

- [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 94-98, 102.
- [8] 赵川, 李俊萱, 陈山琼, 等. 没食子酸抗实验性肝纤维化作用机制[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(11): 1498-1501.
- [9] 马少华. 没食子酸对二甲亚硝胺致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2010.
- [10] 王恒, 宋良科, 汤昊, 等. 不同种质青果清热利咽化学组分的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 669-672.
- [11] 陈剑明, 张声声, 吴震宇, 等. 虎杖苷对非酒精性脂肪肝保护作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(5): 1188-1191, 插页XIV-插页XV.
- [12] 元飞, 刘玮, 黄平, 等. 白藜芦醇对大鼠酒精性脂肪肝的作用及机制研究[J]. 华西药理学杂志, 2016, 31(1): 41-42.
- [13] 杨庆宇, 郜娜. 白藜芦醇通过 miRNA-122 调节神经酰胺水平而治疗非酒精性脂肪肝[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(8): 1506-1513.
- [14] 刘涛, 徐秋玲, 赵岩. 大黄素抑制 NAFLD 大鼠肝脏 TLR4 信号表达的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(2): 201-205.
- [15] 张征波, 薛博瑜. 大黄素对非酒精性脂肪肝小鼠肝脂质沉积的作用及机制[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(9): 2423-2425.

HPLC 法同时测定温肾养肝颗粒中 4 种成分

胡玮¹, 顾丽亚², 周亚萍¹, 毛春芹², 陆兔林², 谈瑄忠^{1*}

(1. 南京市中医院, 江苏南京 210001; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定温肾养肝颗粒(肉苁蓉、乌药、白芍等)中 4 种成分的含有量。方法 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 AkzoNobel Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.2% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 238、330 nm。结果 去甲异波尔多定、松果菊苷、芍药苷、毛蕊花糖苷分别在 0.008 3~0.082 6 mg/mL ($r=0.999\ 8$)、0.021 4~0.213 8 mg/mL ($r=0.999\ 8$)、0.040 7~0.407 0 mg/mL ($r=0.999\ 6$)、0.005 9~0.058 7 mg/mL ($r=0.999\ 6$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.55%、99.85%、99.93%、100.17%, RSD 分别为 1.43%、1.31%、0.97%、1.22%。结论 该方法简便准确, 重复性好, 可用于温肾养肝颗粒的质量控制。

关键词: 温肾养肝颗粒; 去甲异波尔多定; 松果菊苷; 芍药苷; 毛蕊花糖苷; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)04-0756-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.04.009

Simultaneous determination of four constituents in Wenshen Yanggan Granules by HPLC

HU Wei¹, GU Li-ya², ZHOU Ya-ping¹, MAO Chun-qin², LU Tu-lin², TAN Xuan-zhong^{1*}

(1. Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Wenshen Yanggan Granules (*Cistanches Herba*, *Linderae Radix*, *Paeoniae Radix Alba*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic AkzoNobel Kromasil C₁₈ column (250 mm×4.6 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 238 nm and 330 nm. **RESULTS** Norisoboldine, echinacoside, paeoniflorin and acteoside showed good linear relationships within the

收稿日期: 2018-11-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81804022)

作者简介: 胡玮(1993—), 女, 硕士生, 从事中药质量标准及新药研发。Tel: 15951979398, E-mail: hwkeira@126.com

*通信作者: 谈瑄忠(1962—), 男, 研究员, 从事中药学及药事管理研究。Tel: (025) 52308543, E-mail: txz282@sohu.com

ranges of 0.008 3–0.082 6 mg/mL ($r = 0.999\ 8$), 0.021 4–0.213 8 mg/mL ($r = 0.999\ 8$), 0.040 7–0.407 0 mg/mL ($r = 0.999\ 6$) and 0.005 9–0.058 7 mg/mL ($r = 0.999\ 6$), whose average recoveries were 99.55%, 99.85%, 99.93% and 100.17% with the RSDs of 1.43%, 1.31%, 0.97% and 1.22%, respectively.

CONCLUSION This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Wenshen Yanggan Granules.

KEY WORDS: Wenshen Yanggan Granules; norisoboldine; echinacoside; paeoniflorin; acteoside; HPLC

温肾养肝颗粒由肉苁蓉、乌药、白芍、山药、钩藤、益智仁 6 味药材组成，具有温肾助阳、柔肝益气之功效，为南京市中医院临床经验方，主要用于治疗肾阳虚衰、肝血不足、脾虚气弱型帕金森氏病非运动症状^[1-2]。方中肉苁蓉为君药，补肾益精，主要成分为苯乙醇苷类，以松果菊苷和毛蕊花糖苷为代表^[3-6]，具有抗氧化、调节免疫、延缓衰老的作用^[6]；乌药抗炎镇痛，去甲异波尔定是其主要药效成分^[7]；白芍具有明显的免疫调节、镇静活性，其主要成分为芍药苷，对惊厥有拮抗作用^[8]。本实验建立 HPLC 法同时测定温肾养肝颗粒中上述 4 种成分的含有量，以期为该制剂临床应用安全、质量可控提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695 型高效液相色谱仪，配置 Waters 2998 检测器、Empower 色谱工作站（美国 Waters 公司）；Milli-Q Intergal 纯化系统（美国 Millipore 公司）；MS105DU 型电子分析天平（十万分之一，瑞士 Mettler-Toledo 公司）；FA1104 型电子分析天平（万分之一，上海精密科学仪器有限公司）。

1.2 试剂 去甲异波尔定（批号 111825-201402）、松果菊苷（批号 111670-201706）、芍药苷（批号 110736-201741）、毛蕊花糖苷（批号 111530-201512）对照品均购自中国食品药品检定研究院。温肾养肝颗粒（批号 180825、180826、180827，8 g/袋）由南京市中医院提供。磷酸为分析纯；乙腈为色谱纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[9-10] AkzoNobel Kromasil C₁₈ 色谱柱

（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.2% 磷酸（B），梯度洗脱（0~30 min，15%~85% A；30~33 min，35%~65% A；33~40 min，15%~85% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 238 nm（去甲异波尔定、芍药苷）、330 nm（松果菊苷、毛蕊花糖苷）；进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量，加甲醇制成每 1 mL 分别含去甲异波尔定、松果菊苷、芍药苷、毛蕊花糖苷 0.413、1.069、2.036、0.294 mg 的贮备液，精密量取适量，置于 5 mL 量瓶中，甲醇定容，摇匀，制成每 1 mL 分别含四者 0.082 6、0.213 8、0.407 1、0.058 7 mg，即得。

2.3 供试品溶液制备 取 1 袋颗粒，研细，精密称取 2 g 粉末，置于具塞锥形瓶中，精密加入 25 mL 50% 甲醇，密塞，称定质量，超声（100 W、40 kHz）30 min，放冷，50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得^[4]。

2.4 阴性样品溶液 按处方和工艺，分别制备缺肉苁蓉、乌药、白芍阴性样品，按“2.3”项下方法制备，即得。

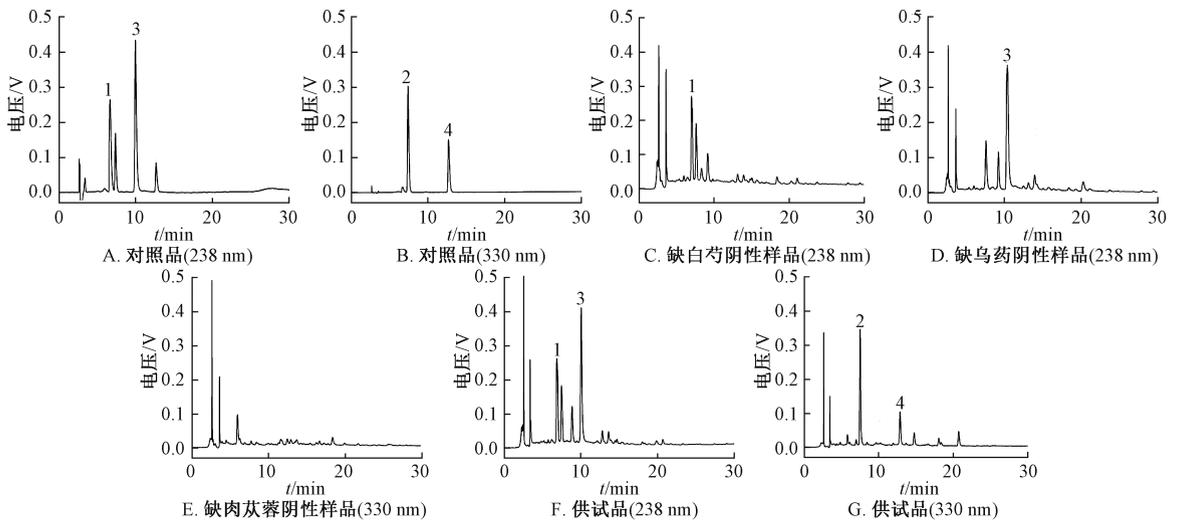
2.5 专属性试验 吸取对照品、供试品、阴性样品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由图可知，各成分分离度良好（>1.5），阴性无干扰，表明方法专属性良好。

2.6 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL，置于 1 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）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	线性范围/(mg·mL ⁻¹)	r
去甲异波尔定	Y=20 214 055X-5 019. 10	0.008 3~0.082 6	0.999 8
松果菊苷	Y=13 376 708X-21 077. 77	0.021 4~0.213 8	0.999 8
芍药苷	Y=14 989 114X-68 956. 14	0.040 7~0.407 0	0.999 6
毛蕊花糖苷	Y=18 959 067X-7 959. 17	0.005 9~0.058 7	0.999 6



1. 去甲异波尔多定 2. 松果菊苷 3. 芍药苷 4. 毛蕊花糖苷
1. norisoboldine 2. echinacoside 3. paeoniflorin 4. acteoside

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定6次，测得去甲异波尔多定、松果菊苷、芍药苷、毛蕊花糖苷峰面积RSD分别为1.7%、2.5%、2.3%、2.8%，表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液（批号180826），于0、3、6、9、12、24 h在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得去甲异波尔多定、松果菊苷、芍药苷、毛蕊花糖苷峰面积RSD分别为1.1%、2.3%、1.9%、1.3%，表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一批颗粒（批号180826）6份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得去甲异波尔多定、松果菊苷、芍药苷、毛蕊花糖苷含有量RSD分别为2.4%、1.3%、2.1%、1.6%，表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取各对照品适量，制成每1 mL分别含去甲异波尔多定、松果菊苷、芍药苷、毛蕊花糖苷0.493、1.281、2.443、0.369 mg的对照品溶液。再将颗粒（批号180826）研细，精密称取9份粉末，每份1 g，均分为3组，置于具塞锥形瓶中，分别加入对照品溶液0.8、1.0、1.2 mL，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样10 μL测定，计算回收率，结果见表2。

2.11 样品含有量测定 取3批颗粒，每批精密称

表2 各成分加样回收率试验结果 (n=9)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=9)

成分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
去甲异波尔多定	1.001 7	0.488	0.395	0.873	97.44	99.55 (1.43)
	1.003 2	0.480	0.395	0.880	101.49	
	1.005 2	0.497	0.395	0.897	101.49	
	1.010 3	0.498	0.493	0.984	98.50	
	1.009 6	0.482	0.493	0.976	100.32	
	1.005 7	0.493	0.493	0.979	98.68	
	1.013 8	0.507	0.591	1.089	98.43	
	1.002 5	0.486	0.591	1.079	100.25	
	1.007 6	0.474	0.591	1.062	99.32	
	松果菊苷	1.001 7	1.274	1.025	2.300	
1.003 2		1.280	1.025	2.324	101.88	
1.005 2		1.285	1.025	2.298	98.83	
1.010 3		1.295	1.281	2.563	98.98	
1.009 6		1.290	1.281	2.581	100.78	
1.005 7		1.287	1.281	2.549	98.49	
1.013 8		1.308	1.537	2.823	98.54	
1.002 5		1.278	1.537	2.807	99.46	
1.007 6		1.289	1.537	2.852	101.63	
芍药苷		1.001 7	2.431	1.954	4.374	99.43
	1.003 2	2.432	1.954	4.399	100.68	
	1.005 2	2.434	1.954	4.370	99.09	
	1.010 3	2.453	2.443	4.864	98.73	
	1.009 6	2.442	2.443	4.897	100.53	
	1.005 7	2.439	2.443	4.849	98.65	
	1.013 8	2.467	2.932	5.387	99.58	
	1.002 5	2.430	2.932	5.393	101.05	
	1.007 6	2.434	2.932	5.395	101.00	
	毛蕊花糖苷	1.001 7	0.354	0.295	0.648	99.66
1.003 2		0.360	0.295	0.652	98.71	
1.005 2		0.362	0.295	0.661	101.32	
1.010 3		0.375	0.369	0.750	101.63	
1.009 6		0.369	0.369	0.733	98.97	
1.005 7		0.365	0.369	0.737	100.81	
1.013 8		0.387	0.443	0.825	98.87	
1.002 5	0.353	0.443	0.803	101.74		
1.007 6	0.367	0.443	0.809	99.82		

取 2 g, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 计算含有量, 结果见表 3。

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

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

批号	去甲异波尔多定	松果菊苷	芍药苷	毛蕊花糖苷
180825	0.487	1.272	2.430	0.358
180826	0.490	1.283	2.441	0.367
180827	0.491	1.279	2.437	0.359

3 讨论

3.1 检测波长选择 本实验对对照品溶液进行扫描 (200~400 nm), 发现在 330 nm 波长处松果菊苷、毛蕊花糖苷有最大吸收, 而在 238 nm 波长处芍药苷、去甲异波尔多定响应值较高, 峰形理想。

3.2 流动相选择 参照文献 [9-15], 本实验比较了甲醇-水、乙腈-三乙胺、甲醇-磷酸、乙腈-0.1%/0.2% 磷酸、甲醇/乙腈-甲酸等流动相, 发现乙腈-0.2% 磷酸分离效果较好, 可达到分离度要求。

3.3 样品处理方法选择 参考文献 [9-15], 本实验比较了不同体积分数甲醇 (50%、70%、80%) 和乙醇 (50%), 发现 50% 甲醇提取时峰形较好, 杂质较少。然后, 比较了不同提取方式 (超声、回流) 和提取时间 (20、30、40 min), 发现超声 30 min 时即可提取完全。

参考文献:

[1] 高宇宏, 柯尊记. 肉苁蓉治疗阿尔茨海默病药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(1): 109-112.

[2] 姜 昆. 苁蓉颗粒治疗帕金森病非运动症状的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.

[3] 李 刚, 朱文斌, 牛 飞, 等. 肉苁蓉苯乙醇苷对大鼠精子体外氧化损伤的保护作用研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2205-2207.

[4] 周亚萍, 陆兔林, 毛春芹, 等. HPLC 法同时测定芪术益气润肠颗粒中 6 种成分含量[J]. 中药材, 2016, 39(1): 127-130.

[5] 薛海燕, 焦媛媛, 姚 军. 肉苁蓉总苷药理作用的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(4): 486-488.

[6] 骆 新, 李建英, 许永华, 等. 肉苁蓉苯乙醇苷对大鼠高原脑水肿的防治作用[J]. 中南药学, 2014, 12(8): 747-750.

[7] 邢梦雨, 田崇梅, 夏道宗. 乌药化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(12): 2147-2151.

[8] 张 利. 白芍的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究, 2014, 6(29): 25-26.

[9] 臧文怡, 毛春芹, 苏晓楠, 等. HPLC 同时测定益经颗粒中芍药苷、阿魏酸、毛蕊花糖苷和斯皮诺素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 60-63.

[10] 张 岩. 高效液相色谱法测定宽肠理气汤中松果菊苷和毛蕊花糖苷[J]. 中草药, 2010, 41(12): 1994-1995.

[11] 周 珺, 王 登, 张 黎, 等. HPLC 法测定当归芍药散中芍药苷的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(30): 4255-4257.

[12] 华之卉, 刘 栋, 李明春. HPLC 法同时测定金兰消炎片中 4 种成分[J]. 中成药, 2018, 40(5): 1097-1100.

[13] 林 林, 刘广楨, 尹宁宁. HPLC 法测定金匮肾气丸中马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷和丹皮酚[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2137-2140.

[14] 杨 华, 易小兰, 谢金华, 等. HPLC 同时测定四磨汤口服液辛弗林、槟榔碱和去甲异波尔多定的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 79-81.

[15] 陈建忠, 俞桂新, 杨 莉, 等. 乌药中异喹啉生物碱去甲异波尔多定的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2774-2776.