

HPLC 法同时测定儿童回春颗粒中 4 种成分

王海丽
(宝鸡市食品药品检验检测中心, 陕西 宝鸡 721013)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定儿童回春颗粒(葛根、黄芩、牛蒡子等)中葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱。**方法** 分析采用 Atlantis C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 25 ℃。**结果** 葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱的线性范围分别为 2.92 ~ 58.4 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、2.12 ~ 42.4 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、2.032 ~ 40.64 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、0.80 ~ 16 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 平均加样回收率在 99.1% ~ 100.3% 之间。**结论** 该方法简便、灵敏、准确, 可用于儿童回春颗粒的质量控制。

关键词: 儿童回春颗粒; 葛根素; 黄芩苷; 牛蒡苷; 盐酸小檗碱; HPLC

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)05-1044-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.05.016

Simultaneous determination of four constituents in Ertong Huichun Granules

WANG Hai-li
(Baoji Municipal Food and Drug Testing Center, Baoji 721013, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for simultaneously determining puerarin, baicalin, arctiin and berberine hydrochloride in Ertong Huichun Granules (*Puerariae Radix*, *Scutellariae Radix*, *Arctii Fructus*, etc.). **METHODS** The analysis was performed on Atlantis C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with its temperature maintained at 25 ℃, mobile phase comprising of acetonitrile - 0.05 mol/L potassium dihydrogen phosphate solution in a gradient elution manner, flow rate of 1.0 mL/min, and detective wavelength of 280 nm. **RESULTS** The linear ranges of puerarin, baicalin, actiin and berberine hydrochloride were 2.92 - 58.4 μg/mL ($r=0.999\ 8$), 2.12 - 42.4 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 2.032 - 40.64 μg/mL ($r=0.999\ 9$) and 0.80 - 16 μg/mL ($r=0.999\ 9$), respectively, whose average recoveries were 99.1% - 100.3%. **CONCLUSION** This simple, sensible and accurate method can be applied in the quality control of Ertong Huichun Granules.

KEY WORDS: Ertong Huichun Granules; puerarin; baicalin; arctiin; berberine hydrochloride; HPLC

儿童回春颗粒属于常见儿童药物, 具有清热解毒、透表豁痰的功效, 用于急性惊风、伤寒发热、临夜发烧、小便带血、麻疹隐现不出引起的身热咳嗽, 以及赤痢、水泻、食积、腹痛等症, 已应用于临床多年, 效果较好。该制剂由黄连、水牛角浓缩粉、羚羊角、人中白(煅)、淡豆豉、大青叶、荆芥(去粗梗)、羌活、葛根、地黄、川木通、赤芍、黄芩、前胡、玄参(去芦)、桔梗、柴胡、西河柳、升麻、牛蒡子(炒) 20 味中药组成, 而现行标准^[1]中, 只有相关鉴别项, 过于简单, 无法保证药品质量。在儿童回春颗粒

中, 葛根具有解肌退热、生津、透疹、升阳止泻的功效, 其指标成分为葛根素; 黄芩具有清热燥湿、泻火解毒的功效, 其指标成分为黄芩苷; 牛蒡子具有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽的功效, 其指标成分为牛蒡苷; 黄连具有清热燥湿、泻火解毒的功效, 其指标成分为盐酸小檗碱, 因此选择葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱 4 种成分进行研究。本实验在参考文献 [2-13] 的基础上, 采用 HPLC 梯度洗脱法同时测定儿童回春颗粒中这 4 个成分的含有量, 以期控制该药物的质量, 为其质量监管提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters e2695HPLC 色谱仪, 包括 Waters 2498 检测器; AE-240 电子分析天平 (十万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-200VDE 三频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药 葛根素 (批号 110752-200912, 含有量 96.0%)、黄芩苷 (批号 110715-200514, 含有量 94.0%)、牛蒡苷 (批号 110819-21309, 含有量 95.6%)、盐酸小檗碱 (批号 110713-201212, 含有量 86.7%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。儿童回春颗粒 (贵州汉方药业有限公司, 批号 1404102、1406105、1409168)。阴性对照样品 (自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Atlantis C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 (B)^[14], 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 10% ~ 20% A; 10 ~ 20 min, 20% A; 20 ~ 35 min, 20% ~ 30% A; 35 ~ 45 min, 30% ~ 40% A; 45 ~ 55 min, 40% ~ 10% A); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 25 ℃; 进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

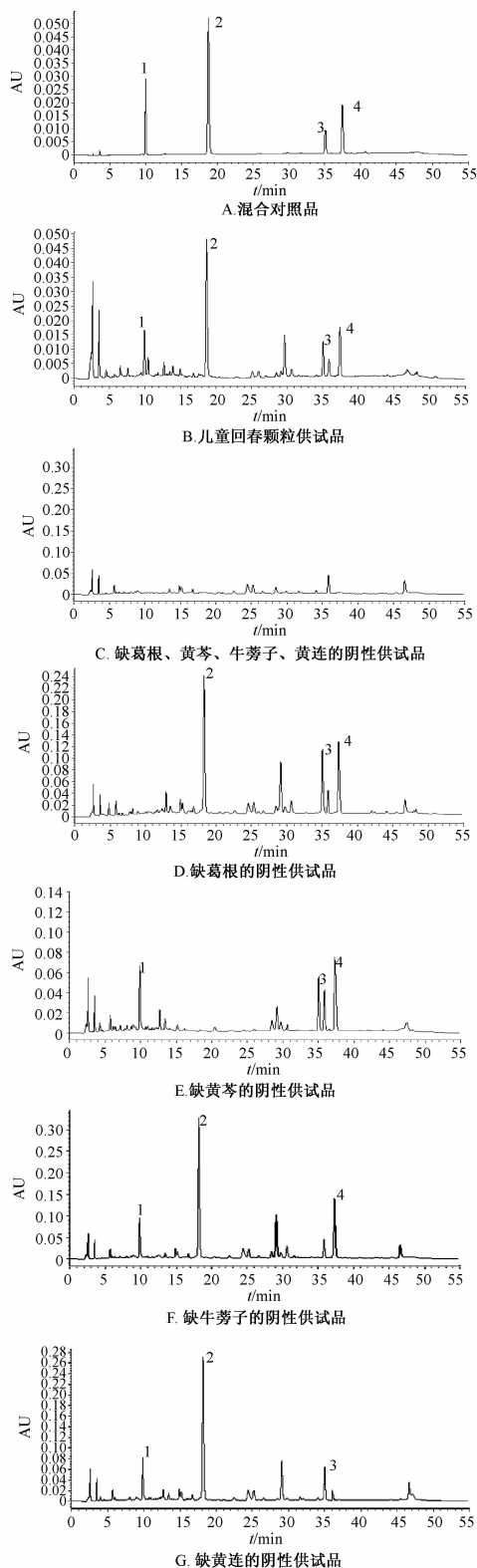
2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱对照品 7.61、11.28、10.63、4.62 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 甲醇超声溶解并稀释至刻度。精密移取上述对照品溶液各 1 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制得质量浓度分别为 0.146、0.212、0.203 2、0.080 mg/mL 的混合对照品贮备液。

精密量取贮备液 5 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 得到混合对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 得到葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱对照品的 HPLC 色谱图。见图 1。

2.2.2 供试品溶液的制备 取儿童回春颗粒, 研细, 精密称取 2.0 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 甲醇补充减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。在“2.1”项色谱条件下测定, 得到儿童回春颗粒样品的 HPLC 色谱图。见图 1。

2.2.3 阴性供试品溶液的制备 按制剂工艺制备不含葛根、黄芩、牛蒡子、黄连的阴性样品, 按

“2.2.2”项下方法制备, 在“2.1”项色谱条件下测定, HPLC 色谱图见图 1, 阴性对照无干扰。



1. 葛根素 2. 黄芩苷 3. 牛蒡苷 4. 盐酸小檗碱
1. puerarin 2. baicalin 3. arctiin 4. berberine hydrochloride

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 1、2、4、6、8、10、15、20 μL，注入 HPLC 色谱仪，在“2.1”项色谱条件下测定峰面积，以峰面积积分值（Y）对质量浓度（μg/mL，X）进行线性回归，得 4 种活性成分的标准曲线方程、相关系数（r）和线性范围，见表 1。由表可知，各成分线性关系良好。

表 1 4 种成分的线性关系

Tab. 1 Linear relationships of four constituents			
成分	回归方程	r	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
葛根素	Y=2 605X + 1 639 158	0.999 8	2.92 ~ 58.4
黄芩苷	Y=1 689X + 3 474 217	0.999 9	2.12 ~ 42.4
牛蒡苷	Y=371X + 573 444	0.999 9	2.032 ~ 40.64
盐酸小檗碱	Y=1 403X + 3 158 919	0.999 9	0.80 ~ 16.0

2.3.2 精密度试验 精取吸取同一混合对照品溶液 10 μL，重复进样 6 次（n=6），记录峰面积。结果，葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱峰面积 RSD 值分别为 0.61%、0.45%、0.57%、0.73%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 精密吸取同一批号（1409168）儿童回春颗粒的供试品溶液适量，于 0、2、6、12、24 h 后进样，测定各成分的峰面积。结果，样品中葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱峰面积 RSD 值分别为 0.59%、0.63%、0.48%、0.95%，表明在室温条件下，供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批号（1409168）供试品适量，研细，精密称取 6 份，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定。结果，葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱峰面积 RSD 值分别为 0.71%、0.46%、0.92%、1.1%，表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取各成分含有量已知的供试品（批号 1409168，葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱的质量浓度分别为 0.138、0.235、0.216、0.097 2 mg/g）适量，研细，精密称取 6 份，置于具塞锥形瓶中，分别精密加入混合对照品溶液 1 mL（即质量浓度分别为 0.146、0.212、0.203 2、0.080 mg/mL 的混合对照品溶液），按“2.2.2”项下方法制备，依法测定。结果表明，该方法回收率良好，见表 2。

2.4 含有量测定 取儿童回春颗粒样品 3 批，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项

1046

色谱条件下测定，记录色谱峰面积，外标法计算含葛根素、黄芩苷、牛蒡苷、盐酸小檗碱的含有量，结果见表 3。

表 2 加样回收率试验结果（n=6）

Tab. 2 Results of recovery tests (n=6)						
成分	称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
葛根素	1.000 1	0.138 0	0.146 0	0.283 7	99.8	100.3 (0.84)
	1.007 2	0.139 0	0.146 0	0.285 3	100.2	
	0.993 5	0.137 1	0.146 0	0.284 9	101.2	
	1.004 7	0.138 6	0.146 0	0.283 9	99.5	
	1.001 2	0.138 2	0.146 0	0.283 8	99.7	
黄芩苷	0.999 3	0.137 9	0.146 0	0.286 1	101.5	99.9 (0.21)
	1.000 1	0.235 0	0.212 0	0.446 8	99.9	
	1.007 2	0.236 6	0.212 0	0.478 8	100.1	
	0.993 5	0.233 4	0.212 0	0.445 0	99.8	
	1.004 7	0.236 0	0.212 0	0.448 4	100.2	
牛蒡苷	1.001 2	0.235 4	0.212 0	0.447 2	99.9	99.6 (0.73)
	0.999 3	0.234 8	0.212 0	0.446 0	99.6	
	1.000 1	0.216 0	0.203 2	0.418 7	99.8	
	1.007 2	0.217 4	0.203 2	0.420 1	100.2	
	0.993 5	0.214 6	0.203 2	0.417 6	99.9	
盐酸小 檗碱	1.004 7	0.217 0	0.203 2	0.419 2	99.5	99.1 (0.84)
	1.001 2	0.216 2	0.203 2	0.419 4	100.0	
	0.999 3	0.215 8	0.203 2	0.415 4	98.2	
	1.000 1	0.097 2	0.080 0	0.176 8	99.5	
	1.007 2	0.097 8	0.080 0	0.177 6	99.8	
	0.993 5	0.096 6	0.080 0	0.176 6	100.0	
	1.004 7	0.097 6	0.080 0	0.176 2	98.2	
	1.001 2	0.097 4	0.080 0	0.175 8	98.1	
	0.999 3	0.097 0	0.080 0	0.176 4	99.2	

表 3 含有量测定结果（n=3）

Tab. 3 Results of content determination (n=3)				
批号	葛根素/ (mg·g ⁻¹)	黄芩苷/ (mg·g ⁻¹)	牛蒡苷/ (mg·g ⁻¹)	盐酸小檗碱/ (mg·g ⁻¹)
1404102	0.151	0.239	0.220	0.098 8
1406105	0.126	0.231	0.211	0.095 6
1409168	0.138	0.235	0.216	0.097 2

3 讨论

3.1 检测波长的选择 本实验对 4 种成分在 200 ~ 400 nm 波长处进行扫描，发现葛根素在 250 nm，黄芩苷在 278、316 nm，牛蒡苷在 278、229 nm，盐酸小檗碱在 235、265 与 345 nm 处有最大吸收。参考《中国药典》2010 年版一部中黄芩、葛根、牛蒡子、黄连含有量测定项下的检测波长（葛根素 250 nm、黄芩苷 280 nm、牛蒡苷 280 nm、盐酸小檗碱 265 nm^[15]），最终选择在 280 nm 处进行测定，此时均有较好的吸收。

3.2 提取方法的选择 在供试品溶液的制备过程中，为了保证样品充分提取，本实验对 50%、

100% 甲醇, 30%、50%、70% 乙醇分别进行了考察。结果表明, 100% 甲醇超声 30 min 时, 提取效果最佳。

3.3 流动相的选择 儿童回春颗粒有效成分众多, 为了保证分离效果, 本实验以甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相, 进行考察。结果发现, 在流动相中加入磷酸二氢钾溶液时, 保留时间更稳定, 分离效果较好, 故选用乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液作为流动相, 进行梯度洗脱。

3.4 其他成分的考察 儿童回春颗粒中含 20 味中药, 本实验除对以上 4 种成分进行研究外, 还对羚羊角、水牛角、人中白等其他 16 味作了考察, 发现其对实验均无干扰。其中, 赤芍中芍药苷在 13 min 时也可检出, 但因其含有量较低, 故未纳入研究范畴, 而其他成分有待作进一步探讨。

参考文献:

[1] WS₃-B-2276-97-1, 国家药品标准[S].
[2] 杨宏静, 陈 瑛, 方应权. HPLC 法同时测定五味消毒饮中 4 种成分[J]. 中成药, 2015, 37(4): 778-781.
[3] 张 梅, 任爱农, 杨玉兰, 等. HPLC 波长切换法同时测定清清颗粒中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 29-33.
[4] 刘宏明, 张 叶, 聂 磊. HPLC 法同时测定小儿柴桂退热颗粒中葛根素、大豆苷、黄芩苷、大豆苷元、桂皮醛、

黄芩素的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(6): 1038-1042.
[5] 于 艳, 于世杰, 修丽丽, 等. HPLC 法同时测定祛瘀清胰颗粒中虎杖苷和黄芩苷[J]. 中成药, 2013, 35(5): 964-966.
[6] 徐 强. HPLC 法同时测定茵栀黄分散片、颗粒、胶囊中绿原酸、栀子苷与黄芩苷[J]. 中成药, 2013, 35(5): 967-970.
[7] 刘晓哲. HPLC 法同时测定香砂六君丸中 3 种成分[J]. 中成药, 2013, 35(6): 1219-1221.
[8] 闫高颖, 董娟妮, 杨 洋, 等. HPLC 法同时测定心脑血管胶囊中 6 种成分[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1672-1675.
[9] 周 蓬, 宋 青, 马 帅. HPLC 法同时测定小儿豉翘清热颗粒中栀子苷、芍药苷、黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1693-1696.
[10] 史国生, 林永强, 徐丽华, 等. HPLC 法同时测定银黄颗粒中 6 个咖啡酰奎宁酸[J]. 中成药, 2015, 37(2): 311-315.
[11] 刘书芬, 梁倩倩, 陈 岩, 等. HPLC 法同时测定防己黄芪汤中 5 种成分[J]. 中成药, 2014, 36(11): 2312-2315.
[12] 汪 芳, 林 吉, 邓丽红, 等. HPLC 法同时测定加味穿心莲散中 6 种成分[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2521-2525.
[13] 王鼎峰, 胡 冰, 王荔青. HPLC 法同时测定丹灯通脑胶囊中阿魏酸、丹酚酸 B、葛根素、野黄芩苷[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2532-2536.
[14] 牟英迪, 林吉茂. HPLC 程序波长测定牛黄上清丸中黄芩苷连翘苷和盐酸小檗碱[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1933-1936.
[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 458, 1139, 1183, 1140.