

同时测定小儿咳喘灵颗粒中 4 种成分的方法研究

王爱娜, 冯贞 (山西省食品药品检验所, 太原 030001)

摘要 **目的:** 建立同时测定小儿咳喘灵颗粒中 (R, S)-告依春、绿原酸、甘草苷和木犀草苷含量的方法。**方法:** 采用高效液相色谱法, Inertsil C8-3 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.5% 乙酸溶液, 梯度洗脱; 流速: 0.6 mL·min⁻¹; DAD 检测器, 检测波长: 木犀草苷 327 nm、绿原酸 327nm、甘草苷 276 nm、(R, S)-告依春 245 nm。**结果:** 金银花中木犀草苷和绿原酸、甘草中甘草苷及板蓝根中 (R, S)-告依春在各自的线性范围内与其峰面积呈良好的线性关系; 平均加样回收率在 99.4% ~ 103.4% 范围内, RSD 均符合规定。**结论:** 该方法准确、简便、快速, 可用于小儿咳喘灵颗粒中多味药材的多个活性成分的含量测定。

关键词: 中成药; 告依春; 绿原酸; 甘草苷; 木犀草苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7777(2017)08-0933-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.08.017

Study on the Method for Simultaneous Determination of Four Components in Xiaoer Kechuanling Granules

Wang Aina, Feng Zhen (Shanxi Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China)

Abstract **Objective:** To establish a method for the simultaneous determination of (R,S)-goitrin, chlorogenic acid, liquiritin and luteoloside in Xiaoer Kechuanling Granules. **Methods:** HPLC was conducted on a Dikma Inertsil C8-3 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with the mobile phase of Acetonitrile and 0.5% acetic acid at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹ under gradient elution. Detection wavelengths of DAD detector were as follows: luteoloside (327 nm), chlorogenic acid (327 nm), liquiritin (276 nm), as well as (R, S)- goitrin (245 nm). **Results:** Luteoloside and chlorogenic acid in honeysuckle, liquiritin in liquorice, and (R, S)- goitrin in radix isatidis all had a good linear relationship with their peak area. The average recoveries were in the range of 99.4% ~ 103.4%. RSD was in accordance with the regulations. **Conclusion:** The method is accurate, simple, and rapid, and it can be used in the determination of multiple medicinal materials and active components in Xiaoer Kechuanling Granules.

Keyword: proprietary chinese medicine; goitrin; chlorogenic acid; liquiritin; luteoloside; HPLC

小儿咳喘灵颗粒具有宣肺、清热, 止咳、祛痰、平喘功效。用于上呼吸道感染、气管炎、肺炎、咳嗽等。由麻黄、金银花、苦杏仁、板蓝根、石膏、甘草、瓜蒌 7 味处方组成^[1]。现行标准为部颁标准第四册及 18 个企业注册标准。中药制剂的

活性成分含量高低是反映其有效性的重要指标, 部颁标准第四册未对其进行控制, 部分注册标准即使对金银花的含量进行了测定, 也存在提取方法、色谱条件、限度规定差异较大和指标单一的问题。为达到对多味药材、多个活性成分的有效

控制,有必要统一采用HPLC法,开展金银花(绿原酸、木犀草苷)、甘草(甘草苷)、板蓝根(R, S-告依春)的含量测定^[2-8],以达到更有效地控制产品质量,保证临床用药安全有效的目的。

1 仪器与试药

仪器: Waters 2695-2996 HPLC高效液相色谱仪, PDA检测器。

试药: 乙腈为色谱纯; 水为纯化水; 其他试剂均为分析纯。

对照品: R, S-告依春、绿原酸、甘草苷、木犀草苷(供含量测定用; 批号分别为: 111753-2010304、0753-9910、111610-201106、111720-200602; 含量分别为: 99.9%、100%、93.7%、100%), 均购于中国食品药品检定研究院。

样品: 小儿咳喘灵颗粒(批号: 15021337, 神威药业集团有限公司)及2015年国家计划抽验样品小儿咳喘灵颗粒210批。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 迪马Inertsil C8-3柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈为流动相A, 0.5%乙酸溶液为流动相B, 按表1中的规定进行梯度洗脱; 检测波长: DAD检测器, 木犀草苷(327 nm)、绿原酸(327 nm)、甘草苷(276 nm)、(R, S)-告依春(245 nm); 流速: 0.6 mL · min⁻¹; 理论板数按

木犀草苷峰计算应不低于20000。

表1 流动相梯度洗脱表

时间 / 分钟	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 25	5 → 6	95 → 94
25 ~ 70	6 → 20	94 → 80
70 ~ 100	20 → 30	80 → 70

2.2 供试品溶液的制备

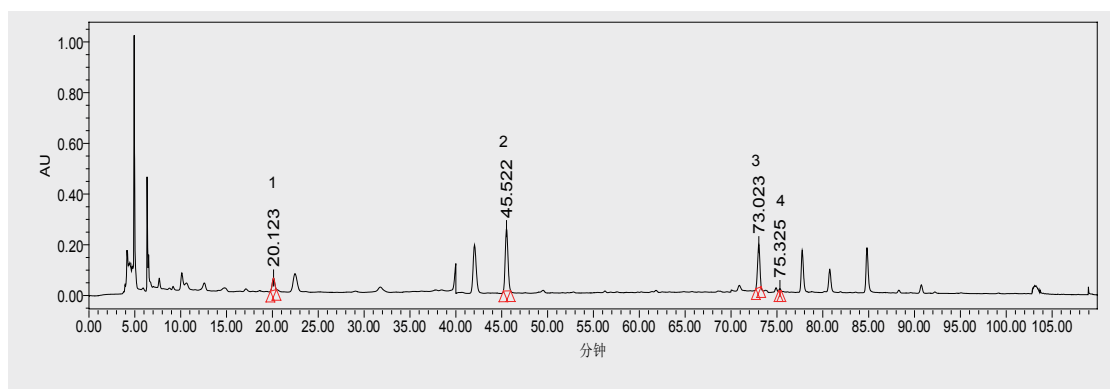
取本品适量, 研细, 取5 g, 精密称定, 精密加入70%甲醇20 mL, 称定重量, 超声处理(功率250 W, 频率33 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用70%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

取R, S-告依春、绿原酸、甘草苷、木犀草苷对照品适量, 精密称定, 分别加70%甲醇制成每1 mL含20、100、100、20 μg的溶液, 即得。

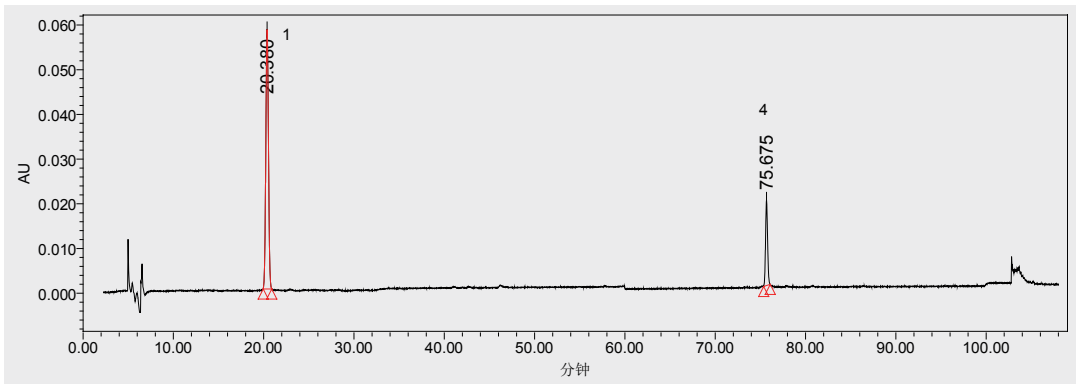
2.4 专属性试验

分别取处方中除金银花、甘草、板蓝根外的全部药味, 按本品制法及供试品溶液的制备方法分别制备金银花、甘草、板蓝根阴性对照溶液, 注入液相色谱仪进行测定, 结果表明: 阴性对照溶液无干扰, 专属性良好, 见图1~6。



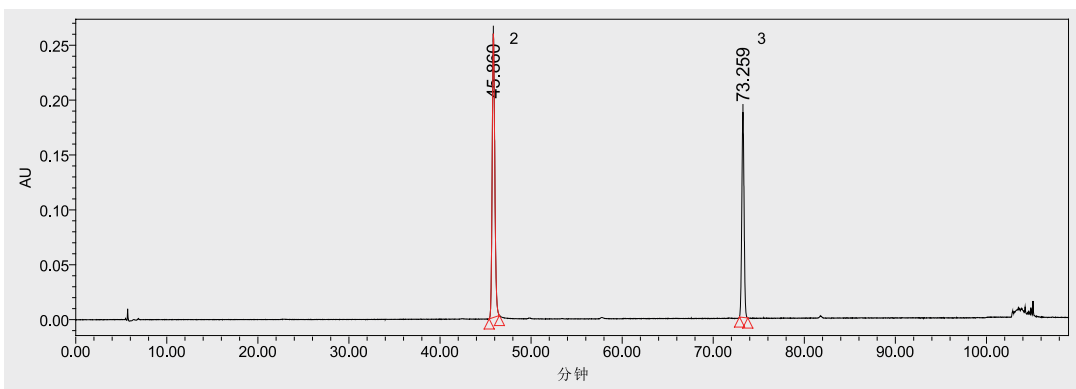
1. 告依春; 2. 绿原酸; 3. 甘草苷; 4. 木犀草苷

图1 供试品 HPLC 色谱图, 0~30 min 245 nm; 30~70 min 327 nm; 70~74 min 276 nm; 74~100 min 327 nm



1. 告依春; 4. 木犀草苷

图 2 对照品溶液 HPLC 色谱图, 0~60 min ; 245 nm ; 60~100 min ; 327 nm



2. 绿原酸; 3. 甘草苷

图 3 对照品溶液 HPLC 色谱图, 0~60 min ; 327 nm ; 60~100 min ; 276 nm

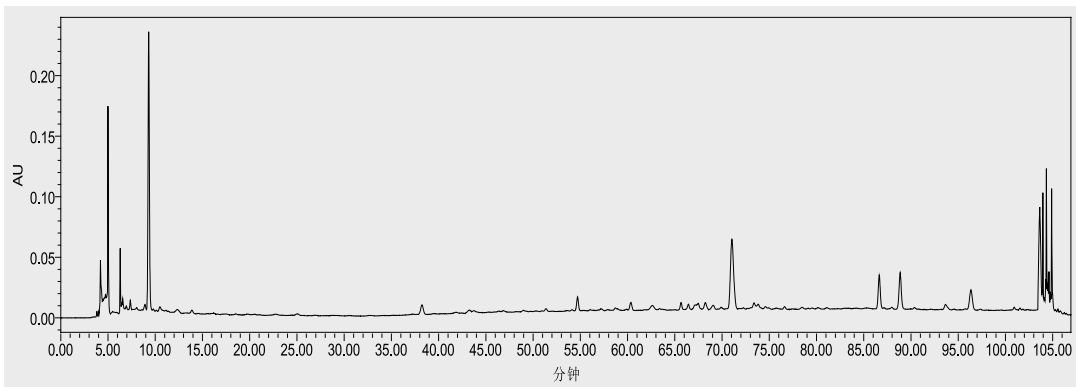


图 4 阴性 (缺金银花) 对照 HPLC 色谱图, 327 nm

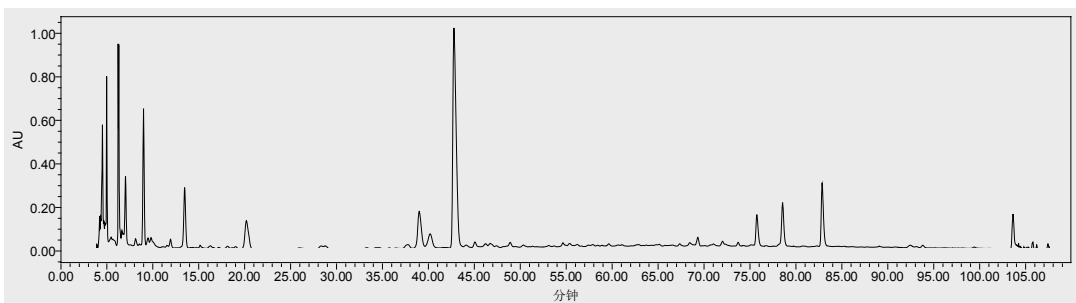


图 5 阴性 (缺甘草) 对照 HPLC 色谱图, 276 nm

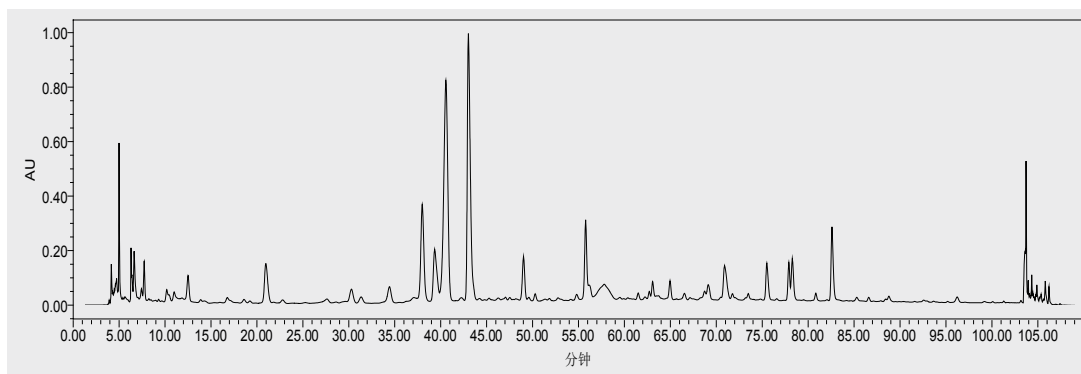


图 6 阴性（缺板蓝根）HPLC 色谱图，245 nm

2.5 线性关系考察

精密吸取 R, S- 告依春 ($0.01704 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、绿原酸 ($0.1928 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、甘草苷 ($0.2056 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)、木犀草苷 ($0.0167 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对照品溶液，按不同进样量依法测定，以峰面积值 (A) 为纵坐标、进样量 (μg) 为横坐标绘制标准曲线，分别测得回归方程：

$$y_{\text{R, S-告依春}} = 1.995 \times 10^7 + 69661, r = 0.9999$$

$$y_{\text{绿原酸}} = 5.176 \times 10^6 + 17472, r = 0.9999$$

$$y_{\text{甘草苷}} = 2.9701 \times 10^6 + 89647, r = 0.9999$$

$$y_{\text{木犀草苷}} = 3.3438 \times 10^6 + 8945, r = 0.9999$$

结果表明，R, S-告依春在 $0.00341 \sim 0.1704 \mu\text{g}$ 、绿原酸在 $0.03856 \sim 1.928 \mu\text{g}$ 、甘草苷在 $0.04112 \sim 2.056 \mu\text{g}$ 、木犀草苷在 $0.00334 \sim 0.167 \mu\text{g}$ ，有良好的线性关系，见表 2。

表 2 线性关系考察结果表 ($n=2$)

名称	进样 / μL	0.2	0.5	1	5	10
R, S- 告依春	μg	0.00341	0.00852	0.0170	0.0852	0.1704
	峰面积	1.2095×10^5	1.6747×10^5	2.6842×10^5	1.0889×10^6	2.1155×10^6
绿原酸	μg	0.03856	0.0964	0.1928	0.964	1.928
	峰面积	4.0413×10^5	6.9692×10^5	1.0795×10^6	5.2294×10^6	1.0129×10^7
甘草苷	μg	0.04112	0.1028	0.2056	1.028	2.056
	峰面积	2.1623×10^5	3.9022×10^5	6.7724×10^5	3.1848×10^6	6.1778×10^6
木犀草苷	μg	0.00334	0.00835	0.0167	0.0835	0.167
	峰面积	2.3997×10^4	3.7838×10^4	6.1898×10^4	2.8389×10^5	5.6965×10^5

2.6 精密度考察

取同一供试品 (批号: 15021337) 溶液，同一进样量，连续进样 5 次，结果平均峰面积分别为 942819、5367676、2379660、161919.8，RSD 分别为 0.19%、0.55%、0.51% 及 0.27%，结果表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性考察

取同一供试品 (批号: 15021337) 溶液，分

别于配制后 0、5、10、12、24 h，测定峰面积，峰面积平均值分别为 938111.8、5267222、2365475、160802，RSD 分别为 0.33%、0.82%、0.67% 及 0.58%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性考察

按拟订含量测定方法，对同一批号 (批号: 15021337) 的 6 份样品进行平行试验，测定结果表明该方法的重复性良好，见表 3。

表 3 重复性考察结果 (n=6)

	R, S- 告依春 / (mg · g ⁻¹)	绿原酸 / (mg · g ⁻¹)	甘草苷 / (mg · g ⁻¹)	木犀草苷 / (mg · g ⁻¹)
平均值	0.03220	0.3852	0.3974	0.0086
RSD/%	1.4	1.1	0.65	0.74

2.9 加样回收率试验

采用加样回收法, 取上述重复性试验所用的样品 (批号 15021337) 2.5 g (9 份), 精密称定, 分别精密加入一定量对照品, 按拟定含测方法制备,

依法测定, 计算回收率, 结果见表 4~7。

2.10 样品的测定

依法对 210 批次样品进行测定, 测得结果见表 8。

表 4 R, S- 告依春回收率测定结果 (n=2)

样品	取样量 /g	测得总量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD/%
1	2.5061	0.1430	0.0643	96.89	99.4	2.07
2	2.5085	0.1427	0.0643	96.27		
3	2.5040	0.1433	0.0643	97.51		
4	2.5189	0.1614	0.0804	100.25		
5	2.5013	0.1612	0.0804	100.37		
6	2.5050	0.1614	0.0804	100.37		
7	2.5068	0.1785	0.0965	101.35		
8	2.5049	0.1786	0.0965	101.45		
9	2.5101	0.1786	0.0965	101.35		

表 5 绿原酸回收率测定结果 (n=2)

样品	取样量 /g	测得总量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD/%
1	2.5061	1.7670	0.7760	103.31	103.4	0.40
2	2.5085	1.7658	0.7760	103.03		
3	2.5040	1.7659	0.7760	103.27		
4	2.5189	1.9643	0.9700	102.84		
5	2.5013	1.9647	0.9700	103.22		
6	2.5050	1.9643	0.9700	103.03		
7	2.5068	2.1639	1.1537	103.87		
8	2.5049	2.1648	1.1537	104.00		
9	2.5101	2.1645	1.1537	103.81		

表 6 甘草苷回收率测定结果 ($n=2$)

样品	取样量 /g	测得总量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD/%
1	2.5061	1.7987	0.8003	100.31	101.7	1.43
2	2.5085	1.8044	0.8003	100.90		
3	2.5040	1.8224	0.8003	103.37		
4	2.5189	2.0536	1.0530	99.96		
5	2.5013	2.0552	1.0530	100.78		
6	2.5050	2.0549	1.0530	100.61		
7	2.5068	2.2424	1.2061	103.32		
8	2.5049	2.2316	1.2061	102.50		
9	2.5101	2.2456	1.2061	103.48		

表 7 木犀草苷回收率测定结果 ($n=2$)

样品	取样量 /g	测得总量 /mg	加入量 /mg	回收率 /%	均值 /%	RSD/%
1	2.5025	0.0416	0.02024	99.09	100.0	1.12
2	2.5025	0.0414	0.02024	98.46		
3	2.5099	0.0417	0.02024	99.63		
4	2.5074	0.0466	0.0253	98.88		
5	2.5014	0.0469	0.0253	100.32		
6	2.5097	0.0470	0.0253	100.61		
7	2.5006	0.0524	0.03036	101.51		
8	2.5006	0.0518	0.03036	99.88		
9	2.5028	0.0524	0.03036	101.64		

表 8 抽验 6 批次以上不同企业样品多指标含量比较 ($n=2$)

生产企业	抽样批次	含量测定结果 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)			
		绿原酸	木犀草苷	甘草苷	告依春
1	11	0.0191 ~ 0.0239	未检出	0.0074 ~ 0.0244	0.0020 ~ 0.0103
2	8	0.0060 ~ 0.1861	未检出	0.0010 ~ 0.0253	0.0001 ~ 0.0010
3	6	0.0389 ~ 0.0420	未检出	0.0100 ~ 0.0142	未检出
4	8	0.0230 ~ 0.0677	未检出	0.0265 ~ 0.1026	0.0015 ~ 0.0128
5	6	0.0388 ~ 0.0536	未检出	0.0112 ~ 0.0306	0.0001 ~ 0.0003

续表 8

生产企业	抽样批次	含量测定结果 / (mg · g ⁻¹)			
		绿原酸	木犀草苷	甘草苷	告依春
6	11	0.0511 ~ 0.1731	0.0011 ~ 0.0050	0.0030 ~ 0.2552	0.0021 ~ 0.0104
7	15	0.0786 ~ 2.4380	0.0016 ~ 0.0031	0.0146 ~ 0.2381	0.0022 ~ 0.0283
8	9	0.1740 ~ 0.3364	0.0020 ~ 0.0056	0.0222 ~ 0.0820	0.0084 ~ 0.0129
9	11	0.1864 ~ 0.5360	0.0094 ~ 0.1100	0.0050 ~ 0.1055	0.0001 ~ 0.0003
10	8	0.3508 ~ 0.7082	0.0017 ~ 0.0050	0.0306 ~ 0.1528	未检出
11	33	0.3806 ~ 1.0481	0.0005 ~ 0.0054	0.0198 ~ 0.0617	0.0018 ~ 0.0304
12	6	0.4570 ~ 0.8643	0.0021 ~ 0.0183	0.0358 ~ 0.1566	0.0050 ~ 0.0128
13	13	0.2588 ~ 1.5227	0.0010 ~ 0.0070	0.0352 ~ 0.1360	0.0017 ~ 0.0182
14	8	0.8612 ~ 2.2118	0.0151 ~ 0.0438	0.1212 ~ 0.2711	0.0072 ~ 0.0570
15	6	0.9442 ~ 3.0073	0.0071 ~ 0.0174	0.2381 ~ 0.3249	0.0043 ~ 0.0410
16	6	4.0186 ~ 6.9687	0.0877 ~ 0.2482	0.6189 ~ 0.8804	0.0609 ~ 0.0916
平均值		0.6730	0.0129	0.0970	0.0095

注：R, S- 告依春检测限：0.04 ug · g⁻¹；木犀草苷检测限：0.02 ug · g⁻¹。

2.11 检测限与定量限考察

根据 R,S- 告依春、绿原酸、甘草苷、木犀草

苷标准溶液 $S/N=3$ 及 $S/N=10$ 时的溶液浓度，分别计算出 4 种成分的检测限和定量限，结果见表 9。

表 9 检测限、定量限考察结果 ($n=3$)

	R, S- 告依春 / (ug · g ⁻¹)	绿原酸 / (ug · g ⁻¹)	甘草苷 / (ug · g ⁻¹)	木犀草苷 / (ug · g ⁻¹)
LOD	0.04	0.20	0.25	0.02
LOQ	0.14	0.80	0.90	0.08

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第四册[S]. 1991: 19.
- [2] 中国药典: 一部[S]. 2015.
- [3] 刘敏彦, 高淑丽, 张丽华, 等. HPLC法同时测定不同产地金银花和山银花中6种有机酸成分[J]. 中药材, 2013, 36 (2): 196-198.
- [4] 张昀, 胡海延, 刘欣. 板蓝根药材及其制剂中告依春稳定性研究[J]. 河南大学学报 (医学版), 2014, 33 (1): 21-23.
- [5] 方宇, 张昀, 李钦. 感冒解毒灵颗粒中 (R, S) -告依

- 春的稳定性的研究[J]. 中成药, 2013, 35 (7): 1484-1486.
- [6] 陈钢, 侯世祥, 胡平. 金银花提取物中绿原酸的稳定性研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 28 (3): 223-226.
- [7] 涂北平, 赖卫华. 高纯度绿原酸的稳定性研究[J]. 江西化工, 2011, (3): 52-54.
- [8] 霍文杰, 李卫民, 高英. 干燥方法对金银花中绿原酸、木犀草苷及总黄酮含量的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2014, 30 (5): 737-739.

(收稿日期 2016年11月19日 编辑 邹宇玲)