

[质 量]

HPLC法同时测定十三味和中丸中9种成分

徐倩¹, 杨满琴¹, 鲍学梅¹, 葛丹丹¹, 徐国兵^{2,3}, 胡云飞⁴, 谢若男^{1,3*}

(1. 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽合肥 230061; 2. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽合肥 230051; 3. 安徽中医药大学, 安徽合肥 230031; 4. 亳州学院, 安徽亳州 236800)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定十三味和中丸(柴胡、枳壳、延胡索等)中芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 的含有量。方法 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Waters SunfireTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 210、230、283、345 nm。结果 9 种成分在各自范围内线性关系良好($R^2 \geq 0.999 1$), 平均加样回收率 95.1%~102.3%, RSD 0.48%~3.11%。结论 该方法简便可靠, 可用于十三味和中丸的质量控制。

关键词: 十三味和中丸; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)02-0297-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.005

Simultaneous determination of nine constituents in Shisanwei Hezhong Pills by HPLC

XU Qian¹, YANG Man-qin¹, BAO Xue-mei¹, GE Dan-dan¹, XU Guo-bing^{2,3}, HU Yun-fei⁴, XIE Ruo-nan^{1,3*}

(1. The Second Hospital Affiliated to Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China; 2. Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China; 3. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 4. Bozhou University, Bozhou 236800, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of paeoniflorin, tetrahydropalmatine, berberine hydrochloride, naringin, hesperidin, baicalin, glycyrrhizic acid, saikosaponin a and saikosaponin d in Shisanwei Hezhong Pills (*Bupleuri Radix*, *Aurantii Fructus*, *Corydalis Rhizoma*, etc.).

METHODS The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Waters SunfireTM C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.2% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 210, 230, 283, 345 nm.

RESULTS Nine constituents showed good linear relationships within their own ranges ($R^2 \geq 0.999 1$), whose average recoveries were 95.1% - 102.3% with the RSDs of 0.48% - 3.11%.

CONCLUSION This simple and reliable method can be used for the quality control of Shisanwei Hezhong Pills.

KEY WORDS: Shisanwei Hezhong Pills; chemical constituents; HPLC

十三味和中丸是由安徽中医药大学第二附属医院研制的特色院内制剂, 由柴胡、枳壳、延胡索、炒白芍、陈皮、酒黄连、酒黄芩、川楝子、姜半夏、吴茱萸、茯苓、砂仁、甘草 13 味药材组成, 具

有疏肝理气、和胃止痛之功效^[1], 主要用于治疗胃脘胀痛、嘈杂、嗝气等症, 临床应用二十多年, 疗效显著。但该方药味较多, 组成复杂, 单一成分分析很难全面反映其特征, 而且不同成分吸收波长也

收稿日期: 2019-07-21

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2015QK098); 安徽中医药大学校级自然科学基金项目(2017fyyb009)

作者简介: 徐倩(1990—), 女, 硕士, 执业中药师, 从事中药质量控制与评价研究。Tel: 18225886316, E-mail: xuqian45China@163.com

* 通信作者: 谢若男(1961—), 女, 主任中药师, 硕士生导师, 从事中药质量控制与评价研究。Tel: (0551) 62668527, E-mail: xieruonan@126.com

有很大差异，目前尚无完整的质量评价体系^[2-3]。

多波长 HPLC 法测定复杂体系含有量已有很多相关报道^[4-6]，目前主要依据复方中君臣佐使关系选择君药或臣药，或成方中用量较大的药材、特殊用药作为考察指标^[7]，并依据 2015 年版《中国药典》一部选择具体药材的指标成分。本实验在此基础上，建立 HPLC 法同时测定十三味和中丸中芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 的含有量，以期提供多指标评价该制剂质量的方法。

1 材料

1.1 仪器 U-3000 高效液相色谱仪（配置 DAD 检测器）、FB15065 超声波清洗器（美国 Thermo 公司）；XPE-205 电子分析天平（0.001 mg，瑞士 Mettler-Toledo 公司）。

1.2 试剂与药物 十三味和中丸（批号 20170616、20170915、20171214、20180318、20180615，编号 SSW1~SSW5，每 10 丸重 1.5 g）购于安徽中医药大学第二附属医院制剂室。芍药苷（批号 110736-201640，质量分数 95.20%）、延胡索乙素（批号 110726-201011，质量分数 99.90%）、盐酸小檗碱（批号 110713-201212，质量分数 86.70%）、柚皮苷（批号 110722-201714，质量分数 94.30%）、橙皮苷（批号 110721-201316，质量分数 95.30%）、黄芩苷（批号 110715-201318，质量分数 93.30%）、甘草酸铵（批号 110731-201418，质量分数

93.10%）、柴胡皂苷 a（批号 110777-201309，质量分数 92.00%）、柴胡皂苷 d（批号 110778-201409，质量分数 96.00%）对照品均购于中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯，购于美国 Tedia 公司；磷酸为分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司；水为超纯水 [屈臣氏集团（香港）有限公司]。

2 方法

2.1 供试品溶液制备 称取本品干燥粉末（过 3 号筛）约 0.50 g，置于 50 mL 锥形瓶中，精密量取 70% 甲醇 20 mL，密塞，称定质量，超声处理 40 min（250 W、50 kHz），放冷，70% 甲醇补足缺失的质量，摇匀，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.2 对照品溶液制备 精密称取芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸铵、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 对照品适量，置于 25 mL 量瓶中，70% 甲醇定容至刻度，分别制成 10.591、18.176、76.167、58.842、99.172、275.825、42.408、51.244、58.678 μg/mL 对照品溶液（甘草酸质量 = 甘草酸铵质量 / 1.0207）。

2.3 色谱条件 Waters Sunfire™ C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.2% 磷酸（B），梯度洗脱，程序见表 1；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 210、230、283、345 nm；进样量 10 μL。色谱图见图 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

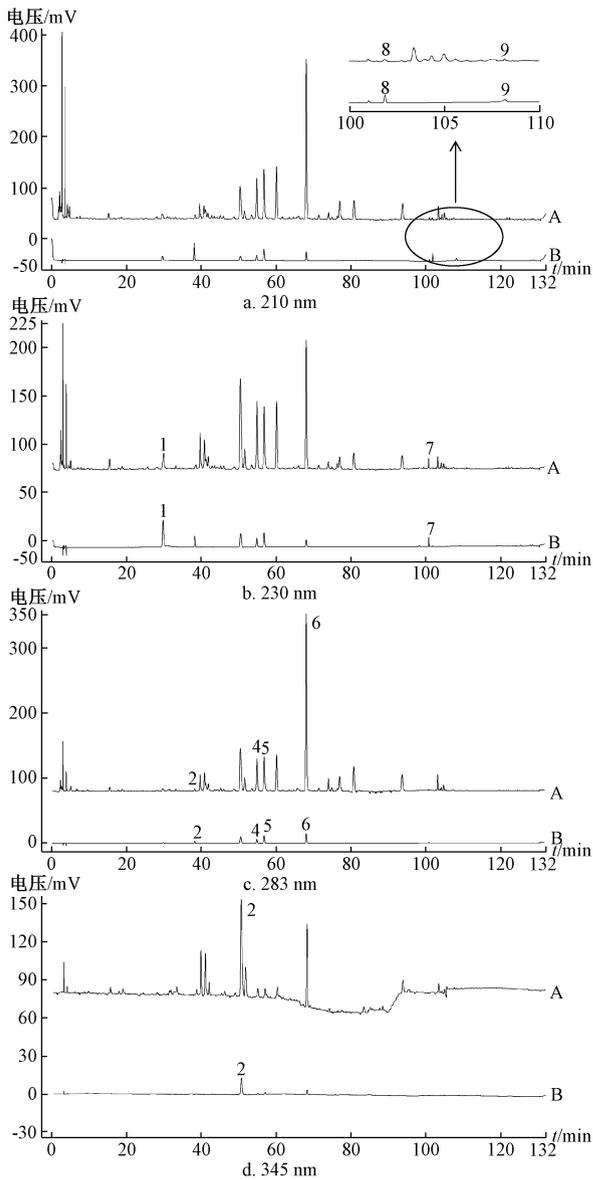
时间/min	A 乙腈/%	B 0.2% 磷酸/%	时间/min	A 乙腈/%	B 0.2% 磷酸/%
0~9	10	90	82~87	28~30	72~70
9~29	10~15	90~85	87~92	30~33	70~67
29~37	15~18	85~82	92~99	33~50	67~50
37~46	18	82	99~110	50	50
46~51	18~20	82~80	110~115	50~53	50~47
51~72	20~28	80~72	115~118	53~70	47~30
72~82	28	72	118~128	70	30

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.5、1、2、5、10 mL，置于 10 mL 量瓶中，70% 甲醇定容，混匀，得到系列质量浓度溶液 B1~B5，在“2.3”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标（Y），溶液质量浓度为横坐标（X）进行回归，信噪比（S/N）≥10 为定量限，S/N ≥ 3 为检测限，结果见表 2，表明各成分在各自范围内线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取对照品溶液（B3）5.0 μL，在“2.3”项色谱条件下进样测定 6 次，测得芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 峰面积 RSD 分别为 2.04%、1.81%、1.23%、0.91%、0.77%、0.56%、0.97%、1.63%、1.54%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取供试品溶液（SSW1），分别于 0、2、4、8、12、24 h，在“2.3”项色谱条



注: A 为供试品 (SSW1), B 为对照品。

1. 芍药苷 2. 延胡索乙素 3. 盐酸小檗碱 4. 柚皮苷 5. 橙皮苷 6. 黄芩苷 7. 甘草酸 8. 柴胡皂苷 a 9. 柴胡皂苷 d
1. paeoniflorin 2. tetrahydropalmatine 3. berberine hydrochloride
4. naringin 5. hesperidin 6. baicalin 7. glycyrrhizic acid
8. saikosaponin a 9. saikosaponin d

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检测限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
芍药苷	$Y=28.819X+3.996$	0.999 6	0.530~10.591	0.13	0.04
延胡索乙素	$Y=18.789X-1.654$	0.999 3	0.909~18.176	0.14	0.04
盐酸小檗碱	$Y=19.636X+4.563$	0.999 7	3.808~76.167	0.42	0.13
柚皮苷	$Y=50.67X-10.98$	0.999 8	2.942~58.842	0.42	0.13
橙皮苷	$Y=61.231X+4.907$	0.999 6	4.959~99.172	0.45	0.14
黄芩苷	$Y=71.012X-11.023$	0.999 5	13.791~275.825	1.56	0.47
甘草酸	$Y=68.19X-17.38$	0.999 3	2.120~42.408	0.40	0.12
柴胡皂苷 a	$Y=9.883X-0.366 7$	0.999 1	2.562~51.244	0.46	0.14
柴胡皂苷 d	$Y=13.264X+0.112$	0.999 7	2.934~58.678	0.50	0.15

件下进样测定,测得芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 峰面积 RSD 分别为 1.93%、1.69%、1.03%、0.89%、0.86%、0.41%、0.94%、1.53%、1.37%,表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批本品 (SSW1) 粉末 6 份,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样测定,测得芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 峰面积 RSD 分别为 0.97%、0.88%、0.71%、0.63%、0.66%、0.24%、0.61%、0.68%、0.78%,表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 称取含有量已知的本品 (SSW1) 粉末约 0.50 g,精密加入适量对照品溶液,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样测定,计算回收率。测得芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 平均加样回收率分别为 100.1%、99.7%、99.3%、99.8%、100.4%、99.5%、95.1%、102.3%、97.7%,RSD 分别为 0.64%、1.89%、1.43%、0.74%、0.85%、1.76%、0.84%、0.48%、3.11%。

2.5 样品含有量测定 取 5 批本品,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,在“2.3”项色谱条件下进样测定,外标法计算含有量,结果见表 3。

3 讨论

3.1 指标成分选择 中成药组分较多,制备工艺复杂,使其质量难以得到较好的控制^[8-9]。十三味和中丸由四逆散、左金丸、金铃子散、二陈汤四方相合,配伍黄芩、砂仁 2 味药材而成,以四逆散为疏肝理气之母方,并以大量枳壳替代枳实,全方以枳壳为君药,柴胡、炒白芍、姜半夏、陈皮、延胡索为臣药^[10]。前期曾考虑选择母方中 3 味药材 (柴胡、炒白芍、甘草)、君药与臣药 (枳壳、柴

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/g)

编号	芍药苷	延胡索乙素	盐酸小檗碱	柚皮苷	橙皮苷	黄芩苷	甘草酸	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 d
SSW1	0.379 0	0.422 7	3.049 8	1.897 7	3.841 2	9.033 5	0.929 0	0.834 6	0.117 2
SSW2	0.381 4	0.411 4	3.035 6	1.901 2	3.977 1	9.102 1	0.931 2	0.840 7	—
SSW3	0.352 4	0.442 1	3.051 2	1.889 3	3.854 6	8.963 5	0.903 2	0.821 4	—
SSW4	0.369 8	0.399 8	2.978 1	1.909 3	3.799 3	8.981 2	0.897 4	0.817 6	0.119 8
SSW5	0.378 4	0.401 2	2.998 9	1.882 7	3.568 4	8.865 4	0.885 6	0.809 3	—

注:—表示未检测出该成分。

胡、炒白芍、姜半夏、陈皮、延胡索)、额外配伍药(酒黄芩、砂仁)作为研究对象,但砂仁有效成分大多为挥发性物质,2015年版《中国药典》采用GC法进行定量测定,而半夏含有量在药典中采用电位滴定法进行测定,故未选择两者作为质控指标。结合处方用量(酒黄连用量较大),本实验最终选择枳壳、柴胡、炒白芍、陈皮、延胡索、酒黄连、酒黄芩、甘草8味药材,并参考药典方法对其特征性成分(如枳壳中柚皮苷、炒白芍中芍药苷等)进行分析。

3.2 提取条件选择 本实验以不同体积分数甲醇、乙醇为溶剂,考察了超声、回流、索氏提取及不同提取时间。综合考虑方法稳定性、便捷性、提取效率,最终选择70%甲醇超声处理40 min作为供试品溶液提取方法。

3.3 流动相选择 本实验考察了不同比例甲醇/乙腈-磷酸盐缓冲液系统,最终选择乙腈-0.2%磷酸作为流动相,此时色谱峰分离度、峰形良好。同时,将洗脱时间延长到128 min,也为指纹图谱(或特征图谱)等后续研究提供基础。

3.4 检测波长选择 根据不同成分在紫外光下的吸收情况,本实验选择最大吸收波长(或其左右)以避免其他物质干扰,保证测定准确性。结合2015年版《中国药典》,最终确定各成分检测波长分别为210 nm(柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d)、230 nm(芍药苷、甘草酸)、283 nm(芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷)、345 nm(盐酸小檗碱),此时色谱峰分离度、峰形理想,可用于定量分析。

4 结论

本实验建立了HPLC法同时测定十三味和中丸中芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、柚皮苷、橙皮苷、黄芩苷、甘草酸、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d的含有量,该方法简便,重复性好,可为该制剂质量控制提供参考,并为今后特征图谱、中药标准物质的研究^[11-14]奠定了一定的理论基础。

参考文献:

- [1] 周 婷. 马骏学术思想总结及十三味和中丸治疗功能性消化不良肝胃不和证的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2015.
- [2] 杨满琴, 谢若男, 马 骏, 等. 十三味和中丸的质量标准研究[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(6): 80-82.
- [3] 金月萍, 李学军, 孙 琴, 等. 十三味和中丸治疗老年肝胃不和型功能性消化不良疗效观察[J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(4): 723-726.
- [4] 龚婧如, 王书芳. HPLC多波长法测定刺五加颗粒中5个化合物的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(4): 595-598; 606.
- [5] 刘征辉, 叶挺祥, 赵琳琳, 等. HPLC多波长法同时测定血府逐瘀颗粒中多指标成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2157-2160.
- [6] 宗 阳, 孙冰婷, 朱立静, 等. 高效液相色谱法同时测定四逆散中6种抗抑郁成分含量[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(17): 1509-1512.
- [7] 王智民, 刘菊妍, 刘晓谦, 等. 谈经典名方的化学、生产和质量控制研发和监管[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1819-1824.
- [8] 黄艳梅, 石 岩, 胡云飞, 等. HPLC结合化学计量学对不同产地菊花中化学成分的比较分析[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(11): 1941-1951.
- [9] 李越峰, 黄玉新, 李廷利, 等. 四逆散拆方过程中成分变化的分析研究[J]. 中成药, 2009, 31(8): 1308-1310.
- [10] 周 婷, 储浩然, 薛西林, 等. 十三味和中丸治疗功能性消化不良肝胃不和证的临床研究[J]. 中国临床保健杂志, 2015, 18(5): 521-523.
- [11] Wang Q J, Sun L, Liu F, et al. Progress and challenges of reference standard and its new form: digital reference standard [J]. *Chin Med*, 2016, 7: 77-91.
- [12] 任雪梅. 调肝方药加味四逆散色谱指纹图谱的初步建立与分析[D]. 广州:广州中医药大学, 2009.
- [13] Chen A Z, Sun L, Yuan H, et al. A holistic strategy for quality and safety control of traditional Chinese medicines by the "iVarious" standard system [J]. *J Pharm Anal*, 2017, 7(5): 271-279.
- [14] Zhu J J, Wang Z M, Ma X Y, et al. A quantitative method for simultaneous determination of four anthraquinones with one marker in *Rhei Radix et Rhizoma* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(2): 157-163.