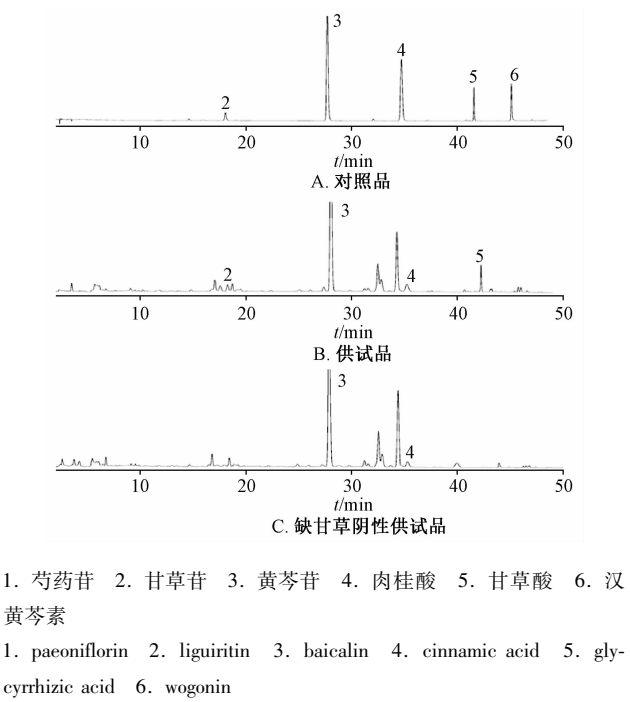


图 2 各成分 HPLC 色谱图 (260 nm)

Fig. 2 HPLC chromatograms of various constituents (260 nm)

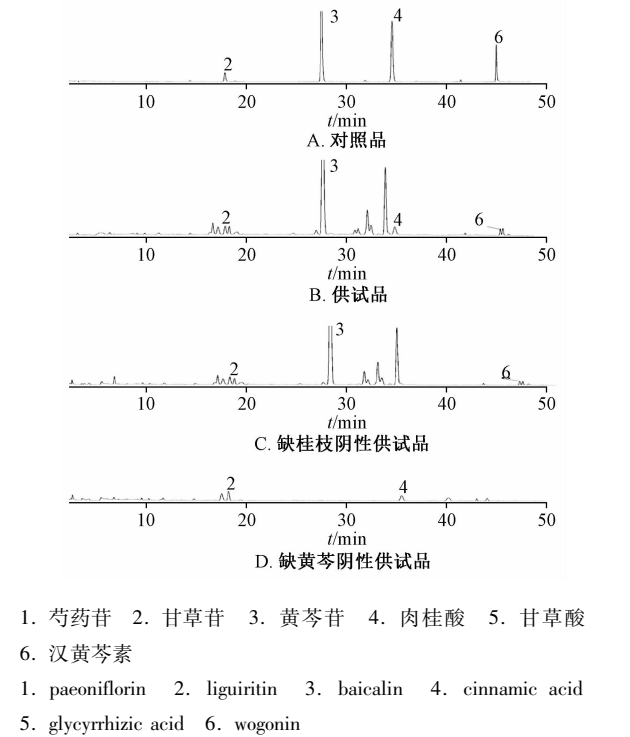


图 3 各成分 HPLC 色谱图 (280 nm)

Fig. 3 HPLC chromatograms of various constituents (280 nm)

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 取“2.1.1”项下对照品溶液①~⑤,在“2.2”项色谱条件下进样测定。

以峰面积为纵坐标 (Y),质量浓度为横坐标 (X) 进行回归,结果见表 1,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系				
Tab. 1 Linear relationships of various constituents				
成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
肉桂酸	$Y=12.562X+0.3849$	0.9997	14.7~139.2	
芍药苷	$Y=19.063X+63.941$	0.9993	25~200	
黄芩苷	$Y=34.808X+263.46$	0.9996	197~1576	
汉黄芩素	$Y=9.5979X-7.7317$	0.9992	10.9~87.2	
甘草苷	$Y=32.797X+67.717$	0.9992	8.5~68	
甘草酸	$Y=15.044X+17.013$	0.9991	21~168	

2.3.2 精密度试验 取“2.1.1”项下对照品溶液②,在“2.2”项色谱条件下进样测定 5 次,测得肉桂酸、芍药苷、黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷、甘草酸峰面积 RSD 分别为 0.34%、1.1%、0.39%、0.28%、0.42%、0.32%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液①,在“2.2”项色谱条件下于 0、4、8、12、16、24 h 进样测定,测得肉桂酸、芍药苷、黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷、甘草酸峰面积 RSD 分别为 0.74%、1.47%、1.57%、0.15%、3.3%、1.9%,表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取“2.1.2”项下供试品溶液①,在“2.2”项色谱条件下进样测定,测得肉桂酸、芍药苷、黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷、甘草酸含有量 RSD 分别为 2.13%、0.35%、0.88%、0.27%、1.21%、0.47%,表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密吸取“2.1.2”项下含有量已知的供试品溶液①,按 80%、100%、120% 水平分别加入各对照品,混匀后过 0.45 μm 微孔滤膜,在“2.2”项色谱条件下进样测定,计算回收率。结果,肉桂酸、芍药苷、黄芩苷、汉黄芩苷、甘草苷、甘草酸平均加样回收率分别为 99.06%、100.37%、100.34%、99.30%、99.63%、100.16%,RSD 分别为 2.26%、2.04%、2.09%、1.77%、1.75%、1.82%。

2.4 样品含有量测定 取“2.1.2”项下供试品溶液①~⑤、“2.1.1”项下对照品溶液②,在“2.2”项色谱条件下进样测定,外标法计算含有量,结果见表 2。

表 2 各成分含有量测定结果 (mg/mL, n=3)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/mL, n=3)

编号	肉桂酸	芍药苷	黄芩苷	汉黄芩素	甘草苷	甘草酸
1	0.071	0.101	0.705	0.018	0.033	0.065
2	0.057	0.103	0.763	0.019	0.029	0.062
3	0.062	0.098	0.644	0.017	0.039	0.063
4	0.059	0.101	0.658	0.019	0.033	0.064
5	0.067	0.101	0.624	0.019	0.020	0.062

注:甘草酸含有量=甘草酸铵含有量/1.020 7

3 讨论

3.1 检测波长选择 柴胡桂枝汤中肉桂酸、芍药苷、黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷、甘草酸结构不同,紫外吸收差别较大。为了提高检测灵敏度,本实验采用二极管阵列检测器(DAD)在 200 ~ 400 nm 范围内进行全波长扫描,最终确定为“2.2”项下检测波长。

3.2 流动相选择 本实验考察了 0.1% 磷酸-甲醇、1% 甲酸-甲醇、0.1% 磷酸-乙腈、1% 甲酸-乙腈等流动相系统,发现 0.1% 磷酸-乙腈洗脱时各待测成分分离度良好,而且峰形对称。

3.3 提取工艺选择 本实验通过正交试验,对煎煮时间(40、60、80 min)、煎煮次数(1、2、3 次)、加水量(6、8、10 倍)进行优化,确定最优工艺为煎煮时间 40 min,煎煮次数 3 次,加水量 10 倍。

4 结论

目前,有关柴胡桂枝汤成分含有量测定的研究大多见于小柴胡汤和桂枝汤^[11-13]。本实验首次通过 HPLC 法对柴胡桂枝汤中肉桂酸、黄芩苷、汉黄芩素、甘草苷、甘草酸的含有量同时进行测定,该方法准确可靠,重复性好,可为其质量控制提供科

学依据。

参考文献:

[1] 张保国,刘庆芳. 柴胡桂枝汤临床新用[J]. 中成药, 2013, 35(10): 2245-2248.

[2] 李 忱,刘晋河,郝伟欣,等. 柴胡桂枝汤加减治疗 SAPHO 综合征临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(4): 429-432.

[3] 吴 霜. 柴胡桂枝汤加减治疗经行感冒临床观察[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(12): 172-173.

[4] 李富旺. 柴胡桂枝汤治疗发热疗效探析[J]. 中医研究, 2005, 18(11): 13.

[5] 史国军,施 航,叶兴涛,等. 柴胡桂枝汤加味治疗乳腺癌伴抑郁症 36 例[J]. 浙江中医杂志, 2017, 52(1): 36-37.

[6] 苏孟华. 柴胡桂枝汤治疗肝郁气滞性肢体疼痛 38 例[J]. 国医论坛, 2005, 20(6): 8-9.

[7] 李国年. 柴胡桂枝汤治疗克罗恩病的临床效果探讨[J]. 基层医学论坛, 2017, 21(7): 858-859.

[8] 赵红梅,李燕宁,吴金勇,等. 李燕宁教授运用柴胡桂枝汤加减治疗儿童血管神经性头痛经验分析[J]. 中国中西医结合儿科学, 2013, 5(6): 509-510.

[9] 查 政. 柴胡桂枝汤在神志病治疗中的运用及机理探讨[J]. 国医论坛, 2017, 32(2): 4-7.

[10] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457

[11] 柏 冬,范 斌,牛晓红,等. 多波长高效液相色谱法同时测定桂枝汤中 5 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(1): 1-5.

[12] 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.

[13] 范广建,张 坚. HPLC 法测定柴胡桂枝颗粒中桂皮醛和桂皮酸的含量[J]. 河北医药, 2015, 37(10): 1575-1577.