

[质 量]

HPLC法同时测定风寒感冒颗粒中7种成分

何艳¹, 胡小祥^{2*}, 汪毅³, 张辉¹

(1. 湘南学院药学院, 湖南 郴州 423000; 2. 郴州市食品药品检验检测中心, 湖南 郴州 423000; 3. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定风寒感冒颗粒(麻黄、葛根、防风等)中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、葛根素、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷、橙皮苷、甘草酸的含量。方法 该药物甲醇-1% HCl (7:3) 提取液的分析采用 Agilent Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸(含 0.1% NH₄Cl), 梯度洗脱; 体积分流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C, 检测波长 210、250、284 nm。结果 7 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999$), 平均加样回收率 96.87%~101.06%, RSD 1.10%~2.88%。结论 该方法简便准确, 重复性好, 可用于风寒感冒颗粒的质量控制。

关键词: 风寒感冒颗粒; 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)09-2272-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.005

Simultaneous determination of seven constituents in Fenghan Ganmao Granules by HPLC

HE Yan¹, HU Xiao-xiang^{2*}, WANG Yi³, ZHANG Hui¹

(1. College of Pharmacy, Xiangnan University, Chenzhou 423000, China; 2. Chenzhou Municipal Center for Food and Drug Control, Chenzhou 423000, China; 3. College of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou 550025, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of ephedrine hydrochloride, pseudoephedrine hydrochloride, puerarin, prim-*O*-glucosylcimifugin, 5-*O*-methylvisammioside, hesperidin and glycyrrhizic acid in Fenghan Ganmao Granules (*Ephedrae Herba*, *Pueraria lobata Radix*, *Saposhnikovia Radix*, etc.). **METHODS** The methanol-0.1% HCl (7:3) extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic Agilent Eclipse Plus-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (containing 0.1% NH₄Cl) flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 210, 250, 284 nm. **RESULTS** Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999$), whose average recoveries were 96.87%~101.06% with the RSDs of 1.10%~2.88%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Fenghan Ganmao Granules.

KEY WORDS: Fenghan Ganmao Granules; chemical constituents; HPLC

风寒感冒颗粒是由麻黄、葛根、紫苏叶、防风、桂枝、白芷、陈皮、苦杏仁、桔梗、甘草、干姜 11 味药材加工而成的中药复方制剂, 具有发汗解表、疏风散寒的作用, 临床用于治疗风寒感冒、

收稿日期: 2019-12-12

基金项目: 湖南省“双一流”药学应用特色学科基金(湘教通[2018]469)

作者简介: 何艳(1985—), 女, 硕士, 实验师, 从事天然药物开发与质量分析研究。Tel: (0735) 2116268, E-mail: hxx3318@126.com

* 通信作者: 胡小祥(1987—), 男, 硕士, 主管技师, 从事药物检验与质量分析研究。Tel: (0735) 2278323, E-mail: 526378710@qq.com

发热、咳嗽、头痛、恶寒、鼻塞等症^[1]。方中麻黄解表发汗、宣肺平喘，桂枝解肌发表、温经散寒，两者相须为用，共为君药；葛根解肌退热，紫苏叶、防风、白芷辛温疏风、散寒止痛，为臣药；陈皮、苦杏仁、桔梗宣肺化痰止咳，干姜温肺散寒，为佐药；甘草调和药性，功兼佐使之用，诸药配伍，共奏发汗解表、化痰止咳、疏散风寒之功效。该制剂现收载于卫生部《药品标准中药成方制剂》第一册中，但其质量控制标准里仅有“性状”和“检查”项，尚无“含有量测定”项，而且现有相关文献也仅针对其中1~2种成分进行定量分析^[2-6]，不能从整体上控制其内在质量。

为了更好地提高和控制风寒感冒颗粒质量，本实验参考中药质量标志物确定原则^[7]，采用HPLC法同时测定方中君药麻黄主要成分盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱^[8]，臣药葛根主要成分葛根素^[9]、防风主要成分升麻素苷和5-*O*-甲基维斯阿米醇苷^[10]，佐药陈皮主要成分橙皮苷^[11]，使药甘草主要成分甘草酸^[12]的含有量，以期为提高该制剂质量标准及临床用药稳定性提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪，配置二极管阵列检测器（DAD）、自动进样器、四元泵、柱温箱（美国安捷伦公司）；KQ-300DE 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Milli-Q 超纯水仪（美国密理博公司）；XSE-205 电子天平（十万分之一，瑞士梅特勒-托利多公司）。

1.2 药物与试剂 盐酸麻黄碱（批号 171241-201809，纯度 100.0%）、盐酸伪麻黄碱（批号 171237-201510，纯度 99.8%）、葛根素（批号 110752-201615，纯度 95.4%）、升麻素苷（批号 111522-201511，纯度 94.8%）、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷（批号 111523-201509，纯度 95.8%）、橙皮苷（批号 110721-201617，纯度 96.1%）、甘草酸铵（批号 110731-201619，纯度 93.0%）对照品均购自中国食品药品检定研究院。风寒感冒颗粒（批号 A20181168、A20190211，每袋装 8 g，贵州百灵企业集团制药股份有限公司；批号 ZAA1922、ZBA1803，每袋装 8 g，云南白药集团股份有限公司；批号 818136，每袋装 8 g，葵花药业有限公司；批号 181110，每袋装 8 g，吉林长白山药业集团股份有限公司）。甲醇、乙腈为色谱纯（德国默克公司）；其余试剂均为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1%磷酸（含 0.1% NH₄Cl）（B）梯度洗脱（0~15 min，4%~7% A；15~30 min，7%~13% A；30~45 min，13%~20% A；45~60 min，20%~50% A；60~65 min，50% A；65~66 min，50%~4% A；66~70 min，4% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；0~20 min 在 210 nm 波长处检测盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱，20~50 min 在 250 nm 波长处检测葛根素、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷，50~55 min 在 284 nm 波长处检测橙皮苷，55~70 min 在 250 nm 波长处检测甘草酸；进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品盐酸麻黄碱 8.11 mg、盐酸伪麻黄碱 6.50 mg、葛根素 9.87 mg、升麻素苷 5.94 mg、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 5.76 mg、橙皮苷 7.94 mg、甘草酸铵 7.97 mg（甘草酸质量 = 甘草酸铵质量/1.020 7），置于 25 mL 量瓶中，70% 甲醇定容至刻度，摇匀，分别精密吸取 2、2、8、2、2、4、4 mL，置于 25 mL 量瓶中，振摇，70% 甲醇定容至刻度，摇匀，即得（各成分质量浓度分别为 25.95、20.76、120.5、18.02、17.66、48.8、46.48 μg/mL）。

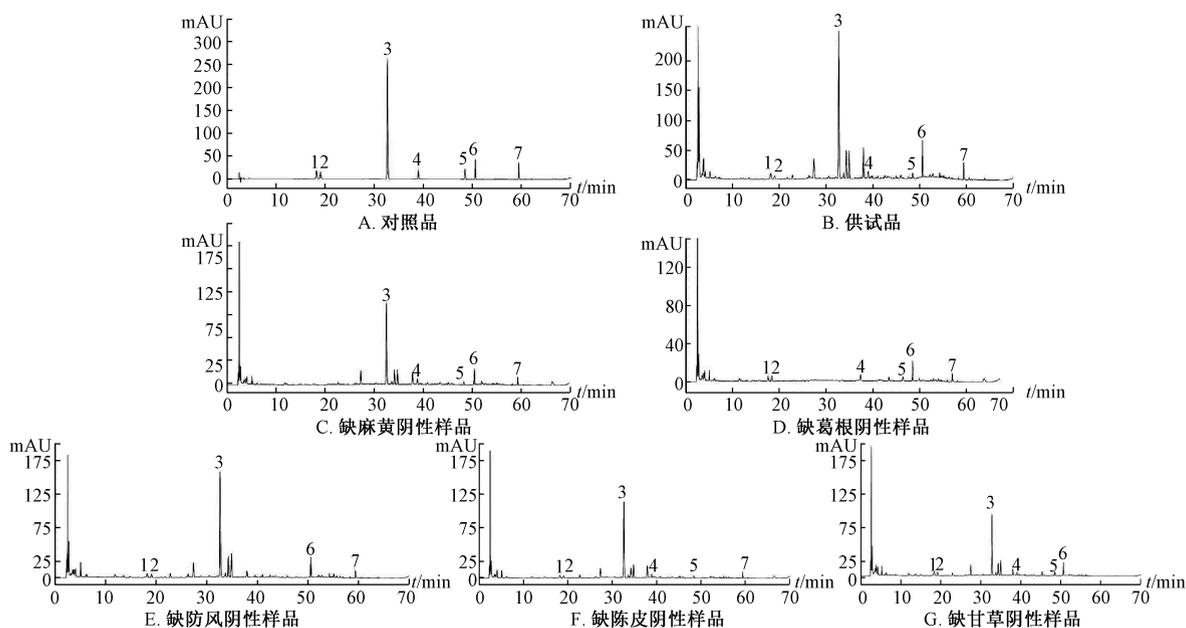
2.2.2 供试品溶液制备 取颗粒 5 袋，将内容物倒入研钵中研细，精密称取粉末 1.5 g，置于锥形瓶中，精密加入 50 mL 甲醇-1% HCl（7：3），称重，超声（300 W、40 kHz）提取 30 min，冷却至室温，甲醇-1% HCl 补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按颗粒处方工艺，分别制得缺麻黄、缺葛根、缺防风、缺陈皮、缺甘草的阴性样品，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，0.45 μm 微孔滤膜过滤，各精密吸取 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，各成分色谱峰的分离度均大于 1.5，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。

2.3.2 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下对照品溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，70% 甲醇稀释至刻度，摇匀，



1. 盐酸麻黄碱 2. 盐酸伪麻黄碱 3. 葛根素 4. 升麻素苷 5. 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷 6. 橙皮苷 7. 甘草酸
1. ephedrine hydrochloride 2. pseudoephedrine hydrochloride 3. puerarin 4. prim-*O*-glucosylcimifugin 5. 5-*O*-methylvisammoside 6. hesperidin 7. glycyrrhizic acid

图1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

各精密吸取 10 μ L, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标 (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	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
盐酸麻黄碱	$Y=22.01X+0.5863$	0.9999	2.595~25.95
盐酸伪麻黄碱	$Y=22.57X+1.353$	0.9998	2.076~20.76
葛根素	$Y=46.17X+1.077$	0.9999	12.05~120.5
升麻素苷	$Y=21.57X+0.4873$	0.9999	1.802~18.02
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$Y=24.58X+1.576$	0.9998	1.766~17.66
橙皮苷	$Y=12.95X-1.153$	0.9998	4.883~48.83
甘草酸	$Y=8.261X+10.93$	0.9991	4.648~46.48

2.3.3 精密度试验 精密量取“2.2.1”项下对照品溶液 5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 70% 甲醇定容至刻度, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、葛根素、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、橙皮苷、甘草酸峰面积 RSD 分别为 0.69%、0.84%、0.26%、0.47%、0.32%、0.19%、1.60%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一批颗粒 (批号 A20190211), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶

液, 于 0、4、10、18、24、36 h 在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μ L 测定, 测得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、葛根素、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、橙皮苷、甘草酸峰面积 RSD 分别为 1.03%、1.06%、0.61%、1.73%、0.66%、0.90%、2.38%, 表明溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批颗粒 (批号 A20190211), 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, 测得盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、葛根素、升麻素苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、橙皮苷、甘草酸含有量 RSD 分别为 1.20%、1.89%、1.23%、2.14%、1.45%、1.35%、2.23%, 表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取同一批各成分含有量已知的颗粒 (批号 A20190211), 研细, 精密称取 0.75 g 粉末, 共 6 份, 按 100% 水平精密加入对照品溶液 (0.183 2 mg/mL 盐酸麻黄碱 1 mL、0.103 8 mg/mL 盐酸伪麻黄碱 1 mL、0.335 0 mg/mL 葛根素 5 mL、0.157 4 mg/mL 升麻素苷 1 mL、0.110 4 mg/mL 5-*O*-基维斯阿米醇苷 1 mL、0.226 4 mg/mL 橙皮苷 4 mL、0.250 7 mg/mL 甘草酸 2 mL), 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, 计算回收率。结果, 盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、葛

根素、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、橙皮苷、甘草酸平均加样回收率分别为 98.96%、97.81%、99.83%、97.80%、99.90%、101.06%、96.87%，RSD 分别为 2.05%、2.88%、2.23%、

2.17%、1.15%、1.73%、1.10%。

2.4 样品含有量测定 取6批颗粒，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，外标法计算含有量，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	盐酸麻黄碱	盐酸伪麻黄碱	葛根素	升麻素苷	5-O-甲基维斯阿米醇苷	橙皮苷	甘草酸
A20181168	0.236 3	0.130 0	2.238	0.122 9	0.120 5	1.178	0.931 8
A20190211	0.261 1	0.123 3	1.946	0.213 9	0.155 2	1.248	0.666 4
ZAA1922	0.480 0	0.201 7	3.269	0.222 7	0.265 7	1.126	0.921 9
ZBA1803	0.221 3	0.085 21	3.377	0.331 6	0.350 4	0.885 9	0.953 4
818136	0.441 5	0.128 4	3.395	0.181 9	0.251 9	1.491	0.951 9
181110	0.329 0	0.171 7	1.434	0.131 2	0.128 8	0.366 4	0.329 5

3 讨论

3.1 检测波长筛选 本实验采用DAD检测器，在紫外光区(190~400 nm)对各成分进行扫描，并采集紫外光谱图。结果，在210 nm波长处盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱有最大吸收，在250 nm波长处葛根素、升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸有最大吸收，在284 nm波长处橙皮苷有最大吸收，故选择三者作为检测波长。

3.2 色谱条件筛选 本实验首先考察了Agilent Eclipse Plus-C₁₈、Thermo Hypersil Gold-C₁₈、Waters Sunfire-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)，发现Agilent Eclipse Plus-C₁₈色谱柱分离效果最好，峰型较佳。再考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.1%甲酸、乙腈-0.1%磷酸(含0.1% NH₄Cl)流动相^[8,13-14]，发现乙腈-0.1%磷酸(含0.1% NH₄Cl)梯度洗脱时盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱峰形最好，而且各成分与相邻色谱峰的分离度均大于1.5，对称性理想。最终，确定为“2.1”项下色谱条件。

3.3 提取方法筛选 本实验首先考察了回流、超声提取，发现两者提取率差异不明显，但后者更简便易行。考察了提取溶剂甲醇、70%甲醇、1%盐酸甲醇、甲醇-1% HCl (7:3)，发现甲醇、1%盐酸甲醇提取时提取率较低，色谱峰拖尾较严重；70%甲醇提取时盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱提取率较低，峰形较差；甲醇-1% HCl (7:3)提取时各成分提取率最高，并且杂质干扰少，色谱峰峰形良好。然后考察了提取时间20、30、40、50 min，发现在30 min时各成分已基本提取完全。最终确定，最优提取方法为甲醇-1% HCl (7:3)超声提取30 min。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第一册)[S]. 1989.

[2] 魏桂蓉. HPLC法测定风寒感冒颗粒中5-O-甲基维斯阿米醇苷的含量[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(1): 18-19.

[3] 胡飞凤. HPLC法测定风寒感冒颗粒中的陈皮苷含量[J]. 海峡药学, 2004, 16(5): 77-79.

[4] 秦 拢, 许红辉, 张永锋, 等. 风寒感冒颗粒质量标准的研究[J]. 中成药, 2006, 28(11): 1588-1589.

[5] 王兆龙, 许淑健, 秦 拢, 等. 反相高效液相色谱法测定风寒感冒颗粒中盐酸麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 中南药学, 2006, 4(4): 289-291.

[6] 汤 云, 岳 宁, 刘宏明. HPLC同时测定风寒感冒颗粒中葛根素和升麻素苷的含量[J]. 食品与药品, 2017, 19(4): 272-274.

[7] 张铁军, 白 钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法[J]. 药学学报, 2019, 54(2): 187-196; 186.

[8] 张 项, 蔺 千, 唐玉婷. HPLC波长切换法同时测定小儿清热止咳口服液液中8种成分的含量[J]. 中国药师, 2019, 22(8): 1531-1534.

[9] 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.

[10] 徐 容. 关防风HPLC特征指纹图谱研究及4个色原酮类成分一测多评法分析研究[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3): 458-466.

[11] 崔庆德, 李海燕, 业艳芬. HPLC法同时测定舒肝健胃丸7种成分的含量[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(9): 1038-1041.

[12] 王子凌云, 梁 琨, 李国文. HPLC法测定芩杏清热止咳颗粒中8种成分[J]. 中成药, 2019, 41(5): 995-999.

[13] 费 龙, 文 煜, 毛晓丽. UPLC波长切换法同时测定小青龙颗粒中9种成分的含量[J]. 中国药师, 2019, 22(9): 1757-1760.

[14] 施崇精, 袁强华, 谢 凡, 等. HPLC法同时测定加味四妙颗粒中6种成分[J]. 中成药, 2019, 41(2): 266-269.