

[质 量]

## HPLC 法同时测定加味四妙颗粒中 6 种成分

施崇精<sup>1</sup>, 袁强华<sup>2</sup>, 谢凡<sup>2</sup>, 刘莉<sup>2</sup>, 宋英<sup>2\*</sup>

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 2. 成都中医药大学附属医院, 四川 成都 610075)

**摘要:** **目的** 建立 HPLC 法同时测定加味四妙颗粒(大血藤、黄柏、甘草等)中红景天苷、黄柏碱、甘草酸铵、延胡索乙素、盐酸小檗碱、甘草苷的含有量。**方法** 该药物 80% 甲醇提取液的分析采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 220、280、250 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 98.98%~100.11%, RSD 0.81%~1.52%。**结论** 该方法简便准确、专属性强, 可用于加味四妙颗粒的质量控制。

**关键词:** 加味四妙颗粒; 红景天苷; 黄柏碱; 甘草酸铵; 延胡索乙素; 盐酸小檗碱; 甘草苷; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)02-0266-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.005

## Simultaneous determination of six constituents in Supplemented Simiao Granules by HPLC

SHI Chong-jing<sup>1</sup>, YUAN Qiang-hua<sup>2</sup>, XIE Fan<sup>2</sup>, LIU Li<sup>2</sup>, SONG Ying<sup>2\*</sup>

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. The Hospital Affiliated to Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of salidroside, phellodendrine, ammonium glycyrrhizinate, tetrahydropalmatine, berberine hydrochloride and liquiritin in Supplemented Simiao Granules (*Sargentodoxae Caulis*, *Phellodendri chinensis Cortex*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of 80% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 220, 280, 250 nm. **RESULTS** Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ( $r>0.999\ 0$ ), whose average recoveries were 98.98% - 100.11% with the RSDs of 0.81% - 1.52%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Supplemented Simiao Granules.

**KEY WORDS:** Supplemented Simiao Granules; salidroside; phellodendrine; ammonium glycyrrhizinate; tetrahydropalmatine; berberine hydrochloride; liquiritin; HPLC

中药颗粒临床应用广泛, 其克服了传统汤剂煎煮不便、服用量大、不易保存携带等缺陷, 而且可

保持中药汤剂吸收快、显效迅速等优势。但该制剂大多由经方、验方等加减而成, 药味多样, 成分复

收稿日期: 2018-03-19

基金项目: 成都中医药大学附属医院课题 (2016-D-YY-03)

作者简介: 施崇精 (1995—), 男, 硕士生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: (028) 87783735, E-mail: 1124758663@qq.com

\* 通信作者: 宋英 (1959—), 男, 教授, 主任中药师, 硕士生导师, 研究方向为中药制剂与炮制。Tel: (028) 87783735, E-mail: songying624@163.com

网络出版日期: 2018-04-17

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20180417.1453.008.html>

杂,含有多个化学组分群,单一成分含有量测定难以保证其整体质量<sup>[1]</sup>。而多成分定量测定能有效全面地优化制剂工艺,提升质量标准,尤其是采用HPLC法时,不仅精密度高,重复性好,还具有成本低、耗时短等优势,可为中药制剂多组分含有量测定提供科学依据<sup>[2-3]</sup>。

加味四妙颗粒是成都中医药大学附属医院研发的新制剂,它以四妙散为基础,由大血藤、延胡索、黄柏、甘草、苍术、川牛膝、薏苡仁7味药材组成,方中大血藤、延胡索为君药,具有活血化瘀、行气止痛、清热解毒之功效,其中前者药效成分红景天苷具有抗炎、改善血液微循环、抗病毒等作用<sup>[4]</sup>,而后者药效成分延胡索乙素具有显著的镇痛、镇静作用<sup>[5]</sup>;臣以黄柏苦寒燥湿,专清下焦湿热,而黄柏碱、盐酸小檗碱是其主要活性成分,具有广谱抗菌、抗炎、镇痛等作用<sup>[6]</sup>;苍术、甘草等为佐使药,可使全方具有燥湿、清热、活血、止痛之功效,其中甘草苷和甘草酸铵作为甘草中最重要的有效成分,前者可抑制炎症因子,而后者具有较强的抑制病毒增殖作用<sup>[7-8]</sup>。前期已有测定加味四妙颗粒中各药材所含成分含有量的报道<sup>[5,9-11]</sup>。本实验采用HPLC法同时测定其中红景天苷、黄柏碱、甘草酸铵、延胡索乙素、盐酸小檗碱、甘草苷的含有量,以期为该制剂的质量控制和评价提供科学依据。

## 1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司);BP-211D 电子天平[十万分之一,赛多利斯科学仪器(中国)有限公司];LE204E 电子天平(万分之一,瑞士梅特勒-托利多公司);KH-250B 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);DK-98-II 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药 红景天苷(批号 170312,含有量 98.0%)、盐酸小檗碱(批号 161203,含有量 98.0%)对照品均购自成都植标化纯生物科技有限公司;黄柏碱(批号 111895-201504,含有量 94.9%)、甘草酸铵(批号 110731-200615,含有量 100%)、延胡索乙素(批号 110726-201112,含有量 99.6%)、甘草苷(批号 111610-201106,含有量 100%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。加味四妙颗粒(批号 20180105、20180109、20180116)由成都中医药大学附属医院药剂科制剂室生产。甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯(美国

Tedia 公司);其他试剂均为分析纯;水为超纯水(自制)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~10 min, 8%~11% A; 10~23 min, 11%~13% A; 23~28 min, 13%~19% A; 28~35 min, 19%~20% A; 35~50 min, 20%~23% A; 50~60 min, 23%~26% A; 60~70 min, 26%~65% A; 70~75 min, 65% A);检测波长 220 nm(0~25、37~45 min)、280 nm(25~37、45~60 min)、250 nm(60~75 min);体积流量 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。

### 2.2 溶液制备

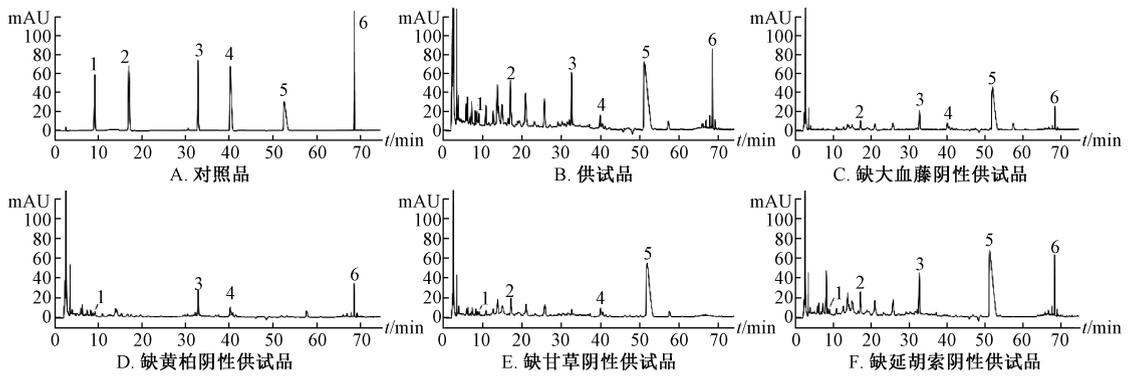
2.2.1 对照品溶液 精密称取对照品红景天苷 4.78 mg、黄柏碱 10.42 mg、甘草酸铵 6.17 mg、延胡索乙素 5.17 mg、盐酸小檗碱 19.64 mg、甘草苷 9.92 mg,置于 5 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容,摇匀,即得相应贮备液,分别精密吸取 1、2、2、1、2、1 mL 置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀,即得(含有红景天苷 93.69 μg/mL、黄柏碱 395.54 μg/mL、甘草酸铵 246.80 μg/mL、延胡索乙素 25.75 μg/mL、盐酸小檗碱 769.89 μg/mL、甘草苷 198.40 μg/mL)。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,研细,精密称取约 1.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 10 mL,密塞,称定质量,加热回流 20 min,放冷,80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性供试品溶液 按加味四妙颗粒处方比例和制备工艺,分别制得缺大血藤、黄柏、甘草、延胡索的阴性颗粒,按“2.2.2”项下方法制备相应阴性供试品溶液。

2.3 系统适应性试验与专属性考察 取“2.2”项下对照品、供试品、阴性供试品溶液适量,在“2.1”项色谱条件下进样测定,结果见图 1。由图可知,各成分与相邻色谱峰的分度均大于 1.5,理论塔板数以各色谱峰计均大于 3 000,阴性无干扰,表明该方法专属性良好。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 5、5、2、3、2、1 mL,置于 5、10、5、10、10、10 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀,得到 6 个不同质量浓度溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵



1. 红景天苷 2. 黄柏碱 3. 甘草酸铵 4. 延胡索乙素 5. 盐酸小檗碱 6. 甘草苷  
1. salidroside 2. phellodendrine 3. ammonium glycyrrhizinate 4. tetrahydropalmatine 5. berberine hydrochloride 6. liquiritin

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

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	r	线性范围/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
红景天苷	$Y = 15.6880X + 1.3091$	0.9999	9.37~93.69
黄柏碱	$Y = 11.683X - 3.9159$	0.9999	39.55~395.54
甘草酸铵	$Y = 14.000X + 9.1930$	1.0000	24.68~246.80
延胡索乙素	$Y = 30.987X + 7.7238$	0.9999	2.57~25.75
盐酸小檗碱	$Y = 17.244X - 8.3364$	0.9999	76.99~769.89
甘草苷	$Y = 12.377X - 7.9387$	1.0000	19.84~198.40

### 2.5 精密度试验

2.5.1 日内精密度 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 在“2.1”项色谱条件下于1 d内进样测定, 测得红景天苷、黄柏碱、甘草酸铵、延胡索乙素、盐酸小檗碱、甘草苷峰面积RSD分别为0.98%、0.77%、1.28%、1.09%、1.79%、1.92%, 表明仪器日内精密度良好。

2.5.2 日间精密度 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 在“2.1”项色谱条件下于1、2、3、4、5、6 d进样测定, 测得红景天苷、黄柏碱、甘草酸铵、延胡索乙素、盐酸小檗碱、甘草苷峰面积RSD分别为1.22%、0.53%、1.05%、1.12%、2.01%、1.61%, 表明仪器日间精密度良好。

2.6 稳定性试验 取样品(批号20180105)适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 于0、3、6、9、12、18、24 h在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得红景天苷、黄柏碱、甘草酸铵、延胡索乙素、盐酸小檗碱、甘草苷峰面积RSD分别为0.92%、0.81%、1.71%、1.46%、1.73%、1.62%, 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取样品(批号20180105)6份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得红景天苷、黄柏碱、甘草酸铵、延胡索乙素、盐酸小檗碱、甘草苷含有量RSD分别为1.34%、0.67%、1.22%、1.50%、1.29%、1.48%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取含有量已知的样品(批号20180105)适量, 研细, 精密称取0.5 g, 共9份, 置于具塞锥形瓶中, 每3份加入高、中、低质量浓度对照品溶液1 mL, 并使其加入量与供试品中成分量的比例分别为1.5:1、1:1、0.5:1, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 红景天苷、黄柏碱、甘草酸铵、延胡索乙素、盐酸小檗碱、甘草苷平均加样回收率分别为98.98%、100.03%、99.34%、100.11%、99.00%、100.03%, RSD分别为0.81%、1.35%、0.93%、1.52%、1.30%、1.10%。

2.9 样品含有量测定 取3批样品(批号20180105、20180109、20180116)适量, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 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	红景天苷	盐酸黄柏碱	甘草酸铵	延胡索乙素	盐酸小檗碱	甘草苷
20180105	0.2018	1.7787	1.0507	0.0648	5.1778	0.6921
20180106	0.2031	1.7796	1.0526	0.0629	5.1812	0.6939
20180107	0.2002	1.7681	1.0583	0.0651	5.1628	0.6901
平均值	0.2017	1.7755	1.0539	0.0643	5.1739	0.6920
RSD/%	0.72	0.36	0.38	1.86	0.19	0.27

### 3 讨论

3.1 指标成分选择<sup>[12-16]</sup> 本实验选择红景天苷、黄柏碱、甘草酸铵、延胡索乙素、盐酸小檗碱、甘草苷作为指标成分,其药理活性大多以抗炎、抗菌、抗病毒、改善血液微循环、镇痛为主,与治疗湿热瘀结型盆腔炎性疾病的原则相符,而且均专属性强、重复性好。同时,加味四妙颗粒中薏苡仁、牛膝、苍术因指标成分不明确、含有量较低、热稳定性较差等因素,未纳入本实验定量测定中,而是采用TLC法作定性鉴别。另外,方中活性成分绿原酸虽然具有抗菌、抗病毒、抗氧化等药理作用<sup>[17]</sup>,但在大血藤、黄柏、苍术中均能检出,不具有专属性,故也不予考虑。

3.2 检测波长选择 加味四妙颗粒中6种成分的吸收波长差异较大,在单一波长下难以同时检测,而且可能导致极性相似成分的干扰,而波长切换技术能在不同时间段切换为待测组分较佳的吸收波长,从而可在同一色谱图中有效准确地显示出其色谱峰信息。本实验通过DAD检测器对6种成分进行全波长扫描,确定0~25 min时采用220 nm检测红景天苷和黄柏碱,25~37 min时采用280 nm检测甘草酸铵,37~45 min时采用220 nm检测延胡索乙素,45~60 min时采用280 nm检测盐酸小檗碱,60~75 min时采用250 nm检测甘草苷,此时各成分响应信号强而稳定,与相邻峰无干扰。

3.3 供试品溶液制备方法选择 本实验对提取方法(加热回流、超声、索氏、振摇)、溶剂种类(甲醇、乙醇、1%盐酸甲醇)、溶剂体积分数(40%、60%、80%、100%)、提取时间(20、40、60、80、100、120 min)、液料比(10:1、20:1、30:1、40:1、50:1)进行考察,发现提取方法和溶剂种类的影响较大,而溶剂体积分数、提取时间、液料比的影响较小,同时考虑到便于操作、节约溶剂、提高效率等方面,最终采用“2.1.3”项下方法制备供试品溶液。

### 4 结论

本实验采用HPLC法同时测定加味四妙颗粒中红景天苷、黄柏碱、甘草酸铵、延胡索乙素、盐酸小檗碱、甘草苷的含有量,该方法简单可靠,具有较好的精密度、稳定性、重复性,可为其内在质量

的全面控制和评价提供科学依据。

### 参考文献:

- [1] 刘 丹,贾晓斌.“中药组分”相关研究的发展现状分析及探讨[J].中国中药杂志,2014,39(2):171-174.
- [2] 谭雄斯.HPLC法同时测定五粒回春丸中8种成分[J].中成药,2018,40(1):110-113.
- [3] 钱 珺,谢 凡,石燕红,等.HPLC法同时测定白芍配方颗粒中5种成分[J].中成药,2018,40(1):117-120.
- [4] 马瑞丽,于小凤,徐秀泉,等.大血藤的化学成分及药理作用研究进展[J].中国野生植物资源,2012,31(6):1-5.
- [5] 王 欢,毕福钧,林 彤,等.延胡索HPLC指纹图谱研究及9种生物碱含量测定[J].中药材,2017,40(3):624-629.
- [6] 廉 莲,万国盛,贾伟利,等.HPLC同时测定黄柏中6种化学成分含量[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(2):94-97.
- [7] 张明发,沈雅琴.甘草及其活性成分对生殖系统药理作用研究进展[J].药物评价研究,2014,37(4):367-374.
- [8] 郭明晔,张燕玲,李 洋,等.HPLC法同时测定甘草及甘草头中4种成分含量[J].世界科学技术(中医药现代化),2014,16(2):358-363.
- [9] 李 浩,赵凤春,袁贤达,等.大血藤药材和饮片中酚类和皂苷类成分的含量[J].中国中药杂志,2015,40(10):1865-1871.
- [10] 潘 超,张 莉,王 玉.HPLC法同时测定二妙丸中黄柏碱、木兰花碱、药根碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的含量[J].中国生化药物杂志,2012,33(4):361-364.
- [11] 杨颜芳,张贵君,王晶娟,等.甘草干姜汤中8种药效组分的含量测定[J].天然产物研究与开发,2017,29(5):810-814.
- [12] 韩雪娇,郭 娜,朱美宣,等.红景天苷药理作用及其作用机理研究进展[J].中国生化药物杂志,2015,35(1):171-175.
- [13] 李 荣,蔡青青,牛彦兵,等.生、熟延胡索饮片药理作用的对比研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(19):133-137.
- [14] 梁园园,于天浩,陈 萍,等.黄柏的药理活性及在化妆品中的应用[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(1):149-151.
- [15] 张友波,徐 崑,杨秀伟,等.RP-HPLC法同时测定不同产地甘草中9个主要成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(2):214-219,229.
- [16] 杨晓露,刘 朵,卞 卡,等.甘草总黄酮及其成分体外抗炎活性及机制研究[J].中国中药杂志,2013,38(1):99-104.
- [17] 严永旺,肖 兰,周 旭,等.绿原酸的药理作用及药用研发对策[J].中国药房,2017,28(19):2729-2732.