

[质 量]

## HPLC法同时测定外感风痧颗粒中9种成分

刘雯<sup>1</sup>, 郭海蛟<sup>1</sup>, 刘进宝<sup>2</sup>, 罗宇东<sup>3</sup>, 王先军<sup>1</sup>, 周丽园<sup>1</sup>, 覃洁萍<sup>1\*</sup>

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530001; 2. 广西国际壮医医院, 广西南宁 530200; 3. 广西中医药大学制药厂, 广西南宁 530023)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定外感风痧颗粒(苍耳草、狗仔花、山芝麻等)中原儿茶酸、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的含有量。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 273、327 nm。对 10 批样品进行聚类分析、主成分分析。结果 9 种成分在各自范围内线性关系良好( $r>0.999\ 0$ ), 平均加样回收率 95.6%~103.5%, RSD 1.9%~2.8%。10 批样品被聚为 3 类, 前 2 个主成分累积贡献率达 91.936%。结论 该方法准确、灵敏、可靠, 重复性好, 可用于外感风痧颗粒的质量控制。

**关键词:** 外感风痧颗粒; 化学成分; HPLC; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)08-1987-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.08.005

## Simultaneous determination of nine constituents in Waigan Fengsha Granules by HPLC

LIU Wen<sup>1</sup>, GUO Hai-jiao<sup>1</sup>, LIU Jin-bao<sup>2</sup>, LUO Yu-dong<sup>3</sup>, WANG Xian-jun<sup>1</sup>, ZHOU Li-yuan<sup>1</sup>, QIN Jie-ping<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning 530200, China; 3. Pharmaceutical Factory, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of protocatechuic acid, neochlorogenic acid, protocatechuic aldehyde, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C in Waigan Fengsha Granules [*Xanthium sibiricum* Patr. ex Widder, *Vernonia patula* (Ait.) Merr., *Helicteris angustifolia* L., etc.]. **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 25 °C thermostatic Hypersil C<sub>18</sub> 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 273, 327 nm. Cluster analysis and principal component analysis were conducted in ten batches of samples. **RESULTS** Nine constituents showed good linear relationships within their own ranges ( $r>0.999\ 0$ ), whose average recoveries were 95.6%–103.5% with the RSDs of 1.9%–2.8%. Ten batches of samples were clustered into three categories, the former two principal components demonstrated the accumulative contribution rate of 91.936%. **CONCLUSION** This accurate, sensitive, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Waigan Fengsha Granules.

**KEY WORDS:** Waigan Fengsha Granules; chemical constituents; HPLC; cluster analysis; principal component analysis

收稿日期: 2019-10-28

基金项目: 广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室项目(桂教科研[2014]6); 广西高校壮医药基础与应用研究重点实验室(厅级)科研课题项目(桂教科研[2016]6 zyyf201608)

作者简介: 刘雯(1984—), 女, 博士, 工程师, 从事中药成分分析及质量控制研究。E-mail: 123745789@qq.com

\* 通信作者: 覃洁萍(1962—), 女, 硕士, 教授, 从事中药成分分析及质量控制研究。E-mail: 594724071@qq.com

外感风痧颗粒为国家颁布标准品种、广西传统特色优势壮药,组方源自壮族民间验方,由苍耳草、狗仔花、藤苦参、山芝麻、岗梅、两面针6味药材配方而成,功效祛风清热,主治风热感冒、咽喉肿痛,但其现行标准中只有性状项和理化鉴别项,无法有效控制其质量。目前,关于该制剂质量控制的报道较少,仅涉及藤苦参、岗梅 TLC 定性鉴别及绿原酸含有量测定<sup>[1]</sup>。

本实验通过查阅文献 [2-8],对外感风痧颗粒中各药材所含成分进行分析,发现苍耳草主要含有酚酸、萜醌;藤苦参根中主要含有皂苷、糖类、甾醇等成分,其中强心苷是其主要药效物质;山芝麻根主要含有三萜;岗梅成分以三萜皂苷为主,也含有酚酸及少量甾体、单萜;两面针根主要含有生物碱、苯丙素、黄酮、三萜、酰胺等化合物;狗仔花含有苯丙素、甾体、脂肪醇、脂肪酸等成分。通过对照品比对、紫外光谱解析、文献 [9-11] 并结合课题组前期研究<sup>[12]</sup>,建立了 HPLC 法同时测定外感风痧颗粒中原儿茶酸、新绿原酸、隐绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 的含有量,再通过聚类分析、主成分分析对其进行化学计量学研究。

## 1 材料

Waters e2695 型高效液相色谱仪,配置四元泵、柱温箱、可变波长检测器(美国 Waters 公司);KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SQP 电子分析天平 [百万分之一,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。外感风痧颗粒共 10 批(批号 20180101、20180301、20180304、20180401、20180402、20180403、20190301、20190302、20190303、20190401),由广西中医药大学百年乐制药厂提供。原儿茶醛(批号 110810-201608,纯度 99.3%)、咖啡酸(批号 110885-201703,纯度 99.7%)、原儿茶酸(批号 110809-201205,纯度 99.9%)、绿原酸(批号 110753-201817,纯度 96.8%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;异绿原酸 B(批号 3089)、隐绿原酸(批号 3208)、新绿原酸(批号 6630)对照品均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司;异绿原酸 C(批号 RP180704),异绿原酸 A(批号 RP180903)对照品均购自成都麦德生科技有限公司。乙腈为色谱纯;甲醇为分析纯;水为纯净水。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 依利特 Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱

(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.2%磷酸,梯度洗脱(0~5 min, 8%乙腈;5~11 min, 8%~12%乙腈;11~25 min, 12%~21%乙腈;25~32 min, 21%~31%乙腈;32~33 min, 31%~100%乙腈;33~40 min, 100%乙腈);体积流量 1.0 mL/min;柱温 25 ℃;检测波长 273 nm(0~11.5、14~16 min)、327 nm(11.5~14 min、16~41 min);进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取原儿茶酸、新绿原酸、隐绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 对照品适量,甲醇制成各成分质量浓度分别为 0.073 4、0.189 0、0.183 2、0.037 2、0.192 0、0.016 1、0.106 4、0.307 6、0.292 4 mg/mL 的溶液,即得。

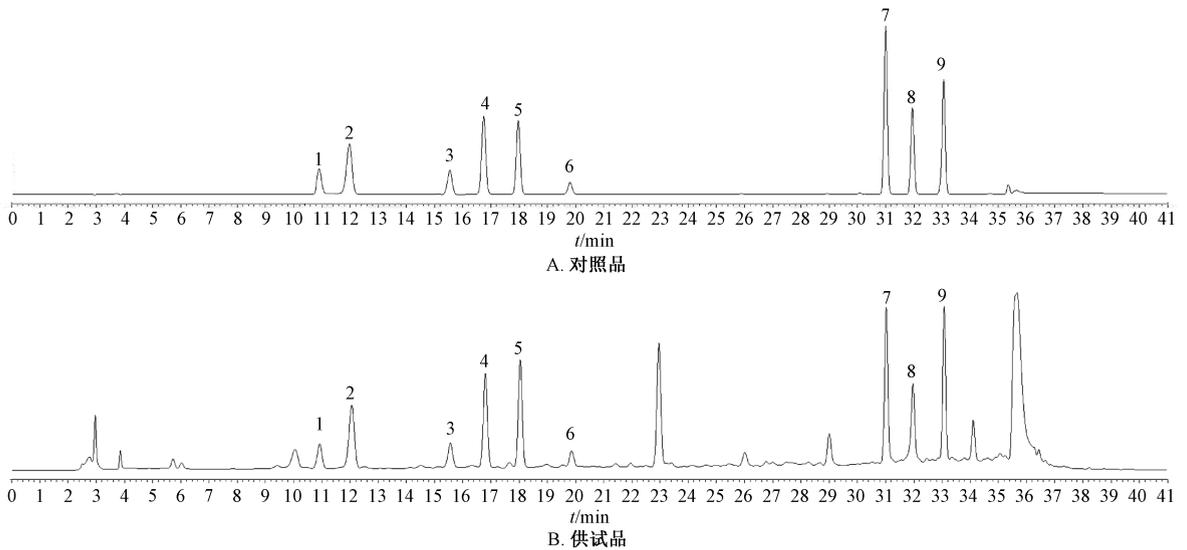
2.3 供试品溶液制备 取颗粒 10 袋,拆掉包装,倾出内容物,精密称定质量,计算平均装量。将颗粒研细后取约 10.0 g,精密称定,置于锥形瓶中,精密加入 25 mL 甲醇,称定质量,超声 40 min 后取出放冷至室温,甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.4 系统适用性、专属性考察 精密吸取对照品、供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,结果见图 1。由此可知,相邻组分分离度均大于 1.5,理论塔板数以最难分离的异绿原酸 C 色谱峰计,应不少于 3 000。

2.5 线性关系考察 精密量取对照品溶液 0.20、0.60、1.00、1.40、1.80 mL,置于 10 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 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。

2.6 精密度试验 取“2.5”项下对照品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次,每次 10 μL,测得原儿茶酸、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积 RSD 分别为 0.93%、0.24%、0.14%、0.12%、0.14%、0.14%、0.13%、0.14%、0.14%,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取 6 份颗粒(批号 20180301),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项下色谱条件各进样 10 μL 测定,测得原儿茶酸、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 含有量



1. 原儿茶酸 2. 新绿原酸 3. 原儿茶醛 4. 绿原酸 5. 隐绿原酸 6. 咖啡酸 7. 异绿原酸 B 8. 异绿原酸 A 9. 异绿原酸 C  
1. protocatechuic acid 2. neochlorogenic acid 3. protocatechuic aldehyde 4. chlorogenic acid 5. cryptochlorogenic acid 6. caffeic acid  
7. isochlorogenic acid B 8. isochlorogenic acid A 9. isochlorogenic acid C

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

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/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
原儿茶酸	$Y=22\ 726X-5\ 308.2$	0.999 1	1.47~13.16
新绿原酸	$Y=31\ 091X-18\ 259$	0.999 1	3.78~34.02
原儿茶醛	$Y=37\ 573X-705.4$	0.999 9	0.74~6.70
绿原酸	$Y=29\ 398X+18\ 288$	0.999 4	3.84~34.56
隐绿原酸	$Y=27\ 698X+15\ 105$	0.999 3	3.66~32.98
咖啡酸	$Y=58\ 591X+80.55$	1.000 0	0.32~2.90
异绿原酸 B	$Y=32\ 640X-151.4$	1.000 0	6.15~55.37
异绿原酸 A	$Y=32\ 799X+1\ 145.4$	1.000 0	3.21~28.87
异绿原酸 C	$Y=23\ 435X+1\ 619.8$	1.000 0	5.85~52.63

RSD 分别为 2.2%、1.1%、2.2%、1.7%、1.5%、3.0%、2.3%、3.1%、2.5%，表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液（批号 20180301），于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下各进样 10  $\mu\text{L}$  测定，测得原儿茶酸、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 峰面积 RSD 分别为 1.4%、1.7%、1.7%、2.5%、1.1%、2.6%、1.8%、2.6%、1.7%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 取 6 份颗粒（批号 20180301），每份约 5.0 g，精密称定，按照 100% 水平加入对照品溶液，按“2.3”项下方法制备供

试品溶液，在“2.1”项色谱条件下各进样 10  $\mu\text{L}$  测定，计算回收率。结果，原儿茶酸、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 平均加样回收率分别为 95.6%、100.7%、97.1%、97.6%、98.4%、101.4%、103.5%、102.5%、103.4%，RSD 分别为 2.1%、2.3%、2.8%、1.9%、2.4%、2.6%、2.6%、2.3%、2.5%。

2.10 样品含有量测定 取 10 批颗粒，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下各进样 10  $\mu\text{L}$  测定，计算每袋颗粒（标示装量 15 g）中各成分含有量，结果见表 2。

### 2.11 化学计量学研究

2.11.1 聚类分析 通过 SPSS 16.0 软件将表 2 数据进行标准化运算，以标准值为变量进行聚类分析，分析方法选用组间联接，度量标准选用“平方 Euclidean 距离”，标准化转换值选择“全距从 0 到 1”，结果见图 2。由此可知，10 批样品大体上被聚为 3 类，其中第 1 类包括 20180301、20180401、20190301、20190302、20190303、20190401，第 2 类包括 20180304、20180402、20180403，第 3 类包括 20180101。

2.11.2 主成分分析 将表 2 数据的标准化得分作为变量，通过 SPSS 16.0 软件进行主成分分析，结果见表 3~4。由表 3 可知，前 2 个主成分特征值

表 2 各成分含有量测定结果 (mg/袋)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/bag)

批号	原儿茶酸	新绿原酸	原儿茶醛	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	异绿原酸 B	异绿原酸 A	异绿原酸 C
20180101	0.53	1.43	0.25	2.09	2.30	0.10	1.90	1.02	2.61
20180301	0.51	1.35	0.26	1.62	1.89	0.14	1.86	0.96	2.35
20180304	0.69	1.54	0.30	2.10	2.41	0.13	2.18	1.18	2.91
20180401	0.47	1.20	0.16	1.45	1.74	0.14	1.69	0.89	2.10
20180402	0.60	1.50	0.26	1.95	2.32	0.15	2.27	1.18	2.96
20180403	0.52	1.44	0.25	1.88	2.24	0.15	2.12	1.09	2.79
20190301	0.53	1.36	0.26	1.80	2.03	0.12	1.81	0.97	2.40
20190302	0.48	1.38	0.18	1.68	1.95	0.14	1.80	0.92	2.39
20190303	0.48	1.42	0.19	1.75	2.04	0.14	1.88	0.97	2.49
20190401	0.46	1.35	0.18	1.63	1.89	0.14	1.86	0.94	2.34

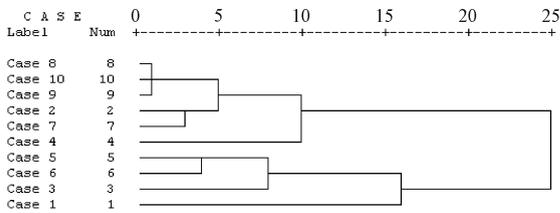


图 2 10 批样品聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis diagram for ten batches of samples

均大于 1, 累积方差贡献率达 91.936%, 基本可以反映各成分的全部信息。由表 4 可知, 主成分 2 主要反映咖啡酸含有量信息, 而主成分 1 主要反映其他 8 种成分含有量信息。

表 3 主成分特征值及贡献率

Tab. 3 Eigenvalues and contribution rates for principal components

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	6.906	76.734	76.734
2	1.368	15.202	91.936
3	0.438	4.869	96.805
4	0.161	1.787	98.592
5	0.106	1.176	99.769
6	0.018	0.203	99.972
7	0.001	0.015	99.987
8	0.001	0.012	99.999
9	0.000	0.001	100.000

表 4 主成分载荷矩阵

Tab. 4 Loading matrices for principal components

成分	主成分 1	主成分 2
原儿茶酸	0.890	-0.044
新绿原酸	0.939	0.050
原儿茶醛	0.839	-0.212
绿原酸	0.920	-0.338
隐绿原酸	0.971	-0.127
咖啡酸	-0.100	0.990
异绿原酸 B	0.919	0.370
异绿原酸 A	0.969	0.197
异绿原酸 C	0.972	0.178

将每个原始变量转换成标准化值后显示在 SPSS 16.0 软件中, 再将因子载荷矩阵中的系数除以 2 个主成分各自对应的特征根后开平方根, 即为主成分中每个指标所对应的系数。根据系数、标准化值结合软件的计算变量功能, 测定 2 个主成分的得分值, 并绘制得分图, 结果见图 3, 可知 10 批样品被分为 3 组, 与聚类分析结果一致。

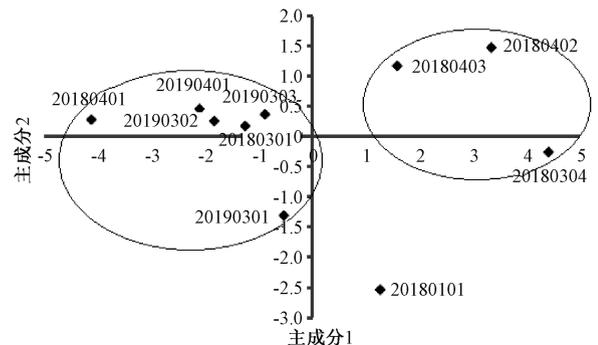


图 3 主成分分析得分图

Fig. 3 Score plot for principal component analysis

### 3 讨论

3.1 指标成分选择 本实验通过查阅相关文献发现, 外感风痧颗粒中各药材主要成分为酚酸、蒽醌、黄酮、三萜, 前期曾尝试检测蒽醌、三萜、黄酮, 但均未检出。因此, 本实验选择酚酸作为指标成分。

3.2 提取条件选择 本实验考察了提取方法 (回流、超声、冷浸)、提取溶剂 (甲醇、乙醇、70% 甲醇、50% 甲醇、纯水)、提取时间 (20、30、40、50 min), 发现甲醇超声 40 min 时提取率最高, 故以其为提取条件。

3.3 流动相系统选择 本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 冰醋酸、甲醇-0.2% 冰醋酸、甲醇-0.2% 磷酸、乙腈-0.2% 磷酸, 发现以乙腈-0.2% 磷酸洗脱时各成分分离度、峰型、对称因子

最佳,故以其为流动相。

3.4 检测波长选择 原儿茶酸、原儿茶醛最大吸收波长为273 nm,而其他成分均为327 nm。因此,本实验采用波长转换法,可使各成分均在其最大吸收波长下进行测定,从而提高了分析灵敏度,减小了测定误差。

3.5 化学计量学研究 聚类分析显示,10批样品大体上被聚为3类,第1类20180301、20180401、20190301、20190302、20190303、20190401,第2类20180304、20180402、20180403,第3类20180101;主成分分析显示,前2个主成分基本可反映各成分全部信息,能以其对样品质量进行控制,其中主成分2主要反映咖啡酸含有量信息,而主成分1主要反映其他8种成分含有量信息,与聚类分析结果一致。

#### 4 结论

本实验建立HPLC法同时测定外感风痧颗粒中原儿茶酸、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C的含有量,该方法准确、灵敏、可靠,重复性好,可用于该制剂的质量控制。

#### 参考文献:

[1] 罗宇东,陆施衡,谭安蕾,等.无糖型外感风痧颗粒质量

标准的研究[J].中国当代医药,2017,24(25):125-129.

- [2] 刘娟秀,罗益远,刘训红,等.不同采收期苍耳草中酚酸类及萜醌类成分的动态积累分析[J].中草药,2016,47(7):1204-1209.
- [3] 张琳,王叶飞,徐丽珍.藤苦参化学成分研究[J].中国药理学杂志,2007,42(6):420-422.
- [4] 郭新东,安林坤,徐迪,等.中药山芝麻的化学成分研究(I)[J].中山大学学报(自然科学版),2003,42(2):52-55.
- [5] 杜冰璽,杨鑫瑶,冯晓,等.岗梅的化学成分和药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2017,42(1):20-28.
- [6] 刘华钢,黄秋洁,赖茂祥.中药两面针的研究概况[J].时珍国医国药,2007,18(1):222-223.
- [7] 梁侨丽,闵知大.咸虾花化学成分的研究[J].中国中药杂志,2003,28(3):235-237.
- [8] 邱淮,陈新,章慧.咸虾花的化学成分研究[J].安徽农业科学,2018,46(4):181-183.
- [9] 苏丹,高玉桥,梅全喜.山芝麻药材中6个三萜类成分及总三萜的含量测定[J].时珍国医国药,2016,27(5):1038-1040.
- [10] 孙科,陈冉,陆世惠.双波长HPLC法同时测定两面针药材中5种成分的含量[J].中国药房,2017,28(3):393-396.
- [11] 刘娟秀,罗益远,刘训红,等.HPLC法同时测定苍耳类药材中酚酸及萜醌类成分的含量[J].天然产物研究与开发,2016,28(6):880-888.
- [12] 刘雯,郭海蛟,刘进宝,等.HPLC法同时测定外感风痧颗粒中4种成分[J].广西科学,2019,26(5):539-542.

## HPLC法同时测定紫白栓中9种成分

吴学辉,肖钦,肖淋,程心玲\*,潘艳琳  
(福建中医药大学附属人民医院药学部,福建福州350004)

**摘要:**目的 建立HPLC法同时测定紫白栓(紫草、大黄、白及等)中贝母兰宁、山药素Ⅲ、乙酰紫草素、 $\beta$ -乙酰氧基异戊酰阿卡宁、异丁酰紫草素、 $\beta$ 、 $\beta'$ -二甲基丙烯酰阿卡宁、异戊酰紫草素、芦荟大黄素、大黄素甲醚的含有量。方法 该药物70%甲醇提取液的分析采用Waters Symmetry C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相乙腈-0.1%甲酸,梯度洗脱;体积流量1.0 mL/min;柱温30  $^{\circ}$ C;检测波长254、275 nm。结果 9种成分在各自范围内线性关系良好( $r \geq 0.9991$ ),平均加样回收率96.98%~100.03%,RSD 0.72%~1.64%。结论 该方法简便、准确、可靠,可用于紫白栓的质量控制。

**关键词:**紫白栓;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)08-1991-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.08.006

收稿日期:2020-02-03

基金项目:福建省科技厅引导性项目(2018Y0043)

作者简介:吴学辉(1973—),男,副主任药师,从事药物质量控制等医院药学相关工作。Tel:(0591)86250178,13799327577

\*通信作者:程心玲(1964—),男,主任药师,从事药物质量控制等医院药学相关工作。Tel:(0591)83946560,13705915758,

E-mail:821614848@qq.com