

HPLC 法同时测定小儿解表颗粒中 6 种成分

何 艳¹, 胡小祥²

(1. 湘南学院药学院, 湖南 郴州 423000; 2. 郴州市食品药品检验检测中心, 湖南 郴州 423000)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定小儿解表颗粒(金银花、连翘、牛蒡子等)中葛根素、连翘酯苷 A、黄芩苷、牛蒡苷、汉黄芩苷、黄芩素的含量。**方法** 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Waters Symmetry C₁₈ 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 30 ℃; 检测波长 250、278、326 nm。**结果** 6 种成分在各自范围内线性关系良好($r\geq 0.999\ 2$), 平均加样回收率 98.8%~101.4%, RSD 0.58%~1.6%。**结论** 该方法准确, 重复性好, 可用于小儿解表颗粒的质量控制。
关键词: 小儿解表颗粒; 葛根素; 连翘酯苷 A; 黄芩苷; 牛蒡苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; HPLC
中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)02-0305-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.007

Simultaneous determination of six constituents in Xiao'er Jiebiao Granules by HPLC

HE Yan¹, HU Xiao-xiang²

(1. College of Pharmacy, Xiangnan University, Chenzhou 423000, China; 2. Chenzhou Municipal Center for Food and Drug Control, Chenzhou 423000, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of puerarin, forsythiaside A, baicalin, arctiin, wogonoside and baicalein in Xiao'er Jiebiao Granules (*Lonicerae Japonicae Flos*, *Forsythiae Fructus*, *Arctii Fructus*, etc.). **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Waters Symmetry C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 250, 278, 326 nm. **RESULTS** Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r\geq 0.999\ 2$), whose average recoveries were 98.8%–101.4% with the RSDs of 0.58%–1.6%. **CONCLUSION** This accurate and reproducible method can be used for the quality control of Xiao'er Jiebiao Granules.
KEY WORDS: Xiao'er Jiebiao Granules; puerarin; forsythiaside A; baicalin; arctiin; wogonoside; baicalein; HPLC

小儿解表颗粒为儿科常用方剂,由金银花、连翘、炒牛蒡子、蒲公英、黄芩、防风、紫苏叶、荆芥穗、葛根、人工牛黄 10 味药材组成,具有宣肺解表、清热解毒的作用,用于小儿外感风热所致的感冒,症见发热恶风、头痛咳嗽,鼻塞流涕、咽喉痛痒^[1]。方中连翘辛凉解表、清热解毒,为君药,主要活性成分为连翘苷、连翘酯苷 A^[2];牛蒡子功

效解风热之邪、利咽止痛、辛凉解表、清热解毒,其主要有效活性成分为牛蒡苷^[3-4],而黄芩清热解毒,主要活性成分有黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素等^[5],两者皆为臣药;葛根性甘、凉,解肌退热,为佐药,其主要活性成分为葛根素^[6]。

在 2015 年版《中国药典》小儿解表颗粒项下,仅以黄芩苷为定量测定成分,指标单一,不利

收稿日期: 2019-06-05
基金项目: 湖南省“十三五”药学应用特色学科基金(湘教通[2018]469)
作者简介: 何 艳(1985—),女,硕士,实验师,研究方向为药物质量分析。Tel: (0735) 2116268, E-mail: hxx3318@126.com

于整体质量控制；文献 [7-11] 中，该制剂都以 1~3 种成分含有量为指标进行测定。本实验建立 HPLC 法同时测定小儿解表颗粒中葛根素、连翘酯苷 A、黄芩苷、汉黄芩苷、牛蒡苷、黄芩素的含有量，涵盖了方中君药、臣药、佐药，以期为该制剂质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪，配置 G1311B 四元泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315D DAD 检测器（美国 Agilent 公司）；XSE-205 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；KQ-300DE 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Milli-Q 超纯水处理系统（美国 Millipore 公司）。

1.2 试剂与药物 葛根素（批号 110752-201615，质量分数 95.4%）、连翘酯苷 A（批号 111810-201606，质量分数 93.4%）、黄芩苷（批号 110715-201619，质量分数 93.5%）、牛蒡苷（批号 110819-201611，质量分数 95.9%）、汉黄芩苷（批号 112002-201702，质量分数 95.9%）、黄芩素（批号 111595-201607，质量分数 98.5%）对照品均购自中国食品药品检定研究院。小儿解表颗粒（批号 171119，四川好医生药业集团有限公司；批号 ZGA1703、ZCA1805、ZBA1804、ZGA1701、ZCA1710，云南白药集团股份有限公司）。乙腈为色谱纯（德国 Merck 公司）；磷酸、甲醇为分析纯（国药集团化学试剂有限公司）；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Symmetry-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（0~15 min，8%~20% A；15~25 min，20%~35% A；25~30 min，35%~40% A；30~35 min，40% A；35~35.1 min，40%~8% A；35.1~40 min，8% A）；体 积 流 量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 0~13 min 时

250 nm，13~22 min 时 326 nm，22~40 min 时 278 nm；进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取对照品葛根素 10.60 mg、连翘酯苷 A 10.89 mg、牛蒡苷 10.13 mg、汉黄芩苷 9.28 mg、黄芩素 5.76 mg，置于 50 mL 量瓶中，70% 甲醇溶解并稀释至刻度。精密称取 3.39 mg 黄芩苷对照品至 25 mL 量瓶中，再分别精密吸取上述 5 种溶液 3、6、8、4、2 mL 置于其中，振摇，70% 甲醇定容，摇匀，即得（含葛根素 24.26 μg/mL、连翘酯苷 A 48.82 μg/mL、黄芩苷 126.8 μg/mL、牛蒡苷 62.17 μg/mL、汉黄芩苷 29.25 μg/mL、黄芩素 9.077 μg/mL）。

2.2.2 供试品溶液 取颗粒适量，研细，取粉末约 0.8 g，精密称定，置于锥形瓶中，精密加入 70% 甲醇 50 mL，称定质量，超声处理（300 W、40 kHz）30 min，放冷，70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，滤液过 0.45 μm 微孔滤膜，即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按颗粒处方工艺，分别制备缺葛根、连翘、黄芩、炒牛蒡子的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，阴性样品溶液在与对照品溶液相同保留时间处无色谱峰出现；各成分分离效果理想，分离度均大于 1.5，表明该方法专属性良好。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL，置于 10 mL 量瓶中，70% 甲醇定容，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。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents			
成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
葛根素	<i>Y</i> = 42.82 <i>X</i> + 3.326	0.999 5	2.426~24.26
连翘酯苷 A	<i>Y</i> = 16.22 <i>X</i> + 2.116	0.999 9	4.882~48.82
黄芩苷	<i>Y</i> = 32.52 <i>X</i> + 2.946	0.999 9	12.68~126.8
牛蒡苷	<i>Y</i> = 5.788 <i>X</i> + 0.173 5	0.999 9	6.217~62.17
汉黄芩苷	<i>Y</i> = 40.13 <i>X</i> + 0.861 5	0.999 9	2.925~29.25
黄芩素	<i>Y</i> = 47.43 <i>X</i> - 10.90	0.999 2	0.907 7~9.077

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得葛

根素、连翘酯苷 A、黄芩苷、牛蒡苷、汉黄芩苷、黄芩素峰面积 RSD 分别为 1.3%、0.23%、

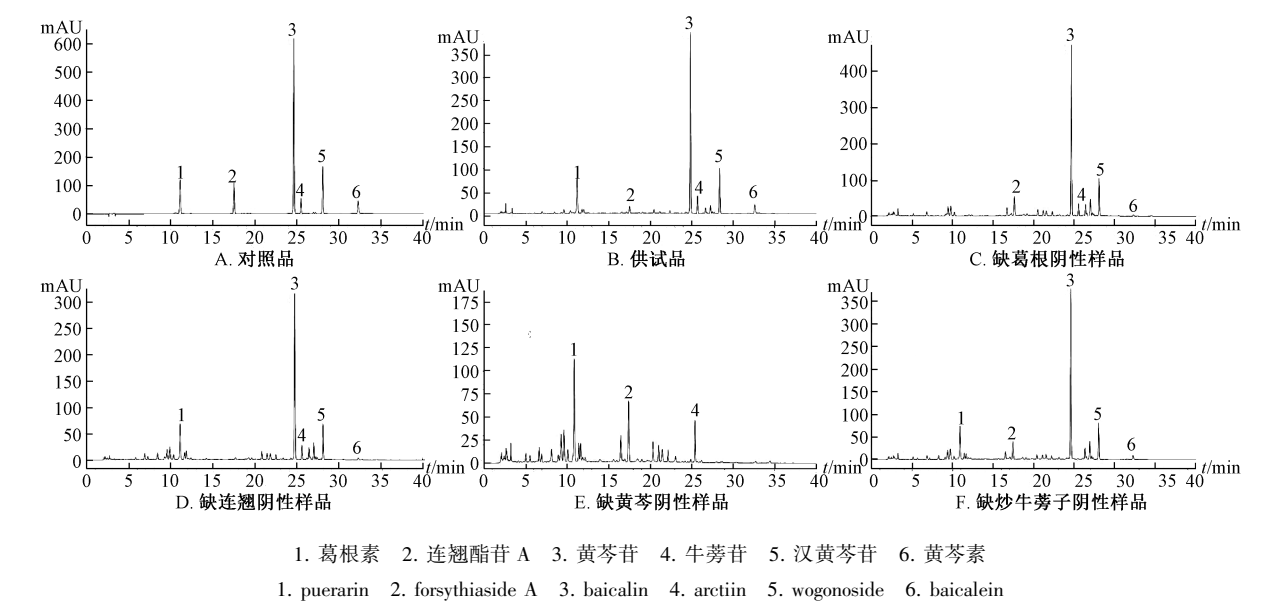


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

0.22%、0.21%、0.27%、0.52%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液（批号 ZGA1703），分别于 0、2、6、12、18、24 h，在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定，测得葛根素、连翘酯苷 A、黄芩苷、牛蒡苷、汉黄芩苷、黄芩素峰面积 RSD 分别为 1.2%、1.7%、0.55%、0.25%、0.37%、2.0%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一份样品（批号 ZGA1703）6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定，测得葛根素、连翘酯苷 A、黄芩苷、牛蒡苷、汉黄芩苷、黄芩素含有量 RSD 分别为 1.1%、0.55%、0.63、1.4%、0.82%、2.1%，表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取含有量已知的同一份颗粒（批号 ZGA1703），研细，称取粉末约 0.4 g，共 6 份，精密加入 50 mL 含葛根素 8.288 μg/mL、连翘酯苷 A 3.654 μg/mL、黄芩苷 42.64 μg/mL、牛蒡苷 22.73 μg/mL、汉黄芩苷 9.141 μg/mL、黄芩素 2.618 μg/mL 的 70% 甲醇溶液，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定，计算回收率。测得葛根素、连翘酯苷 A、黄芩苷、牛蒡苷、汉黄芩苷、黄芩素平均加样回收率分别为 98.8%、101.0%、100.0%、99.4%、98.9%、101.4%，RSD 分别为 1.6%、1.3%、1.2%、0.74%、0.58%、1.2%。

2.9 样品含有量测定 取 6 批颗粒，每批 3 份，按“2.2.2”项下制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定，计算含有量，结果见表 2。

表 2 各成分含有量测定结果（mg/g，n=3）						
Tab. 2 Results of content determination of various constituents（mg/g，n=3）						
批号	葛根素	连翘酯苷 A	黄芩苷	牛蒡苷	汉黄芩苷	黄芩素
171119	0.882	2.739	7.081	2.241	1.471	0.232
ZGA1703	1.086	0.450	5.412	2.901	1.055	0.333
ZCA1805	0.977	0.596	5.058	2.631	0.923	0.183
ZBA1704	0.949	0.883	4.972	2.626	0.903	0.167
ZGA1701	1.071	0.476	5.372	2.890	1.021	0.338
ZCA1710	0.973	0.885	5.609	3.119	1.034	0.139

3 讨论

3.1 成分选择 本实验考察了小儿解表颗粒另一

君药金银花中绿原酸，通过查阅文献 [12-13] 和预实验发现它在牛蒡子、蒲公英中也能检出，不具

有专属性，故未纳入分析；连翘中连翘苷含有量低，均匀性差，故选择另一指标性成分连翘酯苷 A 进行测定。

3.2 检测波长选择 本实验采用 DAD 检测器在 200~400 nm 范围内进行全波长扫描，并采集光谱图。结果，葛根素、连翘酯苷 A、黄芩苷、牛蒡苷、汉黄芩苷、黄芩素分别在 250、326、278、278、276、276 nm 处有最大吸收，故选择 250 nm 作为葛根素检测波长，326 nm 作为连翘酯苷 A 检测波长，278 nm 作为黄芩苷、牛蒡苷、汉黄芩苷、黄芩素检测波长。

3.3 色谱条件优化 本实验考察了 Agilent ZORBAX SB-C₁₈、Waters Symmetry-C₁₈、Thermo Hypersil Gold-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），发现 Waters Symmetry-C₁₈ 色谱柱分离效果最好，色谱峰对称性理想。再考察了流动相乙腈-水、乙腈-0.1% 乙酸、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-0.2% 磷酸^[14-15]，发现乙腈-0.2% 磷酸洗脱时各成分分离度、色谱峰对称性良好。最终，确定为“2.1”项下色谱条件。

3.4 含有量分析 表 3 显示，6 批小儿解表颗粒样品中各成分含有量差异较大，除了不同生产企业之间（如连翘酯苷 A 相差近 6 倍）外，同一生产企业不同批次之间也是如此，如黄芩素相差近 3 倍。其原因可能是不同批次原料药差异所致，需引起厂家关注。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：562.
[2] 原江锋，邱智军，刘建利，等. 河南和山西连翘叶中总木

脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 和连翘苷的含量比较[J]. 天然产物研究与开发，2015，27(5)：845-848；864.
[3] Liu Q D, Qin K M, Shen B J, *et al.* Analysis of *Fructus Arctii* from different regions of China by HPLC coupled with chemometrics methods [J]. *Acta Chromatogr*, 2015，27 (4)：697-709.
[4] 米靖宇，汪志超，宋纯清. 高效液相色谱法测定不同产地牛蒡子中牛蒡子苷和苷元的含量[J] . 时珍国医国药，2004，15(11)：737-739.
[5] 郑勇风，王佳婧，傅超美，等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药，2016，38(1)：141-147.
[6] 傅 舒，李甜甜，刘晓风，等. 几种葛根主要化学成分的测定与比较分析[J]. 西南农业学报，2014，27(3)：1054-1057.
[7] 刘红娜，张小华，庞 伟. 小儿解表颗粒中连翘苷含量测定[J]. 食品与药品，2014，16(6)：441-443.
[8] 许湘军，熊巨良. 高效液相色谱法测定小儿解表颗粒中牛蒡苷的含量[J]. 湖南中医杂志，2014，30(8)：164-165.
[9] 曹 斌，刘 元，李 嘉，等. HPLC 法测定小儿解表颗粒中黄芩苷的含量[J]. 中国民族民间医药，2009，18(9)：11-12.
[10] 张 烨，张海珠，周 浓. 高效液相色谱法测定小儿解表颗粒中黄芩苷含量[J]. 中国药业，2010，19(7)：26-27.
[11] 潘 莹，韩凤梅，吴文华. HPLC 法测定小儿解表颗粒中葛根素、黄芩苷和连翘苷的含量[J]. 湖北大学学报（自然科学版），2009，31(3)：312-314.
[12] 童黄锦，杨海军，曾庆琪，等. HPLC 法同时测定炒牛蒡子饮片中 7 个活性成分的含量[J]. 药物分析杂志，2018，38(5)：771-775.
[13] 施树云，周长新，徐 艳，等. 蒙古蒲公英的化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2008，33(10)：1147-1157.
[14] 鲁 静，牛晓静，段晓颖. HPLC 法同时测定退银合剂中 6 种成分[J]. 中成药，2018，40(5)：1093-1096.
[15] 鄢长余，石亚囡，赵月然，等. UPLC 法同时测定通脉颗粒中 5 个主成分的含量及其灰色关联度分析[J]. 药物分析杂志，2017，37(4)：624-630.