

· 化学与分析 ·

HPLC 测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷、黄芩苷

何建雄¹, 赖小平^{1*}, 魏刚¹, 左竣岭², 李辉标¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405)

[摘要] 目的:建立银翘柴桂汤剂中黄芩苷、绿原酸、芍药苷的含量测定方法。方法:采用 HPLC 法,色谱柱为 Kromasil C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为甲醇-1% 磷酸水(梯度洗脱);流速 1 mL·min⁻¹;柱温为 35℃;多波长检测芍药苷检测波长 230 nm,黄芩苷检测波长 280 nm,绿原酸检测波长 327 nm。结果:绿原酸、芍药苷和黄芩苷在 40 min 内均能与其他组分实现良好分离,绿原酸、芍药苷和黄芩苷分别在 0.077 6~0.776 0 μg($r=0.999\ 9$),0.076 1~0.761 0 μg($r=0.999\ 9$),0.264 8~2.648 μg($r=0.999\ 9$)线性关系良好,加样回收率分别为 102.67% (RSD 1.48, $n=6$),97.85% (RSD 1.85, $n=6$),101.86% (RSD 1.44, $n=6$)。结论:方法简便、结果准确,能同时测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷和黄芩苷 3 种有效成分的含量。

[关键词] 银翘柴桂汤;绿原酸;黄芩苷;芍药苷;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0048-03

Content Determination of Chlorogenic Acid, Paeoniflorin and Baicalin
in Yinqiao Chaigui Decoction

HE Jian-xiong¹, LAI Xiao-ping^{1*}, WEI Gang¹, ZUO Jun-ling², LI Hui-biao¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] Objective: To develop an HPLC method for the Content determination of chlorogenic acid, paeoniflorin and baicalin inYinqiaochaigui decoction. Method: HPLC-based separation of the agents was performed on Kromasil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm,5 μm) at 25℃ with the mobile phase of methanol-0.1% Phosphoric acid water solution (gradient elution), flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and multiple detection wavelength of 327,230, 280 nm. Result: HPLC allowed simultaneous quantitative determination of the 3 components in Yinqiao Chaigui decoction, and they showed good linear relationships when their sample amount ranged 0.077 6 – 0.776 0 μg, 0.076 1-0.761 0 μg and 0.264 8-2.648 μg, respectively, with correlation coefficients all beyond 0.999 9 and average recovery rates of 102.67% ,97.85% and 101.86% , respectively. Conclusion: This method is simple and convenient in detecting the 3 components in Yinqiao Chaigui decoction, and the results are precise and reproducible.

[Key words] Yinqiao Chaigui decoction; chlorogenic acid; paeoniflorin; baicalin; HPLC

银翘柴桂方是广州中医药大学第一附属医院临

床验方,具有调营卫、解表邪、畅枢机的的功效,临床上用于治疗流行性感冒而引起的恶寒、发热、头痛、肌肉酸痛、口干、咽痛等症,效果良好,现拟将其研制成方便携带与服用的颗粒剂。测定临床上常用的银翘柴桂汤中抗病毒有效成分绿原酸、芍药苷和黄芩苷的含量^[1-2],可为银翘柴桂颗粒剂的质量标准制定及药效学研究提供参考。

1 仪器与试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪(岛津);SPD-M20A

[收稿日期] 20101104(011)
[基金项目] 国家科技部“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BA101B00)
[第一作者] 何建雄,博士研究生,研究方向:中药新药研究与指纹图谱分析,E-mail:372374399@qq.com
[通讯作者] * 赖小平,研究员,博士生导师,主要从事中药新药与中药物质基础研究,Tel:020-39358192,E-mail:lxp88@gzhtcm.edu.cn

型二极管阵列检测器(DAD)。

绿原酸对照品(批号 110753-200413),芍药苷对照品(批号 110736-200934),黄芩苷对照品(批号 110715-200212)均购于中国药品生物制品检定所;10 批金银花、连翘、柴胡、桂枝、黄芩、桔梗、白芍、玄参、甘草等药材饮片,分别购于广东多家药材公司,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流动相甲醇(A)-1% 磷酸(B)梯度洗脱,洗脱条件见表 1,柱温 35 ℃;流速 1.0 mL·min⁻¹;DAD 检测器,检测波长 230 nm(芍药苷),280 nm(黄芩苷),327 nm(绿原酸)。结果表明在此条件下 3 个成分能与其他成分达到较好的分离效果,

分离度大于 1.15,理论板数均大于 5 000,阴性对照无干扰,结果见图 1。

表 1 流动相梯度洗脱时间

t/min	A/%	B/%
0~12	18~30	82~70
12~20	30~33	70~67
20~30	33~53	67~47
30~40	53~68	47~32

2.2 对照品溶液制备 取绿原酸对照品、芍药苷对照品和黄芩苷对照品适量,精密称定,用甲醇溶解并配制成每 1 mL 各含 0.388,0.263,1.324 mg 的对照品溶液。

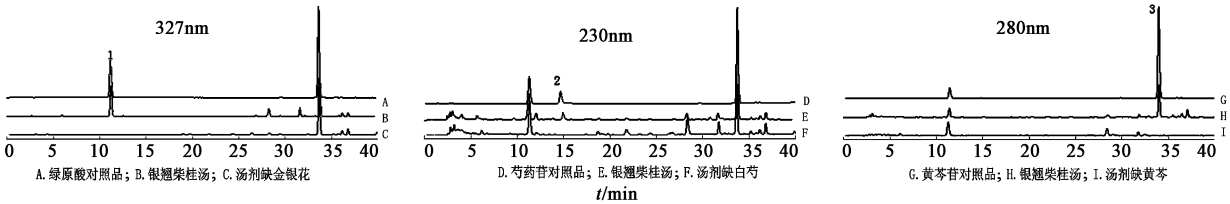


图 1 银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷和黄芩苷的 HPLC 图

1. 绿原酸;2. 芍药苷;3. 黄芩苷

2.3 供试品溶液的制备 称取金银花,连翘,柴胡,桂枝,黄芩,白芍等 10 味药材,至砂锅中。第一煎加入 7 倍药重洁净水,浸泡 30 min,加热至沸,保持微沸 30 min;取汁后加 3 倍量开水进行第二煎,合并 2 次煎煮液,放冷,置 1 000 mL 量瓶中,加水至刻度,得全方汤剂。精密吸取汤液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度。取上清液 1 mL,0.45 μm 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液即得。另按处方比例同法分别制备缺金银花、芍药、黄芩的阴性样品溶液。

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 2,4,8,12,16,20 μL,注入液相色谱仪,按上述色谱条件测定峰面积,以进样量(μg)为横坐标 X,以峰面积为纵坐标 Y,进行线性回归,绿原酸的回归方程为 Y = 3 129 365.9X - 10 329.4,线性范围为 0.077 6 ~ 0.776 0 μg(r = 0.999 9);芍药苷的回归方程为 Y = 938 296.4X - 9 240.3,线性范围 0.076 1 ~ 0.761 0 μg(r = 0.999 9);黄芩苷的回归方程为 Y = 3 259 830.3X - 41 314.8,线性范围为 0.264 8 ~ 2.648 μg(r = 0.999 9)。

2.5 仪器精密度的试验 精密吸取同一混合对照品

溶液各 10 μL,重复进样 6 次,测定峰面积,结果绿原酸、芍药苷、黄芩苷峰面积的 RSD 均 < 1.00%,表示仪器精密性良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一银翘柴桂汤供试品溶液 10 μL,分别在分别在 0,2,4,8,16,24 h 进样,按上述色谱条件测定峰面积,结果表明银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷和黄芩苷等峰面积的 RSD 均 < 1.00%,表明在 24 h 均较稳定。

2.7 重复性试验 取同一批银翘柴桂方饮片 5 份,按 2.3 项下方法制备,测定峰面积,结果银翘柴桂汤剂中绿原酸、芍药苷和黄芩苷峰面积的 RSD 均 < 5.00%,表明重复性良好。

2.8 加样回收试验 精密吸取 5 份已知含量的银翘柴桂汤剂(绿原酸、芍药苷、黄芩苷的质量浓度分别为 0.3405,0.145 2,0.752 6 g·L⁻¹)5 mL,精密加水 5 mL,精密加入一定量的绿原酸对照品(0.174 6 mg)、芍药苷对照品(0.076 1 mg)和黄芩苷对照品(0.397 2 mg),按汤剂供试品溶液的制备与样品的测定同法操作,结果绿原酸、芍药苷、黄芩苷的加样回收率分别 102.67%,97.85%,101.86%,RSD 分别为 1.48%,1.85%,1.44%。

2.9 样品的测定 分别精密吸取汤剂供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪中,测定峰面积,按外标法计算汤剂中绿原酸、黄芩苷、芍药苷的含量($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),测定 10 批汤剂,结果见表 2。

表 2 银翘柴桂汤中 3 种成分测定($n=3$) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

No.	绿原酸	芍药苷	黄芩苷
1	0.298 2	0.189 7	0.482 8
2	0.334 4	0.222 6	0.514 1
3	0.304 7	0.190 2	0.483 1
4	0.293 4	0.186 9	0.730 1
5	0.282 5	0.108 1	0.795 8
6	0.322 9	0.132 9	0.379 3
7	0.269 3	0.162 8	0.232 6
8	0.266 4	0.148 4	0.592 6
9	0.253 2	0.151 3	0.320 4
10	0.499 9	0.131 5	0.492 2

3 小结与讨论

以上 10 批研究结果表明,银翘柴桂汤剂中的绿

原酸、芍药苷、黄芩苷的质量浓度分别为 $0.253\ 2\sim 0.499\ 9$, $0.108\ 1\sim 0.222\ 6$, $0.232\ 6\sim 0.795\ 8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,绿原酸、芍药苷、黄芩苷的含量差异较大,说明采用传统煎煮方法制备的饮片汤剂,由于个人的习惯、对火候的掌握、加水量的多少及药材产地等诸多因素影响,导致汤剂中有效成分的含量变化较大。

本实验以 HPLC 同时测定银翘柴桂汤中绿原酸、芍药苷和黄芩苷的含量,分离效果理想,重现性好,40 min 内完成对 3 种成分的检测,方法简便快捷。通过检测银翘柴桂汤中有效成分的含量,了解这些成分在临床上的日服剂量,可以为银翘柴桂汤的物质基础研究及新药开发研究提供一定参考。

[参考文献]

[1] 胡克杰,孙考祥,王璟璐,等. 绿原酸体外抗病毒作用研究[J]哈尔滨医科大学学报,2001,35(6):430.
[2] 初正云,初明,藤宇. 黄芩苷体内抗病毒作用[J]. 中国中药杂志,2007,32(22):2413.

[责任编辑 蔡仲德]

《中国中药杂志》2011 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医药科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2011 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjcmm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。