

HPLC-ELSD 法同时测定十味鹅黄颗粒中 3 种成分

朱智德^{1,2}, 谭红声³, 罗宇东^{1,2}, 覃洁萍^{3*}, 陆敏灵³
(1. 广西中医药大学制药厂, 广西南宁 530023; 2. 广西高校壮医药基础与应用研究重点实验室, 广西南宁 530001; 3. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530001)

摘要: **目的** 建立 HPLC-ELSD 法同时测定十味鹅黄颗粒(黄芪、辛夷、柴胡等)中 3 种成分的含有量。**方法** 该药物 10% 氨水-水饱和正丁醇-甲醇提取液的分析采用 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃。**结果** 黄芪甲苷、柴胡皂苷 A、木兰脂素分别在 0.081 6~0.816 mg/mL ($r=0.995\ 0$)、0.019 1~0.191 mg/mL ($r=0.993\ 6$)、0.051 8~0.518 mg/mL ($r=0.994\ 3$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 101.5%、100.8%、101.7%, RSD 分别为 0.48%、0.57%、0.34%。**结论** 该法简便可靠, 重复性好, 可用于十味鹅黄颗粒的质量控制。

关键词: 十味鹅黄颗粒; 黄芪甲苷; 柴胡皂苷 A; 木兰脂素; HPLC-ELSD

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)10-2206-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.10.018

Simultaneous determination of three constituents in Shiwei Ehuang Granules by HPLC-ELSD

ZHU Zhi-de^{1,2}, TAN Hong-sheng³, LUO Yu-dong^{1,2}, QIN Jie-ping^{3*}, LU Min-ling³
(1. Pharmaceutical Factory, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Key Laboratory for Zhuang Medicine Prescriptions Basis and Application Research in Guangxi Colleges and Universities, Nanning 530001, China; 3. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC-ELSD method for the simultaneous content determination of three constituents in Shiwei Ehuang Granules (*Astragali Radix*, *Magnoliae Flos*, *Bupleuri Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of 10% aqueous ammonia- (water-saturated *n*-butanol) -methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Astragaloside A, saikosaponin A and magnolin showed good linear relationships within the ranges of 0.081 6–0.816 mg/mL ($r=0.995\ 0$), 0.019 1–0.191 mg/mL ($r=0.993\ 6$) and 0.051 8–0.518 mg/mL ($r=0.994\ 3$), whose average recoveries were 101.5%, 100.8% and 101.7% with the RSDs of 0.48%, 0.57% and 0.34%, respectively. **CONCLUSION** This simple, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Shiwei Ehuang Granules.

KEY WORDS: Shiwei Ehuang Granules; astragaloside A; saikosaponin A; magnolin; HPLC-ELSD

过敏性鼻炎也称为变态反应性鼻炎, 为机体对某些过敏原敏感性增高, 从而呈现以鼻腔黏膜病变为主的一种鼻炎病症, 以突发和反复发作性的鼻塞、鼻痒、打喷嚏、流涕为主要症状^[1]。该疾病

收稿日期: 2017-12-18
基金项目: 南宁市科学研究与技术开发研发计划项目(南科发[2015]17); 广西南宁市青秀区壮瑶成药创新技术平台建设及产业化项目(2015S15); 广西高校壮医药基础与应用研究重点实验室开放课题(2016)
作者简介: 朱智德(1974—), 男, 博士生, 从事壮瑶新药研究与开发。Tel: 15977775151, E-mail: gxzhuzhide@163.com
*通信作者: 覃洁萍(1962—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事中药分析与质量控制研究。Tel: 15177175610, E-mail: 594724071@qq.com

在中医属“鼻鼽”范畴，认为其发病内因大多为脏腑功能失调，感受风寒、异气之邪侵袭鼻窍而成，有不同的学派学说，如千祖望的“肺经伏热论”、田道法的“禀赋不足，肾阳亏虚论”、熊大经的“肺虚感寒，卫外不固论”^[2]。

壮瑶医药作为我国传统中医药的重要组成部分，在治疗过敏性鼻炎方面具有源远流长的历史传统，而且功效明确显著，其中十味鹅黄颗粒是由壮医特色方剂“十味鹅黄方”创新研制而成，具有长期临床实践基础，是专治过敏性（变应性）鼻炎的一种复方壮药方剂。方中黄芪为君药，具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌的功效，对机体免疫系统、心脑血管系统具有明显疗效，同时具有抗病毒、抗肿瘤等作用^[3]；辛夷和柴胡为臣药，其中前者有散风寒、通鼻窍之功，临床上普遍用于治疗各种鼻炎^[4-6]，而后者有和解表里、疏肝、升阳之功，所含柴胡皂苷具有抗内毒素、免疫调节、抗过敏、抗细胞黏附等药理作用^[7-8]。

本实验选择黄芪甲苷、柴胡皂苷 A、木兰脂素作为十味鹅黄颗粒检测成分^[9-10]，其中黄芪甲苷可通过体内外增加 T、B 淋巴细胞增殖和抗体生成，以及抑制 NF- κ B 通路等机制，发挥免疫调节、抗炎等作用^[11]，因此常作为黄芪药材、饮片、制剂的指标性成分^[12-16]；木兰脂素具有较强的抗过敏作用，对炎症早期也有明显的抑制作用^[17]，因此常作为辛夷药材、饮片、制剂的指标性成分^[18-21]；柴胡皂苷 A 具有解热、抗炎、免疫调节等作用^[22-23]，因此常作为柴胡药材、饮片、制剂的指标性成分^[24-27]。同时，建立 HPLC-ELSD 法同时测定该制剂中以上 3 种成分的含有量，以期为其质量控制提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；Alltech 3300-ELSD 型蒸发光散射检测器（美国 Alltech 公司）；SQP 型电子天平〔十万分之一，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司〕；KQ5200 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；L600、TGL-16G 型离心机（上海安亭科学仪器厂）。

1.2 试药 十味鹅黄颗粒（批号 20170301、20170302、20170303、20170304、20170801、20170802、20170803、20170901、20170902、20170903）由广西中医药大学制药厂提供。黄芪甲苷对照品（批号 110781-200613，中国食品药品

检定研究院）；木兰脂素对照品（批号 R02J7F15582，上海源叶生物科技有限公司）；柴胡皂苷 A 对照品（批号 E3170010，上海安谱实验科技股份有限公司）。对照药材鹅不食草、白术、白芷、防风、广藿香、丹皮、乌梅经广西中医药大学制药厂质量保证部专家检验均为正品。乙腈为色谱纯（美国 Fisher 公司）；氨水、正丁醇、甲醇为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取黄芪甲苷、柴胡皂苷 A、木兰脂素对照品适量，甲醇分别稀释至 2.20、2.12、3.24 mg/mL，吸取适量，甲醇定容至同一量瓶中，制得质量浓度分别为 0.816、0.191、0.518 mg/mL 的溶液，即得。

2.2 供试品溶液制备 精密称取颗粒 2.5 g，精密加入 25 mL 10% 氨水，回流提取 30 min 后，6 000 r/min 离心 10 min，取上清液，回流提取 2 次。残渣加入 5 mL 10% 氨水洗涤 2 次，离心，合并上清液，水饱和正丁醇萃取 2 次，第 1 次加 100 mL，第 2 次加 50 mL，合并正丁醇液，水浴锅上蒸干，残渣用甲醇溶解，移至 5 mL 量瓶，定容，摇匀，13 000 r/min 离心 10 min，取上清液，即得。

2.3 阴性供试品溶液制备 原方分别去除黄芪、辛夷、柴胡，按颗粒制备工艺进行煎煮、浓缩得浸膏，按“2.2”项下方法制备，即得。

2.4 色谱条件 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μ m）；流动相乙腈-水，梯度洗脱（程序见表 1）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样量 10 μ L。蒸发光散射检测器，漂移管温度 80 $^{\circ}$ C；气体体积流量 2.50 L/min；增益值 4.0。

表 1 梯度洗脱程序
Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	水/%	乙腈/%
0	90	10
5	80	20
10	75	25
15	70	30
20	68	32
25	65	35
35	50	50
45	40	60

2.5 系统适应性试验 取对照品、供试品、阴性供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下进样测定，

结果见图 1。由图可知, 对照品、供试品在相同保留时间处都有相应色谱峰, 而阴性供试品中无相应色谱峰, 表明其他成分对三者测定无干扰, 同时理论塔板数按柴胡皂苷 A 计算, 应不少于 80 000。

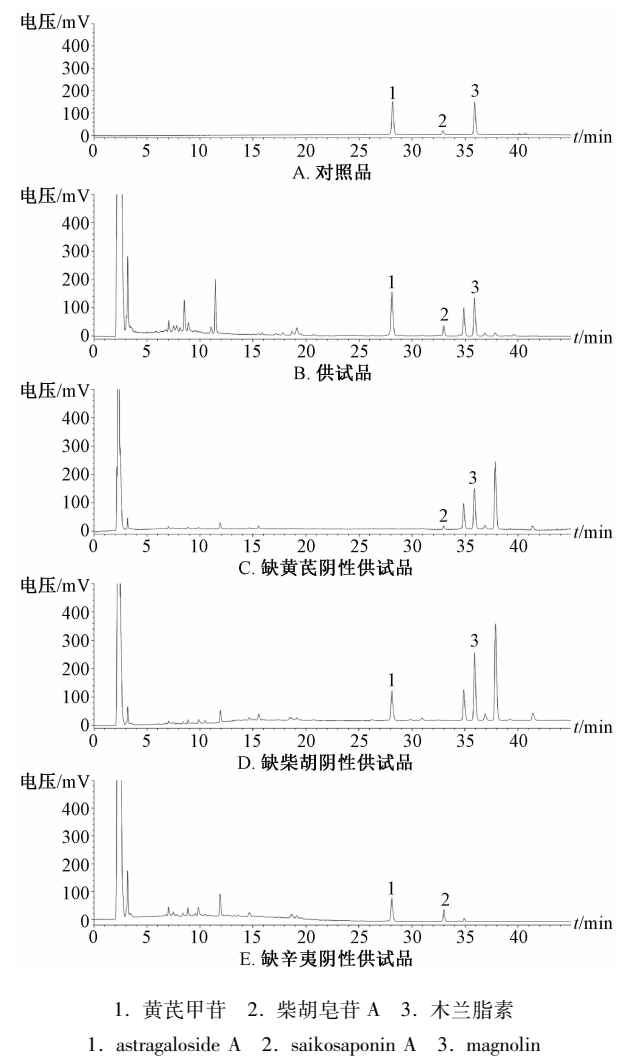


图 1 各成分 HPLC-ELSD 色谱图
Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms of various constituents

2.6 线性关系考察 取“2.1”项下对照品溶液, 甲醇稀释至分别含黄芪甲苷 0.081 6、0.245、0.327、0.449、0.612、0.816 mg/mL, 柴胡皂苷 A 0.019 1、0.057 2、0.076 3、0.105、0.143、0.191 mg/mL, 木兰脂素 0.051 8、0.156、0.207、0.285、0.389、0.518 mg/mL 的溶液, 在“2.4”项色谱条件下进样 10 μ L 测定。以质量浓度自然对数为横坐标(X), 峰面积自然对数为纵坐标 (Y) 进行回归, 得到方程分别为黄芪甲苷 $Y=1.789\ 3X+4.205\ 4(r=0.995\ 0)$ 、柴胡皂苷 A $Y=1.437\ 0X+4.017\ 2\ (r=0.993\ 6)$ 、木兰脂素 $Y=1.737\ 6X+4.515\ 8\ (r=0.994\ 3)$, 分别在 0.081 6 ~ 0.816、

0.019 1 ~0.191、0.051 8 ~0.518 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.7 精密度试验 取分别含黄芪甲苷、柴胡皂苷 A、木兰脂素 0.449、0.105、0.285 mg/mL 的对照品溶液, 在“2.4”项色谱条件下进样 10 μ L 测定 6 次, 测得黄芪甲苷、柴胡皂苷 A、木兰脂素峰面积自然对数 RSD 分别为 0.36%、0.47%、0.33%, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取供试品溶液 (批号 20170304), 在“2.4”项色谱条件下于 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μ L 测定, 测得黄芪甲苷、柴胡皂苷 A、木兰脂素峰面积自然对数 RSD 分别为 0.89%、1.2%、1.3%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 精密称取颗粒 (批号 20170304) 6 份, 每份 2.5 g, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.4”项色谱条件下进样 10 μ L 测定, 测得黄芪甲苷、柴胡皂苷 A、木兰脂素含有量 RSD 分别为 0.83%、0.30%、0.37%, 表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取含有量已知的颗粒 (20170304) 6 份, 每份 1.25 g, 分别精密加入 3 种对照品 0.663、0.276、0.389 mg, 按“2.2”项下制备供试品溶液, 在“2.4”项色谱条件下进样 10 μ L 测定, 计算回收率, 结果见表 2。

2.11 样品含有量测定 精密称取 10 批颗粒各 2.5 g, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.4”项色谱条件下进样 10 μ L 测定, 计算含有量, 平行 3 次, 结果见表 3。

表 3 各成分含有量测定结果 ($n=3$)
Tab. 3 Results of content determination of various constituents ($n=3$)

批号	黄芪甲苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	柴胡皂苷 A/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	木兰脂素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
20170301	0.569	0.193	0.330
20170302	0.577	0.174	0.328
20170303	0.587	0.182	0.332
20170304	0.605	0.184	0.336
20170801	0.344	0.118	0.328
20170802	0.319	0.112	0.329
20170803	0.332	0.119	0.330
20170901	0.332	0.124	0.337
20170902	0.315	0.106	0.334
20170903	0.340	0.116	0.333
平均值	0.432	0.143	0.332

表 2 各成分加样回收率试验结果 (n=6)
Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/% (RSD/%)
黄芪甲苷	1.250 6	0.680 0	0.663	1.355	101.8	101.5 (0.48)
	1.250 3	0.679 8	0.663	1.355	101.8	
	1.250 0	0.679 6	0.663	1.350	101.1	
	1.250 8	0.680 1	0.663	1.348	100.7	
	1.250 5	0.679 9	0.663	1.356	102.0	
	1.250 4	0.679 8	0.663	1.354	101.7	
柴胡皂苷 A	1.250 6	0.270 9	0.276	0.548 5	100.6	100.8 (0.57)
	1.250 3	0.270 8	0.276	0.549 6	101.0	
	1.250 0	0.270 8	0.276	0.551 1	101.6	
	1.250 8	0.270 9	0.276	0.547 4	100.2	
	1.250 5	0.270 9	0.276	0.547 4	100.2	
	1.250 4	0.270 8	0.276	0.550 3	101.3	
木兰脂素	1.250 6	0.376 7	0.389	0.771 7	101.8	101.7 (0.34)
	1.250 3	0.376 6	0.389	0.772 3	102.0	
	1.250 0	0.376 5	0.389	0.770 4	101.5	
	1.250 8	0.376 7	0.389	0.773 1	102.2	
	1.250 5	0.376 7	0.389	0.769 9	101.4	
	1.250 4	0.376 6	0.389	0.769 7	101.3	

3 讨论

本实验以甲醇、水、10% 氨水为提取溶剂，采用超声、回流、冷浸提取方法，并对提取次数、提取时间、萃取次数、溶剂用量进行考察，发现以 10% 氨水为提取溶剂，回流提取 2 次，每次加 25 mL 10% 氨水，回流提取 30 min，水饱和正丁醇萃取 2 次，第一次加 100 mL，第二次加 50 mL 时，所得供试液中黄芪甲苷、柴胡皂苷 A、木兰脂素含有量最高。然后，以 甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸为流动相，对柱温、蒸发光散射检测器参数（温度、气体流量、增益值）等条件进行考察，发现以乙腈-水为流动相，柱温 30 ℃，漂移管温度 80 ℃，气体体积流量 2.5 L/min，增益值 4.0 时，所得色谱图较理想。

由于蒸发光散射检测器对环境要求较高，水分会使基线产生波动，甚至会影响检测结果，故房间应保持较低的湿度，同时勤换空气压缩机硅胶，以排除外部条件对蒸发光检测的影响。在对蒸发光参数进行考察时，应注意在保证样品能完全雾化的前提下，尽量选择较低的漂移管温度，这样既可保护仪器，同时还可得到较高的测量灵敏度，并防止在较高漂移管温度下造成低沸点组分损失。在梯度洗脱过程中，水相比比例对色谱图的影响较大，比例较高时通常需要较高的雾化温度，这样可能会使基线波动，并造成低沸点组分损失，故在得到较好分离度的前提下应尽量减少水相比比例。

4 结论

本实验建立 HPLC-ELSD 法同时测定十味鹅黄颗粒中黄芪甲苷、柴胡皂苷 A、木兰脂素的含有量，该方法简便快速，重复性好，结果准确，可用于该制剂生产过程中的质量控制。

参考文献：

[1] 韩德民. 变应性鼻炎[M]. 北京：人民卫生出版社，2007：450.

[2] 范愈燕，支楠，张罗. 中草药治疗过敏性鼻炎概况[J]. 中医临床研究，2013，5(1)：112-115.

[3] 刘洋，杜婧，沈颜红. 10 种药用黄芪属植物化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(18)：222-234.

[4] 王伟民. 辛夷鼻炎胶囊治疗鼻炎 100 例临床观察[J]. 河南科技大学学报（医学版），2011，29(3)：211-212.

[5] 汪月红，徐盈，程志娟，等. 辛夷散治疗儿童鼻窦炎 80 例临床观察[J]. 浙江中医杂志，2008，43(1)：42.

[6] 侯周武. 辛夷药烟熏鼻配合穴位按摩治疗鼻炎初探[J]. 时珍国医国药，2008，19(11)：2803.

[7] 牛向荣. 柴胡药理作用研究概述[J]. 中国药师，2009，12(9)：1310-1312.

[8] 刘萍，杨芳寅，周素文，等. 中药柴胡抗细菌内毒素的实验研究[J]. 中成药，2002，24(8)：627-628.

[9] 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.

[10] 张铁军，许浚，韩彦琪，等. 中药质量标志物（Q-marker）研究：延胡索质量评价及质量标准研究[J]. 中草药，2016，47(9)：1458-1467.

[11]曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(5): 954-960.

[12]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: 302-303.

[13]刘和平, 彭招华, 张润容, 等. 黄芪药材中黄芪甲苷 UPLC-ELSD 含量测定方法的优化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 92-94.

[14]涂波, 汪志勇. 当归补血汤颗粒中黄芪甲苷和黄芪多糖的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 115-117.

[15]陈剑平, 郑平, 李中桂, 等. HPLC-MS 法同时测定健脾益肾丸中 8 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 962-967.

[16]支旭然, 刘洪涛, 吴茵, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定肾康注射液液中 7 个有效成分[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(1): 37-42.

[17]俞瑜, 袁浩宇, 曾健鹏. 木兰脂素在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国药房, 2015, 26(25): 3522-3524.

[18]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: 182.

[19]曹纬国, 陶燕铎, 颜学伟, 等. 辛夷中辛夷脂素与木兰脂素高效液相色谱含量测定方法的建立与优化[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1598-1599.

[20]刘灵改, 支旭然, 郭进, 等. HPLC-MS 法同时测定防芷鼻咽喉颗粒中 6 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 830-835.

[21]倪美华, 狄留庆, 孙淑萍. HPLC 法测定穴贴定喘膏中木兰脂素的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(6): 433-435.

[22]薛燕, 白金叶. 柴胡解热成分的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(1): 11-12.

[23]梁云, 崔若兰. 柴胡皂苷及其同系物抗炎和免疫功能的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(7): 446-448.

[24]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: 280-281.

[25]孟杰, 陈兴福, 杨文钰, 等. 柴胡主根与侧根中柴胡皂苷 a 及皂苷 d 含量测定[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1218-1222.

[26]马泽刚, 黄春花, 钟辉云. HPLC 法对不同产地柴胡根中柴胡皂苷 a 及柴胡皂苷 d 的含量测定[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(13): 2519-2520.

[27]李军, 姜华, 张延萍, 等. 柴胡汤剂中酰化柴胡皂苷 a、b2 的含量测定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(1): 74-80.