

[质 量]

HPLC 法同时测定感冒止咳颗粒中 10 种成分

何 艳¹, 胡小祥², 王 庆^{1*}
(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 法同时测定感冒止咳颗粒(柴胡、山银花、葛根等)中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、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 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 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** 10 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999\ 4$), 平均加样回收率为 98.05%~101.95%, RSD 为 0.45%~2.28%。**结论** 该方法简便准确, 重复性好, 可用于感冒止咳颗粒的质量控制。

关键词: 感冒止咳颗粒; 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)04-0849-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.04.005

Simultaneous determination of ten constituents in Ganmao Zhike Granules by HPLC

HE Yan¹, HU Xiao-xiang², WANG Qing^{1*}
(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 neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, puerarin, forsythiaside A, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, baicalin, wogonoside and baicalein in Ganmao Zhike Granules (*Bupleuri Radix*, *Lonicerae Flos*, *Puerariae lobatae Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent ZORBAX SB-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** Ten constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999\ 4$), whose average recoveries were 98.05%–101.95% with the RSDs of 0.45%–2.28%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Ganmao Zhike Granules.
KEY WORDS: Ganmao Zhike Granules; chemical constituents; HPLC

感冒止咳颗粒由柴胡、山银花、葛根、黄芩、青蒿、连翘、桔梗、苦杏仁、薄荷脑 9 味药材组成, 可用于外感风热所致感冒, 症见发热恶风、头痛鼻塞、咽喉肿痛^[1]。方中柴胡、山银花疏散退热, 共为君药; 葛根解肌退热, 青蒿退虚热, 连翘、黄芩清热解毒, 共为臣药; 桔梗、苦杏仁宣降肺气以止咳化痰, 薄荷脑芳香辛散, 共为佐药, 诸药合用, 共奏清热解表、止咳化痰之功效。感冒止咳颗粒收载于 2015 年版《中国药典》, 但仅以黄芩苷为定量测定的指标成分, 而相关报道也只主要

收稿日期: 2019-07-31
基金项目: 湖南省“双一流”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, 从事药物质量分析研究。Tel: (0735) 2116268, E-mail: hxx3318@126.com
* 通信作者: 王 庆 (1985—), 女, 博士, 副教授, 从事天然药物开发与质量分析研究。Tel: (0735) 2278323, E-mail: 526378710@126.com

针对其中 1~3 种成分^[2-6]。

中药复方制剂组成复杂，单一成分检测难以有效控制其质量和疗效的稳定性，多指标成分测定已成为相关质量评价的发展趋势。感冒止咳颗粒中君药山银花主要有效成分为有机酸类，包括绿原酸、异绿原酸、咖啡酸等^[7-8]；臣药葛根主要含有异黄酮类，包括葛根素、大豆苷元等^[9]，青蒿所含成分主要为挥发油类、香豆素类、苯丙酸类，其中绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸为苯丙酸类代表性物质^[10-11]，连翘主要有效成分为连翘苷、连翘酯苷 A^[12]，黄芩主要活性化合物有黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素等^[13]。本实验建立 HPLC 法同时测定感冒止咳颗粒中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、葛根素、连翘酯苷 A、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素的含有量，以期为该制剂质量控制提供参考。

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 Technologies 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 绿原酸（批号 110753-201716，纯度 99.3%）、葛根素（批号 110752-201615，纯度 95.4%）、连翘酯苷 A（批号 111810-201606，纯度 93.4%）、异绿原酸 C（批号 111894-201102，纯度 94.1%）、黄芩苷（批号 110715-201619，纯度 93.5%）、汉黄芩苷（批号 112002-201702，纯度 95.9%）、黄芩素（批号 111595-201607，纯度 98.5%）对照品均购自中国食品药品检定研究院；新绿原酸（批号 18031001，纯度 99.67%）、隐绿原酸（批号 18032403，纯度 99.07%）、异绿原酸 A（批号 18032601，纯度 98.82%）对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司。小儿解表颗粒（批号 ZBB1916、ZBB1909，云南白药集团股份有限公司），批号 180502 的购自江西铜鼓仁和制药有限公司，批号 1811016 的购自太极集团四川绵阳制药有限公司。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 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱

（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0~20 min，8%~16% A；20~25 min，16%~20% A；25~35 min，20%~30% A；35~50 min，30%~40% A；50~50.1 min，40%~8% A；50.1~55 min，8% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 326 nm（0~15.5 min）、250 nm（15.5~20 min）、326 nm（20~35 min）、278 nm（35~55 min）；进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取对照品新绿原酸 5.57 mg、绿原酸 7.43 mg、隐绿原酸 7.03 mg、葛根素 8.02 mg、连翘酯苷 A 10.17 mg、异绿原酸 A 6.37 mg、异绿原酸 C 7.36 mg、汉黄芩苷 9.14 mg、黄芩素 5.67 mg，置于 25 mL 量瓶中，70% 甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，作为贮备液；精密称取黄芩苷对照品 3.81 mg，置于 25 mL 量瓶中，精密吸取上述贮备液（新绿原酸 2 mL、绿原酸 2 mL、隐绿原酸 3 mL、葛根素 4 mL、连翘酯苷 A 2 mL、异绿原酸 A 1 mL、异绿原酸 C 1.5 mL、汉黄芩苷 2 mL、黄芩素 1 mL）至该量瓶中，振摇，70% 甲醇定容，摇匀，即得（含新绿原酸 17.77 μg/mL、绿原酸 23.61 μg/mL、隐绿原酸 33.43 μg/mL、葛根素 48.97 μg/mL、连翘酯苷 A 30.40 μg/mL、异绿原酸 A 10.07 μg/mL、异绿原酸 C 16.62 μg/mL、黄芩苷 142.5 μg/mL、汉黄芩苷 28.81 μg/mL、黄芩素 8.936 μg/mL）。

2.2.2 供试品溶液 取颗粒适量，研细，取粉末约 1.0 g，精密称定，置于锥形瓶中，精密加入 50 mL 70% 甲醇，称定质量，超声（功率 300 W、频率 40 kHz）处理 30 min，放冷，70% 甲醇补足缺失的质量，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 按处方工艺，分别制备缺山银花和青蒿、缺葛根、缺连翘、缺黄芩的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 专属性试验 精密吸取对照品溶液、供试品溶液、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，各成分分离效果良好，分离度均大于 1.5，阴性无干扰，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，各精密吸取 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（X），峰面

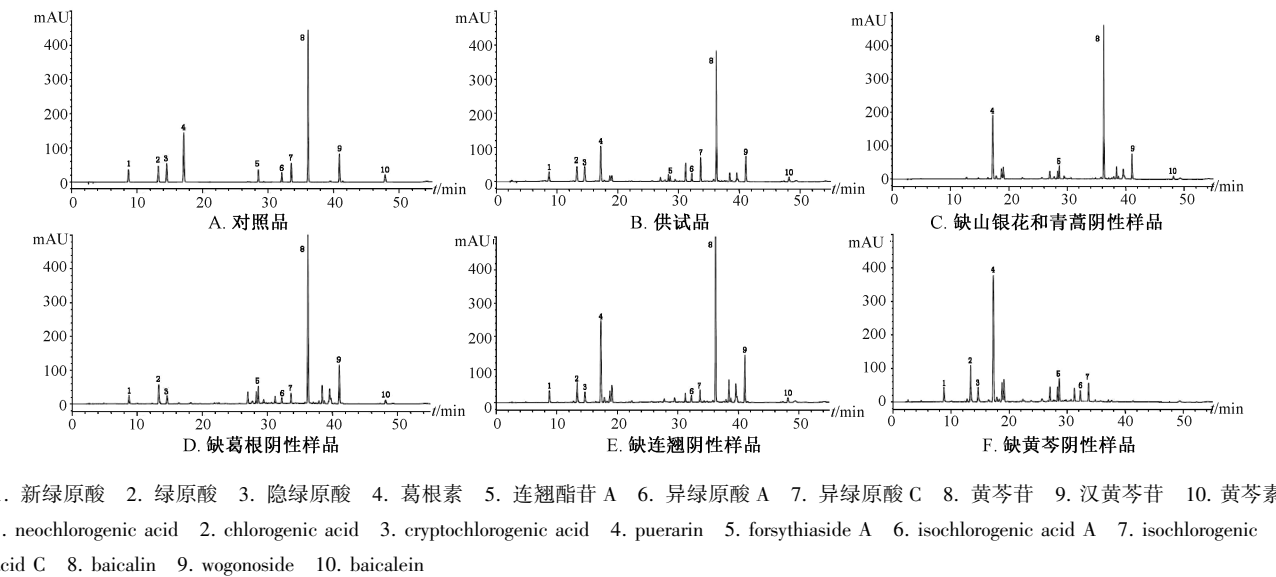


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

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	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
新绿原酸	$Y=27.59X+7.580$	0.999 4	1.777~17.77
绿原酸	$Y=31.02X+3.120$	0.999 8	2.361~23.61
隐绿原酸	$Y=25.66X+1.437$	0.999 9	3.343~33.43
葛根素	$Y=46.57X+2.082$	0.999 7	4.897~48.97
连翘酯苷 A	$Y=15.01X-1.013$	0.999 9	3.040~30.40
异绿原酸 A	$Y=36.54X-0.033\ 3$	0.999 9	1.007~10.07
异绿原酸 C	$Y=39.40X-0.590\ 7$	0.999 9	1.662~16.62
黄芩苷	$Y=37.29X+3.976$	0.999 9	14.25~142.5
汉黄芩苷	$Y=40.84X-0.671\ 4$	0.999 9	2.881~28.81
黄芩素	$Y=49.39X-3.906$	0.999 8	0.893\ 6~8.936

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, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素峰面积 RSD 分别为 1.08%、0.44%、0.46%、0.27%、0.65%、0.15%、0.20%、0.65%、0.13%、0.73%, 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 1811016), 于 0、4、8、16、24、36 h 在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素峰面积 RSD 分别为 1.67%、1.22%、0.67%、0.69%、1.34%、1.13%、0.54%、0.37%、0.93%、1.76%,

表明溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批样品 6 份 (批号 1811016), 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, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素含有量 RSD 分别为 1.25%、0.55%、0.43%、0.32%、2.23%、1.80%、1.04%、0.67%、0.37%、2.12%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取各成分含有量已知的同一批颗粒 (批号 1811016), 研细, 取粉末约 0.5 g, 精密称定, 共 6 份, 精密加入对照品溶液 (0.153 1 mg/mL 新绿原酸 2 mL、0.206 9 mg/mL 绿原酸 2 mL、0.250 8 mg/mL 隐绿原酸 2 mL、0.301 1 mg/mL 葛根素 2 mL、0.190 0 mg/mL 连翘酯苷 A 1 mL、0.150 6 mg/mL 异绿原酸 A 1 mL、0.312 4 mg/mL 异绿原酸 C 1 mL、0.219 9 mg/mL 黄芩苷 10 mL、0.199 2 mg/mL 汉黄芩苷 2 mL、0.088 62 mg/mL 黄芩素 1 mL), 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。结果, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素平均加样回收率分别为 99.54%、101.25%、99.89%、98.05%、99.69%、99.51%、99.07%、101.75%、101.95%、101.09%, RSD 分别为 2.05%、1.07%、1.10%、0.45%、1.85%、2.07%、1.87%、1.65%、1.41%、2.28%。

2.9 样品含有量测定 精密称取 4 批颗粒，每批 3 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，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)

成分	批号			
	ZBB1916	ZBB1909	180502	1811016
新绿原酸	0.392 3	0.417 7	0.094 51	0.515 9
绿原酸	0.690 4	0.752 3	0.239 0	0.787 9
隐绿原酸	0.706 3	0.746 4	0.199 7	0.941 2
葛根素	1.828	1.901	0.488 6	1.169
连翘酯苷 A	0.730 3	0.722 1	0.281 6	0.368 4
异绿原酸 A	0.214 6	0.228 1	0.084 72	0.251 4
异绿原酸 C	0.488 0	0.512 1	0.126 7	0.598 1
黄芩苷	4.126	3.950	3.579	3.782
汉黄芩苷	0.884 4	0.844 4	0.684 8	0.794 5
黄芩素	0.088 93	0.090 72	0.241 9	0.163 8

3 讨论

3.1 指标成分选择 本实验曾考察了感冒止咳颗粒另一君药柴胡中柴胡皂苷 a^[14]，发现其含有量较低，甚至有些样品未检出，故未予以考虑。前期预实验发现，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。最终，选择新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、异绿原酸 A、异绿原酸 C、黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素作为指标成分，涵盖了感冒止咳颗粒君药、臣药，能较全面地反映其质量。

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，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、连翘酯苷 A 在 326 nm 波长处有最大吸收，葛根素在 250 nm 波长处有最大吸收，黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素 278 nm 波长处有最大吸收，故选择 326 nm 作为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、连翘酯苷 A 检测波长，250 nm 作为葛根素检测波长，278 nm 作为黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素检测波长。

3.3 色谱条件优化 本实验首先考察了 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Waters Symmetry-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Thermo Hypersil Gold-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)，发现以 Agilent ZORBAX SB-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、甲醇-0.2% 磷酸^[15-16]，发现以乙腈-0.1% 磷酸洗脱时各成分达到了理想的分离效果，色谱峰对称性良好，故选择其作为流动相。

3.4 含有量分析 表 3 显示，感冒止咳颗粒 (批号 180502) 中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、葛根素、连翘酯苷 A 含有量较低，故为了保证产品质量、临床疗效稳定性，建议将山银花、葛根、连翘指标性成分纳入该制剂定量测定中。

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，2015：1643.

[2] 赵士冶，冯秀珍. 高效液相色谱法测定感冒止咳颗粒中黄芩苷含量[J]. 中国现代药物应用，2009，3(12)：11-12.

[3] 李 坚，王玉紫，陈作环，等. HPLC 法测定感冒止咳颗粒中连翘苷的含量[J]. 湖北医药学院学报，2011，30(5)：520-522.

[4] 王 静，常新全，刘俐纯，等. HPLC 测定感冒止咳颗粒剂中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 中成药，2004，26(3)：206-207.

[5] 李 媛，李 强. HPLC 法测定感冒止咳颗粒中葛根素的含量[J]. 药学研究，2015，34(1)：13-15.

[6] 柴鑫莉，陈 蕾，舒金富. HPLC 法同时测定感冒止咳颗粒中绿原酸、葛根素和黄芩苷的含量[J]. 中国药房，2014，25(40)：3824-3826.

[7] 温建辉，倪付勇，赵祎武，等. 山银花化学成分研究[J]. 中草药，2015，46(13)：1883-1886.

[8] 肖美凤，刘文龙，周 晋，等. 金银花和山银花的研究现状及质量控制的关键问题[J]. 中草药，2018，49(20)：4905-4911.

[9] 方晓艳，张 蕾，冯素香，等. HPLC 法比较河南 8 个产地葛根中 5 种成分[J]. 中成药，2016，38(9)：2073-2075.

[10] 孙玉刚，秦续文，张 玲，等. 高效液相色谱法同时测定青蒿绿原酸、隐绿原酸东莨菪内酯含量[J]. 天津中医药，2012，29(5)：484-486.

[11] 赵祎武，倪付勇，宋亚玲，等. 青蒿化学成分研究[J]. 中国中药杂志，2014，39(24)：4816-4821.

[12] 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.

[13] 郑勇凤，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.

[14] 李 军，姜 华，张延萍，等. 柴胡水煎液中柴胡皂苷 a 和 d 的溶出与转化差异[J]. 中国药学杂志，2014，49(19)：1692-1696.

[15] 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.

[16] 王子凌云，梁 琨，李国文. HPLC 法测定芩香清热止咳颗粒中 8 种成分[J]. 中成药，2019，41(5)：995-999.