

# RP-HPLC法同时测定热感赛比斯坦颗粒中4种成分的含量<sup>Δ</sup>

翟欣<sup>1\*</sup>, 庞克坚<sup>2</sup>, 唐辉<sup>1#</sup>, 刘新豫<sup>1</sup>, 孙小雅<sup>1</sup>, 王亚乔<sup>1</sup>(1.石河子大学药学院/新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆石河子 832002; 2.和田维吾尔药业有限责任公司, 新疆和田 848200)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-2963-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.23

**摘要** 目的:建立同时测定热感赛比斯坦颗粒中没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Waters RP-C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm(没食子酸、迷迭香酸和甘草苷)、230 nm(甘草酸铵), 柱温为 28 ℃, 进样量为 20 μL。结果:没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵检测进样量线性范围分别为 0.274 4~7.546 μg ( $r=0.999\ 8$ )、0.187 0~5.143 μg ( $r=0.999\ 6$ )、0.130 0~3.575 μg ( $r=0.999\ 9$ )、0.254 0~6.985 μg ( $r=0.999\ 8$ ); 定量限分别为 2.67、1.36、1.09、2.11 ng, 检测限分别为 1.03、0.62、0.87、0.91 ng; 精密密度、稳定性、重复性试验的 RSD < 2.0%; 加样回收率分别为 97.26%~101.00% (RSD=1.1%,  $n=9$ )、97.66%~101.80% (RSD=1.3%,  $n=9$ )、97.45%~101.70% (RSD=1.4%,  $n=9$ )、97.74%~101.70% (RSD=1.4%,  $n=9$ )。结论:该方法简便、准确, 重复性好, 可用于热感赛比斯坦颗粒中没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵含量的同时测定。

**关键词** 热感赛比斯坦颗粒; 反相高效液相色谱法; 没食子酸; 迷迭香酸; 甘草苷; 甘草酸铵

## Simultaneous Determination of 4 Components in Regan Saibisitan Granules by RP-HPLC

ZHAI Xin<sup>1</sup>, PANG Kejian<sup>2</sup>, TANG Hui<sup>1</sup>, LIU Xinyu<sup>1</sup>, SUN Xiaoya<sup>1</sup>, WANG Yaqiao<sup>1</sup>(1.School of Pharmacy, Shihezi University/Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Recourses Utilization, Ministry of Education, Xinjiang Shihezi 832002, China; 2.Hotan Uygur Pharmaceuticals Co., Ltd., Xinjiang Hotan 848200, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of gallic acid, rosmarinic acid, liquiritin and ammonium glycyrrhetate in Regan saibisitan granules. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters RP-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.2% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were 210 nm (gallic acid, rosmarinic acid and liquiritin), 230 nm (ammonium glycyrrhetate). The column temperature was 28 ℃, and sample size was 20 μL. RESULTS: The linear ranges were 0.274 4-7.546 μg for gallic acid ( $r=0.999\ 8$ ), 0.187 0-5.143 μg for rosmarinic acid ( $r=0.999\ 6$ ), 0.130 0-3.575 μg for liquiritin ( $r=0.999\ 9$ ) and 0.254 0-6.985 μg for ammonium glycyrrhetate ( $r=0.999\ 8$ ), respectively. The LOQ were 2.67, 1.36, 1.09 and 2.11 ng, respectively. The LOD were 1.03, 0.62, 0.87 and 0.91 ng, respectively. RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 2.0%. The average recoveries were 97.26%-101.00% (RSD=1.1%,  $n=9$ ), 97.66%-101.80% (RSD=1.3%,  $n=9$ ), 97.45%-101.70% (RSD=1.4%,  $n=9$ ), 97.74%-101.70% (RSD=1.4%,  $n=9$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be applied for simultaneous determination of gallic acid, rosmarinic acid, liquiritin and ammonium glycyrrhetate in Regan saibisitan granules.

**KEYWORDS** Regan saibisitan granules; RP-HPLC; Gallic acid; Rosmarinic acid; Liquiritin; Ammonium glycyrrhetate

- [5] 曾金, 张志荣, 廖萍, 等. 隐丹参酮的药理作用研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(6): 1309-1313.
- [6] 王艳. 丹参酮 I 抗血管生成作用和机制研究[D]. 南昌: 南昌大学医学院, 2015.
- [7] 闫俊, 冯娟, 杨雪, 等. 丹参酮 II A 的药理作用及疾病治疗的最新进展[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(8): 972-977.
- [8] 王冰瑶, 吴晓燕, 樊官伟. 丹参素保护心血管系统的药理作用机制研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2571-2575.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1223-1224.
- [10] 杨九凌, 祝晓玲, 李成文, 等. 咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(8): 577-582.
- [11] 周丹, 刘艾林, 杜冠华. 迷迭香酸的药理学研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(7): 594-598.
- [12] 林超, 刘兆国, 钱星, 等. 丹酚酸 B 在心血管疾病中药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(4): 449-452.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81260627)

\* 硕士研究生. 研究方向: 药物分析. E-mail: 810347045@qq.com

# 通信作者: 教授, 博士. 研究方向: 药物分析及新药研究. 电话: 0993-2057878. E-mail: Tanghuishz@qq.com

(收稿日期: 2016-12-30 修回日期: 2017-04-22)

(编辑: 刘柳)

热感赛比斯坦颗粒(国药准字:Z65020143)是维吾尔民族治疗感冒的常用药,处方由破布木果、甘草、罂粟壳等中药组成,具有清除异常胆液质、止咳、化痰的功效,可用于治疗热性感冒咳嗽、呼吸道感染<sup>[1]</sup>。本制剂收载于1998年版《中华人民共和国卫生部药品标准(维吾尔药分册)》<sup>[2]</sup>中,该标准仅采用薄层色谱法对罂粟壳和罂粟子进行定性鉴别;也有文献对热感赛比斯坦颗粒中的吗啡、甘草苷和甘草酸铵分别进行含量测定的报道<sup>[3]</sup>,但目前还未见对方中君药破布木果进行含量测定的报道。维吾尔医认为,破布木果具有生湿生热、润肺润喉、止咳化痰、清音止渴、通便利尿的功效,主治干寒性或黑胆质性疾病<sup>[4-7]</sup>。鉴于此,本课题组采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立了测定热感赛比斯坦颗粒中破布木果和甘草的主要成分(没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵)含量的方法,以期为该制剂的质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

e2695型HPLC仪,包括2998二级管阵列检测器、717自动进样器、Empower色谱工作站(美国Waters公司);KH-300DE型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:40 kHz);BT125D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司)。

### 1.2 药品与试剂

热感赛比斯坦颗粒(新疆和田维吾尔药业有限责任公司,批号:20150602、20150711、20150910,规格:12 g/袋);没食子酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号:CAS#149-91-7,纯度:≥98%);迷迭香酸对照品(中国科学院成都生物研究所,批号:MUST-12020702,纯度:≥98%);甘草苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:11610-201106,纯度:≥98%);甘草酸铵对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110731-201418,纯度:≥98%);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为双蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters RP-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~7 min,6% A;7~11 min,6%→45% A;11~25 min,45%→80% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm(没食子酸、迷迭香酸、甘草苷)、230 nm(甘草酸铵);柱温:28 ℃;进样量:20 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取没食子酸、迷迭香酸、甘草苷、甘草酸铵对照品各适量,分别加乙腈溶解,制成质量浓度分别为0.823 0、0.501 0、0.390 0、

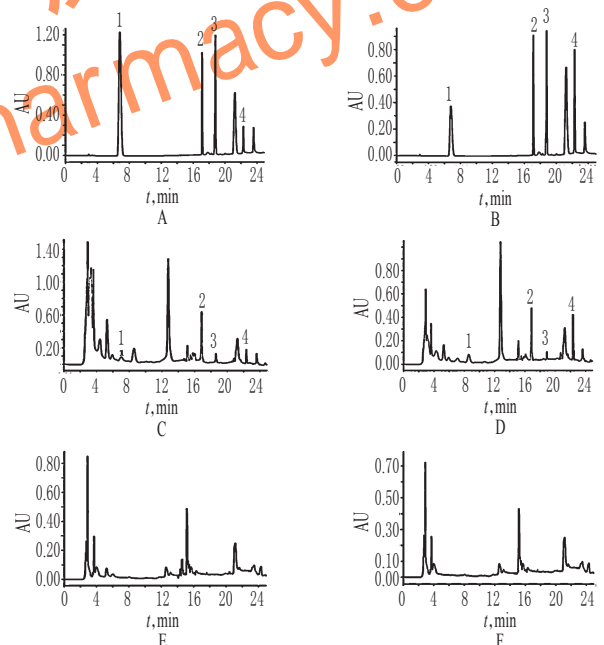
0.254 0 mg/mL的单一对照品溶液;取上述单一对照品溶液各适量,置于同一10 mL量瓶中,加乙腈定容,摇匀,制成没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵质量浓度分别为137.2、93.5、65.0、127.0 μg/mL的混合对照品溶液。于4 ℃下避光保存备用。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加75%甲醇溶液20 mL,称定质量,超声处理40 min,放至室温,再次称定质量,加75%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例,取不含破布木果和甘草的其余药材制备阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以没食子酸峰计≥5 000,没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵保留时间分别为6.932、17.160、18.810、22.320 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.混合对照品(210 nm);B.混合对照品(230 nm);C.供试品(210 nm);D.供试品(230 nm);E.阴性对照(210 nm);F.阴性对照(230 nm);1.没食子酸;2.甘草苷;3.迷迭香酸;4.甘草酸铵

A. mixed control (210 nm); B. mixed control (230 nm); C. test sample (210 nm); D. test sample (230 nm); E. negative control (210 nm); F. negative control (230 nm); 1. gallic acid; 2. glycyrrhizin; 3. rosmarinic acid; 4. ammonium glycyrrhizinate

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液2、10、20、30、40、55 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
没食子酸	$y=8.69 \times 10^4 x - 4.996 \times 10^4$	0.999 8	0.274 4~7.546
迷迭香酸	$y=3.80 \times 10^4 x + 4.639 \times 10^4$	0.999 6	0.187 0~5.143
甘草苷	$y=3.57 \times 10^4 x + 6.164 \times 10^4$	0.999 9	0.130 0~3.575
甘草酸铵	$y=1.177 \times 10^4 x + 3.888 \times 10^4$	0.999 8	0.254 0~6.985

## 2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD,结果见表2。

表2 LOQ与LOD测定结果(ng)

Tab 2 Determination results of LOQ and LOD(ng)

待测成分	LOQ	LOD
没食子酸	2.67	1.03
迷迭香酸	1.36	0.62
甘草苷	1.09	0.87
甘草酸铵	2.11	0.91

## 2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.48%、0.49%、0.35%、0.39%(n=6),表明仪器精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20150602)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.51%、0.95%、0.77%和0.62%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性较好。

## 2.8 重复性试验

取样品(批号:20150602)适量,共6份,每份5.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.81%、1.90%、0.98%和0.52%(n=6),表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

取样品(批号:20150602)适量,共9份,每份约0.5 g,精密称定,各置于10 mL量瓶中,分别加入低、中、高质量的没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	取样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
没食子酸	0.500 7	38.01	30.94	68.90	99.84	99.46	1.1			
	0.510 3	38.56	30.94	69.82	101.00					
	0.501 8	38.05	30.94	68.94	99.84					
	0.502 2	38.10	38.68	76.74	99.90					
	0.502 7	38.15	38.68	76.25	98.50					
	0.501 9	38.05	38.68	75.67	97.26					
	0.502 0	38.08	46.42	84.48	99.96					
	0.502 5	38.12	46.42	84.13	99.11					
	0.502 3	38.10	46.42	84.50	99.96					
	迷迭香酸	0.500 7	90.78	73.49	164.20			99.92	99.93	1.3
		0.510 3	93.07	73.49	167.90			101.80		
		0.501 8	91.98	73.49	165.40			101.50		
		0.502 2	92.12	91.44	181.40			97.66		
		0.502 7	92.45	91.44	183.90			99.97		
		0.501 9	91.63	91.44	182.90			99.87		
0.502 0		92.01	109.40	199.90	98.58					
0.502 5		92.20	109.40	201.40	99.84					
0.502 3		92.08	109.40	201.40	99.92					
甘草苷		0.500 7	211.60	168.50	375.80	97.45	99.82	1.4		
		0.510 3	214.10	168.50	382.20	99.76				
		0.501 8	212.00	168.50	381.80	100.80				
		0.502 2	212.30	210.60	423.10	100.10				
		0.502 7	213.10	210.60	421.50	98.96				
		0.501 9	212.20	210.60	423.00	100.10				
	0.502 0	212.30	252.70	460.80	98.34					
	0.502 5	212.70	252.70	469.70	101.70					
	0.502 3	212.50	252.70	468.20	101.20					
	甘草酸铵	0.500 7	225.30	182.90	404.30	97.87			99.56	1.4
		0.510 3	228.30	182.90	413.80	101.40				
		0.501 8	226.60	182.90	409.30	99.90				
		0.502 2	226.50	228.60	452.80	98.99				
		0.502 7	227.10	228.60	455.70	99.91				
		0.501 9	226.70	228.60	459.10	101.70				
0.502 0		226.70	274.30	494.80	97.74					
0.502 5		226.90	274.30	500.20	99.64					
0.502 3		226.80	274.30	498.10	98.91					

## 2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

表4 样品含量测定结果( $n=3$ , mg/g)Tab 4 Results of contents determination of 3 batches of samples( $n=3$ , mg/g)

样品批号	没食子酸	迷迭香酸	甘草苷	甘草酸铵
20150602	0.078 01	0.166 0	0.416 5	0.447 1
20150711	0.077 30	0.172 8	0.430 7	0.456 6
20150910	0.077 21	0.169 5	0.428 3	0.455 7
RSD, %	0.57	2.01	1.79	1.16

相关文献报道,没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵最大吸收波长分别为208、220、230、237 nm<sup>[8-10]</sup>。本试验采用紫外检测器在190~600 nm波长范围内进行全波长扫描,发现没食子酸在210、215、247 nm波长处有最大吸收,迷迭香酸在210、329 nm波长处有最大吸收,甘草苷在210、230、275 nm波长处有最大吸收,甘草酸铵在230、237 nm波长处有最大吸收;为了测定结果的准确性,本试验选择210 nm(没食子酸、迷迭香酸、甘草苷)、230 nm(甘草酸铵)为检测波长。

### 3.2 提取溶剂、提取方法和超声时间的考察

在预试验时,本课题组参考相关文献选择20%甲醇溶液、75%甲醇溶液、80%甲醇溶液为提取溶剂<sup>[11-13]</sup>,结果75%甲醇溶液的提取率最高,因此选择75%甲醇溶液为本试验的提取溶剂。本课题组还考察了提取方法(超声法和加热回流法),结果超声法与加热回流法的提取量相当,综合考虑超声法简便、快速易行,因此选择超声法为本试验的提取方法。此外,本课题组对超声时间也进行了考察(15、40、60 min),结果超声处理40 min和60 min时的提取量相当且均大于超声处理15 min时的提取量。为节约试验时间,最终确定本试验的超声处理时间为40 min。

### 3.3 流动相的选择

在预试验中本课题组还考察了不同的流动相系统(乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液和乙腈-0.2%磷酸溶液),结果发现,在流动相中加入磷酸溶液时,保留时间更稳定,分离效果较好,并且乙腈-0.2%磷酸溶液比乙腈-0.1%磷酸溶液的峰形好,故选用乙腈-0.2%磷酸溶液作为本试验的流动相<sup>[14-15]</sup>。

### 3.4 柱温的选择

色谱柱的温度对被分离物质有较大影响,本试验考察了不同温度(25、28、30 ℃)对没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵色谱分离的影响。结果,柱温为25 ℃时,色谱峰有拖尾现象,分离度不佳;柱温为30 ℃时,色

谱峰有上漂现象;柱温为28 ℃时,各待测成分的分离均较好。因此,最终确定本试验的柱温为28 ℃。

综上所述,本方法简便、准确、重复性好,可用于热感赛比斯坦颗粒中没食子酸、迷迭香酸、甘草苷和甘草酸铵含量的同时测定。

### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:维吾尔药卷[M].上海:上海科学技术出版社,2015:310-311.
- [2] 卫生部药典委员会.药品标准:维吾尔药分册[S].1998:177.
- [3] 贺金华,薛桂蓬,康雨彤,等.热感赛比斯坦颗粒定性定量方法研究[J].药物分析杂志,2015,35(1):139-145.
- [4] 田树革.异常黑胆质成熟剂及其组方药材破布木果质量控制与体外活性研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2013.
- [5] 刘枫,张雪佳,李洁,等.破布木果总多酚的超声提取工艺研究[J].环球中医药,2013,6(8):580-584.
- [6] 黄幼霞,黄荣桂,郑兴中.迷迭香酸药理作用的研究进展[J].海峡药学,2010,22(5):17-20.
- [7] 许维国,刘洋,刘多见.没食子酸抑菌活性分析[J].中国公共卫生,2012,28(10):1329-1331.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:86-87.
- [9] 朱林燕,谢建峰,孔子铭,等.藏药二十一味寒水石丸的HPLC指纹图谱研究[J].药物分析杂志,2015,35(8):1430-1435.
- [10] 周婷,谭晓斌,封亮,等.HPLC同时测定漏芦中的6个成分含量[J].中药材,2015,38(3):544-547.
- [11] 陈晓静,何杰,杨建云,等.RP-HPLC法同时测定葡萄籽提取物中没食子酸、儿茶素和表儿茶素的含量[J].药物分析杂志,2015,35(4):724-725.
- [12] 许栋明,程可建.RP-HPLC同时测定温胆汤中甘草苷、柚皮苷、橙皮苷和甘草酸[J].中国中药杂志,2011,36(1):45-46.
- [13] 黄旭东,刘伟,徐新元.HPLC法同时测定新癩片中8个成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(10):1853-1856.
- [14] 杜晔,陈洪英.RP-HPLC法同时测定柴归消瘿胶囊中6种成分[J].中成药,2015,37(11):2434-2438.
- [15] 罗友华,杨辉,林雪晶,等.HPLC法同时测定复方板蓝根利咽颗粒中6种成分[J].中成药,2014,36(7):1436-1439.

(收稿日期:2016-10-02 修回日期:2017-03-10)

(编辑:刘柳)