

# 配伍对黄芩汤中黄芩苷含量的影响

陈建真,吕圭源,罗小敏,叶磊(浙江中医药大学,杭州 310053)

**摘要:**目的 建立黄芩汤各配伍煎液中黄芩苷的 HPLC 含量测定方法,研究配伍对黄芩苷含量的影响。方法 采用  $L_8(2^7)$  正交设计法,以 HPLC 法测定各配伍样品中黄芩苷含量。结果 白药、大枣以及甘草和大枣的交互作用对黄芩苷含量影响的差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ),甘草对黄芩苷含量的影响不显著。结论 白药、大枣可增加黄芩苷的含量。

**关键词:**黄芩汤;配伍;黄芩苷;高效液相色谱

中图分类号:R289.1;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2008)03-0205-04

基金项目:浙江省教育厅课题(20030953)

作者简介:陈建真,女,博士,副教授

Tel: (0571) 86613657

E-mail: chjz102@yahoo.com.cn

CHEN Jian-zhen, LV Gui-yuan, LUO Xiao-min, YE Lei (Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To setup a HPLC method of baicalin in decoction prepared by various compatibility and to study the change of baicalin in different decoctions. **METHODS** Eight decoctions of *Radix Scutellariae* were prepared and analyzed by  $L_8(2^7)$  orthogonal design. Their baicalin contents were determined by RP-HPLC. **RESULTS** The difference of influence *Radix Paeoniae*, *Fructus Jujubae*, and interaction between *Radix et Rhizome Glycyrrhizae* and *Fructus Jujubae* on baicalin is significant ( $P < 0.05$ ). For *Radix et Rhizome Glycyrrhizae*, it is insignificant. **CONCLUSION** The content of baicalin is increased by *Radix Paeoniae* and *Fructus Jujubae*.

**KEY WORDS:** Huangqin Decoction; compatibility; baicalin; HPLC

黄芩汤为张仲景《伤寒论》中经典方,由黄芩、芍药、甘草、大枣组成,具有清热止痢、和中止痛的功效,被认为是治热性痢疾的祖方,临床多用于治疗泄泻、急性肠炎、细菌性痢疾等肠道感染性疾病,现代药理研究表明黄芩汤具有抑菌、抗炎、退热、镇痛、镇静等作用<sup>[1-2]</sup>。黄芩为方中君药,清少阳邪热、厚肠止痢,其主要有效成分为黄芩苷,具有抗炎、抗变态反应、抗菌、解热、镇静等作用<sup>[3]</sup>。本实验采用正交试验法研究不同配伍对黄芩苷含量的影响,从化学成分的角度探讨黄芩汤配伍组方机制。

## 1 仪器和试剂

美国 Waters 高效液相色谱仪,瑞士 METTLER TOLEDO AG 135 电子天平。甲醇(流动相)为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。黄芩苷对照品(供含量测定用,中国药品生物制品检定所,批号 110715-200502)。药材购自浙江中医药大学中药饮片厂,经浙江中医药大学黄真教授鉴定黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根,白芍为毛茛科植物芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)的干燥根,甘草为豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)的干燥根及根茎,大枣为鼠李科植物枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)的干燥成熟果实。

## 2 方法和结果

### 2.1 黄芩药材中黄芩苷含量测定<sup>[4]</sup>

按中国药典 2005 年版(一部)黄芩药材中“黄芩苷含量测定方法”,对黄芩药材进行含量测定,结果黄芩苷含量为 9.59% ( $n=3$ ),符合药典关于黄芩药材中黄芩苷含量不得低于 9% 的规定。

### 2.2 黄芩汤中黄芩苷含量测定<sup>[4-5]</sup>

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱: Hypersil BDS  $C_{18}$  柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2); 流速: 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 检测波长: 280 nm; 柱温: 25  $^{\circ}$ C。进样量: 5  $\mu$ L。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密称取黄芩苷对照品 3.60 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 0.144 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

### 2.2.3 供试品溶液及缺黄芩阴性对照溶液的制备

按黄芩汤处方组成及比例, 称取各味药饮片(黄芩 6 g, 白芍、甘草、大枣各 4 g)及缺黄芩阴性方, 分别加全方生药量的 12 倍水, 微沸煎煮 3 次, 每次煎煮 1 h, 过滤, 合并滤液, 浓缩至 100 mL。精密吸取上述提取液 0.1 mL 置 10 mL 量瓶, 加甲醇定容至刻度, 离心 (4 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>) 5 min, 上清液经 0.45  $\mu$ m 滤膜滤过, 配制成供试品溶液。依法进样测定, 对照品、供试品、阴性对照色谱图见图 1。

**2.2.4 线性关系考察** 精密吸取上述对照品溶液 (0.144 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 20, 25, 50, 100, 500  $\mu$ L 置 1 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。分别精密吸取 5  $\mu$ L 注入色谱仪, 测定峰面积, 以黄芩苷浓度 ( $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 为横坐标 (x), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程为  $Y = 13\,467x - 2\,704.7$ ,  $r = 0.999\,9$ , 黄芩苷在 2.88 ~ 72.00  $\mu$ g 之间呈良好的线性关系。

**2.2.5 精密度试验** 取同一供试品溶液, 重复进样 6 次, 每次 5  $\mu$ L, 黄芩苷峰面积积分值 RSD 为 1.71% ( $n=6$ ), 表明仪器精密度良好。

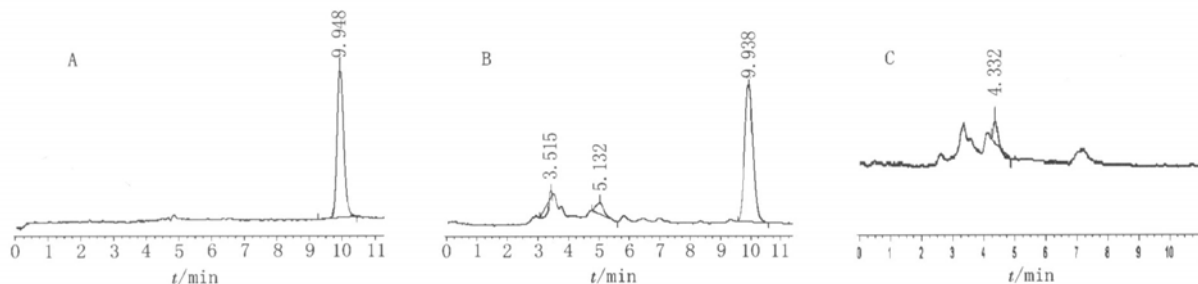


图 1 黄芩苷色谱图

A - 黄芩苷对照品 ( $t_R = 9.948$  min); B - 样品 ( $t_R = 9.938$  min); C - 阴性对照

Fig 1 HPLC chromatograms of baicalin

A - Baicalin; B - Sample; C - Negative sample

2.2.6 重复性试验 取黄芩汤处方药材,按供试品溶液制备方法制成 6 份,按上述色谱条件进样测定,结果黄芩苷平均含量  $4.42 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , RSD 为  $3.11\%$  ( $n=6$ )。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定,每次  $5 \mu\text{L}$ ,黄芩苷峰面积积分值 RSD 为  $1.05\%$ ,表明 24h 内黄芩苷稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密吸取已知含量的黄芩汤提取液  $0.05 \text{ mL}$ ,分别准确加入高、中、低三种不同浓度的黄芩苷对照品,加入量分别为  $0.192 \text{ mg}$ ,  $0.226 \text{ mg}$ ,  $0.276 \text{ mg}$ (约相当于已知浓度的  $80\% \sim 120\%$ ),每种浓度 3 份,制成供试品溶液,进样测定,测得回收率分别为  $95.83\%$ ,  $98.44\%$ ,  $99.48\%$ ,  $102.21\%$ ,  $99.56\%$ ,  $96.90\%$ ,  $96.01\%$ ,  $97.46\%$ ,  $100.36\%$ ,平均回收率  $98.47\%$ , RSD 为  $2.16\%$ 。

表 2  $L_8(2^7)$  正交设计及结果

Tab 2  $L_8(2^7)$  Orthogonal design and result

| 因素   | 因 素    |        |        |        |        |        |        | 黄芩苷含量<br>(mg) |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------------|
|      | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |               |
| 试验号  | A      | B      | A × B  | C      | A × C  | B × C  | 空白     |               |
| 1    | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 445.01        |
| 2    | 1      | 1      | 1      | 2      | 2      | 2      | 2      | 314.87        |
| 3    | 1      | 2      | 2      | 1      | 1      | 2      | 2      | 372.16        |
| 4    | 1      | 2      | 2      | 2      | 2      | 1      | 1      | 336.86        |
| 5    | 2      | 1      | 2      | 1      | 2      | 1      | 2      | 401.78        |
| 6    | 2      | 1      | 2      | 2      | 1      | 2      | 1      | 267.10        |
| 7    | 2      | 2      | 1      | 1      | 2      | 2      | 1      | 363.33        |
| 8    | 2      | 2      | 1      | 2      | 1      | 1      | 2      | 292.34        |
| 均值 1 | 367.23 | 357.19 | 353.89 | 395.57 | 344.17 | 369.00 | 353.08 |               |
| 均值 2 | 331.14 | 341.17 | 344.48 | 302.79 | 354.21 | 329.37 | 345.29 |               |
| 极差   | 36.09  | 16.02  | 9.41   | 92.78  | 10.06  | 39.63  | 7.79   |               |

2.3.3 结果 从表 2 测定结果进行直观分析,以空白列作为误差项进行方差分析,结果各因素均无显著影响,由于  $A \times B$  和  $A \times C$  的偏差平方和较小,因此将该两列和空白列合并为一项做误差的估计值,再经方差分析,见表 3。从表 2、表 3 可见各样品中以四味药合煎时黄芩苷含量最高,白芍、甘草和大枣在用药水平时,黄芩苷含量均大于三者不用药水平时,其对黄芩苷含量的影响程度为:大枣 > 白芍 > 甘草,白芍 (A)、大枣 (C)、甘草和大枣的交互作用 ( $B \times C$ ) 对黄芩苷含量的影响差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ),甘草 (B) 对黄芩苷的影响无显著性。

表 3 方差分析表

Tab 3 Results of variance analysis

| 因素           | 偏差平方和    | 自由度 | F 值    | F0.05 | 显著性 |
|--------------|----------|-----|--------|-------|-----|
| A            | 2604.62  | 1   | 15.60  | 10.10 | *   |
| B            | 513.12   | 1   | 3.07   | 10.10 |     |
| $A \times B$ | 177.19   | 1   | 1.06   | 10.10 |     |
| C            | 17215.33 | 1   | 103.13 | 10.10 | *   |
| $A \times C$ | 202.31   | 1   | 1.21   | 10.10 |     |
| $B \times C$ | 3141.47  | 1   | 18.82  | 10.10 | *   |
| 空白           | 121.29   | 1   | 0.73   | 10.10 |     |
| 误差           | 500.79   | 3   |        |       |     |

由于甘草和大枣的交互作用 ( $B \times C$ ) 具有显著性,将 B、C 两种因素进行组合,计算出 B、C 四种组合的平均值,结果见表 4。从表 4 可看出,  $B_1C_1$  的平均值最大,提示甘草和大枣之间的交互作用可明显提高黄芩苷的含量。

### 2.3 不同配伍条件对黄芩苷含量的影响

2.3.1 正交设计<sup>[6]</sup>以白芍 (A)、甘草 (B) 和大枣 (C) 作为三个因素,选用药和不用药为两个水平,并考虑两两交互作用,因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

Tab 1 Factors and levels

| 水 平 | 因 素  |      |      |
|-----|------|------|------|
|     | A 白芍 | B 甘草 | C 大枣 |
| 1   | 用药   | 用药   | 用药   |
| 2   | 不用药  | 不用药  | 不用药  |

2.3.2 样品制备和测定 采用  $L_8(2^7)$  正交试验表,见表 2。根据表 2 的安排,制备各配伍供试品溶液,照上述色谱条件测定,计算各样品中黄芩苷含量,结果见表 2。

表 4 甘草和大枣的交互作用

Tab 4 Interaction between Radix et Rhizome Glycyrrhizae and Fructus Jujubae

| 因素    | $C_1$                            | $C_2$                            |
|-------|----------------------------------|----------------------------------|
| $B_1$ | $(445.01 + 401.78) / 2 = 423.40$ | $(314.87 + 267.01) / 2 = 290.99$ |
| $B_2$ | $(372.16 + 363.33) / 2 = 367.75$ | $(336.86 + 292.34) / 2 = 314.60$ |

### 3 讨论

3.1 文献报道<sup>[1-2]</sup>黄芩汤全方对大鼠离体回肠的收缩频率,收缩幅度及紧张性有非常明显的抑制作用,如果减去君药黄芩,其作用呈现相反的兴奋作用,与各单味药比较,全方作用最佳,证明君药在复方中起主要作用。君臣药物配伍 (黄芩配伍芍药) 有增强药理作用的相须关系。黄芩汤的退热作用与方中黄芩和甘草的作用有关。

3.2 中医治病遵循整体观,讲究配伍用药。药物配伍后,化学成分间可能发生各种反应,使各有效成分含量发生改变。从本实验结果看,复方四味药合煎时黄芩苷含量最大,白芍、大枣对提高黄芩苷含量有显著影响,甘草和大枣的交互作用也可明显提高黄芩苷的含量,表明本方中其余三味药均有利于黄芩苷的溶出。由于黄芩苷为处方中含量最高的有效成分之一,复方配伍后黄芩苷含量的增加,对其药效作用的提高起到重要作用。结合文献报道依据,表明本处方配伍具有科学性和合理性。如能对黄芩汤不同配伍组合进行药效方面的比

较研究,将有助于更全面地阐述其复方配伍的作用机制。

## REFERENCES

- [ 1 ] HUANG L, YE W H, CAI B W, *et al*. The pilot pharmacological study on Huangqin Decoction and it's compositive constituent [ J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1990, 15( 2): 51-53.
- [ 2 ] HUANG L, LIU J F, LI D F, *et al*. The study on compatibility of Huangqin Decoction[ J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1991, 16( 3): 177-181.
- [ 3 ] ZHANG X P, TIAN H, CHENG Q H. The current situation in pharmacological study on baicalin[ J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2003, 19( 11): 212-215.
- [ 4 ] Ch. P( 2005) Vol I (中国药典 2005 版,一部) [ S]. 2005: 211 - 212.
- [ 5 ] SUN L X, ZHAO T. Study on quality standards of Xiao' erqingfei oral liquid[ J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2002, 19 ( 4): 323-324.
- [ 6 ] WU Z H, XI L M, DAI K J, *et al*. Influence of compatibility on content of berberine in Gegen Qinlian Decoction[ J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2004, 35( 1): 33-35.

收稿日期: 2007-09-29