

# HPLC 同时测定清热解毒胶囊中 6 种成分的含量

林远凤<sup>1</sup>, 黄燕萍<sup>2\*</sup>

(1. 广西北海市人民医院, 广西 北海 536000; 2. 广西北海食品药品检验所, 广西 北海 536000)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 测定清热解毒胶囊中绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素含量的方法。方法:采用 Eclipse XDB 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.4% 磷酸溶液,梯度洗脱,流速 0.80 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 275 nm。绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素与其相邻质谱峰能完全分离。结果:绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素的线性范围分别为 7.83 ~ 313 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 9$ ), 4.30 ~ 132 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 8$ ), 0.836 ~ 33.5 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 7$ ), 4.36 ~ 349 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=1.000\ 0$ ), 0.731 ~ 58.4 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 7$ ), 0.314 ~ 12.6 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 7$ )。方法回收率均不低于 98%。结论:该方法简便、准确、重复性好,能排除其他成分的干扰,可用于该制剂的质量控制的评价。

**[关键词]** 高效液相色谱; 绿原酸; 栀子苷; 木犀草苷; 黄芩苷; 连翘苷; 汉黄芩素; 清热解毒胶囊

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0067-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170067

## Simultaneous Determination of Six Effective Components in Qingre Jiedu Capsules by HPLC

LIN Yuan-feng<sup>1</sup>, HUANG Yan-ping<sup>2\*</sup> (1. Guangxi Beihai People's Hospital, Beihai 536000, China; 2. Guangxi Beihai Food and Drug Control Institute, Beihai 536000, China)

**[Abstract]** **Objective:** A HPLC method was established for the determination of chlorogenic acid, geniposide, luteolin, baicalin, phillyrin and wogonin in Qingrejiedu capsules. **Method:** Eclipse XDB column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was adopted and eluted in gradient with the mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution. The flow rate was 0.80 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 275 nm. Chlorogenic acid, geniposide, luteolin, baicalin, phillyrin and wogonin could be completely separated from adjacent mass spectra peaks. **Result:** The HPLC method showed a good linear range of 7.83-313 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 9$ ) for chlorogenic acid, 4.30-132 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 8$ ) for geniposide, 0.836-33.5 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 7$ ) for luteolin, 4.36-349 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=1.000\ 0$ ) for baicalin, 0.731-58.4 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 7$ ) for phillyrin and 0.314-12.6 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 7$ ) for wogonin, with the recoveries above 98%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and highly reproducible and so can be used to remove interferences from other components and evaluate the quality control of the preparation.

**[Key words]** HPLC; chlorogenic acid; geniposide; luteolin; baicalin; phillyrin; wogonin; Qingrejiedu capsules

清热解毒胶囊由石膏、金银花、玄参、地黄、连翘、栀子、甜地丁、黄芩、龙胆、板蓝根、知母、麦冬 12 味中药经加工、提取制成的中成药<sup>[1-2]</sup>,具有清热解毒的功效。临床用于治疗流感、上呼吸道感染。原标准只有黄芩苷的含量测定项,目前已有文献报道有测定清热解毒胶囊中的 1 种或 2 种成分<sup>[3-5]</sup>,但尚未见同时测定清热解毒胶囊绿原酸、栀子苷、木犀草

苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素 6 种成分的报道,由于清热解毒胶囊由 12 味药组成,化学成分复杂,1 ~ 2 个成分的定量测定不能完整地反映该制剂的化学组分特征。现有标准中<sup>[2]</sup>,多组分含量测定大都分别采用不同的高效液相色谱条件测定,工作效率低;随着先进仪器设备的面世,同时测定多成分含量的文献<sup>[6-7]</sup>也逐渐增多。本文参考相关文献<sup>[2-13]</sup>,建立

**[收稿日期]** 20140907(010)

**[第一作者]** 林远凤,副主任药师,从事医院管理研究, Tel:0779-2022201, E-mail:yuanfeng4@126.com

**[通讯作者]** \* 黄燕萍,主任药师,从事食品与药品检验研究, Tel:0779-6803508, E-mail:huangyanping500@163.com

了HPLC测定清热解毒胶囊中金银花、栀子、连翘、黄芩的主要成分绿原酸、木犀草苷、栀子苷、连翘苷、黄芩苷和汉黄芩素的含量,为控制清热解毒胶囊的质量提供依据。

### 1 仪器与试药

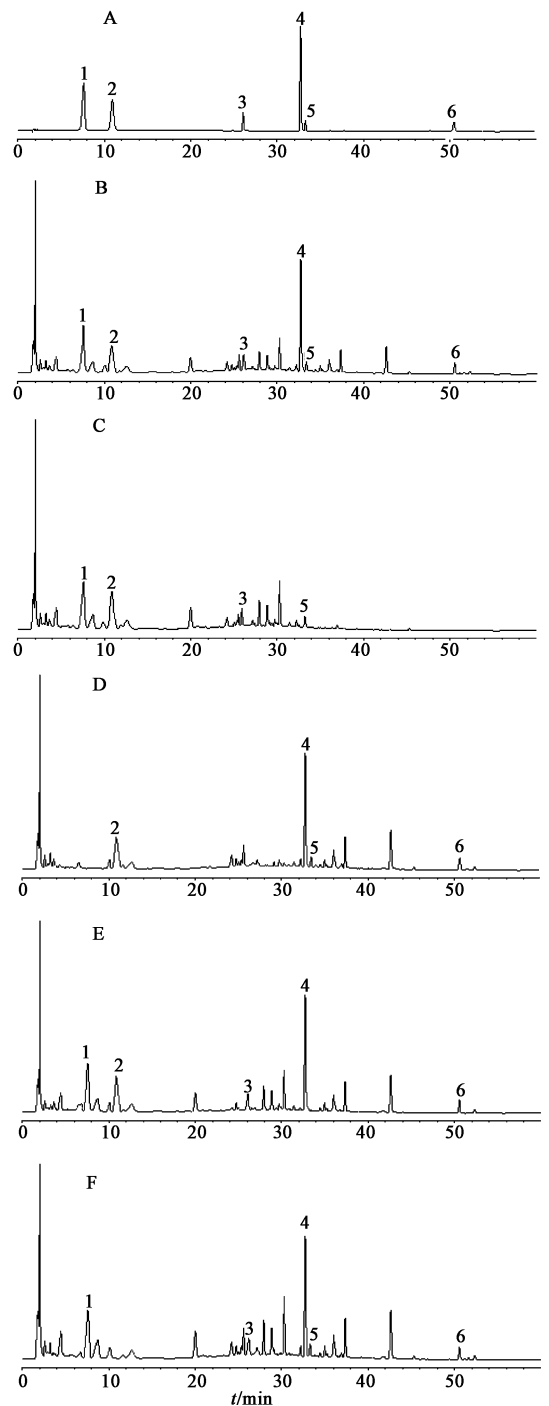
1200系列高效液相色谱仪,G1322A溶剂脱气机,G1311A(Quat Pump)四元泵,G1329A(ALS)自动进样器,G1314B VWD紫外检测器(DEGASSER)(1200 LC色谱工作站,美国Agilent);CP225D型电子天平(德国赛多利斯),AW-120型自动电子天平(西班牙Cobos),SB3200WS型超声波清洗器(上海必能信),HT-203A型柱温箱(天津市恒奥科技发展有限公司)。

绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷、汉黄芩素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110753-201314,110749-200714,111720-201106,110715-200815,110821-201112,111514-200202),清热解毒胶囊(样1,样2,样3,江西银涛药业有限公司,批号分别为1202002,1208011,1302005),乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Shim-pack VP-ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm);流动相乙腈(A)-0.4%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~13 min,10.5% A;13~53 min,10.5%~48% A;53~55 min,48.0%~10.5% A),流速0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长275 nm,柱温30℃,进样量10 μL。在该色谱条件下,绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素与相邻组分峰的分度均>1.5,理论塔板数按绿原酸峰计不低于1000,阴性样品在与对照品色谱峰相应的位置上无吸收峰,表明处方中的其他成分对测定结果无影响。见图1。

**2.2 线性关系的考察** 精密称取绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素对照品适量,加甲醇配制成含绿原酸0.3914 g·L<sup>-1</sup>,栀子苷0.4305 g·L<sup>-1</sup>,木犀草苷0.08365 g·L<sup>-1</sup>,黄芩苷0.6982 g·L<sup>-1</sup>,连翘苷0.07307 g·L<sup>-1</sup>,汉黄芩素0.03144 g·L<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。倍比稀释法配置成系列质量浓度的溶液,进样10 μL,测定各组分峰面积。以各组分质量浓度(C)为横坐标,相应峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程。分别为  $A = 16.040C - 5.9242$  ( $r = 0.9999$ ),  $A = 17.398C + 36.110$  ( $r = 0.9998$ ),  $A = 23.889C +$



A. 混合对照品;B. 样品;C. 缺黄芩;D. 缺金银花;E. 缺连翘;F. 缺栀子;1. 绿原酸;2. 栀子苷;3. 木犀草苷;4. 黄芩苷;5. 连翘苷;6. 汉黄芩素

图1 清热解毒胶囊 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Qingrejiadu capsules

1.5231 ( $r = 0.9997$ ),  $A = 28.151C - 41.683$  ( $r = 1.0000$ ),  $A = 15.841C + 9.1235$  ( $r = 0.9997$ ),  $A = 37.124C - 8.7835$  ( $r = 0.9997$ ), 线性范围分别为 7.83~313, 4.30~132, 0.836~33.5, 4.36~349, 0.731~58.4, 0.314~12.6 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3 供试品溶液的制备** 取本品 10 粒的内容物, 研细, 取约 0.5 粒的量, 精密称定, 精密加入 70% 乙醇 20 mL, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 40 min, 放冷, 用 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.4 阴性对照溶液的制备** 按处方中药味的比例, 分别自配缺金银花、缺栀子、缺连翘和缺黄芩的群药, 按其工艺制成阴性对照样品, 再按供试品溶液制备项下方法制备阴性对照溶液。

**2.5 精密度试验** 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 按上述色谱条件进样, 测定绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素的含量, 重复进样 6 次, 其 RSD 分别为 0.7%, 1.0%, 1.1%, 0.4%, 1.2%, 1.0%。

**2.6 重复性试验** 取同一批样品约 0.5 粒的量共 6 份, 精密称定, 分别制备供试品溶液, 进样 10 μL, 测定绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素的峰面积, 其 RSD 分别为 0.9%, 1.0%, 1.2%, 0.9%, 1.7%, 1.5%。

**2.7 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别在 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 时进样 10 μL, 记录色谱峰面积, 计算绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素的峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 0.9%, 1.6%, 0.7%, 1.1%, 1.5%。

**2.8 加样回收率试验** 取已测定绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素含量的清热解毒胶囊(批号 1202002) 样品 9 份(每份约 1/3 粒的量), 精密称定, 分别精密加入一定量的绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素对照品, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 清热解毒胶囊的加样回收率试验

Table 1 Result of sample recovery tests of Qingre Jiedu capsules

名称	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
绿原酸	0.721 3	0.352 3	1.080 2	101.88	100.51	1.5
	0.705 5	0.352 3	1.066 5	102.47		
	0.725 6	0.352 3	1.071 7	98.25		
	0.712 0	0.704 5	1.426 8	101.46		
	0.719 9	0.704 5	1.420 6	99.46		
	0.740 0	0.704 5	1.448 3	100.53		
	0.704 8	1.056 8	1.758 6	99.72		

续表 1

名称	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
栀子苷	0.730 0	1.056 8	1.806 5	101.87		
	0.722 1	1.056 8	1.768 3	99.01		
	0.382 5	0.189 4	0.5684	98.10	100.83	1.6
	0.374 2	0.189 4	0.566 3	101.46		
	0.384 8	0.189 4	0.579 8	102.93		
	0.377 6	0.378 8	0.761 6	101.37		
	0.381 8	0.378 8	0.770 0	102.48		
	0.392 4	0.378 8	0.766 9	98.84		
	0.373 8	0.568 3	0.947 3	100.93		
木犀草苷	0.387 1	0.568 3	0.953 5	99.67		
	0.382 9	0.568 3	0.960 7	101.67		
	0.135 1	0.066 9	0.203 5	102.22	101.02	1.7
	0.132 1	0.066 9	0.197 9	98.36		
	0.135 9	0.066 9	0.205 3	103.69		
	0.133 3	0.133 9	0.268 6	101.06		
	0.134 8	0.133 9	0.268 1	99.56		
	0.138 6	0.133 9	0.273 1	100.55		
	0.132 0	0.200 8	0.338 4	102.79		
黄芩苷	0.136 7	0.200 8	0.336 1	99.33		
	0.135 2	0.200 8	0.339 2	101.58		
	2.402 7	1.200 1	3.609 4	100.56	100.57	1.4
	2.350 1	1.200 1	3.589 4	103.27		
	2.417 0	1.200 1	3.597 7	98.38		
	2.371 6	2.400 2	4.770 1	99.93		
	2.397 9	2.400 2	4.825 9	101.16		
	2.464 8	2.400 2	4.845 6	99.19		
	2.347 7	3.600 3	5.976 0	100.78		
连翘苷	2.431 3	3.600 3	6.049 4	100.49		
	2.405 0	3.600 3	6.055 6	101.39		
	0.201 4	0.109 6	0.309 0	98.13	101.04	2.1
	0.197 0	0.109 6	0.310 9	103.88		
	0.202 6	0.109 6	0.313 5	101.14		
	0.198 8	0.219 2	0.414 1	98.22		
	0.201 0	0.219 2	0.421 2	100.46		
	0.206 6	0.219 2	0.432 6	103.08		
	0.196 8	0.328 9	0.534 2	102.61		
汉黄芩素	0.203 8	0.328 9	0.531 9	99.75		
	0.201 6	0.328 9	0.537 3	102.08		
	0.075 3	0.036 7	0.112 5	101.33	100.99	1.3
	0.073 7	0.036 7	0.109 8	98.33		
	0.075 8	0.036 7	0.113 5	102.83		
	0.074 4	0.073 4	0.148 3	100.81		
	0.075 2	0.073 4	0.149 8	100.73		
	0.077 3	0.073 4	0.151 0	100.46		
	0.073 6	0.110 0	0.185 8	101.95		

2.9 样品测定 取不同批号的清热解毒胶囊,按供试品溶液制备方法处理,进行 HPLC 分析,以外标一点法计算绿原酸、栀子苷、木犀草苷、黄芩苷、连翘苷和汉黄芩素的含量。结果见表 2。

表 2 清热解毒胶囊样品中含量测定 (n=3) mg/粒  
Table 2 Content determination results of Qingre Jiedu capsules (n=3) mg/pill

批号	绿原酸	栀子苷	木犀草苷	黄芩苷	连翘苷	汉黄芩素
1202002	2.131 0	1.130 1	0.399 0	7.098 0	0.595 0	0.222 6
1208011	1.794 4	1.327 5	0.552 5	7.546 1	0.528 9	0.129 1
1302005	1.812 2	1.168 1	0.470 6	7.421 9	0.703 0	0.199 4

### 3 讨论

本试验曾尝试用单一流动相洗脱,比较了乙腈-0.4%磷酸溶液(13:87),甲醇-水-磷酸(47:53:0.2),乙腈-水(15:85)<sup>[2]</sup>,结果发现分离效果差或只能测单一成分;也尝试以甲醇-0.2%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱<sup>[5]</sup>,效果都不理想,通过比较后,选择现正文所用流动相,待测的6个成分分离好且峰形佳。

经紫外吸收测定,绿原酸 277 nm 和 324 nm 处有最大吸收,栀子苷 238 nm 处有最大吸收,木犀草苷在 255,350 nm 有最大吸收,黄芩苷在 276,315 nm 波长处有最大吸收,连翘苷的最大吸收波长为 277 nm,汉黄芩素在 275 nm 波长处有最大吸收。由于汉黄芩素含量较其他 5 个成分低很多,故选用 275 nm 为切换测定波长,以提高汉黄芩素的检测灵敏度。

分别用甲醇、乙醇和 50% 甲醇,70% 乙醇作为提取溶剂超声提取 40 min 或 70% 乙醇超声提取 20,30,40,50 min 等进行提取考察。结果发现本实验所用溶剂及提取方法最为简便、完全。

现有的清热解毒胶囊的质量控制方法较简单,不能有效地控制清热解毒胶囊质量。而本实验所建立的方法检测成分多,效率高,6 种有效成分稳定性、重复性良好,回收率符合要求,可作为评价清热

解毒胶囊的质量标准之一。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 国家药品标准新药转正标准. 中药第四十一册[S]. 2004:91.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:159,205,231,282,846.

[3] 杜中惠. 高效液相色谱法测定清热解毒胶囊中绿原酸的含量[J]. 现代预防医学,2012,39(18):4821-4822,4827.

[4] 胡军波,张红萍. HPLC 法测定清热解毒胶囊中栀子苷的含量[J]. 海峡药学,2013,25(2):44-46.

[5] 费毅琴,聂晶. HPLC 法同时测定清热解毒软胶囊中黄芩苷和栀子苷的含量[J]. 中国药事,2012,26(5):490-493.

[6] 班丽娜,徐远金. HPLC/MS 同时测定双黄连口服液中的 4 种有效成分[J]. 中成药,2012,34(2):265-268.

[7] 罗玲,黄玉婵,黄琴等. UPLC-MS-MS 同时测定双黄连粉针中 7 种活性成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(13):80-84.

[8] 戢艳琼,李洪亮,张秋芳. HPLC 法测定复方鱼腥草合剂中绿原酸、黄芩苷的含量[J]. 中国药师,2012,15(6):828-830.

[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] 赵霞,杨丽. HPLC 法测定双黄连颗粒中栀子苷的含量[J]. 中国药事,2012,26(1):59-60,63.

[11] 周燕,俞秀. HPLC 法测定双黄连胶囊中栀子苷、黄芩苷、连翘苷的含量[J]. 中国药师,2012,15(1):72-74.

[12] 宋明侠. HPLC 法同时测定复方金银花颗粒中栀子苷、连翘苷和黄芩苷的含量[J]. 按摩与康复医学,2011,21(5)(下):31.

[13] 汤须崇,肖美添,叶静. HPLC 法同时测定双黄连制剂中栀子苷、黄芩苷和连翘苷的含量[J]. 江西中医学院学报,2010,22(3):64-66.

[责任编辑 顾雪竹]