

# HPLC法同时测定小儿清咽颗粒中5种成分的含量

张申亮<sup>1\*</sup>, 聂黎行<sup>2#</sup>(1.山西省平遥县人民医院药剂科,山西平遥 031100;2.中国食品药品检定研究院中药民族药检定所,北京 100050)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-3004-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.35

**摘要** 目的:建立同时测定小儿清咽颗粒中哈巴昔、哈巴俄昔、绿原酸、咖啡酸、连翘苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Zorbax SB-C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为210 nm(0~13 min,哈巴昔)、327 nm(13~25 min,绿原酸、咖啡酸)、277 nm(25~29 min,连翘苷)、210 nm(29~40 min,哈巴俄昔),柱温为30℃,进样量为10 μL。结果:哈巴昔、哈巴俄昔、绿原酸、咖啡酸、连翘苷检测进样量线性范围分别为8.400~168.0 ng( $r=0.999\ 6$ )、11.30~226.0 ng( $r=0.999\ 8$ )、128.8~257.6 ng( $r=0.999\ 3$ )、8.110~162.2 ng( $r=0.999\ 6$ )、29.69~593.8 ng( $r=0.999\ 4$ );定量限分别为33.39、451.2、515.2、324.5、1 188 ng/mL,检测限分别为8.348、112.8、128.8、81.12、297.0 ng/mL;精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为96.39%~98.64%(RSD=0.83%, $n=6$ )、96.60%~98.89%(RSD=0.89%, $n=6$ )、96.28%~99.22%(RSD=1.25%, $n=6$ )、96.49%~99.54%(RSD=1.16%, $n=6$ )、96.26%~99.70%(RSD=1.30%, $n=6$ )。结论:该方法操作简单、结果准确,适用于小儿清咽颗粒中5种成分含量的同时测定。

**关键词** 小儿清咽颗粒;高效液相色谱法;波长切换;哈巴昔;哈巴俄昔;绿原酸;咖啡酸;连翘苷

## Simultaneous Determination of 5 Components in Xiaoer Qingyan Granules by HPLC

ZHANG Shenliang<sup>1</sup>, NIE Lixing<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Shanxi Pingyao County People's Hospital, Shanxi Pingyao 031100, China; 2. Division of TCM and Ethnomedicine, National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of harpagide, harpagoside, chlorogenic acid, caffeic acid and phillyrin in Xiaoer qingyan granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Zorbax SB-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm (0-13 min, harpagide), 327 nm (13-25 min, chlorogenic acid and caffeic acid), 277 nm (25-29 min, phillyrin), 210 nm (29-40 min, harpagosid); the column temperature was 30℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of harpagide, harpagosid, chlorogenic acid, caffeic acid and phillyrin were 8.400-168.0 ng( $r=0.999\ 6$ ), 11.30-226.0 ng ( $r=0.999\ 8$ ), 128.8-257.6 ng ( $r=0.999\ 3$ ), 8.110-162.2 ng( $r=0.999\ 6$ ), 29.69-593.8 ng( $r=0.999\ 4$ ), respectively. LOQs of the 5 components were 33.39, 451.2, 515.2, 324.5, 1 188 ng/mL; LODs were 8.348, 112.8, 128.8, 81.12, 297.0 ng/mL, respectively; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 96.39%-98.64% (RSD=0.83%, $n=6$ ), 96.60%-98.89% (RSD=0.89%, $n=6$ ), 96.28%-99.22% (RSD=1.25%, $n=6$ ), 96.49%-99.54% (RSD=1.16%, $n=6$ ), 96.26%-99.70% (RSD=1.30%, $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and suitable for simultaneous determination of 5 components in Xiaoer qingyan granules

**KEYWORDS** Xiaoer qingyan granules; HPLC; Wavelength switching; Harpagide; Harpagosid; Chlorogenic acid; Caffeic acid; Phillyrin

小儿清咽颗粒是由玄参、蒲公英、连翘等中药组成的成方制剂,具有清热解表、解毒利咽的功效,可用于小儿外感风热引起的发热头痛、咳嗽音哑、咽喉肿痛等症。处方中玄参具有清热凉血、滋阴降火、解毒散结的功效;蒲公英具有清热解毒、消肿散结的功效;连翘具有清热解毒、消肿散结、疏散风热的功效<sup>[1]</sup>。小儿清咽颗粒现收载于《卫生部药品标准中药成方制剂(第六册)》,但

标准中只有薄层鉴别项,未有含量测定项,不能保证该制剂的质量和用药的有效性<sup>[2]</sup>;且目前的文献报道多为对小儿清咽颗粒中1~2个成分的含量进行测定,不能全面控制该制剂的质量<sup>[3-7]</sup>。鉴于此,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定小儿清咽颗粒中玄参的主要成分(哈巴昔和哈巴俄昔)、蒲公英中的主要成分(绿原酸和咖啡酸)、连翘中的主要成分(连翘苷)含量的方法,以期完善该制剂的质量标准提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括四元泵、可变波长检测器、自

\* 副主任药师。研究方向:医院药学。E-mail: zhangsl2000@hotmail.com

# 通信作者:副研究员,硕士。研究方向:中药分析。E-mail: nielixing@163.com

动进样器、ChemStation 化学工作站(美国 Agilent 公司); AE240 型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率: 150 W, 频率: 40 kHz)。

## 1.2 药品与试剂

小儿清咽颗粒(福建省泉州罗裳山制药厂, 批号: 160318、160106、150908, 规格: 6 g/袋); 哈巴昔对照品(批号: 111729-201506, 纯度: 95.9%)、哈巴俄昔对照品(批号: 111730-201508, 纯度: 96.0%)、绿原酸对照品(批号: 110753-201415, 纯度: 96.2%)、咖啡酸对照品(批号: 110885-200102, 纯度: 100.0%)、连翘苷对照品(批号: 110821-201615, 纯度: 94.9%)均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min, 2%→7% A; 5~10 min, 7%→13% A; 10~20 min, 13%→25% A; 20~40 min, 25%→35% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 210 nm(0~13 min, 哈巴昔)、327 nm(13~25 min, 绿原酸、咖啡酸)、277 nm(25~29 min, 连翘苷)、210 nm(29~40 min, 哈巴俄昔); 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取哈巴昔、哈巴俄昔、绿原酸、咖啡酸、连翘苷对照品适量, 加甲醇分别制成每 1 mL 含哈巴昔 208.7 μg、哈巴俄昔 225.6 μg、绿原酸 257.6 μg、咖啡酸 202.8 μg、连翘苷 198.0 μg 的单一对照品贮备液。分别精密量取哈巴昔对照品贮备液 0.4 mL、哈巴俄昔对照品贮备液 0.5 mL、绿原酸对照品贮备液 0.5 mL、咖啡酸对照品贮备液 0.4 mL、连翘苷对照品贮备液 1.5 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 即得。

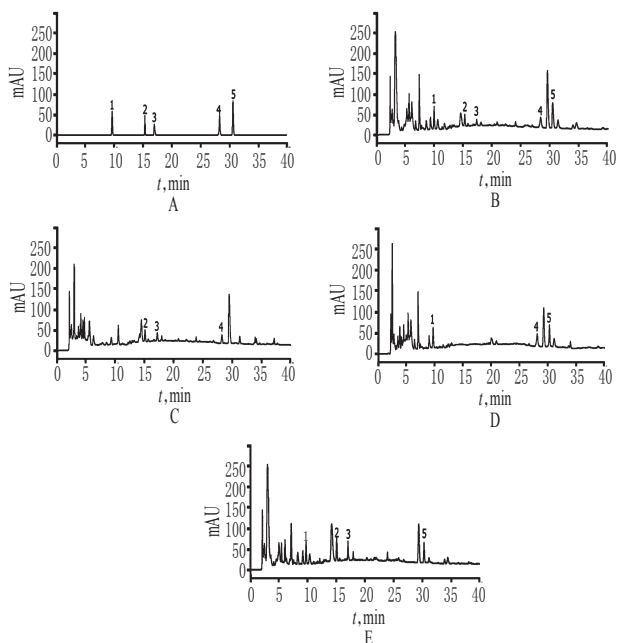
2.2.2 供试品溶液 取样品适量, 研细, 取约 3 g, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇溶液超声处理 30 min, 放冷至室温, 再加 50% 甲醇定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺分别制备缺玄参、蒲公英、连翘的阴性样品, 再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

分别取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、各阴性对照溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。由图 1 可知, 各成分均能达到基线分离, 分离度均>1.5; 各成分的理论板数均>3 000, 哈巴昔、哈巴俄昔、绿原酸、咖啡酸、连翘苷的保留时间分别为 9.6、30.9、15.3、17.1、28.3 min。结果表明, 其他成分

对测定无干扰。



A.混合对照品; B.供试品; C.缺玄参的阴性对照(210 nm); D.缺蒲公英的阴性对照(327 nm); E.缺连翘的阴性对照(277 nm); 1.哈巴昔; 2.绿原酸; 3.咖啡酸; 4.连翘苷; 5.哈巴俄昔

A. mixed control; B. test sample; C. negative control without *Scrophularia ningpoensis* (210 nm); D. negative control without taraxaci herba (327 nm); E. negative control without *Forsythia suspense* (277 nm); 1. harpagide; 2. chlorogenic acid; 3. caffeic acid; 4. phillyrin; 5. harpagosid

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分进样量(x, ng)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 回归方程与线性范围见表 1。

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围, ng
哈巴昔	$y=2.375x-2.655$	0.999 6	8.400~168.0
哈巴俄昔	$y=2.744x+11.90$	0.999 8	11.30~226.0
绿原酸	$y=1.061x+3.954$	0.999 3	128.8~257.6
咖啡酸	$y=5.337x+9.531$	0.999 6	8.110~162.2
连翘苷	$y=658.2x-4.999$	0.999 4	29.69~593.8

### 2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 倍比稀释, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。当信噪比为 10:1 时, 得 LOQ; 当信噪比为 3:1 时, 得 LOD, 结果见表 2。

### 2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果, 哈巴昔、哈巴俄昔、绿原酸、咖啡酸、连翘苷峰面积的 RSD 分别为 0.65%、0.75%、1.48%、1.07%、1.76% (n=6), 表

明仪器精密度良好。

表2 LOQ与LOD测定结果(ng/mL)

待测成分	LOQ	LOD
哈巴昔	33.39	8.348
哈巴俄昔	451.2	112.8
绿原酸	515.2	128.8
咖啡酸	324.5	81.12
连翘苷	1118	297.0

## 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:160318)适量,分别于室温下放置0、1、2、4、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,哈巴昔、哈巴俄昔、绿原酸、咖啡酸、连翘苷峰面积的RSD分别为0.97%、1.06%、1.57%、1.27%、1.46%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

## 2.8 重复性试验

取样品(批号:160318)适量,研细,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算平均含量。结果,哈巴昔、哈巴俄昔、绿原酸、咖啡酸、连翘苷含量的平均值分别为62.90、88.62、115.9、64.29、271.4 μg/g, RSD分别为1.75%、1.46%、1.07%、1.58%、1.93%(n=6),表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:160318)适量,共6份,每份约1.5 g,各置于25 mL量瓶中,分别加入一定质量的待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

## 2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

## 3 讨论

### 3.1 提取方法和提取溶剂的选择

笔者分别考察了加热回流和超声两种样品提取方法对提取效果的影响,结果发现待测成分经超声法提取时比加热回流提取时的含量高,因此选择超声法为样品的提取方法。此外,还考察了不同的提取溶剂(30%甲醇溶液、50%甲醇溶液、70%甲醇溶液、甲醇)对提取效果的影响,结果发现50%甲醇溶液作为提取溶剂时,待测成分的提取效率高于其他溶剂,因此选择50%甲醇溶液为本试验的提取溶剂。

### 3.2 检测波长的选择

小儿清咽颗粒中哈巴昔、哈巴俄昔、绿原酸、咖啡酸、连翘苷等5个成分的紫外特征吸收波长各不相同,为了准确测定其含量,本试验根据2015年版《中国药典》(一部)<sup>[1]</sup>和相关文献<sup>[8-11]</sup>确定5个成分的最大吸收波长,

表3 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	取样量,g	样品含量,μg	加入量,μg	测得量,μg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
哈巴昔	1.504	94.60	104.4	196.7	97.80	97.77	0.83
	1.502	94.48	104.4	196.2	97.43		
	1.513	95.17	104.4	197.3	97.83		
	1.524	95.86	104.4	198.7	98.51		
	1.521	95.67	104.4	196.3	96.39		
	1.517	95.42	104.4	198.4	98.64		
哈巴俄昔	1.504	133.30	135.4	266.3	98.23	97.97	0.89
	1.502	133.10	135.4	267.0	98.89		
	1.513	134.10	135.4	267.8	98.74		
	1.524	135.10	135.4	266.9	97.34		
	1.521	134.80	135.4	265.6	96.60		
	1.517	134.40	135.4	267.1	98.01		
绿原酸	1.504	174.30	180.3	348.6	96.67	97.85	1.25
	1.502	174.10	180.3	350.8	98.00		
	1.513	175.40	180.3	351.7	97.78		
	1.524	176.60	180.3	355.4	99.17		
	1.521	176.30	180.3	349.9	96.28		
	1.517	175.80	180.3	354.7	99.22		
咖啡酸	1.504	96.69	101.4	196.0	97.94	97.48	1.16
	1.502	96.56	101.4	194.4	96.49		
	1.513	97.27	101.4	198.2	99.54		
	1.524	97.98	101.4	196.2	96.86		
	1.521	97.79	101.4	196.5	97.35		
	1.517	97.53	101.4	195.6	96.72		
连翘苷	1.504	408.20	395.9	794.5	97.58	97.65	1.30
	1.502	407.60	395.9	788.7	96.26		
	1.513	410.60	395.9	805.3	99.70		
	1.524	413.60	395.9	803.8	98.56		
	1.521	412.80	395.9	795.9	96.77		
	1.517	411.70	395.9	795.9	97.04		

表4 样品含量测定结果(n=3,μg/g)

Tab 4 Results of content determination of samples(n=3,μg/g)

样品批号	哈巴昔	哈巴俄昔	咖啡酸	绿原酸	连翘苷
160318	62.90	88.62	115.9	64.29	271.4
160106	59.82	84.74	109.3	75.91	282.2
150908	67.41	79.22	97.52	73.44	197.0

再通过紫外检测器的波长切换功能,在每个成分的最大吸收波长下同时、准确地测定小儿清咽颗粒中5个成分的含量,最终确定本试验的检测波长分别为210 nm(0~13 min,哈巴昔)、327 nm(13~25 min,绿原酸、咖啡酸)、277 nm(25~29 min,连翘苷)、210 nm(29~40 min,哈巴俄昔)。

### 3.3 洗脱方式和流动相的选择

小儿清咽颗粒中哈巴昔、哈巴俄昔、绿原酸、咖啡酸、连翘苷等5个成分的极性差异较大,且组分中化学成分较为复杂,采用等度洗脱流动相的方式,难以取得满意的色谱分离效果,因此选择梯度洗脱的方式。笔者还分别考察了不同的流动相体系(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液),结果发现采用乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相时,较其他流动相的色谱基线平稳,峰形更好,可达到分离测定的要求,因此本试验选择其作为流

# HPLC法同时测定白蒲黄片中5种成分的含量

崔俊凤\*,于志华,刘晓鹏(滨州市食品药品检验检测中心,山东滨州 256600)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-3007-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.36

**摘要** 目的:建立同时测定白蒲黄片中白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agela Technologies Venusil XBP C<sub>18</sub>(L),流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,检测波长为203 nm(白头翁皂苷B<sub>1</sub>)和323 nm(咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱检测进样量线性范围分别为0.081 41~8.141 μg( $r=0.999\ 8$ )、0.018 71~1.871 μg( $r=0.999\ 4$ )、0.037 33~3.733 μg( $r=0.999\ 2$ )、0.028 85~2.885 μg( $r=0.999\ 6$ )、0.027 58~2.758 μg( $r=0.999\ 7$ );定量限分别为0.009、0.006、0.008、0.011、0.013 ng,检测限分别为0.030、0.020、0.025、0.034、0.036 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为97.39%~102.34%(RSD=1.81%, $n=6$ )、96.77%~98.92%(RSD=0.85%, $n=6$ )、97.38%~103.72%(RSD=2.46%, $n=6$ )、96.73%~102.01%(RSD=2.22%, $n=6$ )、96.47%~101.07%(RSD=1.61%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于白蒲黄片中白头翁皂苷B<sub>1</sub>、咖啡酸、黄芩苷、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱含量的同时测定。

**关键词** 高效液相色谱法;白蒲黄片;白头翁皂苷B<sub>1</sub>;咖啡酸;黄芩苷;盐酸巴马汀;盐酸小檗碱;含量

## Simultaneous Determination of 5 Components in Baipuhuang Tablets by HPLC

CUI Junfeng, YU Zhihua, LIU Xiaopeng (Binzhou Center for Food and Drug Control, Shandong Binzhou 256600, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of pulchinenoside B<sub>1</sub>, caffeic acid, baicalin, palmatine hydrochloride and berberine hydrochloride in Baipuhuang tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination of Agela Technologies Venusil XBP C<sub>18</sub>(L) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05 mol/L monopotassium phosphate (gradient elution) at the flow rate of 0.8 mL/min. The detection wavelengths were set at 203 nm (pulchinenoside B<sub>1</sub>) and 323 nm (caffeic acid, baicalin, palmatine hydrochloride, berberine hydrochloride). The column temperature was set at 30 ℃, and the sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges were 0.081 41-8.141 μg for pulchinenoside B<sub>1</sub>( $r=0.999\ 8$ ), 0.018 71-1.871 μg for caffeic acid ( $r=0.999\ 4$ ), 0.037 33-3.733 μg for baicalin ( $r=0.999\ 2$ ), 0.028 85-2.885 μg for palmatine hydrochloride ( $r=0.999\ 6$ ) and 0.027 58-2.758 μg for berberine hydrochloride ( $r=0.999\ 7$ ). The limits of quantitation were 0.009, 0.006, 0.008, 0.011, 0.013 ng, respectively. The limits of detection were 0.030, 0.020, 0.025, 0.034, 0.036 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The average recoveries were 97.39%-102.34% (RSD=1.81%, $n=$

动相。

综上所述,本方法操作简单、结果准确,适用于小儿清咽颗粒中5种成分含量的同时测定。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社, 2015: 117、170、352.
- [2] 国家药典委员会.卫生部药品标准中药成方制剂:第六册[S]. 1992:23.
- [3] 陈苑林,叶芳.高效液相色谱法测定小儿清咽颗粒中绿原酸的含量[J].中国中医药现代远程教育, 2009, 7(10): 40-41.
- [4] 方铁铮,黎志坚,谭银合.高效液相色谱法测定小儿清咽颗粒中哈巴俄苷的含量[J].中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8):20-22.
- [5] 胡艳红,李志浩.HPLC测定小儿清咽颗粒中靛蓝和靛玉

红的含量[J].现代仪器与医疗, 2013, 19(4):58-61.

- [6] 杨志一,王汉平.HPLC法测定小儿清咽颗粒中牛蒡苷的含量[J].中国药师, 2006, 9(1):44-45.
- [7] 张晓南,毛云宏,游燕,等.小儿清咽颗粒中青黛的薄层色谱鉴别研究[J].中国民族民间医药, 2015, 24(22):21-22.
- [8] 林世和,易艳东,肖宏,等.HPLC法同时测定白英叶中绿原酸、咖啡酸及芦丁的含量[J].中国药师, 2011, 14(1): 43-45.
- [9] 白云娥,袁鹏飞,王庆辉,等.HPLC-UV波长转换法测定玄参药材及饮片中哈巴昔与哈巴俄苷的含量[J].中国中药杂志, 2011, 36(19):2697-2702.
- [10] 李超,董自波,蒋金来,等.HPLC法测定蒲公英中菊苣酸、咖啡酸与绿原酸[J].中草药, 2015, 46(23):3577-3580.
- [11] 孙业成,李亚荣.高效液相色谱法测定利咽灵片中哈巴俄苷的含量[J].中国药师, 2007, 10(12):1223-1224.

(收稿日期:2017-01-19 修回日期:2017-04-04)

(编辑:刘柳)

\* 主管中药师。研究方向:药品检验检测和质量标准。电话:0543-8176988。E-mail:yjcsjf@163.com