

# RP-HPLC法同时测定羚羊感冒胶囊中5种成分的含量

王玉团\*,许丽丽,林晓,刘群(山东省食品药品检验所,济南 250101)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4475-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.20

**摘要** 目的:建立同时测定羚羊感冒胶囊中绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Waters Atlantis C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为35℃,检测波长为280 nm。结果:绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷的进样量分别在0.008 2~0.164 0 μg( $r=0.999 9$ )、0.052 8~1.056 0 μg( $r=0.999 8$ )、0.022 7~0.454 0 μg( $r=0.999 6$ )、0.021 4~0.427 0 μg( $r=0.999 6$ )、0.020 6~0.412 0 μg( $r=0.999 5$ )范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.00%;平均加样回收率分别为100.81%、99.22%、102.03%、98.55%、99.14%( $n$ 均为6)。结论:该方法操作简便,结果准确、可靠,可用于羚羊感冒胶囊的质量控制。

**关键词** 反相高效液相色谱法;羚羊感冒胶囊;绿原酸;牡荆苷;连翘酯苷A;连翘苷;牛蒡苷;含量测定

## Simultaneous Determination of 5 Components in Lingyang Ganmao Capsules by RP-HPLC

WANG Yu-tuan, XU Li-li, LIN Xiao, LIU Qun (Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To establish the method for simultaneous determination of chlorogenic acid, vitexin, forsythoside A, forsyth and arctinin in Lingyang ganmao capsules. **METHODS:** RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Waters Atlantis C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 35℃ and the detection wavelength was set at 280 nm. **RESULTS:** The linear range were 0.008 2-0.1640 μg for chlorogenic acid( $r=0.999 9$ ), 0.052 8-1.056 0 μg for vitexin( $r=0.999 8$ ), 0.022 7-0.454 0 μg for forsythoside A ( $r=0.999 6$ ), 0.021 4-0.427 0 μg for forsyth ( $r=0.999 6$ ) and 0.020 6-0.412 0 μg for arctinin ( $r=0.999 5$ ), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%; average recoveries were 100.81%, 99.22%, 102.03%, 98.55% and 99.14% ( $n=6$ ), respectively. **CONCLUSIONS:** The method is accurate and reliable, and can be used for the quality control of Lingyang ganmao capsules.

**KEYWORDS** RP-HPLC; Lingyang ganmao capsules; Chlorogenic acid; Vitexin; Forsythoside A; Forsyth; Arctinin; Content determination

羚羊感冒胶囊是治疗感冒的常用中成药,由羚羊角、金银花、淡竹叶、牛蒡子、连翘等10味药组成,临床主要用于流行性感冒、伤风咳嗽、头晕发热、咽喉肿痛等症,疗效较好,市场需求量非常大。日常检验中发现,市售羚羊感冒胶囊的内在质量存在较大差异,特别是有效成分的含量差异明显,有必要对其质量控制方法进行研究。

现行的羚羊感冒胶囊质量标准有4个,分别为《中药成方制剂(第六册)》(无含量测定项)、国家食品药品监督管理局标准YBZ01022004(仅有绿原酸含量测定项)、YBZ24122005-2009Z(仅有牛蒡苷含量测定项)和YBZ04062006(仅有绿原酸含量测定项)。上述标准含量测定指标不仅不统一,而且不够完善,缺乏较全面的专属性含量测定项,无法有效控制羚羊感冒胶囊的质量。本研究参考羚羊感冒片的现有质量标准及相关文献<sup>[1-5]</sup>,对羚羊感冒胶囊的药效成分(绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷、牛蒡苷)进行了含量测定的方法学研究,建立了反相高效液相色谱(RP-HPLC)法同时测定5种有效成分含量的方法,并应用该方法对市售31批羚羊感冒胶囊进行了含量测定,现将结果报道如下。

## 1 材料

\* 主管中药师。研究方向:中药质量控制与标准。电话:0531-81216527。E-mail: wytuan@163.com

## 1.1 仪器

1200型HPLC仪(美国Agilent公司);AE240型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

## 1.2 药品与试剂

绿原酸对照品(批号:110753-200413)、牡荆苷对照品(批号:111687-200602)、连翘苷对照品(批号:110821-200508)、连翘酯苷A对照品(批号:111810-201001,含量:94.3%)、牛蒡苷对照品(批号:110819-201007,含量:94.6%)均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂均为分析纯。羚羊感冒胶囊来自10家企业的31批市售药品(规格:每粒0.42 g),详见表1。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 混合对照品溶液** 取绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷对照品各适量,精密称定,分别加50%甲醇制成每1 ml含0.204 8、1.320 0、1.135 4、1.068 0、1.029 2 mg的对照品贮备液。分别精密量取对照品贮备液2、2、1、1、1 ml,置同一10 ml量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,制成质量浓度分别为40.96、264.00、113.54、106.80和102.92 μg/ml的混合对照品溶液。再分别精密量取对照品贮备液20、20、10、10、10 ml,置

100 ml量瓶中,分别用50%甲醇稀释至刻度,制成同上质量浓度的5种对照品溶液。

表1 31批羚羊感冒胶囊来源

Tab 1 The source of 31 batches of Lingyang ganmao capsules

厂家	批号							
A	130201	120301	111101	111201	120201	130202	130102	130203
B	120913	130325	130326	120628	120921	120625		
C	20130201	20120902						
D	20130401	20130505	20130702	20130901				
E	20121201	20130101						
F	20130826	20130817	20130849					
G	111238	131150						
H	130504	130308						
I	20130101							
J	130301							

2.1.2 供试品溶液 取装量差异项下的本品内容物约0.42 g,精密称定,加50%甲醇50 ml,密塞,称定质量,超声(功率:500 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,再次精密称定,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,即得。

2.1.3 阴性对照溶液 按处方工艺制备缺金银花(含绿原酸)、淡竹叶(含绿原酸和牡荆苷)、牛蒡子(含牛蒡苷)和连翘(含连翘酯苷A和连翘苷)的羚羊感冒胶囊阴性对照样品,并按“2.1.2”项下方法制备阴性对照溶液,即得。

## 2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters Atlantis C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~20 min, 5% → 25% A; 20~70 min, 25% → 35% A; 70~90 min, 35% → 55% A);流速:1 ml/min;柱温:35 °C;检测波长:280 nm。在此色谱条件下,绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷的保留时间分别为9.974、39.767、43.807、60.715和62.065 min,与相邻峰的分度均>1.5;理论板数按绿原酸峰计算应不低于6 000。色谱见图1。

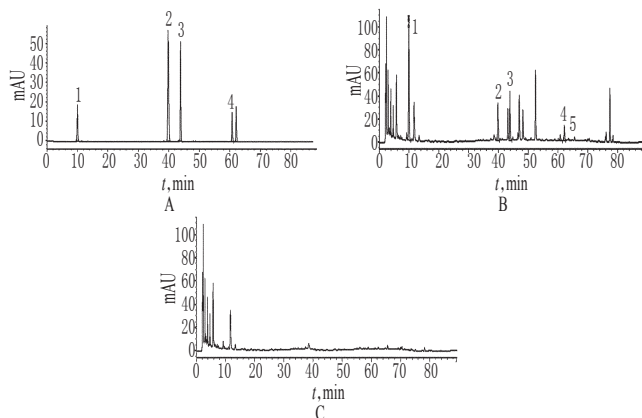


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品(F企业,批号:20130849);C.阴性对照;1.绿原酸;2.牡荆苷;3.连翘酯苷A;4.连翘苷;5.牛蒡苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample (manufacturer F, lot No. 20130849); C. negative control; 1. chlorogenic acid; 2. vitexin; 3. forsythoside A; 4. forsyth; 5. arctinin

## 2.3 线性关系考察

分别取绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷对照品贮备液各适量,采用倍比稀释法制成系列质量浓度的溶液,

按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品的进样量(x, μg)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得各组分的回归方程及相关系数,详见表2。由表2可见,5种成分的进样量均在各自线性范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

表2 各组分的回归方程及线性范围(n=5)

Tab 2 Regression equations and linear ranges of five components (n=5)

成分名称	回归方程	r	线性范围, μg
绿原酸	y=6 637.3x+1.461 7	0.999 9	0.008 2~0.164 0
牡荆苷	y=3 492x+253.18	0.999 8	0.052 8~1.056 0
连翘酯苷A	y=2 533.4x+161.94	0.999 6	0.022 7~0.454 0
连翘苷	y=2 213.7x+5.188 8	0.999 6	0.021 4~0.427 0
牛蒡苷	y=2 320.3x+21.542	0.999 5	0.020 6~0.412 0

## 2.4 精密度的试验

精密量取同一混合对照品溶液适量,按“2.2”项下色谱条件进样测定,重复6次,记录峰面积。结果,绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷峰面积的RSD分别为1.13%、0.92%、1.04%、1.27%和0.49%(n=6),表明仪器精密度良好。

## 2.5 稳定性试验

精密吸取“2.1.2”项下的供试品溶液10 μl,分别于0、2、4、6、10、12 h按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷峰面积的RSD分别为1.48%、1.03%、1.34%、1.17%和0.91%(n=6),表明供试品溶液在12 h内稳定。

## 2.6 重复性试验

精密称取同一批样品(A企业,批号:130201)共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷峰面积的RSD分别为1.64%、1.03%、0.49%、0.73%和0.89%(n=6),表明本法重复性良好。

## 2.7 方法适应性考察

本研究比较了3种不同厂家牌号的HPLC色谱柱(Agilent Extend C<sub>18</sub>、Thermo BDS HYPERSIL C<sub>18</sub>和Waters Atlantis C<sub>18</sub>),结果均取得了较好的分离效果,表明本方法的适应性较好。

## 2.8 加样回收率试验

取已知含量的同一批(A企业,批号:130201)样品(绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷的含量分别为0.55、0.56、0.61、2.09、2.72 mg/粒,平均装量为0.433 9 g)粉末共6份,每份约0.21 g,精密称定,分别加入绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷和牛蒡苷的对照品溶液各5、1、3、10、10 ml(质量浓度分别为40.96、264.00、113.54、106.80、102.92 μg/ml),按“2.2”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。

## 2.9 样品含量测定

分别取31批样品每批装量差异项下的本品内容物约0.42 g,精密称定,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,用外标法计算样品含量,结果见表4。

## 3 讨论

### 3.1 含量测定结果分析

由本研究结果可见,不同厂家样品的各指标成分的含量高低不一,且差异较大,部分成分的含量甚至相差几十倍,提

表3 加样回收率试验结果(n=6)  
Tab 3 Results of recovery tests(n=6)

成分名称	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
绿原酸	0.210 5	0.266 8	0.204 8	0.471 5	99.95		
	0.213 1	0.270 1	0.204 8	0.479 1	102.05		
	0.210 7	0.267 1	0.204 8	0.475 6	101.81	100.81	1.20
	0.211 5	0.268 1	0.204 8	0.472 5	99.80		
	0.211 2	0.267 7	0.204 8	0.471 3	99.41		
牡荆苷	0.210 9	0.267 3	0.204 8	0.475 9	101.86		
	0.210 5	0.271 7	0.264 0	0.531 2	98.30		
	0.213 1	0.275 0	0.264 0	0.533 9	98.07		
	0.210 7	0.271 9	0.264 0	0.537 7	100.68	99.22	1.13
	0.211 5	0.273 0	0.264 0	0.537 3	100.11		
连翘酯苷A	0.211 2	0.272 6	0.264 0	0.536 2	99.85		
	0.210 9	0.272 2	0.264 0	0.531 8	98.33		
	0.210 5	0.295 9	0.340 6	0.641 0	101.32		
	0.213 1	0.299 6	0.340 6	0.645 2	101.47	102.03	0.85
	0.210 7	0.296 2	0.340 6	0.642 5	101.67		
连翘苷	0.211 5	0.297 3	0.340 6	0.648 9	103.23		
	0.211 2	0.296 9	0.340 6	0.642 3	101.41		
	0.210 9	0.296 5	0.340 6	0.647 5	103.05		
	0.210 5	1.013 9	1.068 0	2.072 5	99.12		
	0.213 1	1.026 5	1.068 0	2.070 1	97.72	98.55	0.76
牛蒡苷	0.210 7	1.014 9	1.068 0	2.078 9	99.63		
	0.211 5	1.018 7	1.068 0	2.065 4	98.01		
	0.211 2	1.017 3	1.068 0	2.072 3	98.78		
	0.210 9	1.015 9	1.068 0	2.062 6	98.01		
	0.210 5	1.319 6	1.029 0	2.347 4	99.88		
	0.213 1	1.335 9	1.029 0	2.344 5	98.02		
	0.210 7	1.320 8	1.029 0	2.339 2	98.97	99.14	0.66
	0.211 5	1.325 8	1.029 0	2.344 5	99.00		
	0.211 2	1.324 0	1.029 0	2.346 9	99.41		
	0.210 9	1.322 1	1.029 0	2.346 4	99.54		

表4 样品含量测定结果(mg/粒,n=2)

Tab 4 Results of content determination(mg/capsule,n=2)

批号	厂家	绿原酸	牡荆苷	连翘酯苷A	连翘苷	牛蒡苷
130201	A	0.55	0.56	0.61	2.09	2.72
120301	A	0.43	0.60	0.62	2.39	1.57
111101	A	0.28	0.51	0.54	1.36	1.79
111201	A	0.35	0.74	0.77	1.74	1.46
120201	A	0.28	0.31	0.28	1.16	1.82
130202	A	0.41	0.53	0.48	1.52	2.15
130102	A	0.56	0.64	0.64	1.82	2.90
130203	A	0.43	0.48	0.48	1.48	2.12
120913	B	0.47	0.34	0.32	0.28	1.02
130325	B	0.50	0.29	0.26	0.31	2.10
130326	B	0.55	0.32	0.31	0.26	2.58
120628	B	0.59	0.45	0.40	0.34	2.60
120921	B	0.50	0.40	0.37	0.26	1.43
120625	B	0.60	0.34	0.35	0.25	2.76
20130201	C	1.68	0.43	0.53	0.24	3.32
20120902	C	3.08	0.67	0.73	0.49	2.64
20130401	D	0.20	0.03	0.05	0.02	0.15
20130505	D	0.16	0.04	0.03	0.02	0.05
20130702	D	0.18	0.03	0.06	0.01	0.04
20130901	D	0.14	0.02	0.03	0.04	0.10
20121201	E	1.13	0.26	0.33	0.18	2.17
20130101	E	1.14	0.26	0.33	0.17	2.25
20130826	F	5.92	2.64	2.11	0.99	7.20

续表4

Continued tab 4

批号	厂家	绿原酸	牡荆苷	连翘酯苷A	连翘苷	牛蒡苷
20130817	F	6.53	3.26	2.71	2.05	2.79
20130849	F	6.32	3.28	2.65	1.18	2.11
111238	G	2.41	1.09	0.80	0.52	3.66
131150	G	2.42	0.99	0.81	0.41	0.56
130504	H	6.08	0.68	0.71	0.34	0.35
130308	H	6.02	0.76	0.77	0.31	0.56
20130101	I	1.65	1.92	1.99	0.80	3.00
130301	J	2.11	1.05	1.02	0.66	3.59

示不同企业的药品质量存在明显差异,无法保障临床用药的安全性和有效性。

### 3.2 检测波长的选择

笔者参考相关文献<sup>[6-11]</sup>,考察了各成分在流动相中的紫外吸收特征。结果表明,绿原酸、牡荆苷、连翘酯苷A、连翘苷、牛蒡苷分别在327、323、330、277、280 nm波长处有最大吸收,提示5种成分均在280 nm波长附近有较强的吸收,故选用280 nm作为其共同测定波长;又采用了切换波长法(各成分均在最大吸收波长处)进行试验,检测灵敏度未见明显提高,且波长切换处基线较差,故本研究未采用切换波长的检测方法。

### 3.3 未知色谱峰的处理

在样品分析过程中,笔者按照处方使用了中国食品药品检定研究院提供的相关对照药材进行色谱峰匹配,能准确定位出金银花、连翘、牛蒡子、淡竹叶、荆芥与样品中的相关色谱峰,但有些面积较大的色谱峰尚未能确定其结构。今后,本课题组将继续深入研究相关问题。

综上所述,本方法操作简便易行,结果准确、可靠,可用于羚羊感冒胶囊的质量控制。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1 102.
- [2] 杨庆胜, 张京健, 李江华. HPLC测定羚羊感冒片中牛蒡苷和连翘苷的含量[J]. 中成药, 2007, 29(3): 383.
- [3] 吴伯英. HPLC法测定羚羊感冒颗粒中牛蒡子苷含量[J]. 中药与临床, 2012, 3(3): 19.
- [4] 封宇飞. HPLC同时测定陈皮饮片中5种黄酮类化合物的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 10.
- [5] 姚帅, 杨跃华, 刘岩, 等. RP-HPLC同时测定大卫颗粒中绿原酸、黄芩苷、连翘苷、黄芩素和汉黄芩素的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1 253.
- [6] 李玉兰, 高美华. HPLC法测定不同产地连翘中连翘苷和连翘酯苷的含量[J]. 中国医学工程, 2010, 18(2): 46.
- [7] 付云飞, 李清, 毕开顺. RP-HPLC法同时测定不同产地连翘中的7种成分[J]. 中草药, 2013, 44(8): 1 043.
- [8] 朱红, 周旭, 袁海龙, 等. UPLC法测定连翘中连翘苷的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(31): 2 922.
- [9] 梁恕坤, 付庆霞, 冯尚彩. HPLC法同时测定山楂叶提取物中的7种主要成分[J]. 齐鲁药事, 2009, 28(1): 20.
- [10] 逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 等. RP-HPLC法同时测定芫花药材中7种黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 633.
- [11] 杨燕飞. HPLC法测定银翘解毒胶囊中连翘苷和牛蒡苷含量[J]. 中国药事, 2010, 24(4): 389.

(收稿日期: 2014-04-25 修回日期: 2014-07-07)