

HPLC 同时测定荆防颗粒中 6 种成分

刘雯¹, 李峰^{1*}, 孙春亮², 张雯雯²

(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东新时代药业有限公司, 山东临沂 273400)

[摘要] 目的: 建立同时测定荆防颗粒中升麻素苷、阿魏酸、柚皮苷、胡薄荷酮、蛇床子素、异欧前胡素 6 种成分的 HPLC 方法。方法: 采用 HPLC 法, ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃。结果: 6 种指标成分分离效果良好, 升麻素苷在 5.5 ~ 27.4 mg·L⁻¹, 阿魏酸在 6.5 ~ 32.3 mg·L⁻¹, 柚皮苷在 60.6 ~ 303.0 mg·L⁻¹, 胡薄荷酮在 0.48 ~ 2.4 mg·L⁻¹, 蛇床子素在 0.98 ~ 4.9 mg·L⁻¹, 异欧前胡素在 3.5 ~ 17.5 mg·L⁻¹ 线性关系良好; 平均加样回收率在 97.5% ~ 101.3%。结论: 该法准确、灵敏、可靠, 重复性较好, 可用于荆防颗粒的质量控制。

[关键词] 荆防颗粒; 升麻素苷; 阿魏酸; 柚皮苷; 胡薄荷酮; 蛇床子素; 异欧前胡素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0055-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016170055

Simultaneous Determination of Six Components in Jingfang Granule by HPLC

LIU Wen¹, LI Feng^{1*}, SUN Chun-liang², ZHANG Wen-wen²

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, College of Pharmacy, Ji'nan 250355, China;
2. Shandong New Time Pharmaceutical Factory, Linyi 273400, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of prim-*O*-glucosylcimifugin, ferulic acid, naringin, menthone, osthole, and isoimperatorin in Jingfang granules. **Method:** The chromatographic separation was achieved on a ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with acetonitrile-water as mobile phases for gradient elution, at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was 30 ℃. **Result:** The results showed that the six active components were well separated and showed good linear relationship within the following range, prim-*O*-glucosylcimifugin (5.5-27.4 mg·L⁻¹), ferulic acid (6.5-32.3 mg·L⁻¹), naringin (60.6-303.0 mg·L⁻¹), menthone (0.48-2.4 mg·L⁻¹), osthole (0.98-4.9 mg·L⁻¹), and isoimperatorin (3.5-17.5 mg·L⁻¹). The average recovery was between 97.5%-101.3%. **Conclusion:** This method is accurate, sensitive, credible and repeatable. It can be applied for the quality control of Jingfang granules.

[Key words] Jingfang granule; prim-*O*-glucosylcimifugin; ferulic acid; naringin; menthone; osthole; isoimperatorin

荆防颗粒的处方出自明朝张时彻《摄生众妙方》中所载荆防败毒散, 由荆芥、防风、柴胡、川芎、羌活、独活、前胡、茯苓、桔梗、枳壳、甘草共 11 味中药组成。荆防颗粒能够发汗解表, 散风祛湿, 主要用于风寒感冒, 证见恶寒无汗, 头痛身痛, 鼻塞清涕, 咳嗽白痰, 临床效果较为显著。荆防颗粒的现行标准

为卫生部标准 WS₃-B-0328-90, 载于《中药成方制剂》第 2 册, 其中只有性状项和颗粒剂检查项, 无法有效控制荆防颗粒的质量, 有必要增加含量测定项对其中的指标性成分进行测定。查阅相关文献, 焦灵利等^[1]采用 HPLC 法对荆防抗感泡腾片中升麻苷和 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷的含量进行了测定; 冉华

[收稿日期] 20160104(004)

[第一作者] 刘雯, 博士, 工程师, 从事中药质量控制及资源研究, Tel: 15163900639, E-mail: 15163900639@163.com

[通讯作者] * 李峰, 博士, 教授, 从事中药质量控制及资源研究, Tel: 13969141796, E-mail: 13969141796@163.com

康等^[2]采用 HPLC 法对复方荆防合剂中牛蒡苷的含量进行了测定;黄莉等^[3]利用 UV 法对荆防小儿止咳口服液中的总皂苷进行了含量测定,未见关于荆防颗粒含量测定的相关报道。由于中药及中药复方中所含组分较多,功效的产生是多组分协同作用的结果,因此单一组分的质量控制已不能满足需要,近年来多数学者采用多指标控制的方法^[4-6]。为了更全面、客观的评价荆防颗粒的质量,本文拟采用多指标控制法对其进行质量控制。通过组方分析、查阅相关文献^[7-9]、结合 2015 年版《中国药典》^[10]和笔者的前期工作,本文建立了波长转换同时测定荆防颗粒中升麻素苷(防风)、阿魏酸(川芎)、柚皮苷(枳壳)、胡薄荷酮(荆芥)、蛇床子素(独活)、异欧前胡素(羌活)6 种成分的 HPLC 法,可用于荆防颗粒的质量控制。

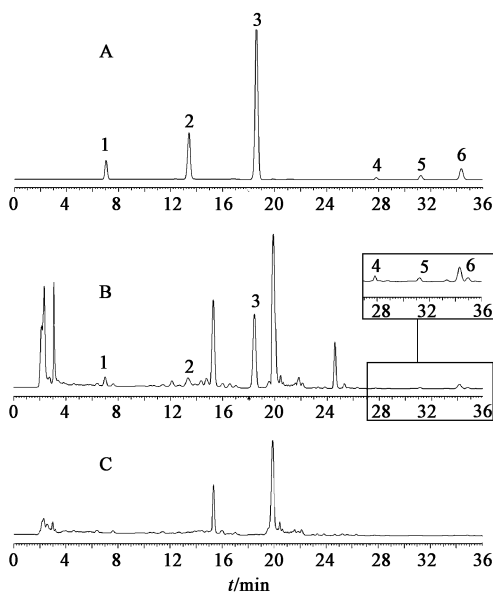
1 材料

L-2400 型高效液相色谱仪(包括四元泵,柱温箱,可变波长检测器,日本 Hitachi),MS105DU 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);水为蒸馏水,甲醇为分析纯,乙腈为色谱纯。对照品升麻素苷(批号 111522-201209,纯度 93.7%),阿魏酸(批号 110773-201313,纯度 99.6%),柚皮苷(批号 110722-201312,纯度 94.7%),胡薄荷酮(批号 111706-200602,纯度 100.0%),蛇床子素(批号 110822-201308,纯度 100.0%),异欧前胡素(批号 110827-201109,纯度 99.6%),均购自中国食品药品检定研究院。荆防颗粒(批号 0011403010,0011403038,0011404047,0011507021,0011507038)由山东新时代药业提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~4 min,16% A;4~10 min,16%~19% A;10~16 min,19%~21% A;16~16.1 min,21%~58% A;16.1~31 min,58% A;31~36 min,58%~80% A),进样量 10 μ L,柱温 30 $^{\circ}$ C,流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,波长转换条件(0~10 min,254 nm;10~16 min,321 nm;16~24 min,283 nm;24~30 min,252 nm;30~33 min,330 nm;33~36 min,310 nm)。在上述色谱条件下,混合对照品、荆防颗粒样品以及阴性样品的 HPLC 色谱见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸 6.48 mg,升麻素苷 5.84 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备溶液①;精密称取胡薄荷酮 4.82 mg,蛇床子素 9.76 mg,置 100



1. 升麻素苷;2. 阿魏酸;3. 柚皮苷;4. 胡薄荷酮;5. 蛇床子素;6. 异欧前胡素

图 1 混合对照品溶液(A),荆防颗粒供试品溶液(B)及阴性样品(C)HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed control solution (A), test solution (B) and negative sample (C)

mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备溶液②;精密称取异欧前胡素 8.80 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备溶液③;精密称取柚皮苷 6.40 mg,置 10 mL 量瓶中,精密吸取对照品储备溶液①,②,③各 1 mL 并入同一量瓶中,再加适量甲醇超声使柚皮苷溶解并加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品储备溶液。分别精密量取 100, 200, 300, 400, 500 μ L 混合对照品储备溶液,置 1 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得不同浓度的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取样品 10 袋,除去包装,精密称定,求得平均装量,然后取样品适量,研细,取约 10.0 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量后,超声 30 min,放冷,再称定质量,并用甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,将上清液滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性样品溶液的制备 按工艺方法制备缺少荆芥、防风、羌活、独活、川芎、枳壳的阴性样品,按 2.3 项下方法制备阴性样品溶液。

2.5 线性关系考察 将 2.2 项下 5 个不同浓度的混合对照品溶液注入高效液相色谱仪,进样量 10 μ L,测定峰面积,并以峰面积值(Y)对进样浓度(X)进行回归,分别计算标准曲线方程。结果见表 1。

表 1 6 种指标成分的线性关系

Table 1 Linear relation of 6 index compounds

成分	回归方程	r	线性范围 /mg·L ⁻¹
升麻素苷	$Y = 1.372 \times 10^4 X + 43\ 924$	0.999 8	5.5 ~ 27.4
阿魏酸	$Y = 3.830 \times 10^4 X + 3\ 536$	0.999 7	6.5 ~ 32.3
柚皮苷	$Y = 1.261 \times 10^7 X + 506\ 930$	0.999 9	60.6 ~ 303.0
胡薄荷酮	$Y = 1.620 \times 10^4 X - 1\ 385$	0.999 8	0.48 ~ 2.4
蛇床子素	$Y = 2.286 \times 10^4 X - 3\ 386$	0.999 7	0.98 ~ 4.9
异欧前胡素	$Y = 2.044 \times 10^4 X + 3\ 438$	0.999 8	3.5 ~ 17.5

2.6 精密度试验 精密吸取第 3 个浓度的混合对照品溶液 10 μL, 重复进样 6 次, 记录色谱图, 测得升麻素苷、阿魏酸、柚皮苷、胡薄荷酮、异欧前胡素、蛇床子素峰面积值, 计算峰面积的 RSD 分别为 0.1%, 0.2%, 0.1%, 0.4%, 0.6%, 0.3%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取 6 份批号为 0011403010 的样品, 分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 依法测定, 记录色谱图, 计算升麻素苷、阿魏酸、柚皮苷、胡薄荷酮、异欧前胡素、蛇床子素平均质量分数分别为 0.032, 0.014, 0.36, 0.002 3, 0.012, 0.002 3 g·L⁻¹, RSD 分别为 1.1%, 1.3%, 1.0%, 2.5%, 2.4%, 2.2%, 表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取重复性项下第 1 份供试品溶液, 在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 不同时间间隔点精密吸取 10 μL 进行分析, 升麻素苷、阿魏酸、柚皮苷、胡薄荷酮、异欧前胡素、蛇床子素峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 0.2%, 0.2%, 1.4%, 1.3%, 1.4%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 取批号为 0011403010 的样品, 研细, 取约 5.0 g, 精密称定, 平行称取 9 份, 分成 3 组, 分别按照样品已知含量的 80%, 100%, 120% 共 3 个水平加入混合对照品溶液, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL, 依法进样, 计算回收率。结果升麻素苷、阿魏酸、柚皮苷、胡薄荷酮、异欧前胡素、蛇床子素的平均回收率分别为 100.8%, 101.3%, 99.8%, 97.5%, 97.7%, 98.3%, RSD 分别为 2.0%, 2.1%, 1.9%, 2.3%, 2.9%, 3.0%, 表明本方法准确度良好。结果见表 2。

2.10 样品含量测定 取 5 批荆防颗粒样品, 分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下记录色谱图并用标准曲线法计算升麻素苷、阿魏酸、柚皮苷、胡薄荷酮、异欧前胡素、蛇床子素的含

表 2 荆防颗粒中 6 种成分的加样回收率试验 (n=3)

Table 2 Results of recovery tests of 6 compounds of Jingfang Granule (n=3)

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
升麻素苷	0.370	0.304	0.672	99.2	100.8	2.0
	0.370	0.380	0.753	100.7		
	0.370	0.456	0.837	102.5		
阿魏酸	0.370	0.137	0.509	101.8	101.3	2.1
	0.370	0.171	0.540	99.8		
	0.370	0.205	0.579	102.2		
柚皮苷	4.13	3.09	7.19	98.9	99.8	1.9
	4.13	3.87	8.04	101.0		
	4.13	4.64	8.74	99.4		
胡薄荷酮	0.026 7	0.021 3	0.047	96.9	97.5	2.3
	0.026 7	0.026 6	0.052	96.4		
	0.026 7	0.031 9	0.058	99.1		
蛇床子素	0.026 5	0.021 0	0.047	97.7	98.3	3.0
	0.026 5	0.026 2	0.052	97.2		
	0.026 5	0.031 5	0.058	100.1		
异欧前胡素	0.138	0.113	0.251	99.6	97.7	2.9
	0.138	0.141	0.275	96.7		
	0.138	0.169	0.302	96.9		

量, 结合平均装量计算每袋(标示装量 15 g)中所含指标成分的质量。结果见表 3。

表 3 荆防颗粒中 6 种指标性成分的质量分数

Table 3 Content of 6 index compounds in Jingfang Granule

批号	升麻素苷	阿魏酸	柚皮苷	胡薄荷酮	蛇床子素	异欧前胡素
0011403010	1.11	0.50	12.4	0.080	0.079	0.42
0011403038	0.96	0.51	12.3	0.089	0.088	0.44
0011404047	0.82	0.45	10.1	0.073	0.076	0.47
0011507021	1.05	0.57	11.9	0.062	0.091	0.55
0011507038	0.93	0.57	10.2	0.070	0.087	0.48

3 讨论

荆防颗粒对流感、感冒等病证初起时有显著疗效。本品种在市场中占有较大份额。由于缺乏有效质量标准的约束, 市场中的荆防颗粒质量不一, 价格相差较大。为保障人民群众用药的安全有效性, 为推广荆防颗粒的应用, 荆防颗粒标准的提高势在必行。近日国家食品药品监督管理局在网上发布了荆

防颗粒标准的征求意见稿,其中的含量测定项只测定了柚皮苷的含量,指标单一,难以满足需要。本文建立了 HPLC 测定荆防颗粒中 6 种指标性成分的方法,该方法简便易操作,结果准确可靠,可用于荆防颗粒的质量控制。

本方中荆芥、防风,取辛温而收,散风解表之功,增发汗之力,为君药;羌活、独活发散风寒湿邪,除头痛身痛,柴胡升清透表,川芎行血祛风,为臣药;桔梗、枳壳、前胡、茯苓分别有开肺、降气、祛痰、渗湿之效,共为佐药。甘草和中调药,兼助益气,为使药。本文在选择指标性成分时,参照 2015 年版《中国药典》^[10]中荆防颗粒有关单味药的含量测定标准,并结合君臣佐使及样品实际分析情况,最终确定了 6 味药材中的 6 个有效成分,分别为君药荆芥中的胡薄荷酮、防风中的升麻素苷、臣药羌活中的异欧前胡素、独活中的蛇床子素、川芎中的阿魏酸、佐药枳壳中的柚皮苷。

笔者对 2015 年版《中国药典》中 6 味药材的提取溶剂、流动相、检测波长等进行了梳理,因 6 味药材所用提取溶剂皆为甲醇,故选择甲醇为提取溶剂;提取方法大多为超声法,因此选择超声提取法;本文考察了提取时间,发现超声 30 min 提取率最高,增长时间提取率没有明显变化,因此选择超声 30 min;本文分别考察了甲醇-水流动相系统和乙腈-水流动相系统,结果发现乙腈-水系统下色谱峰形较好,因此选用乙腈-水系统;各种指标性成分最大吸收波长存在较大差异,笔者在初步确定了各组分出峰位置之后选择多波长转换法对 6 种组分进行测定,并选择检测波长后的“保持”功能,以消除波长转换引起的基线阶梯状漂移,此法可以让每个成分均在最大

吸收波长下进行测定,减小了测定误差。

[参考文献]

- [1] 焦灵利,狄留庆,姚仲青. 荆防抗感泡腾片的质量研究[J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(3): 182-183.
- [2] 冉华康,王益平,潘小华. HPLC 测定复方荆防合剂中牛蒡苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(2): 277-278.
- [3] 黄莉,夏新华. 荆防小儿止咳口服液中总皂苷含量测定[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(4):47-49.
- [4] 郭倩,田成旺,朱月信,等. HPLC 法同时测定疏风解毒胶囊中 7 种活性成分[J]. 中草药, 2015, 46(8):1174-1177.
- [5] 陈晓虎,苏晶,王慧,等. UPLC 法同时测定栀子金花丸中 11 种成分[J]. 中草药, 2014, 45(7): 955-959.
- [6] 王丽萍,曹英杰,段晓颖. HPLC 同步测定润肠通丸中 9 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(23): 50-54.
- [7] 牛晓静,鲁静,段晓颖,等. HPLC 同时测定健脾舒胃凝胶中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵 5 种成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2): 77-79.
- [8] 王洪成,尹海波,曹波,等. HPLC 同时测定不同产地野老鹳草中 5 种活性成分含量[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(4): 834-836.
- [9] 郭宏,张月辉. HPLC 法同时测定抗风湿类中成药中的 5 种糖皮质激素[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(9): 1721-1723.
- [10] 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,2015.

[责任编辑 顾雪竹]