

# 双波长 HPLC 同时测定防风通圣丸中 7 个成分的含量

郭琪, 李向阳, 李桂本

(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

**[摘要]** **目的:**建立防风通圣丸中栀子苷、连翘苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵 7 个成分的高效液相色谱测定方法。**方法:**采用 phenomenex Luna 5u-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长分别为 234, 254 nm。**结果:**栀子苷、连翘苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵 7 个成分在相应的范围内线性关系良好, *r* 不低于 0.999 1; 平均回收率 97.3% ~ 99.8%; RSD 均 < 2.0。**结论:**经方法学验证, 本方法简单、快速、灵敏、准确, 可用于防风通圣丸中栀子苷、连翘苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵 7 个成分的含量测定。

**[关键词]** 防风通圣丸; 栀子苷; 连翘苷; 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷; 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 甘草酸铵

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0079-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150079

**Simultaneous Determination of Seven Compounds in Fangfeng Tongsheng Pill by HPLC** GUO Qi, LI Xiang-yang, LI Gui-ben (Henan Provincial Institute of Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an HPLC method for simultaneous determination of geniposide, phillyrin, 5-*O*-methylvisammioside, baicalin, baicalein, wogonin, and ammonium glycyrrhizinate in Fangfeng Tongsheng pill. **Method:** The chromatographic separation was on phenomenex Luna 5u-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of methanol (A) -0.1% phosphoric acid solution (B) in a gradient mode at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelengths were 234 nm and 254 nm. **Result:** Within the linear range of geniposide, phillyrin, 5-*O*-methylvisammioside, baicalin, baicalein, wogonin, ammonium glycyrrhizinate, the correlation coefficients were larger than 0.999 1. The average recoveries of the seven components were in the range of 97.3% -99.8%. RSD were less than 2.0%. **Conclusion:** By method validation, this method is proved to be simple, rapid, sensitive and accurate. It can be used to determine the contents of geniposide, phillyrin, 5-*O*-methylvisammioside, baicalin, baicalein, wogonin, and ammonium glycyrrhizinate in Fangfeng Tongsheng pill.

**[Key words]** Fangfeng Tongsheng pill; geniposide; phillyrin; 5-*O*-methylvisammioside; baicalin; baicalein; wogonin; ammonium glycyrrhizinate

防风通圣丸属于解表类中成药, 由防风、荆芥穗、薄荷、麻黄、大黄、芒硝、栀子、滑石、桔梗、石膏、川芎、当归、黄芩、连翘、甘草、白芍、白术(炒)共计 17 味中药组成。方中以防风、麻黄、芥穗、薄荷疏风解表, 使风邪从汗而解; 以大黄、芒硝泻热通便, 使里热积滞从大便而解; 配滑石、栀子清湿利尿, 引邪热从小便排出; 用黄芩、石膏、连翘清泻肺胃积热; 加入川芎、白芍、当归养血和血, 白术健脾燥湿, 甘草调和诸药。各药配合, 共起解表通里、散风清热之效。该

方最早来源于金代名医刘完素的《宣明论方》, 现收载于《中国药典》2010 年版一部<sup>[1]</sup>, 具有清热解毒、解表通里的作用, 传统用于外寒内热、表里俱实、恶寒壮热、头痛咽干、小便短赤、大便秘结、风疹湿疮等, 现代临床上把防风通圣丸又进行一些引申应用, 治疗肥胖、神经痛、支气管哮喘、细菌性痢疾、多发性疮肿、副鼻窦炎、皮肤病、尿路感染等, 取得了一定的疗效<sup>[2-4]</sup>。

目前已有文献报道 HPLC 测定防风通圣丸中的

5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、连翘苷等有效成分<sup>[5-6]</sup>,但由于组成复方的药味较多,化学成分比较复杂,若只采用单一指标成分进行评价,不能全面反映药品内在质量。本文采用 HPLC-DAD 同时测定防风通圣丸中的栀子苷、连翘苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵的含量,可为防风通圣丸的产品质量控制分析提供试验依据。

### 1 材料

1260 型液相色谱仪(配置四元泵,真空二极管阵列检测器 DAD,美国 Agilent),AE240 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 Mettler 公司),ASS150 型超声波提取器(济宁科技超声电子有限责任公司)。

栀子苷(批号 110749-200613),连翘苷(批号 110821-200610),5-*O*-甲基维斯阿米醇苷(批号 111523-200405),黄芩苷(批号 110715-200514),黄芩素(批号 111595-200604),汉黄芩素(批号 111514-200403),甘草酸铵(批号 110731-200614)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司),水为超纯水,其余试剂为分析纯。防风通圣丸(厂家代码 JHT,批号 14011811;厂家代码 ZY,批号 130313;厂家代码 YD,批号 130503)均购自郑州药店。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** phenomenex Luna 5u-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 20 min, 25%

A; 20 ~ 45 min, 25% ~ 40% A; 45 ~ 60 min, 40% ~ 60% A; 60 ~ 105 min, 60% ~ 90% A),柱温 30 ℃,流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵检测波长 254 nm,栀子苷、连翘苷检测波长 234 nm,进样量为各 10 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别取栀子苷、连翘苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释,制成质量浓度分别为 9.5, 16.2, 12.8, 322.4, 72.8, 58.32, 19.6 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,冷藏,备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 取防风通圣丸适量,研细,精密称取约 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声提取(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失质量,过滤,即得。

**2.4 线性关系考察** 分别精密吸取 2.2 项下对照品溶液 1, 2, 3, 5, 8, 10 μL,依次注入液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进行测定。分别以栀子苷、连翘苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵的质量浓度(mg·L<sup>-1</sup>)为横坐标,各峰面积为纵坐标绘制标准曲线,结果见表 1;以仪器的信噪比 S/N 为 10 时测定最低定量限(LOQ),信噪比 S/N 为 3 时测定最低检测限(LOD),结果见表 1。各对照品及样品色谱图见图 1。结果表明,7 个化合物均有较好的线性关系。

表 1 7 个成分的标准曲线方程、相关系数和线性范围

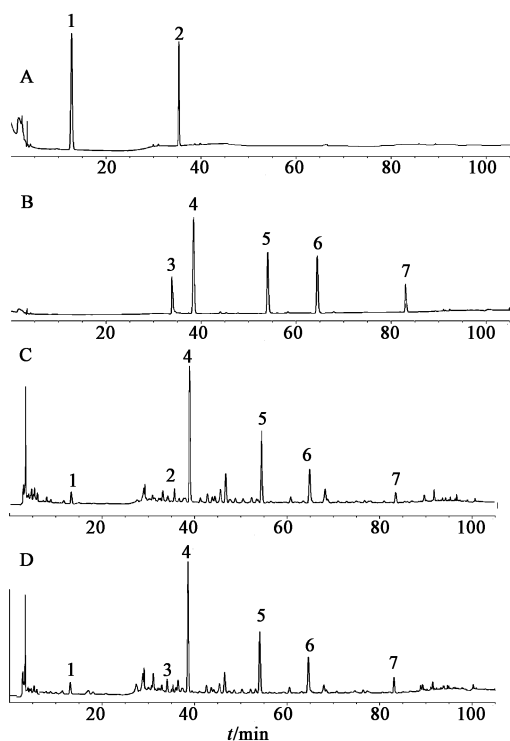
Table 1 Regression equations, correlation coefficients, and linear ranges of seven constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/mg·L <sup>-1</sup>	LOQ/mg·L <sup>-1</sup>	LOD/mg·L <sup>-1</sup>
栀子苷	$Y = 1\ 532X + 12.53$	0.999 1	0.95 ~ 9.5	0.285	0.095
连翘苷	$Y = 2\ 284X - 3.44$	0.999 3	1.62 ~ 16.2	0.243	0.081
5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇苷	$Y = 2\ 356X - 11.68$	0.999 6	1.28 ~ 12.8	0.288	0.096
黄芩苷	$Y = 3\ 572X - 67.7$	0.999 8	32.24 ~ 322.4	0.081	0.027
黄芩素	$Y = 2\ 640X - 28.57$	0.999 6	7.28 ~ 72.8	0.104	0.036
汉黄芩素	$Y = 2\ 431X - 87.63$	0.999 7	5.832 ~ 58.32	0.087	0.029
甘草酸铵	$Y = 2\ 073X - 94.47$	0.999 4	1.96 ~ 19.6	0.088	0.029

**2.5 精密度试验** 分别精密吸取对照品溶液 10 μL,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,以峰面积计算,结果栀子苷、连翘苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.9%, 0.6%, 0.4%, 0.6%, 0.9%,

0.74%。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液适量,室温下放置,在 2.1 项下色谱条件下分别在 0, 2, 8, 12, 24 h 进样测定,以峰面积计算,测得供试品溶液中栀子苷、连翘苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、



A. 对照品(234 nm); B. 对照品(254 nm); C. 供试品(234 nm); D. 供试品(254 nm); 1. 栀子苷; 2. 连翘苷; 3. 5-O-甲基维斯阿米醇苷; 4. 黄芩苷; 5. 黄芩素; 6. 汉黄芩素; 7. 甘草酸铵

图 1 防风通圣丸 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Fangfeng Tongsheng pill

黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵 7 个成分峰面积的 RSD 分别为 0.9% , 1.1% , 0.8% , 0.4% , 0.7% , 0.6% ,

表 2 防风通圣丸中 7 个成分的回收率试验

Table 2 Results of recovery in seven constituents of Fangfeng Tongsheng pill

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
栀子苷	0.511 4	0.058 8	0.047 5	0.105 0	97.26	97.3	1.2
	0.500 6	0.057 6	0.047 5	0.102 9	95.37		
	0.502 8	0.057 8	0.047 5	0.104 6	98.53		
	0.497 2	0.057 2	0.047 5	0.103 8	98.11		
	0.504 5	0.058 0	0.047 5	0.104 5	97.89		
	0.499 7	0.057 5	0.047 5	0.103 3	96.42		
连翘苷	0.511 4	0.088 0	0.081	0.167 5	98.15	98.1	1.7
	0.500 6	0.086 1	0.081	0.166 8	99.63		
	0.502 8	0.086 5	0.081	0.164 7	96.54		
	0.497 2	0.085 5	0.081	0.166 2	99.63		
	0.504 5	0.086 8	0.081	0.167 1	99.14		
	0.499 7	0.085 9	0.081	0.163 3	95.56		
5-O-甲基维斯阿米醇苷	0.511 4	0.078 2	0.064	0.142 7	100.78	98.8	2.0
	0.500 6	0.076 6	0.064	0.138 4	96.56		

0.9% ,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 取防风通圣丸(批号 14011811)样品,平行称取 6 份,每份 1.0 g,分别精密称定,按 2.3 项下方法制得供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定并计算待测成分的含量。结果,栀子苷、连翘苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵的质量分数平均值分别为 0.115, 0.172, 0.153, 4.03, 0.947, 0.729, 0.246 mg · g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 1.5% , 1.1% , 1.4% , 0.9% , 1.0% , 1.1% , 1.7% ,表明本方法重复性良好。

**2.8 回收率试验** 精密称取已知含量的防风通圣丸(批号 14011811)样品共 6 份,每份 0.5 g,分别加入 2.2 项下混合对照品溶液 5 mL 及甲醇 20 mL,按 2.3 项下方法制得供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进行测定,计算回收率。结果见表 2。

**2.9 样品测定** 取不同厂家批次的防风通圣丸各 1.0 g,分别精密称定,按 2.3 项下方法制得供试品溶液,在 2.1 项下色谱条件进行测定,计算各成分的含量。结果见表 3。

### 3 讨论

**3.1 样品提取条件的优化** 防风通圣丸的处方较大,化学成分复杂而且极性差异大<sup>[7-8]</sup>,因此,本试验从提取溶剂(不同浓度的甲醇)、提取方法(索氏提取、超声提取、回流提取)进行考察,发现,以甲醇超声提取为佳,7 个成分均能有效提取,且杂质成分

续表 2

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	
黄芩苷	0.502 8	0.076 9	0.064	0.141 7	101.25			
	0.497 2	0.076 1	0.064	0.139 1	98.44			
	0.504 5	0.077 2	0.064	0.139 2	96.88			
	0.499 7	0.076 5	0.064	0.139 8	98.91			
	0.511 4	2.061	1.612	3.657 5	99.04	99.1	0.6	
	0.500 6	2.017	1.612	3.601 9	98.32			
	0.502 8	2.026	1.612	3.624 3	99.15			
	0.497 2	2.004	1.612	3.618 5	100.16			
	0.504 5	2.033	1.612	3.630 2	99.08			
	0.499 7	2.014	1.612	3.609 3	98.96			
黄芩素	0.511 4	0.484 3	0.364	0.846 2	99.42	99.8	1.3	
	0.500 6	0.474 1	0.364	0.832 6	98.49			
	0.502 8	0.476 2	0.364	0.844 1	101.07			
	0.497 2	0.470 8	0.364	0.827 5	97.99			
	0.504 5	0.477 8	0.364	0.845 6	101.04			
	0.499 7	0.473 2	0.364	0.839 4	100.60			
	0.511 4	0.372 8	0.291 6	0.661 3	98.94	98.5	1.1	
	0.500 6	0.364 9	0.291 6	0.654 5	99.31			
	0.502 8	0.366 5	0.291 6	0.650 9	97.53			
	0.497 2	0.362 5	0.291 6	0.648 4	98.05			
汉黄芩素	0.504 5	0.367 8	0.291 6	0.659 1	99.90			
	0.499 7	0.364 3	0.291 6	0.647 8	97.22			
	0.511 4	0.125 8	0.098	0.220 8	96.94	98.3	1.8	
	0.500 6	0.123 1	0.098	0.218 9	97.76			
	0.502 8	0.123 7	0.098	0.221 4	99.69			
	0.497 2	0.122 3	0.098	0.216 6	96.22			
	0.504 5	0.124 1	0.098	0.223 1	101.02			
	0.499 7	0.122 9	0.098	0.219 3	98.37			
	甘草酸铵							

表 3 防风通圣丸样品中各成分含量测定 (n=3)

批号	栀子苷	连翘苷	5-O-甲基维斯 阿米醇苷	黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	甘草酸铵
14011811	0.115	0.172	0.153	4.03	0.947	0.729	0.246
130313	0.067	0.093	0.107	4.81	2.114	0.625	0.188
130503	0.133	0.181	0.148	3.57	1.492	0.675	0.142

相对较少,进而对超声提取时间、溶剂用量分析考察,最终选定以甲醇 25 mL 超声提取 30 min 作为供试品的提取方法。

3.2 流动相的考察 本实验对流动相的组成及不

同比例进行了考察,分别采用甲醇、乙腈、水、磷酸水的不同组合,结果发现,在流动相中加入一定比例的磷酸有利于提高待测组分与干扰峰的分度,且能在一定程度上改善峰形。经过对比,最终选取甲醇-

0.1%磷酸水作为流动相,并对梯度洗脱条件进行优化,使得待测组分与干扰峰分离度良好。

**3.3 波长的选择** 本实验采用二极管阵列检测器,参考药典中目标组分的检测波长,分别对目标成分的对照品溶液在200~400 nm进行了全波长扫描,结果发现,5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵均在254 nm波长处有吸收,且共同吸收较大,同时可排除杂质对目标组分的干扰;而栀子苷、连翘苷在234 nm波长下有理想的吸收值。故选择234,254 nm分别作为栀子苷、连翘苷及5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵的检测波长。

鉴于中成药组分的复杂性和多样性,有必要对中药复方制剂的主要有效成分进行多成分、多指标控制,从而可以较为全面的控制防风通圣丸的质量状况。栀子苷、连翘苷、5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、甘草酸铵分别是该方中栀子、连翘、防风、黄芩、甘草的主要成分<sup>[9-11]</sup>,本文采用了HPLC同时测定防风通圣丸中这7个成分的含量,使得一次检测可以同时评价方中5味药的质量,该方法分离效果理想、重复性好,可用于评价防风通圣丸的综合质量。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京:中国医药科技出版社,2010.

[2] 刘永平. 防风通圣丸的临床应用[J]. 内蒙古中医药, 2014(9):75-77.  
[3] 崔贤镒. 针刺联合防风通圣丸治疗肥胖症临床研究[J]. 中医学报,2014,29(4):603-604.  
[4] 屈沛,李鸿雁. 防风通圣丸治疗儿童舔口皮炎60例疗效分析[J]. 临床合理用药杂志,2013,6(5):81-82.  
[5] 李强,赵斌,李媛. HPLC法测定防风通圣丸中升麻素苷和5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量[J]. 齐鲁药事, 2012,31(9):525-526.  
[6] 侯志坚,师永清. 双波长HPLC同时测定防风通圣丸中栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):80-84.  
[7] 刘阿静,齐广才,刘珍叶,等. RP-HPLC法测定防风通圣丸中芍药苷、栀子苷、黄芩苷、连翘苷的含量[J]. 西北药学杂志,2012,27(5):415-417.  
[8] 吴玉,孙国祥,李晓稳. 防风通圣丸高效液相色谱数字化定量指纹图谱研究[J]. 中南药学,2012,10(11):842-845.  
[9] 朱德斌. HPLC法测定防风通圣丸中2个色原酮苷类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(16):113-115.  
[10] 尹浣姝,宋新波,刘晓明,等. 防风通圣丸质量标准研究[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(1):52-54.  
[11] 陈祥胜,凌桂梅,李梦. HPLC法测定防风通圣丸中黄芩苷的含量[J]. 山东中医杂志,2010,29(11):786-788.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,收取高额审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

②http://www.syfjxzz.com 为本刊唯一域名。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。