

HPLC 法同时测定五粒回春丸中 8 种成分

谭雄斯
(肇庆医学高等专科学校, 广东 肇庆 526020)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定五粒回春丸(防风、牛蒡子、连翘等)中牛蒡子苷、牛蒡子苷元、连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含有量。**方法** 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.4% 冰醋酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 25 ℃。**结果** 8 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 96.55%~99.50%, RSD 0.54%~1.72%。**结论** 该方法准确可靠, 重复性好, 可用于五粒回春丸的质量控制。

关键词: 五粒回春丸; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)01-0110-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.021

Simultaneous determination of eight constituents in Wuli Huichun Pills by HPLC

TAN Xiong-si
(Zhaoqing Medical College, Zhaoqing 526020, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of arctiin, arctigenin, forsythoside A, narirutin, naringin, rhoifolin, prim-*O*-glucosylcimifugin and 5-*O*-methylvisammioside in Wuli Huichun Pills (*Saposhnikoviae Radix*, *Arctii Fructus*, *Forsythiae Fructus*, etc.). **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 25 ℃ thermostatic Agilent TC-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.4% glacial acetic acid flowing at 0.9 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Eight constituents showed good linear relationships within their own ranges($r>0.999\ 0$), whose average recoveries were 96.55%–99.50% with the RSDs of 0.54%–1.72%. **CONCLUSION** This accurate, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Wuli Huichun Pills.

KEY WORDS: Wuli Huichun Pills; chemical constituents; HPLC

五粒回春丸宣肺透表、清热解毒, 临床上主要用于小儿瘟毒引起的头痛高烧、流涕多泪、咳嗽气促、烦躁口渴、麻疹初期、疹出不透等症状的治疗, 疗效显著^[1]。该处方源于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第 20 册^[2], 由西河柳、金银花、连翘、牛蒡子(炒)、蝉蜕、薄荷、桑叶、防风、麻黄、羌活、僵蚕(麸炒)、胆南星(酒炙)、化橘红、苦杏仁(去皮炒)、川贝母、茯苓、赤芍、淡竹叶、甘草、羚羊角粉、人工麝香、牛黄、冰片 23 味中药材加工而成, 方中防风、麻黄、羌活辛温解表、发汗退热; 牛蒡子、苦杏仁、桑叶宣

肺利气止咳; 化橘红、茯苓和胃化痰止呕; 连翘、金银花、赤芍、甘草清热凉血解毒; 西河柳、蝉蜕、薄荷辛凉解表消热透疹; 川贝母润肺化痰; 胆南星、僵蚕清热化痰定抽; 淡竹叶清心利水; 牛黄清心凉血解毒; 羚羊角清肝肺透疹熄风、止抽搐; 麝香、冰片镇心安神通窍, 但质量标准中仅对该制剂的性状和盐酸麻黄碱的薄层鉴别作了规定^[2], 尚无成分定量研究。因此, 本实验采用 HPLC 法同时测定五粒回春丸中牛蒡子苷、牛蒡子苷元、连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含有量, 为完善其质

量控制方法提供数据支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪，配置自动进样器、柱恒温箱、可变波长检测器（美国安捷伦公司）；电子天平（十万分之一，瑞士 Mettler-Toledo 公司）。

1.2 试药 五粒回春丸来源于北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂（每 100 丸重 12 g，批号 15040853、15090735、16041618）。牛蒡子苷元（7770-78-7，含有量 97.0%）、柚皮芸香苷（14259-46-2，含有量 98.0%）对照品来源于上海纯优生物科技有限公司；牛蒡子苷（110819-201611，含有量 95.9%）、连翘酯苷 A（111810-201606，含有量 93.4%）、柚皮苷（110722-201613，含有量 94.3%）、野漆树苷（111919-201503，含有量 92.3%）、升麻素苷（111522-201511，含有量 94.8%）、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷（111523-201509，含有量 95.8%）对照品来源于中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取牛蒡子苷、牛蒡子苷元、连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品适量，70% 甲醇制成每 1 mL 分别含 1.772、0.408、0.404、0.412、1.958、0.416、1.604、0.998 mg 单一成分的贮备液，吸取 5.0、2.5、5.0、2.5、5.0、5.0、5.0、5.0 mL，置于同一 100 mL 量瓶中，70% 甲醇稀释，制成 88.6、10.2、20.2、10.3、97.9、20.8、80.2、49.9 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液。

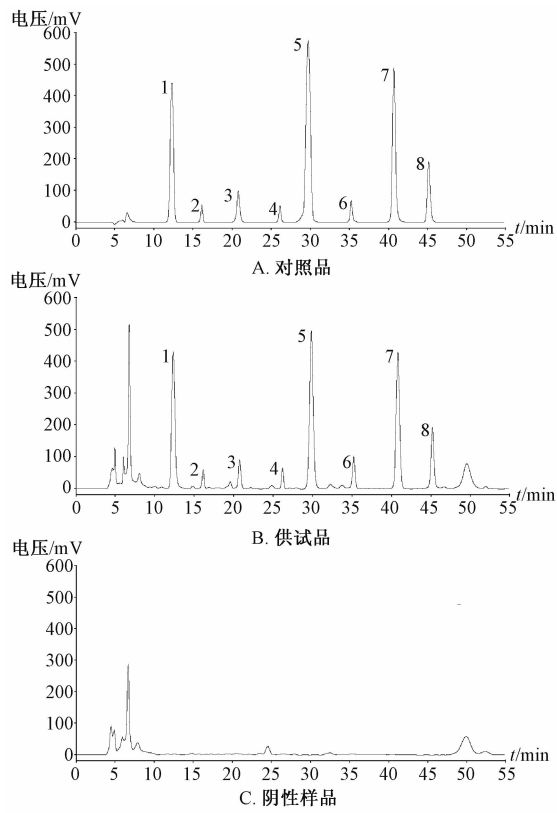
2.1.2 供试品溶液 取五粒回春丸，研细，精密称取约 3.0 g，精密加入 70% 甲醇 50 mL，称定质量，超声提取 60 min，取出，放冷，70% 甲醇补足减失的质量，过滤，取续滤液，即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按五粒回春丸质量标准^[2]项下的处方和生产工艺，制备不含牛蒡子（炒）、连翘、化橘红、防风的阴性样品，按“2.1.2”项下方法制备阴性样品溶液。

2.2 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm ）；流动相甲醇（A）-0.4% 冰醋酸（B），梯度洗脱（0~9 min，15.0% A；9~17 min，15.0% → 26.0% A；17~24 min，26.0% → 32.0% A；

24~38 min，32.0% → 45.0% A；38~47 min，45.0% → 60.0% A；47~55 min，60.0% → 15.0% A）；检测波长分别为 280 nm（0~17 min，牛蒡子苷和牛蒡子苷元）^[3-4]、330 nm（17~24 min，连翘酯苷 A）^[5]、283 nm（24~38 min，柚皮芸香苷、柚皮苷和野漆树苷）^[6-7]、254 nm（38~55 min，升麻素苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷）^[8]；体积流量 0.9 mL/min；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 系统适用性与专属性试验 精密吸取“2.1”项下 3 种溶液适量，在“2.2”项条件下测定，结果见图 1。由图可知，在与各对照品色谱图相应的保留时间处，供试品溶液有所测各成分的吸收峰，而阴性样品未显示，表明阴性无干扰，同时各色谱峰之间的分离度均大于 1.5。



1. 牛蒡子苷 2. 牛蒡子苷元 3. 连翘酯苷 A 4. 柚皮芸香苷 5. 柚皮苷 6. 野漆树苷 7. 升麻素苷 8. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷
1. arctiin 2. arctigenin 3. forsythoside A 4. narirutin 5. naringin 6. rhoifolin 7. prim-O-glucosylcimifugin 8. 5-*O*-methylvisammioside

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL，70% 甲醇制成 6 个质量浓度梯度的对照品溶液，在“2.2”项色谱条

件下测定。以质量浓度为横坐标（ X ），峰面积为纵坐标（ Y ）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	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r
牛蒡子苷	$Y=1.6154\times10^6X+377.1$	8.860~177.2	0.9996
牛蒡子苷元	$Y=8.1392\times10^5X+408.9$	2.040~40.80	0.9999
连翘酯苷 A	$Y=1.0867\times10^6X+352.8$	2.020~40.40	0.9991
柚皮芸香苷	$Y=9.2594\times10^5X-169.4$	2.060~41.20	0.9997
柚皮苷	$Y=1.7216\times10^6X-225.0$	9.790~195.8	0.9998
野漆树苷	$Y=1.1068\times10^6X+347.9$	2.080~41.60	0.9999
升麻素苷	$Y=1.8589\times10^6X+190.6$	8.020~160.4	0.9994
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$Y=1.2051\times10^6X-445.2$	4.990~99.80	0.9993

2.5 精密度试验 取“2.1.1”项下对照品溶液，连续进样 6 次，在“2.2”项色谱条件下测定，测得牛蒡子苷、牛蒡子苷元、连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷峰面积 RSD 分别为 0.72%、1.25%、0.51%、1.29%、0.75%、1.12%、0.87%、1.03%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取样品（批号 15040853）6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定，测得牛蒡子苷、牛蒡子苷元、连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷含有量 RSD 分别为 1.02%、0.81%、1.66%、1.23%、0.90%、1.65%、0.98%、1.73%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取供试品（批号 15040853）溶液，于室温下放置 0、2、4、6、8、12、16 h 后在“2.2”项色谱条件下测定，测得牛蒡子苷、牛蒡子苷元、连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷峰面积 RSD 分别为 0.76%、1.17%、0.93%、1.05%、

0.78%、1.14%、0.88%、1.01%，表明溶液在室温下 16 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取牛蒡子苷、牛蒡子苷元、连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷对照品适量，70% 甲醇制成每 1 mL 分别含 0.451 1、0.280 3、0.534 4、0.223 8、0.579 8、0.442 1、0.455 4、0.572 4 mg 单一成分的对照品溶液。精密称取样品（批号 15040853）6 份，研细，每份 1.5 g，置于不同的具塞锥形瓶中，精密加入上述对照品溶液适量，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定。结果，牛蒡子苷、牛蒡子苷元、连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷平均加样回收率（RSD）分别为 98.77%（0.92%）、97.32%（1.02%）、98.01%（1.31%）、99.08%（1.72%）、99.50%（1.49%）、96.55%（0.54%）、97.90%（0.79%）、98.39%（1.47%）。

2.9 样品含有量测定 取 3 批样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定，计算含有量，结果见表 2。

表 2 各成分含有量测定结果（mg/g， $n=3$ ）

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

批号	牛蒡子苷	牛蒡子苷元	连翘酯苷 A	柚皮芸香苷	柚皮苷	野漆树苷	升麻素苷	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷
15040853	1.503	0.187	0.356	0.149	1.932	0.295	1.519	0.763
15090735	1.576	0.177	0.339	0.160	2.025	0.268	1.489	0.841
16041618	1.385	0.202	0.372	0.137	1.746	0.336	1.580	0.702

3 讨论

3.1 所测成分选择 防风、牛蒡子、化橘红和连翘为五粒回春丸中的主要药材，其中防风具有祛风解表、胜湿止痛、止痉的功效，临床上主要用于感冒头痛、风疹瘙痒、风湿痹痛等症状的治疗^[9-10]，主要含有色原酮类、香豆素类成分，所测成分升麻

素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷具有解热、镇痛、抗炎及抗血小板凝集作用^[11-12]；牛蒡子疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽，临床上主要用于风热感冒、咳嗽痰多、麻疹、风疹、咽喉肿痛、痈肿疮毒等症状的治疗，其主要化学成分为木脂素类化合物（牛蒡子苷、牛蒡子苷元等），口服时牛蒡子苷在

肠内菌的作用下转化为牛蒡子苷元，其药理活性主要有抗菌、抗肿瘤、免疫活性等^[13]；化橘红具有燥湿化痰的功效，可用于咳嗽、痰多的治疗，主要含有柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、芹菜素等黄酮类成分，其中柚皮苷、柚皮芸香苷等具有明显的镇咳化痰作用^[14]；连翘具有清热解毒、消肿散结、疏散风热等功效，临床上主要用于温病初起、温热入营、高热烦渴、风热感冒等症状的治疗，其主要药效成分为连翘酯苷 A、连翘苷等，具有解热、抗菌、抗感染、抗 DNA 损伤、防护耳毒性等广泛的药理作用^[15]。

3.2 流动相选择 首先考察了乙腈-水^[16]、甲醇-水^[17]流动相体系，发现后者优于前者，但由于所测成分较多，该体系下连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷分离效果不佳。在此基础上，又对甲醇-0.05% 磷酸、甲醇-0.4% 冰醋酸^[18]、甲醇-0.1% 乙酸^[7]流动相体系进行了考察，发现甲醇-0.4% 冰醋酸按照“2.2”项下条件进行洗脱时，所测各色谱峰之间，以及与其他杂质峰均能达到有效分离，基线平稳。因此，最终采用甲醇-0.4% 冰醋酸作为流动相进行梯度洗脱。

4 结论

本实验建立了 HPLC 法同时测定五粒回春丸中牛蒡子苷、牛蒡子苷元、连翘酯苷 A、柚皮芸香苷、柚皮苷、野漆树苷、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含有量，该方法精密准确，重复性好，对其研究及质量控制具有重要意义。

参考文献：

[1] 王金燕. 五粒回春丸加减治疗水痘的方法与疗效[J]. 中国保健医学杂志, 2015, 17(3): 233.

[2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂): 第 20 册[S]. 1998: 42.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 72, 74-75,

149-150, 170-171.

[4] 杨亮蕊, 胡建勇, 纪伶俐, 等. 高效液相色谱法测定牛蒡子中牛蒡苷和牛蒡苷元的含量[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(1): 53-54.

[5] 王进明, 范圣此, 李安平, 等. 连翘不同部位中连翘苷和连翘酯苷 A 的含量分析及其入药探讨[J]. 中国现代中药, 2013, 15(7): 556-559.

[6] 李吉华. 化橘红中柚皮苷, 柚皮芸香苷, 野漆树苷和柚皮素的 HPLC 测定[J]. 山东中医杂志, 2012, 31(4): 277-278.

[7] 邓少东, 王莲婧, 林 励, 等. UPLC 法测定酸水解前后化橘红中 4 种黄酮类成分的含量[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 924-928.

[8] 李悦悦, 王 慧, 陈 俊, 等. HPLC 法测定防风中升麻苷, 升麻素, 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷和亥茅酚苷的含量[J]. 药学实践杂志, 2010, 28(6): 445-447, 474.

[9] 张宝娣, 万山红. 防风的化学成分与药理研究近况[J]. 中医药信息, 2003, 20(4): 23.

[10] 高鸿霞, 邵世和, 王国庆. 中药防风的研究进展[J]. 井冈山医学学报, 2004, 11(4): 12.

[11] 薛宝云, 李 文, 李 丽, 等. 防风色原酮甙类成分的药理活性研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5): 297-299.

[12] 李 文, 李 丽, 刘元艳, 等. 防风有效部位的药理作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6): 29-31.

[13] 鞠玫君, 窦德强, 康廷国. 牛蒡子提取物中牛蒡苷和牛蒡苷元的含量测定研究[J]. 中国现代中药, 2008, 10(2): 14-16.

[14] 李沛波, 王永刚, 吴 忠, 等. 以化橘红为基源的一类新药柚皮苷的临床前研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2015, 54(6): 1-5.

[15] 吴国友. 连翘药理作用研究进展[J]. 中医学报, 2013, 28(10): 1508-1509.

[16] 姜艳艳, 刘 斌, 石任兵, 等. 高效液相色谱法测定防风色原酮部位中 4 种成分含量[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(2): 128-131.

[17] 杨棣华, 黄 兰, 郑显辉. 不同产地连翘叶中连翘苷和连翘酯苷 A 的含量测定[J]. 临床医学工程, 2013, 20(3): 288-289.

[18] 孙艳涛, 赵兰英, 李婷婷, 等. 高效液相色谱切换波长法同时测定牛蒡子中活性成分的含量[J]. 医药导报, 2014, 33(1): 100-102.