

高效液相色谱法研究小青龙颗粒的组方特点

邵琼¹ 张莹² 王艳梅¹ 严敢意¹

(1 湖北省鄂州市中心医院中草药房,鄂州,436000; 2 湖北省鄂州市中心医院重症医学科,鄂州,436000)

摘要 目的:采用高效液相色谱法对小青龙颗粒进行组方特点的研究,观察其组方是否具有预测小青龙颗粒制剂质量水平的特点。方法:首先制备小青龙颗粒供试品溶液、4种组方药材供试品溶液并优化色谱条件:进样量为2 μL,研究中选用250 mm×4.6 mm的C₁₈色谱柱,柱温为35℃,而流动相A为0.1%磷酸水+0.02%庚烷磺酸钠;流动相B为82乙腈:10无水乙醇:8(水+0.24%磷酸),检测波长为220 nm。接着从考察精密度、重复性、稳定性、专属性、加样回收率等5个维度对HPLC的方法严谨性进行研究;最后建立小青龙颗粒的指纹图谱,并结合组方模式预测小青龙颗粒质量水平的特点。结果:1)精密度研究结果显示共有峰相对保留时间RSD为0.08%,重复性研究结果显示共有峰相对保留时间RSD为0.3%,稳定性结果显示共有峰相对保留时间RSD为0.4%,表明高效液相色谱仪具有良好的精密度、重复性和稳定性;2)专属性结果显示小青龙颗粒各味药物在相对保留时间内各个峰之间不存在杂质峰,具有良好的专属性;3)加样回收结果显示平均回收率的范围是96.52%~104.73%,RSD的范围是为0.67%~2.14%,表明高效液相色谱方法具有良好的准确度;4)22批小青龙颗粒供试品溶液指纹图谱共有40个共有峰,其中S13、S14、S19和S21等4个批次的小青龙颗粒质量相对较差;5)组方色谱中组方全相加模式比组方最大化模式质量较低;单位质量药物色谱中全相加模式比最大化模式质量等级低;组方色谱预测能力和单位质量药物色谱的预测能力相当,差异无统计学意义($P>0.05$),进而从CMF和PMF的平均值2与RFP比较发现,2组间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:可通过高效液相色谱检测方法对单位药物指纹图谱的分析预测小青龙颗粒制剂质量水平的组方特点。

关键词 高效液相色谱;小青龙颗粒;组方特点;系统指纹定量评价法;麻黄;桂枝;芍药;炙甘草

Study on the Characteristics of Xiaoqinglong Granules by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Shao Qiong¹, Zhang Ying², Wang Yanmei¹, Yan Ganyi¹

(1 Chinese Herbal Medicine Department, Ezhou Central Hospital, Ezhou 436000, China;

2 Intensive Care Unit, Ezhou Central Hospital, Ezhou 436000, China)

Abstract Objective: To study the characteristics of Xiaoqinglong Granules by HPLC and to observe whether the formula has the characteristics of predicting the quality level of Xiaoqinglong Granules. **Methods:** First, prepare Xiaoqinglong Granules, and four kinds of medicinal materials for test solution and optimize chromatographic conditions. The injection volume was 2 μL. In the study, a C₁₈ column of 250×4.6 mm was used, and the column temperature was 35 degrees Celsius, and the mobile phase A was 0.1% phosphoric acid water + 0.02% sodium heptane sulfonate; the mobile phase B was 82 acetonitrile:10 Anhydrous ethanol:8 (water + 0.24% phosphoric acid), and detection wavelength was 220 nm. Then, from the 5 dimensions of precision, repeatability, stability, specificity and sample recovery rate, we studied the rigor of HPLC. Finally, we established the fingerprints of Xiaoqinglong Granules and combined with the prescription mode to predict the quality level of Xiaoqinglong Granules. **Results:** 1) The results of the precision study showed that the RSD of the shared peak relative retention time was 0.08%. The reproducibility study showed that the shared peak relative retention time RSD was 0.3%. The stability results showed that the shared peak relative retention time RSD was 0.4%, indicating HPLC has good precision, repeatability and stability. 2) The results of specificity showed that there were no impurity peaks between the peaks of Xiaoqinglong Granules in the relative retention time, which indicated good specificity of Xiaoqinglong Granules. 3) The results of sample recovery showed that the average recovery rate was 96.52%~104.73%, and the range of RSD was 0.67%~2.14%, indicating that the HPLC method had good accuracy. 4) there were 40 common peaks in the 22 batches of Xiaoqinglong Granules, including 4 common batches of S13, S14, S19 and S21. 5) The total additive pattern of group composition was lower than that of group maximization mode; the total additive mode in unit mass chromatography was lower than that in maximization mode; the prediction ability of the column chromatography and the quality of the unit chromatography were comparable, and there was no significantly statistical difference ($P>0.05$); and then from the comparison of the average value of

基金项目:2013~2014年度湖北省卫生厅科研重点项目(JX6B79)

作者简介:邵琼(1982.12—),女,本科,主管中药师,研究方向:中药方面,E-mail:156330911@qq.com

通信作者:张莹(1981.11—),女,硕士,主任医师,研究方向:重症临床,E-mail:2706275267@qq.com

CMF and PMF with 2 RFP, the difference between the two groups was very small ($P > 0.05$). **Conclusion:** The quality level of Xiaoqinglong Granules preparation can be predicted by high performance liquid chromatography (HPLC).

Key Words High performance liquid chromatography; Xiaoqinglong Granules; Prescription characteristics; System of fingerprint quantitative evaluation method; Herba Ephedrae; Radix Paeoniae Alba; Radix Aconiti Praeparata; Ramulus Cinnamomi

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.10.059

小青龙颗粒是由出自《伤寒论》的经典方小青龙汤制成颗粒剂而来,近年来颗粒剂逐渐在各大医院流行,以满足想服用中药而没时间煎药的患者。小青龙颗粒的药物组成和原方小青龙汤一样,由麻黄、芍药、桂枝、炙甘草、细辛、半夏、生姜和五味子组成,主要用于治疗太阳伤寒兼里停水饮证,原文中记载“伤寒表不解,心下有水气,干呕,发热而咳,或渴,或利,或噎,或小便不利、少腹满,或喘者,小青龙汤主之”,而现代研究中发现小青龙汤/小青龙颗粒对具有改善肺通气功能,缓解气道平滑肌的痉挛而降低其高反应作用,对支气管哮喘急性发作期^[1-2]、急性慢性支气管炎发作期^[3-5]和慢性阻塞性肺疾病发作期^[6]等有显著疗效。小青龙汤的组方配伍特点可以看出,麻黄、桂枝均为性温之药,温能走表,温能散寒,除外感之风寒;干姜、半夏、五味子也均属于性温之药,然其温能走里,化里之寒邪,其中干姜温中回阳以固本,温肺化饮以祛肺寒之邪;半夏性温而化寒痰,使邪出有道而不滞于内;细辛性温而入表里;全方以温药为主配以炙甘草调和诸药^[7-8]。而小青龙颗粒经过制备后是否具有好的中药质量水平,其质量水平是否能通过小青龙颗粒的组方特点进行预测,基于上述疑问展开本课题研究,在中药单味药物及复方研究中高效液相色谱是目前比较公认的研究手段,本研究结果显示,可通过高效液相色谱检测方法对单位药物指纹图谱的分析预测小青龙颗粒制剂质量水平的组方特点。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 购买于 Agilent 科技有限公司的高效液相色谱仪(Agilent 100,应用 ChemStation 工作站),购买于北京赛多利斯天平有限公司的 0.1 mg 分析天平(型号:Sartorius BS110S)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯)、无水乙醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、磷酸(色谱纯)和去离子水均购于天津市康科德技术有限公司。

1.3 分析样品 22 个不同批次小青龙颗粒(四川泰乐制药有限公司,国药准字 Z10983085);麻黄、芍药、桂枝、甘草均本院药房提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 进样量为 2 μ L,研究中选用 250 mm \times 4.6 mm 的 C₁₈ 色谱柱(型号: Arcus EP),柱温为 35 $^{\circ}$ C,而流动相 A 为 0.1% 磷酸水 + 0.02% 庚烷磺酸钠;流动相 B 为 82 乙腈:10 无水乙醇:8(水 + 0.24% 磷酸),检测波长为 220 nm。

表 1 梯度洗脱表(流速 1.0 mL/min)

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	92	8
10	82	18
20	67	33
25	50	50
30	47	53
50	20	80

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 小青龙颗粒供试品溶液制备 小青龙颗粒适量加入 25 mL 甲醇,采用回流提取的方式提取小青龙颗粒 1 h,取第 1 次过滤液,残渣中继续加入等量甲醇提取 30 min,取第 2 次过滤液,混合两次过滤液并以甲醇定容 50 mL,制取小青龙颗粒供试品溶液^[9-10]。

2.2.2 4 种组方药材供试品溶液制备

2.2.2.1 组方量制备法 根据小青龙颗粒组方量(即配方中单味药材的含量)配制法取麻黄(约 1.5 g)、芍药(1.5 g)、桂枝(1.5 g)、炙甘草(1.5 g)机械粉碎后,过筛于烧瓶中回流提取,同 1.2.1 的方法经两次过滤混合定容后,获得组方量药材供试品溶液。

2.2.2.2 单位质量制备法 单位质量即 1 g,麻黄、芍药、桂枝和炙甘草均分别精密称取 1 g,同 2.2.2.1 方法,机械粉碎和回流提取,获得单位质量药材供试品溶液。

2.3 专属性试验 通过专属性试验检测小青龙颗粒各味药物的专属性,相互间是否存在干扰因素,结果显示在相对保留时间内各个峰之间不存在杂质峰,具有良好的专属性。

2.4 中间精密度试验 精密称取同一小青龙颗粒供试品溶液,连续进样 6 次,结果显示共有峰相对保留时间 RSD 为 0.08%,表明高效液相色谱仪具有良好的精密度。

2.5 供试品溶液稳定性试验 将小青龙颗粒供试品溶液室温放置 0、2、4、12、24 h 分别常规进样测定 HPLC 色谱图,结果显示共有峰相对保留时间 *RSD* 为 0.4%,表明小青龙颗粒供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

2.6 重复性试验 以同一批小青龙颗粒,根据 1.2.1 配制 6 份小青龙颗粒供试品溶液,常规进样测定 HPLC 色谱图,结果显示共有峰相对保留时间 *RSD* 为 0.3%,表明高效液相色谱仪具有良好的重复性。

2.7 回收率试验 精密称取 6 份已知含量的同一批小青龙颗粒样品各约 6 g,分别精密加入 10 mL 混合对照品甲醇溶液,采用加样回收法测定,计算结果显示平均回收率的范围是 96.52%~104.73%,*RSD* 的范围是为 0.67%~2.14%,表明高效液相色谱方法具有良好的准确度。

2.8 样品测定结果

2.8.1 小青龙颗粒指纹图谱的建立 根据 1.3 色谱条件检测 22 批小青龙颗粒供试品溶液,检测波长为 220 nm,以 15 号峰甘草苷作为参照峰,共有 40 个共有峰的出现率均达到 100%。根据系统指纹定量评价法^[11-12],以宏定性相似度(S_m)、宏定量相似度(P_m)和指纹均化性变动误差控制系数 α 三者相结合来评价中药质量,22 批小青龙颗粒供试品溶液经系统指纹定量法鉴定,结果发现其中 S13、S14、S19 和 S21 等 4 个批次的小青龙颗粒质量相对较次;因此由 S1-S12 和 S15-S18 及 S20、S22 共 18 批小青龙颗粒供试品溶液重新用“中药色谱指纹图谱定量相似度数字化评价体统 3.0”分析生成对照指纹图谱,记作 RFP。具体详细见图 1 和表 2、表 3。

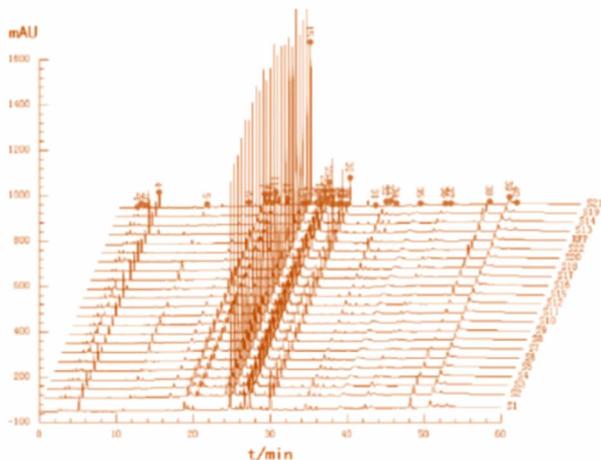


图 1 22 批小青龙颗粒指纹图谱(波长 220 nm)

2.8.2 组方色谱 根据 1.2.2.1 配制的组方量药材供试品溶液进行高效液相色谱检测,检测波长 220 m,将检测所得的指纹图谱导入“中药色谱指纹

图谱定量相似度数字化评价体统 3.0”分析软件中,设置 0.1 min 为时间漂移窗,根据全相加模式,将输入某一范围的时间域值,采用全相累加的方式将各单味药色谱法累加,获得组方指纹图谱对应的峰,从而形成组方指纹图谱,记作 CSF1;根据最大化模式,将将输入某一范围的时间域值,将各单味药色谱峰取最大峰作为组方指纹图谱,记作 CSF2。组方药物烧瓶化学混合记作 CMF,组方药物直接物理混合记作 PMF。具体详细见图 2。

2.8.3 单位质量药物色谱 根据 1.2.2.2 配制的单位质量药材供试品溶液进行高效液相色谱检测,检测波长 220 m,将检测所得的指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱定量相似度数字化评价体统 3.0”分析软件中,设置 0.1 min 为时间漂移窗,根据全相加模式,将输入某一范围的时间域值,采用全相累加的方式将各单味药色谱法累加,获得组方指纹图谱对应的峰,从而形成组方指纹图谱,记作 CSF3;根据最大化模式,将将输入某一范围的时间域值,将各单味药色谱峰取最大峰作为组方指纹图谱,记作 CSF4。具体详细见图 2。

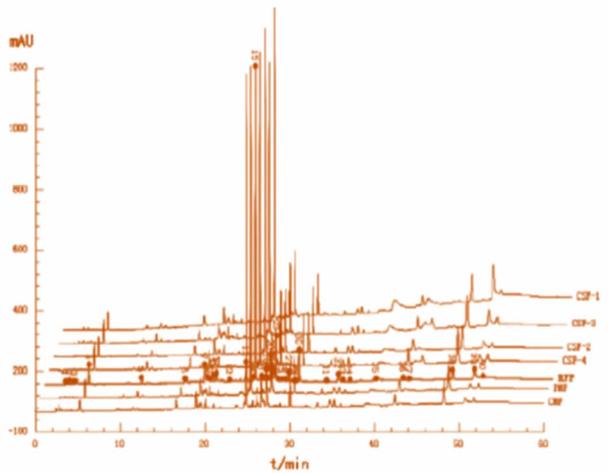


图 2 4 种组方融合预测模式的指纹图谱

2.8.4 组方模式预测小青龙颗粒质量结果 从表 4 可得,在组方模式预测小青龙颗粒质量结果中可以看出,组方色谱中组方全相加模式比组方最大化模式质量较低;单位质量药物色谱中全相加模式比最大化模式质量等级低;而比较平均值 1 和平均值 3 发现组方色谱预测能力和单位质量药物色谱的预测能力相当,差异无统计学意义($P > 0.05$),进而从 CMF 和 PMF 的平均值 2 与 RFP 比较发现,2 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),综合研究结果显示,可通过高效液相色谱检测方法对单位药物指纹图谱的分析预测小青龙颗粒制剂质量水平的组方特点。团

表 2 22 批小青龙颗粒系统指纹定量法评价质量结果

指标	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S_m	0.97	0.98	0.94	0.99	0.98	0.96	0.96	0.99	0.95	0.96	0.96	0.98
P_m	97.11	99.17	99.02	101.81	97.16	102.15	99.92	104.3	108.02	99.5	103.3	100.9
α	0.040	0.004	0.005	0.030	0.014	0.037	0.055	0.035	0.029	0.052	0.045	0.003
等级	1	1	2	1	1	1	2	1	2	2	1	1
质量	极好	极好	很好	极好	极好	极好	很好	极好	很好	很好	极好	极好

表 3 22 批小青龙颗粒系统指纹定量法评价质量结果

指标	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	S21	S22	RFP	平均值
S_m	0.83	0.87	0.99	0.98	0.91	0.95	0.88	0.97	0.89	0.97	1	0.95
P_m	90.12	87.44	98.52	98.48	94.93	93.68	73.16	96.48	90.06	82.21	100	96.54
α	0.024	0.065	0.023	0.006	0.057	0.066	0.084	0.008	0.063	0.024	0	0.038
等级	3	3	1	1	2	2	5	1	3	2	1	1.8
质量	好	好	极好	极好	很好	很好	中等	极好	好	很好	极好	很好

表 4 组方模式预测小青龙颗粒质量结果

指标	组方色谱							单位质量药物色谱			
	CSF1	CSF2	平均值 1	RFP	CMF	PMF	平均值 2	CSF3	CSF4	平均值 3	
S_m	0.92	0.93	0.93	1	0.96	0.95	0.96	0.93	0.93	0.93	
P_m	106.71	100.05	103.38	100	103.25	99.93	101.59	102.36	110.01	106.19	
α	0.102	0.008	0.110	0	0.002	0.007	0.005	0.147	0.076	0.111	
等级	3	2	2	1	1	1	2	3	2	2.5	
质量	好	很好	很好	极好	极好	极好	很好	好	很好	很好	

队在此次小青龙颗粒组方特点的研究中未对半夏、生姜、细辛和五味子进行分析,主要由于在此色谱条件及检测波长下未检测出这 4 味药物的特征峰,因此未对这 4 味药物进行展开研究。

3 讨论

3.1 麻黄-桂枝组方 麻黄与桂枝组方的作用会随着组方的比例不同而不同,如《伤寒论》中麻黄汤,麻黄用药比例比桂枝大,其作用即以发汗解表为主;而在桂枝去芍药加麻黄细辛附子汤中,麻黄用药比例比桂枝小,即呈现温胃化饮之效;而在本研究中的小青龙汤组方中,麻黄与桂枝用药比例相同,表里同治,即解表以治太阳伤寒证,又温里以化寒饮郁肺证。高效液相色谱研究表明^[13-14],在小青龙汤研究中,取单味桂枝水煎液、麻黄-桂枝多比例组方水煎液以及小青龙汤水煎液的供试品溶液计算香豆素、桂皮醇和桂皮醛的含量,研究结果发现随着桂枝的比例增加,麻黄桂枝多比例组方水煎液中的 5 种麻黄生物碱的含量也随之增加,而在桂枝单煎液中,5 种麻黄生物碱的含量、香豆素、桂皮醇和桂皮醛的含量均出现不同程度的降低,此研究与《伤寒杂病论》中麻黄与桂枝的比例不同、作用不同这一理论遥相呼应。

3.2 麻黄-甘草组方 麻黄-甘草组方在《伤寒论》

及《金匱要略》各经典方剂中出现的频次最多,本研究中的小青龙汤仅是其中一个出现麻黄-甘草组方的经典方。麻黄-甘草组方,以水煎法制备麻黄甘草组方供试品溶液的 HPLC 研究中发现,随着甘草配比量的增加 5 种麻黄类生物碱的含量出现不同程度地降低,研究中发现中当 4 倍麻黄:1 倍甘草时,5 种麻黄类生物碱的含量含量最高;当 2 倍麻黄:1 倍甘草时,5 种麻黄类生物碱的含量含量适中;当 1 倍麻黄:1 倍甘草时,5 种麻黄类生物碱的含量最低;这一研究结果与“甘草调和诸药”的药理相吻合。此时当我们反观麻黄-甘草组方后甘草苷、甘草酸的含量随着配伍比例的改变情况,发现麻黄甘草水煎液中当麻黄配伍的比例逐渐减少时,甘草中的甘草苷、甘草酸的含量也逐渐降低。而本研究中的小青龙汤原方是 1 倍麻黄:1 倍甘草,体现其解表而不伤气的组方特点。

3.3 白芍-桂枝组方 《伤寒论》中桂枝、白芍组方多有调和营卫、温阳止汗之功。在指纹图谱研究中当桂枝、白芍组方的配比不同时指纹图谱上出现的特征峰也会不同。白芍-桂枝组方主要的化学成分包括没食子酸、氧化芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酰芍药苷、肉桂酸、香豆素等随着比例的不同而出现不同的峰高。研究发现^[15]小青龙汤芍药-桂枝组

方配比为 1:1 时,肉桂酸和芍药苷在指纹图谱中的特征峰高比为 7。

3.4 白芍-甘草组方 白芍-甘草组方有一个著名的缓急止痛代表方剂,即芍药甘草汤,方中白芍与炙甘草配伍比例为 1:1,HPLC 指纹图谱研究芍药甘草汤发现,白芍中的芍药苷和苯甲酰芍药苷起到药效作用,而甘草中的甘草苷和甘草酸含量最高^[16]。小青龙汤中白芍与炙甘草组方配比同芍药甘草汤,为 1:1,有研究表明 0.6:1、1:1、3:1 等 3 个不同配比的白芍-炙甘草组方,以 3:1 配比中的芍药苷、甘草苷和甘草酸的溶出率最高,其次为 1:1 配比的白芍-炙甘草组方,0.6:1 配比的白芍-炙甘草组方最低^[17]。

参考文献

- [1]谢一俊,徐艳玲.徐艳玲小青龙汤加减治疗支气管哮喘[J].实用中医内科杂志,2016,30(7):7-9.
- [2]李星,蒋鹏娜,王雪慧,等.小青龙汤联合西药治疗成人哮喘随机对照试验的 Meta 分析[J].中华中医药杂志,2016,31(9):3502-3508.
- [3]杨淑慧,丁吉善,鄧琳.基于现代医家探讨小青龙汤的应用规律[J].北京中医药大学学报,2017,40(1):83-88.
- [4]刘枚芳,练鹏颖,郭震浪,等.小青龙汤联合西药治疗慢性支气管炎急性发作期疗效 Meta 分析[J].辽宁中医药大学学报,2017,19(3):139-142.
- [5]尚云飞,朱立成.小青龙颗粒治疗支气管哮喘急性发作的临床观察[J].中国中西医结合杂志,2012,21(8):799-800.
- [6]陈花,许光兰.小青龙汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性发作期临床

疗效的 Meta 分析[J].湖南中医杂志,2016,32(12):141-143,173.

- [7]马莉娜.小青龙汤方证研究[J].中医学报,2016,31(8):1242-1248.
- [8]樊建平.论小青龙汤在《金匮要略》中的应用[J].世界中西医结合杂志,2016,11(11):1500-1503.
- [9]王正宽,石晓朦,杨素德,等.小青龙颗粒微波、超声提取工艺的比较[J].中成药,2016,38(11):2375-2379.
- [10]王正宽,石晓朦,刘圆,等.Box-Behnken 法中试规模下优化小青龙颗粒超声提取工艺[J].中国中药杂志,2016,41(4):683-688.
- [11]孙国祥,孙万阳,张晶,等.中药质量一致性评价体系-基于定量指纹图谱检查的中药标准制剂控制模式的解析[J].中南药学,2018,16(1):2-13.
- [12]孙国祥,张玉静,孙万阳,等.中药一致性评价关键问题——中药标准制剂控制模式和定量指纹图谱检查项[J].中南药学,2016,14(10):1026-1032.
- [13]张保国,刘庆芳.小青龙汤现代研究与新用[J].中成药,2012,34(2):340-344.
- [14]范晓辉,肖舜,艾妮,等.基于网络方剂学的小青龙汤类方功效物质组研究[J].中国中药杂志,2015,40(13):2634-2638.
- [15]李童.小青龙汤方证相应研究[J].长春中医药大学学报,2011,27(2):176-178.
- [16]陈梅,姚楠,周秋香,等.血清 HPLC 指纹图谱法研究芍药甘草汤伍用的合理性[J].中国药房,2010,21(15):1347-1350.
- [17]蔡悦萍,张贵君,朱广伟,等.配伍比例及配伍组分对芍药甘草汤中 9 种药效组分的影响[J].药物分析杂志,2015,35(10):1770-1776.

(2018-04-17 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 2607 页)

- [6]卢新华,唐伟军,谢应桂,何军山,陈钢.苦苣菜提取物抗炎作用的实验研究[J].中国中医药科技,2006,13(4):240-241.
- [7]杨光,李记争,马琳,等.苦苣菜对糖尿病小鼠血糖血脂及抗氧化酶的影响[J].中药材,2010,33(7):1132-1135.
- [8]夏勇,董晓岚,林昕,郝武,高筱萍.蕨麻麦冬提取物对实验性糖尿病小鼠血糖的影响[J].实用预防医学,2008,15(2):388-390.
- [9]康文艺,张丽.五种苦苣苔科植物 α -葡萄糖苷酶抑制活性研究[J].天然产物研究与开发,2010,22(1):122-125.
- [10]梁惠珍,王丽芳,裴妙荣.小苦苣菜水提取物中木犀草苷的含量

测定[J].山西中医,2010,26(5):46-47.

- [11]周燕.苦苣菜的化学成分及生物活性研究[D].内蒙古医学院,2009:1-51.
- [12]王振苗.苦苣菜水提物的抗炎作用及其作用机制研究[D].河北医科大学,2015:1-40.
- [13]Huda Mohammad, Alkreaty; Rahmat Ali, et, al. CCl₄ induced genotoxicity and DNA oxidative damages in rats; hepatoprotective effect of *Sonchus arvensis* [J]. BMC complementary and alternative medicine, 2014, 39(14):452.

(2017-06-26 收稿 责任编辑:张雄杰)