

HPLC 法同时测定外感风寒颗粒中 10 种成分

曲颂扬¹, 关 开¹, 周 慧¹, 毛清雯²
(1. 辽宁中医药大学附属医院药学部, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定外感风寒颗粒(桂枝、防风、葛根等)中苦杏仁苷、3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、肉桂酸、桂皮醛的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃; 检测波长 207、254、280 nm。**结果** 10 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999\ 1$), 平均加样回收率为 96.97%~100.08%, RSD 为 0.80%~1.45%。**结论** 该方法简便、重复性好, 可用于外感风寒颗粒的质量控制。
关键词: 外感风寒颗粒; 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)04-0853-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.04.006

Simultaneous determination of ten constituents in Waigan Fenghan Granules by HPLC

QU Song-yang¹, GUAN Kai¹, ZHOU Hui¹, MAO Qing-wen²
(1. Department of Pharmacy, The Hospital Affiliated to Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China; 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of amygdalin, 3'-hydroxy puerarin, puerarin, 3'-methoxy puerarin, prim-*O*-glucosylcimifugin, cimifugin, 5-*O*-methylvisammioside, sec-*O*-glucosylhamaudol, cinnamic acid and cinnamaldehyde in Waigan Fenghan Granules (*Cinnamomi Ramulus*, *Saposhnikovia Radix*, *Puerariae lobatae Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 25 ℃ thermostatic Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (4.6 mm×250 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 207, 254, 280 nm. **RESULTS** Ten constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999\ 1$), whose average recoveries were 96.97%–100.08% with the RSDs of 0.80%–1.45%. **CONCLUSION** This simple and reproducible method can be used for the quality control of Waigan Fenghan Granules.
KEY WORDS: Waigan Fenghan Granules; chemical constituents; HPLC

外感风寒颗粒由桂枝、防风、葛根、白芷、荆芥穗、羌活、柴胡、白芍、桔梗、炒苦杏仁、生姜、甘草 12 味药材组成, 临床上主要用于风寒感冒、恶寒发热、头痛项强、全身酸疼、鼻塞流清涕、咳嗽、苔薄白、脉浮等病症的治疗^[1]。方中桂枝、白芷、羌活发汗解表, 祛风散寒, 共为君药; 辅以防风、葛根、荆芥穗、生姜解肌退热, 温肺止咳; 炒苦杏仁、柴胡、桔梗、白芍祛痰止咳平喘, 生津养血止痛; 甘草缓急止痛, 调和诸药, 诸药合用, 共奏解表散寒、退热止咳之功效。

中药及其制剂具有多成分、多靶点的特点, 临床疗效为各成分协同作用的结果, 单一成分检测难

以全面评价其质量,近年来多指标控制模式已逐步应用于相关质量控制中。外感风寒颗粒现行质量标准收载于 2015 年版《中国药典》一部^[1],但仅对葛根素进行了定量测定,未涉及方中君药及其他药味所含成分。本实验参照中药质量标志物以君药为主,兼顾臣药、佐药、使药的原则,选择外感风寒颗粒中君药桂枝所含肉桂酸、桂皮醛,臣药防风所含升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷,葛根所含 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素,佐药炒苦杏仁所含苦杏仁苷作为指标成分,建立 HPLC 法同时测定这 10 种成分含量,为全面评价该制剂质量提供依据。

1 材料

Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);BP-211D 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);KQ5200 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

桂皮醛(批号 110710-201821,纯度 99.6%)、肉桂酸(批号 110786-201604,纯度 98.8%)、苦杏仁苷(批号 110820-201808,纯度 88.2%)、葛根素(批号 110752-201816,纯度 95.4%)、升麻素苷(批号 111522-201712,纯度 96.2%)、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷(批号 111523-201811,纯度 97.4%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;3'-羟基葛根素(批号 17051825,纯度 100.0%)、3'-甲氧基葛根素(批号 17032021,纯度 99.8%)、升麻素(批号 18042043,纯度 99.7%)、亥茅酚苷(批号 17072821,纯度 99.5%)对照品均购自上海同田生物技术股份有限公司。外感风寒颗粒[每袋装 12 g(相当于原药材 12.5 g),批号 18090401、18100201、19020602)]来源于华润三九(临清)药业有限公司。桂枝、防风、葛根、白芷、荆芥穗、羌活、柴胡、白芍、桔梗、炒苦杏仁、生姜、甘草均来源于沈阳中药饮片药业有限公司,经辽宁中医药大学附属医院药学部曲颂扬副主任中药师鉴定为正品,符合 2015 年版《中国药典》一部各药材相关要求。乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司);其他试剂均为分析纯;水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B),梯度洗脱(0~11.0 min, 9.0% A; 11.0~17.0 min, 9.0%~15.0% A; 17.0~32.0 min, 15.0%~26.0% A; 32.0~50.0 min,

26.0%~52.0% A; 50.0~61.0 min, 52.0%~60.0% A; 61.0~70.0 min, 60.0%~9.0% A);体积流量 1.0 mL/min;柱温 25 ℃;检测波长 207 nm^[1-3](0~17.0 min, 苦杏仁苷)、254 nm^[1,4-10](17.0~50.0 min, 3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷)、280 nm^[1,11-13](50.0~70.0 min, 肉桂酸、桂皮醛);进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,甲醇制成贮备液(苦杏仁苷 2.718 mg/mL、3'-羟基葛根素 1.152 mg/mL、葛根素 3.438 mg/mL、3'-甲氧基葛根素 0.974 mg/mL、升麻素苷 2.932 mg/mL、升麻素 0.946 mg/mL、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 1.468 mg/mL、亥茅酚苷 0.696 mg/mL、肉桂酸 0.192 mg/mL、桂皮醛 1.354 mg/mL),各精密量取 2.5 mL,置于同一 50 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,即得(苦杏仁苷 135.9 μg/mL、3'-羟基葛根素 57.6 μg/mL、葛根素 171.9 μg/mL、3'-甲氧基葛根素 48.7 μg/mL、升麻素苷 146.6 μg/mL、升麻素 47.3 μg/mL、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 73.4 μg/mL、亥茅酚苷 34.8 μg/mL、肉桂酸 9.6 μg/mL、桂皮醛 67.7 μg/mL)。

2.2.2 供试品溶液 取颗粒适量,剪开内包装,倾出内容物后研细,取约 2.0 g,精密称定,精密加入 25 mL 甲醇,密塞,称定质量,超声(功率 200 W、频率 40 kHz)处理 30 min,放冷,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 阴性样品溶液 按颗粒质量标准项下处方比例和工艺过程,分别制备缺苦杏仁、缺葛根、缺防风、缺桂枝的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制备,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液适量,在“2.1”项色谱条件下进样测定,结果见图 1。由此可知,各成分色谱峰基线平稳,均能达到有效分离,分离度均大于 1.5,理论塔板数均大于 4 500,阴性无干扰。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品贮备液各 2.0 mL,置于 25 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取适量,甲醇依次稀释 2、5、10、15、20 倍,制成系列质量浓度对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶

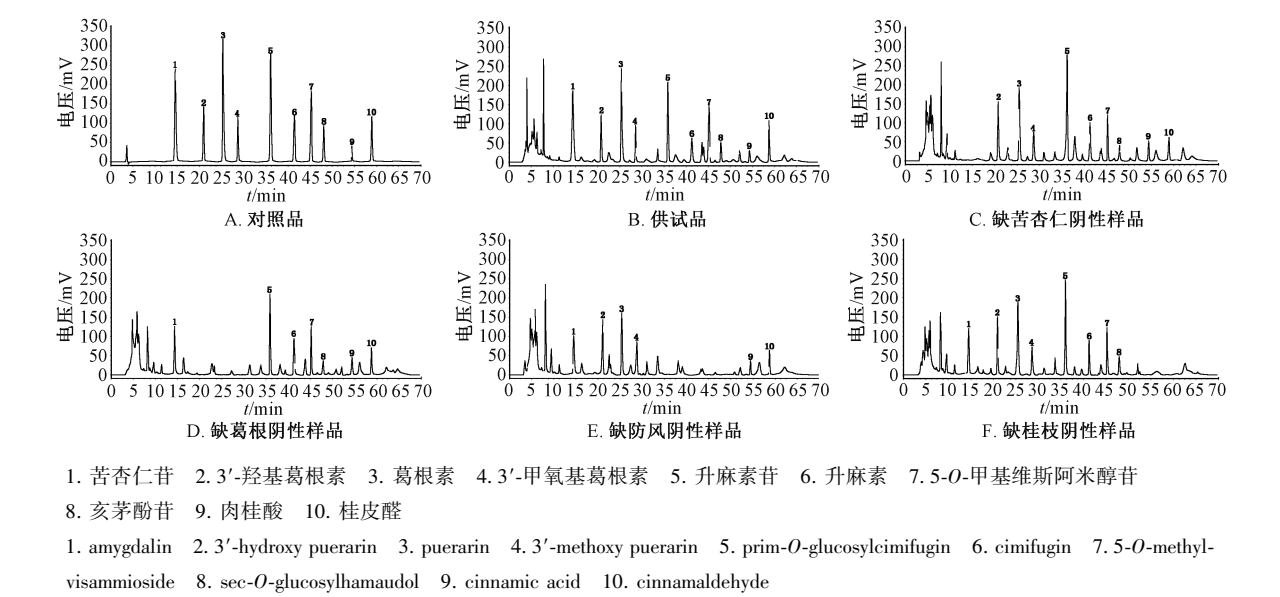


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

液质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 线性关系良好。
进行回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内

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/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
苦杏仁苷	$Y=7.1126\times10^5X+239.9$	0.999 7	10.872~217.440
3'-羟基葛根素	$Y=6.3791\times10^5X-407.1$	0.999 2	4.608~92.160
葛根素	$Y=9.4873\times10^5X+354.3$	0.999 3	13.752~275.040
3'-甲氧基葛根素	$Y=5.8836\times10^5X+288.6$	0.999 5	3.896~77.920
升麻素苷	$Y=8.3589\times10^5X+272.7$	0.999 8	11.728~234.560
升麻素	$Y=4.9985\times10^5X-196.9$	0.999 9	3.784~75.680
5-O-甲基维斯阿米醇苷	$Y=8.3692\times10^5X+325.2$	0.999 1	5.872~117.440
亥茅酚苷	$Y=5.1679\times10^5X-467.6$	0.999 3	2.784~55.680
肉桂酸	$Y=9.2472\times10^5X-396.3$	0.999 1	0.768~15.360
桂皮醛	$Y=5.9165\times10^5X+175.7$	0.999 6	5.416~108.320

2.3.3 精密度试验 取同一供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得苦杏仁苷、3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、肉桂酸、桂皮醛峰面积 RSD 分别为 0.68%、1.13%、0.55%、1.22%、0.71%、1.06%、0.87%、1.31%、1.49%、1.23%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取颗粒适量，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得苦杏仁苷、3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、肉桂酸、桂皮醛含量 RSD 分别为 1.08%、1.30%、0.99%、1.46%、1.19%、1.52%、1.25%、1.74%、1.81%、

1.63%，表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一供试品溶液，于 0、2、4、6、10、16、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得苦杏仁苷、3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、升麻素苷、升麻素、5-O-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、肉桂酸、桂皮醛峰面积 RSD 分别为 0.71%、1.06%、0.58%、1.19%、0.69%、1.03%、0.90%、1.33%、1.47%、1.24%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取各成分含有量已知的颗粒（批号 18090401）9 份，研细，3 份为 1 组，每份约 1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入对照品溶液（苦杏仁苷 1.528 mg/mL、3'-羟基葛根素 0.654 mg/mL、葛根素 1.968 mg/mL、

3'-甲氧基葛根素 0.532 mg/mL、升麻素苷 1.746 mg/mL、升麻素 0.522 mg/mL、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 0.838 mg/mL、亥茅酚苷 0.396 mg/mL、肉桂酸 0.108 mg/mL、桂皮醛 0.782 mg/mL) 0.5、1.0、1.5 mL 各 3 份 (约分别相当于样品含的 50%、100%、150%)，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，苦杏仁苷、3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、肉桂酸、桂皮

醛平均加样回收率分别为 99.46%、98.03%、100.08%、98.54%、99.89%、97.37%、97.89%、96.97%、97.09%、100.00%，RSD 分别为 0.96%、1.22%、0.80%、1.37%、0.73%、1.10%、1.45%、0.86%、1.09%、0.95%。

2.4 样品含有量测定 取 3 批颗粒 (批号 18090401、18100201、19020602)，研细，各取约 2.0 g，精密称定，按“2.2.2”项方法平行制备 3 份供试品溶液，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	苦杏仁苷	3'-羟基葛根素	葛根素	3'-甲氧基葛根素	升麻素苷	升麻素	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	亥茅酚苷	肉桂酸	桂皮醛
18090401	1.524	0.657	1.972	0.536	1.752	0.519	0.834	0.397	0.109	0.784
18100201	1.378	0.703	2.139	0.485	1.580	0.456	0.739	0.361	0.117	0.858
19020602	1.603	0.596	1.777	0.581	1.911	0.552	0.902	0.434	0.096	0.715

3 讨论

3.1 流动相选择 本实验考察了乙腈-水^[1]、甲醇-水^[1,7-8]，发现两者均出现不同程度基线漂移，部分待测成分分离不完全，前者相对效果较佳。考虑到磷酸能平稳基线，改善峰形，故又采用乙腈-磷酸^[1-3,5,11,14]进行梯度洗脱。通过对磷酸体积分数和洗脱比例不断进行摸索，最终确定乙腈-0.1%磷酸作为流动相，按“2.1”项下比例洗脱，此时各成分色谱图基线平稳，峰形良好，分离效果理想。

3.2 供试品溶液制备方法选择 本实验考察了提取溶剂 (甲醇^[1,4,7-12]、70% 甲醇、70% 乙醇^[2,5]、30% 乙醇^[1,6])、提取方式 (加热回流^[1-2,4-8]、超声^[1,11-12])，发现甲醇提取效果优于其他溶剂，超声、加热回流提取率差异不大，可能与各药材均经提取浓缩后制成颗粒有关，同时还考察了提取时间 (15、30、45 min)。最终，确定甲醇超声提取 30 min 作为供试品溶液制备方法。

4 结论

本实验首次采用 HPLC 法同时测定外感风寒颗粒中苦杏仁苷、3'-羟基葛根素、葛根素、3'-甲氧基葛根素、升麻素苷、升麻素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、亥茅酚苷、肉桂酸、桂皮醛的含有量，该方法操作简便，准确度高，专属性强，可为该制剂质量控制提供参考依据，有助于方中原药材产地、采收季节、质量标准的制定及制剂生产工艺参数的不断细化，以确保其质量稳定性和疗效一致性。

参考文献:

[1] 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: 149-150; 201-202; 276; 333; 805-806.

[2] 邹小娟, 谢和兵, 钱芳, 等. HPLC 法测定苦杏仁中苦杏仁苷含量的方法研究 [J]. 中国药事, 2009, 23(1): 33-36.

[3] 李智利. HPLC 法同时测定五仁润肠丸中 10 种成分 [J]. 中成药, 2018, 40(9): 1978-1981.

[4] 赵厚珍, 庞红伟, 王凡. HPLC 法测定外感风寒颗粒中葛根素的含量 [J]. 齐鲁药事, 2011, 30(3): 144-145.

[5] 尤春雪, 张振秋, 李峰, 等. HPLC 波长切换技术对葛根中 8 种成分的测定及指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 616-621.

[6] 赵路, 关琴笑, 路丽, 等. UHPLC 法同时测定不同产地葛根中 5 种活性成分的含量 [J]. 中药材, 2015, 38(3): 473-475.

[7] 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.

[8] 赵博, 杨鑫宝, 杨秀伟, 等. HPLC 法同时测定防风中 6 个主要成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(3): 382-387.

[9] 陆林杰, 姜洪旭, 潘科. 一测多评法同时测定玉液消渴颗粒中 8 种成分 [J]. 中成药, 2018, 40(6): 1302-1307.

[10] 刘威, 李红娟, 张帅, 等. HPLC 测定不同商品规格桂枝中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 134-138.

[11] 卢泳, 孙冬梅, 王洛临, 等. 基于近红外光谱法对防风中色原酮含量快速测定的研究 [J]. 广东药科大学学报, 2019, 35(4): 517-522.

- [12] 刘 冲, 刘荫贞, 乐智勇, 等. 桂枝饮片标准汤剂质量标准研究[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1577-1583.

[13] 张 静, 李壮壮, 杜宝香, 等. HPLC 法同时测定柴胡桂枝汤中 6 种成分[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2202-2205.
- [14] 周雅琪, 蒋 林, 魏博伟, 等. 六味葛蓝降脂片 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分测定[J]. 中成药, 2019, 41(7): 1510-1514.

一测多评法同时测定宽中顺气丸中 8 种成分

骆 航, 李华生, 王文渊
(永州职业技术学院医学院, 湖南 永州 425100)

摘要: **目的** 建立一测多评法同时测定宽中顺气丸(香附、陈皮、莪术等)中橙皮苷、川陈皮素、桔皮素、莪术二酮、莪术醇、吉马酮、香附烯酮、 α -香附酮的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相乙腈-0.1% 冰醋酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 214、242、326 nm; 柱温 25 $^{\circ}$ C。以吉马酮为内标, 建立其他 7 种成分相对校正因子, 测定含有量。**结果** 8 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r\geq 0.999\ 2$), 平均加样回收率为 96.93%~100.00%, RSD 为 0.81%~1.63%。一测多评法所得结果与外标法接近。**结论** 该方法简便准确, 可用于宽中顺气丸的质量控制。

关键词: 宽中顺气丸; 化学成分; 一测多评

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)04-0857-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.04.007

Simultaneous determination of eight constituents in Kuanzhong Shunqi Pills by QAMS

LUO Hang, LI Hua-sheng, WANG Wen-yuan
(College of Medicine, Yongzhou Vocational and Technical College, Yongzhou 425100, China)

ABSTRACT: AIM To establish a quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method for the simultaneous content determination of hesperidin, nobiletin, tangeretin, curdione, curcumol, germacrone, cyperotundone and α -cyperone in Kuanzhong Shunqi Pills (*Cyperi Rhizoma*, *Citri reticulatae Pericarpium*, *Curcumae Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 25 $^{\circ}$ C thermostatic Agilent TC-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% glacial acetic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 214, 242, 326 nm. Germacrone was used as an internal standard to calculate the relative correction factors of the other seven constituents, after which the content determination was made. **RESULTS** Eight constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r\geq 0.999\ 2$), whose average recoveries were 96.93%–100.00% with the RSDs of 0.81%–1.63%. The results obtained by QAMS approximated those obtained by external standard method. **CONCLUSION** This simple and accurate method can be used for the quality control of Kuanzhong Shunqi Pills.

KEY WORDS: Kuanzhong Shunqi Pills; chemical constituents; quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS)