

- 学学报, 2005, 22(2): 103-105.
- [3] 杨书彬, 王承. 龙胆化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医学报, 2005, 33(6): 54-56.
- [4] HE YM, ZHU S, GE YW, et al. The anti-inflammatory secoiridoid glycosides from *Gentianae Scabrae Radix*: the root and rhizome of *Gentiana scabra*[J]. *J Nat Med*, 2015, 69: 303-312.
- [5] 郭海凤, 朴惠顺. 关龙胆抗肿瘤活性实验研究[J]. 中药材, 2010, 33(6): 970-973.
- [6] 曾文雪, 宋小玲, 张尧, 等. 龙胆苦苷药理学活性及药动学研究进展[J]. 江西中医药, 2014, 45(375): 69-71.
- [7] LIAN LH, WU YL, WAN Y, et al. Anti-apoptotic activity of gentiopicroside in d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure [J]. *Chem-Biol Interact*. 2010, 188: 127-133.
- [8] WANG ZY, WANG CY, SU TT, et al. Antioxidant and immunological activities of polysaccharides from *Gentiana scabra* Bunge roots [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 112: 114-118.
- [9] 曾振兴, 高言明, 王健科, 等. 高效毛细管电泳测定龙胆草炮制前后龙胆苦苷的含量变化[J]. 贵阳中医学院学报, 2009, 31(5): 83-85.
- [10] 曹悦, 樊飞, 左代英, 等. 龙胆药材中 3 种功效成分含量的同时测定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1100-1101.
- [11] 许秋霞, 李小芳, 舒予, 等. 干燥方法对龙胆炮制品中龙胆苦苷含量的影响[J]. 中国药房, 2013, 24(7): 622-624.
- [12] 朱鹤云, 关皎, 郭小存, 等. RP-HPLC 法同时测定龙胆中 3 种活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(12): 2298-2301.
- [13] 赵万里, 许文, 丘建芳, 等. UFLC 同时测定泽泻中 6 种三萜类成分含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 64-68.
- [14] 李芙蓉, 陈世忠, 罗世恒, 等. UFLC 法测定茜草中羟基茜草素和大叶茜草素[J]. 中草药, 2010, 41(12): 2087-2089.
- (编辑: 梁进权)

HPLC 法同时测定银翘马勃散中 5 种有效成分的含量

梁德东^{1,2}, 马钦海^{1,2}, 宋 帅^{1,2}, 史春雨^{1,2}, 于青田^{1,2}, 侯玮婷^{1,2}, 罗佳波^{1,2}(1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 2. 南方医科大学广东省中药制剂重点实验室, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 建立同时测定银翘马勃散中绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷、次野鸢尾黄素 5 种成分含量的方法。**方法** 采用 HPLC 法。COSMOSIL 5 C₁₈-AR-II 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以甲醇-0.4%磷酸水为流动相, 梯度洗脱; 流速 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 272 nm。**结果** 绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷、次野鸢尾黄素的保留时间分别为 24.963, 39.996, 45.863, 47.983, 63.868 min; 线性范围分别为 0.992~9.92 ($r=0.9999$), 0.498~4.98 ($r=0.9996$), 2.66~26.6 ($r=0.9999$), 0.092~0.92 ($r=0.9998$), 0.0149~0.149 μg ($r=0.9997$); 平均加样回收率分别为 99.82%, 96.38%, 96.69%, 103.23%, 98.70%。**结论** 该方法简单、准确、稳定, 可用于银翘马勃散中绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷、次野鸢尾黄素的同时测定, 为银翘马勃散及其类方制剂的新药开发与质量评价提供参考。

关键词: 银翘马勃散; 绿原酸; 连翘酯苷 A; 牛蒡苷; 连翘苷; 次野鸢尾黄素; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)01-0096-0

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2017. 01. 020

Simultaneous Determination of Five Effective Components in Yinqiao Mabo Powder by HPLC

LIANG Dedong^{1, 2}, MA Qin Hai^{1, 2}, SONG Shuai^{1, 2}, SHI Chunyu^{1, 2}, YU Qingtian^{1, 2}, HOU Weiting^{1, 2}, LUO Jiabo^{1, 2} 上标

(1. School of Traditional Chinese Medical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515 Guangdong, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmaceuticals, Southern Medical University,

收稿日期: 2016-06-12

作者简介: 梁德东, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药药效学研究及质量控制。Email: 345580414@qq.com。通讯作者: 罗佳波, 男, 教授, 研究方向: 中药新药研究与复方配伍规律研究。Email: ljb@smu.edu.cn。

Guangzhou 510515 Guangdong, China)

加粗？

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, Forsythiaside A, Arctiin, Phillyrin and Irisflorelin in Yinqiao Mabo Powder. **Method** A COSMOSIL 5C18-AR-II column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, with methanol -0.4 % phosphoric acid as mobile phase in gradient elution, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, the detection wave length was 272 nm. **Result** The linear range of chlorogenic acid, Forsythiaside A, Arctiin, Phillyrin and Irisflorelin was 0.992 ~ 9.92 (r=0.9999), 0.498 ~ 4.98 (r=0.9996), 2.66 ~ 26.6 (r=0.9999), 0.092 ~ 0.92 (r=0.9998), 0.0149 ~ 0.149 μg (r=0.9997). The average recoveries were 99.82 %, 96.38 %, 96.69 %, 103.23 %, 98.70 %. **Conclusion** The method is convenient, accurate and stable for simultaneous determination of chlorogenic acid, Forsythiaside A, Arctiin, Phillyrin and Irisflorelin of Yinqiao Mabo Powder.

Keyword: Yinqiao Mabo Powder; Chlorogenic acid; Forsythiaside A; Arctiin; Phillyrin; Irisflorelin; HPLC

银翘马勃散出自清代温病学大家吴鞠通的代表著作《温病条辨》卷一上焦篇，由连翘、金银花、牛蒡子、射干、马勃 5 味药组成，具有清热、解毒、利咽的功效，为治疗“湿温喉阻咽痛”的常用方。银翘马勃散类方制剂对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、甲型链球菌等均具有抑制作用，并能抑制迟发性超敏免疫反应^[1]，且具有良好的抗病毒、抗炎、镇痛、解热等作用^[2]；银翘马勃散在临床上应用广泛，其原方或加减方对上呼吸道感染、急性咽喉炎、急性化脓性扁桃体炎、手足口病等有较好的疗效^[2-7]。目前尚未见银翘马勃散含量测定的报道。本研究首次建立了 HPLC 法同时测定银翘马勃散中绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷、次野鸢尾黄素 5 种有效成分的含量方法，为银翘马勃散的研究与开发提供参考。

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱仪，G1312B 型二元泵，G1329B 型自动进样器，G1315D DAD 型检测器，HP 化学工作站，美国 Agilent 公司；EYELA N-1100 型旋转蒸发仪，日本东京理化；JP-080ST 超声波清洗器，深圳洁盟清洗设备有限公司；DZX-6090B 型真空干燥箱，上海福玛实验设备有限公司；CP225D 型 1/10 万电子天平，德国赛多利斯公司。

绿原酸对照品(批号：110753-201415)、连翘酯苷 A 对照品(批号：111810-201001)、连翘苷对照品(批号：110821-200711)、牛蒡苷对照品(批号：110819-201510)、次野鸢尾黄素对照品(批号：111557-200602)，均购自中国食品药品检定研究院；色谱纯甲醇，超纯水，其余试剂均为分析纯。

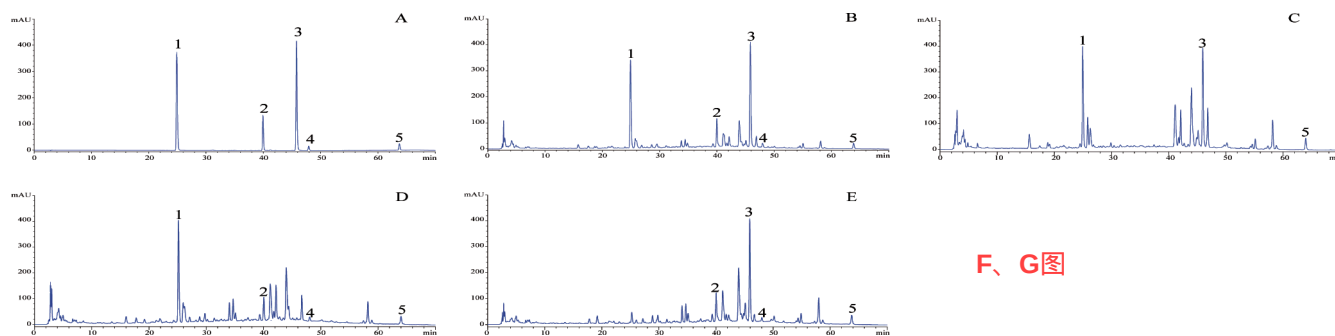
2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 COSMOSIL 5C18-AR-II 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)；以甲醇(A)-0.4 %磷酸水(B)溶液为流动相，洗脱梯度(0~10 min, 10~13 %A；10~60 min, 13~60 %A；60~70 min, 60 %A)；流速 1.0 mL·min⁻¹；检测波长为 272 nm；柱温 30 °C；进样量 10 μL。HPLC 色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷、次野鸢尾黄素对照品适量，加 50 % 甲醇制成质量浓度分别为 992.00, 498.00, 2660.00, 92.00, 14.90 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液与阴性样品溶液的制备 按照银翘马勃散原方比例称取各味药材(连翘 30 g, 牛蒡子 18 g, 金银花 15 g, 射干 9 g, 马勃 6 g)，粉碎为粗粉，加入 12 倍量水，浸泡 30 min，煎煮 15 min，共煎煮 2 次，4 层纱布过滤，合并滤液，60 °C 减压浓缩成浸膏。取浸膏 0.5 g，置 10 mL 量瓶中，以 50 % 甲醇溶解定容，超声提取 15 min，以 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得供试品溶液。同法分别制备缺连翘、牛蒡子、金银花、射干的阴性样品溶液与只含马勃的空白对照溶液。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取 2.2 项下的混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 mL 置 10 mL 量瓶中，加 50 % 甲醇定容，即得系列浓度的混合对照品溶液。按 2.1 项色谱条件分析，记录峰面积，以峰面积 Y 为纵坐标，进样量 X(μg)为横坐标，进行线性回归。得回归各成分的方程。绿原酸：Y=579.99X+20.244 (r=0.9999)，线性范围 0.992~9.92 μg；连翘酯苷 A：Y=308.21X+5.4148 (r=0.9996)，线性范围 0.498 ~



1. 绿原酸; 2. 连翘酯苷 A; 3. 牛蒡苷; 4. 连翘苷; 5. 次野鸢尾黄素; A. 对照品; B. 供试品; C. 缺连翘阴性对照; D. 缺牛蒡子阴性对照; E. 缺金银花阴性对照; F. 缺射干阴性对照; G. 马勃空白对照

图 1 银翘马勃散 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC chromatograms of Yinqiao Mabo Powder

4.98 μg ; 牛蒡苷: $Y=280.36X+38.18(r=0.9999)$, 线性范围 2.66~26.6 μg ; 连翘苷: $Y=346.69X+2.2712(r=0.9998)$, 线性范围 0.092 ~ 0.92 μg ; 次野鸢尾黄素: $Y=2511.3X+5.7247(r=0.9997)$, 线性范围 0.0149~0.149 μg 。表明 5 种成分在线性范围内均有良好的线性关系。同时以仪器的信噪比 S/N 为 10 时测定 5 种成分的最低定量限(LOQ), 得到绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷和次野鸢尾黄素的最低定量限分别为 1.76, 2.93, 3.51, 2.97, 0.42 ng。

2.5 精密度试验 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, 记录峰面积。结果绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷和次野鸢尾黄素峰面积的 RSD 分别为 1.2 %、1.0 %、1.3 %、1.4 %、1.4 %, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下条件分别进样, 结果绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷和次野鸢尾黄素峰面积的 RSD 分别为 1.4 %、1.7 %、1.8 %、1.8 %、1.1 %, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 结果绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷和次野鸢尾黄素峰面积的 RSD 分别为 0.9 %、1.7 %、1.1 %、0.7 %、1.1 %, 表明供试品在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的银翘马勃散浸膏 0.25 g, 共 6 份, 分别精密加入 5 种成分的对照品适量, 50 % 甲醇定容至 10 mL, 按 2.3 项下方法操作, 进样测定, 计算加样回收率。结果见表 1。

2.9 样品含量测定 按 2.3 项下方法制备 3 批供试品溶液, 按 2.1 项下条件分别进行测定, 5 种成分的含量

表 1 银翘马勃散中 5 种成分的加样回收率试验结果($n=6$)

Table 1 Result of recovery test of 5 components in Yinqiao Mabo Powder

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均回收 率值 /%	RSD /%
绿原酸	1.1512	1.1600	2.3024	99.24	99.82	0.37
	1.1512	1.1600	2.3126	100.12		
	1.1512	1.1600	2.3053	99.50		
	1.1512	1.1600	2.3118	100.05		
	1.1512	1.1600	2.3128	100.14		
连翘酯苷 A	1.1512	1.1600	2.3098	99.88	96.38	0.94
	0.5982	0.6220	1.1897	95.10		
	0.5982	0.6220	1.1987	96.54		
	0.5982	0.6220	1.2005	96.83		
	0.5982	0.6220	1.2026	97.17		
牛蒡苷	0.5982	0.6220	1.2028	97.21	96.69	0.26
	0.5982	0.6220	1.1918	95.43		
	3.1153	3.1400	6.1501	96.65		
	3.1153	3.1400	6.1435	96.44		
	3.1153	3.1400	6.1411	96.36		
连翘苷	3.1153	3.1400	6.1564	96.85	103.23	0.81
	3.1153	3.1400	6.1560	96.84		
	3.1153	3.1400	6.1610	97.00		
	0.1219	0.1220	0.2467	102.30		
	0.1219	0.1220	0.2491	104.30		
次野鸢尾黄素	0.1219	0.1220	0.2467	102.30	98.70	0.95
	0.1219	0.1220	0.2476	103.00		
	0.1219	0.1220	0.2484	103.70		
	0.1219	0.1220	0.2485	103.80		
	0.0195	0.0196	0.0387	97.80		
	0.0195	0.0196	0.0391	99.94		
	0.0195	0.0196	0.0388	98.46		

量测定结果见表 2。绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷和次野鸢尾黄素含量的 RSD 值分别为 2.72 %，3.01 %，2.29 %，2.94 %，1.56 %。

表 2 银翘马勃散中 5 种指标成分的含量(mg·g⁻¹，n=3)

样品	绿原酸		连翘酯苷 A		牛蒡苷		连翘苷		次野鸢尾黄素	
	含量	均数	含量	均数	含量	均数	含量	均数	含量	均数
1	3.013		2.624		16.481		1.080		0.252	
2	2.891	2.923	2.584	2.561	16.222	16.151	1.038	1.046	0.260	0.256
3	2.864		2.475		15.751		1.020		0.256	

3 讨论

银翘马勃散中君药连翘有清热解毒，消肿散结的功效，具有抗菌、抗病毒、抗炎、镇痛、解热等药理作用^[8]，其活性成分主要为连翘苷与连翘酯苷 A^[9-10]；金银花清热解毒、凉散风热，具有抗病原微生物、抗炎解热、调节免疫等作用，以绿原酸为代表的有机酸类化合物是其主要活性成分^[11]；牛蒡子有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽的功效，所含牛蒡苷具有抗炎、免疫调节、抗病毒等作用^[12]；射干清热解毒、消痰利咽，具有抗炎、抗菌、抗病毒等作用^[13]，以次野鸢尾黄素为代表的异黄酮类成分为其主要成分之一。这 5 种成分与银翘马勃散的功效主治密切相关，故选择他们作为测定对象。

《温病条辨》中记载银翘马勃散“服如银翘散法。杵为散，煎至香气大出，即取服。”参考前人制备银翘散水煎液及相关前处理方法^[14-15]，考察了供试品煎煮 15 min，30 min，60 min 时 5 种成分的含量，发现绿原酸、连翘酯苷 A 及牛蒡苷随着煎煮时间的增加而降低，连翘苷与次野鸢尾黄素的含量变化不明显，故确定煎煮时间为 15 min，这亦与《温病条辨》中“勿过煎”的说法相吻合。在制备对照品溶液的过程中发现，若以纯甲醇为溶剂，绿原酸与连翘酯苷 A 的峰形会出现前拖，故最终采用 50 % 甲醇来制备对照品溶液。

本研究考察了乙腈 - 水、甲醇 - 水、甲醇 - 0.2 % 磷酸水、甲醇 - 0.4 % 磷酸水作为流动相的梯度洗脱情况。结果发现，采用甲醇 - 0.4 % 磷酸水时各峰分离情况良好，峰形较理想。对 5 种成分进行了全波长扫描，绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷和次野鸢尾黄素的最大吸收波长分别为 327，330，

277，280，266 nm，通过 3D 图谱比较以及考虑各成分的含量与紫外吸收情况，发现在 272 nm 处各吸收峰的峰面积、峰形及分离度等指标较为理想，故选定 272 nm 作为检测波长。

本研究首次实现了对银翘马勃散水煎液中绿原酸、连翘酯苷 A、牛蒡苷、连翘苷和次野鸢尾黄素 5 种成分同时定量分析，基本涵盖了银翘马勃散中金银花、连翘、牛蒡子、射干的主要有效成分，较全面地控制其水提物的质量，且该方法简单、准确、稳定，可为银翘马勃散及其类方制剂的新药开发、质量控制研究提供参考。

参考文献：

[1] 张俊明, 郭晟, 方铝, 等. 银马抗病毒颗粒抗菌、抑制迟发性超敏免疫反应的实验研究[J]. 世界中医药, 2013, 8(7): 790-792.

[2] 郭光辉. 银马抗病毒颗粒治疗感冒(风热证)的临床观察[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2008: 9.

[3] 刘晓菲. 银翘马勃解毒颗粒治疗疱疹性咽峡炎湿热毒蕴证的临床研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2014: 1-17.

[4] 王平. 银翘马勃散加味在小儿热证中的应用[J]. 河北中医, 2008, 30(7): 727-728.

[5] 刘继萍, 汪莉莉, 王彦平. 加味银翘马勃散治疗小儿急性化脓性扁桃体炎[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(8): 1070-1071.

[6] 敖素华, 韦袁政. 胡天成教授运用银翘马勃散经验撷萃[J]. 四川中医, 2002, 20(1): 4-5.

[7] 孙长虎, 张敏. 银翘马勃散加减合安乃近治疗上呼吸道感染 84 例[J]. 河南中医, 2016(2): 325-326.

[8] 张炜, 张汉明, 郭美丽, 等. 连翘的药理学研究[J]. 中国现代应用药学, 2000, 17(1): 7-10.

[9] 魏晋宝, 杨光义, 陈欢, 等. 连翘苷的提取方法、药理毒理及药动学研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(12): 2144-2148.

[10] 刘文博, 李德朋, 张桂林, 等. 连翘酯苷药理活性研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 236-238.

[11] 王亚丹, 杨建波, 戴忠, 等. 中药金银花的研究进展[J]. 药物分析杂志, 2014(11): 1928-1935.

[12] 王璐, 赵烽, 刘珂. 牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展[J]. 中草药, 2008(3): 467-470.

[13] 钟鸣, 关旭俊, 黄炳生, 等. 中药射干现代研究进展[J]. 中药材, 2001, 24(12): 904-907.

[14] 薛鑫, 郑琴, 杨佳柳, 等. HPLC 法同时测定银翘散煎液中七种有效成分含量[Z]. 成都: 2013: 754-759.

[15] 束雅春, 秦昆明, 蔡皓, 等. 正交试验优选银翘散最佳传统煎煮工艺[J]. 中华中医药杂志, 2012(10): 2651-2655.

(编辑: 梁进权)

[14] 郑琴, 喻进, 薛鑫, 等. 银翘类方组分在不同制备工艺过程链传变规律的比较研究[J]. 中国药理学杂志, 2015(11): 935-940.