

# 复方鱼腥草胶囊中连翘苷和黄芩苷的高效液相色谱法含量检测

周宝玉 虞文妹

(南京中医药大学附属常州市武进中医医院中药房, 南京, 213161)

**摘要** 目的:评价采用高效液相指纹图谱分析复方鱼腥草胶囊中连翘苷和黄芩苷的含量。方法:首先制备复方鱼腥草胶囊供试品溶液及连翘苷、黄芩苷对照品溶液,通过文献检索和预实验优化高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱的条件,色谱条件为采用 ACQUITY-BEHP-henyl-C<sub>18</sub> 保护柱(5 μm),以室内温度为柱温,进样量为 20 μL 以乙腈为流动相 A,以水 + 0.02% 磷酸为流动相 B,流速 1.0 mL/min;检测波长为 327 nm;进行线性回归、精密度、重复性、稳定性、专属性试验和加样回收率试验,考察 HPLC 方法学的严谨性,检测样品中连翘苷和黄芩苷的含量。结果:复方鱼腥草胶囊中连翘和黄芩专属性良好。连翘苷回归方程  $Y = 98\ 009X - 86\ 650$ ,  $r = 0.999\ 2$  ( $n = 5$ ),连翘苷对照品在 3.23 ~ 103.02 μg/mL 范围内线性关系良好;黄芩苷回归方程  $Y = 212\ 284X + 108\ 806$ ,  $r = 0.999\ 8$  ( $n = 5$ ),黄芩苷对照品在 2.74 ~ 87.89 μg/mL 范围内线性关系良好。薄层色谱法鉴别连翘苷和黄芩苷经 365 nm 的紫外灯观察发现连翘苷和黄芩苷在阴性对照品位置上相互之间不存在干扰现象。样品 1 连翘苷含量 0.51 mg, RSD 为 1.72%,黄芩苷含量 14.6 mg, RSD 为 4.95%;而样品 2 连翘苷 0.50 mg, RSD 为 1.69%,黄芩苷含量 14.3 mg, RSD 为 4.92%;2 组复方鱼腥草胶囊样品中连翘苷和黄芩苷的含量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论:复方鱼腥草胶样品质量可控性、稳定性和专属性均较好。

**关键词** 高效液相色谱;指纹图谱;复方鱼腥草胶囊;连翘苷;黄芩苷;含量检测;稳定性;专属性

## Detection of the Content of Forsythia and Baicalin in Fufang Yuxingcao Capsules by High Performance Liquid Chromatography

Zhou Baoyu, Yu Wenmei

(TCM Pharmacy, Wujin Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 213161, China)

**Abstract Objective:** To analyze the content of forsythia and baicalin in Fufang Yuxingcao capsules by high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint. **Methods:** The Fufang Yuxingcao capsule test solution and phillyrin and baicalin control solution were prepared. Through literature search and pre experiment, HPLC fingerprint was optimized. The chromatographic conditions were ACQUITY-BEHP-henyl-C<sub>18</sub> protection column (5 μm). Indoor temperature was column temperature. Injection volume was 20 μL. Acetonitrile was mobile phase A, and water + 0.02 % phosphoric acid was mobile phase B. Flow rate was 1.0 mL/min; Detection wavelength was 327 nm. Linear regression, precision, repeatability, stability, specificity test and sample recovery test were performed to observe the rigor stringency of HPLC method. The contents of phillyrin and baicalin in the samples were detected. **Results:** 1) HPLC chromatography was applied to the specific test of Fructus Forsythiae and Radix Scutellariae in Fufang Yuxingcao capsule, which had good specificity. 2) Forsyth regression equation  $Y = 98009X - 86650$ ,  $r = 0.9992$  ( $n = 5$ ), and the linearity of phillyrin control in 3.23 ~ 103.02 μg/mL was good; Baicalin regression equation  $Y = 212284X + 108806$ ,  $r = 0.9998$  ( $n = 5$ ), and the linearity of baicalin control in 2.74 ~ 87.89 μg/mL was good. 3) Identification of forsythin and baicalin by 365 nm showed that there was no interference between forsythin and baicalin in the location of negative controls. 4) Samples 1: 0.51 mg of phillyrin, RSD 1.72%; 14.6 mg of baicalin, RSD 4.95%. Sample 2: 0.50 mg phillyrin, RSD 1.69%; 14.3 mg baicalin, RSD 4.92%. There was no significantly difference between phillyrin and baicalin in Fufang Yuxingcao capsule samples ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** The quality control, stability and specificity of the Fufang Yuxingcao capsule sample are good.

**Key Words** High performance liquid phase; Fingerprint; Fufang Yuxingcao capsule; Forsythia; Baicalin; Content detection; Stability; Specificity

中图分类号: R245; R289.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.055

复方鱼腥草胶囊是近年来《中华人民共和国药典》新增加的中药复方制剂,临床生产和使用量较大,有多家厂家获得复方鱼腥草胶囊的生产批准文号,复方鱼腥草胶囊的主要药物组成及比例为鱼腥草20:草板蓝根5:黄芩5:连翘2:金银花2,该方主要用于治疗具有风热证候表现,因外感风热而起咽喉疼痛、急性扁桃体炎、急性咽炎等病症,全方以鱼腥草为君药清热解毒,以黄芩、板蓝根为臣药,清热泻火、燥湿凉血、解毒利咽,以连翘和金银花为佐使,助君臣清散风热,凉血解毒之功<sup>[1-2]</sup>。目前关于复方鱼腥草胶囊的文献报道较少,有研究显示高效液相色谱法(HPLC)分析发现鱼腥草中药理活性较多<sup>[3-4]</sup>,有研究复方鱼腥草合剂中薄层色谱法(TLC)研究金银花的主要成分绿原酸并测定其含量<sup>[5]</sup>,然对该方中主要药物的连翘和黄芩,目前的报道研究较少,基于此,本课题组以测定连翘苷和黄芩苷为主要研究指标,检测复方鱼腥草胶囊中二者的含量,以满足患者不同服药需求,现将复方鱼腥草胶囊 HPLC 研究详细报道如下。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 沃特世高效液相色谱仪 2695,沃谱达仪器(苏州)有限公司;外校电子精密天平(梅特勒 ML802,苏上海精学科学仪器有限公司);TQC 薄层板涂布器(VF2161,上海诺彩贸易有限公司)

1.2 试剂 色谱 HPLC 甲醇,色谱 HPLC 冰醋酸、色谱 HPLC 乙腈、色谱 HPLC 磷酸和色谱 HPLC 无水乙醇均购于上海展云化工有限公司;中国食品药品检定研究院提供的超纯水、连翘苷对照品(批号-110821-201514)和黄芩苷对照品(批号-0715-9909)。

1.3 分析样品 随机选取2个不同厂家生产的样品1:复方鱼腥草胶囊(云南云龙制药股份有限公司,国药准字 Z20055662);样品2:复方鱼腥草胶囊(安徽威尔曼制药,国药准字 Z20050708)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 ACQUITY-BEHP-henyl-C<sub>18</sub> 保护柱(5 μm),以室内温度为柱温,进样量为 20 μL 以乙腈为流动相 A,以水+0.02%磷酸为流动相 B,流速 1.0 mL/min;检测波长为 327 nm。

2.2 对照品溶液的制备 首先将连翘苷对照品、黄芩苷对照品放置于 60 °C 真空干燥至恒重,然后分别精密称取 10.3、5.3 mg 于 50 mL 量瓶中,连翘苷对照品瓶加入 50% 甲醇适量,黄芩苷对照品瓶加入无水乙醇适量,均超声溶解,混合均匀后制成连翘苷对照品溶液(0.206 mg/mL)和黄芩苷对照品溶液(含

黄芩苷 0.106 mg/mL)。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取复方鱼腥草胶囊的内容物 3.0 g 于 20 mL 的锥形瓶中并加入适量甲醇,采用软木塞塞紧瓶口,充分混合均匀后记录重量,超声处理(功率 500 W)30 min 后,待溶液冷区后记录重量,比较 2 次重量,计算重量差并以甲醇补齐至等重,采用 0.45 μm 微孔滤膜过滤混合液制成供试品溶液。

2.4 专属性试验 取同一供试品溶液根据 2.3 制备的供试品溶液,采用 HPLC 对复方鱼腥草胶囊中连翘、黄芩等进行专属性试验,结果显示如图 1 和图 2,复方鱼腥草胶囊中连翘和黄芩专属性良好。

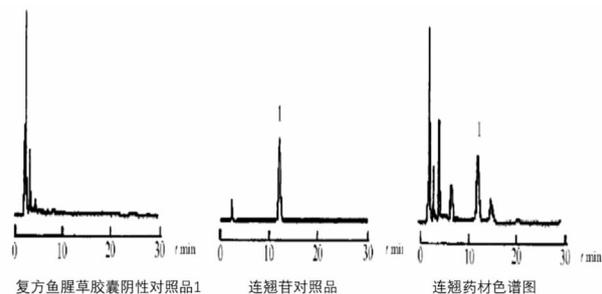


图1 连翘专属性试验 HPLC 色谱图

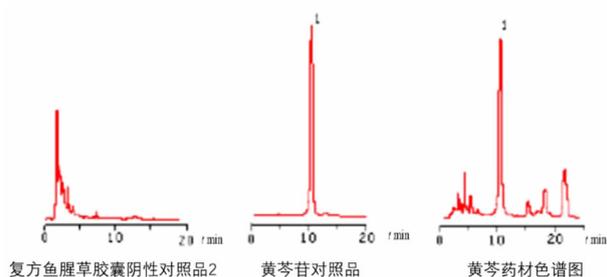


图2 黄芩专属性试验 HPLC 色谱图

2.5 线性关系考察 分别精密量取连翘苷、黄芩苷对照品的甲醇溶液 3.0、6.0、12.0、18.0、24.0 mL,分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀后分别精密吸取 10 μL,采用 HPLC,记录峰面积;以对照品进样量(μg)为横坐标(X,峰面积积分为纵坐标(Y),绘制标准曲线,连翘苷回归方程  $Y = 98\ 009X - 86650$ ,  $r = 0.999\ 2$  ( $n = 5$ ),结果表明,连翘苷对照品在 3.23 ~ 103.02 μg/mL 范围内线性关系良好;黄芩苷回归方程  $Y = 212\ 284X + 108\ 806$ ,  $r = 0.999\ 8$  ( $n = 5$ ),结果表明,黄芩苷对照品在 2.74 ~ 87.89 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.6 中间精密度试验 精密吸取 10 μL 同一供试品溶液,连续进样 5 次,结果显示相对标注偏差 RSD 是 1.13%,精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 在室温下精密吸取 10 μL 同一供试品溶液,配置后分别放置 0、1、4、8、

10、12、24 h 后进样检测,结果显示 24 h 内供试品溶液基本稳定,*RSD* 是 1.35%。

2.8 重复性试验 精密吸取 10  $\mu\text{L}$  同一供试品溶液,在相同色谱条件,相同液相分析仪上检测 5 次,结果显示标准偏差 *RSD* 为 1.20%,重复性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,精密称取 5 份已知含量的同一批号样品各约 0.5 g,分别精密加入 20 mL 混合对照品甲醇溶液(0.005 36 mg/mL),进行回收率试验测定,计算结果显示平均回收率为 99.07%,*RSD* 为 0.75%。见表 1 和表 2。

表 1 连翘苷回收率试验测定结果

编号	称样量(g)	加样量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	<i>RSD</i> (%)
1	0.586 3	0.575 3	1.133 2	95.54		
2	0.586 3	0.575 3	1.128 4	94.33		
3	0.586 3	0.575 3	1.157 0	99.41	97.25	3.18
4	0.586 3	0.575 3	1.135 1	95.56		
5	0.586 3	0.575 3	1.168 9	101.43		

表 2 黄芩苷回收率试验测定结果

编号	称样量(g)	加样量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	<i>RSD</i> (%)
1	0.125 6	0.122 5	0.244 3	96.87		
2	0.125 6	0.122 5	0.250 2	101.63		
3	0.125 6	0.122 5	0.246 0	98.24	98.66	1.94
4	0.125 6	0.122 5	0.244 9	97.41		
5	0.125 6	0.122 5	0.247 8	99.32		

## 2.10 样品测定结果

2.10.1 薄层色谱法鉴别连翘苷和黄芩苷 将制成的对照品和供试品溶液分别吸取 5  $\mu\text{L}$  滴于硅胶 G 薄层板上,在展开剂 23 醋酸丁酯:8 甲酸:7 水的作用下,经 365 nm 的紫外灯观察发现连翘苷和黄芩苷在阴性对照品位置上相互之间不存在干扰现象。见图 3。

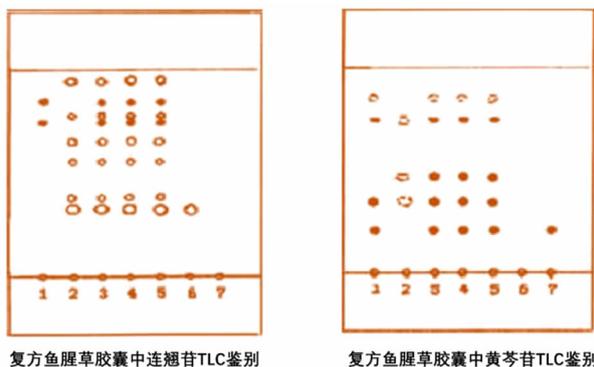


图 3 复方鱼腥草胶囊中连翘苷和黄芩苷的鉴别

注:1. 金银花、鱼腥草双阴性对照品,2. 黄芩阴性对照品,3~5 复方鱼腥草胶囊,6. 连翘苷,7. 黄芩苷

2.10.2 高效液相色谱分析连翘苷和黄芩苷含量 在每批样品做 3 次重复研究取平均值后,结果显示 2 个样品中连翘苷和黄芩苷的含量和 *RSD* 值均差不多,具体数值如表 3 所示。

表 3 复方鱼腥草胶囊中连翘苷和黄芩苷含量测定结果

检查项目	连翘苷(mg)	<i>RSD</i> (%)	黄芩苷(mg)	<i>RSD</i> (%)
样品 1	0.51	1.72	14.6	4.95
样品 2	0.50	1.69	14.3	4.92

## 3 讨论

3.1 流动相的优化 在分离连翘药材中的连翘苷和黄芩药材中的黄芩苷的 HPLC 研究中,实验室流动相优化研究中,分别以水-甲醇、水-乙腈,乙腈-0.01% 磷酸,乙腈-0.02% 磷酸,乙腈-0.03% 磷酸等不同的流动相进行分离,经过反复数次的研究后,发现室内温度为柱温,进样量为 20  $\mu\text{L}$  时,以乙腈为流动相 A,以水 + 0.02% 磷酸为流动相 B,流速 1.0 mL/min:连翘苷和黄芩苷的分离度最大,能够满足后续研究中连翘苷和黄芩苷的定量测定,由此本研究最终选择的流动相是乙腈-0.02% 磷酸。

3.2 专属性试验的重要性 本研究复方鱼腥草胶囊由五味药组成,制订了 HPLC 色谱法鉴别研究其专属性进行定性质量评价;本研究的目的是检查复方鱼腥草胶囊中连翘苷和黄芩苷的含量,而复方鱼腥草胶囊药味多,药性复杂,在有其他成分存在的可能情况下,如果连翘苷和黄芩苷这 2 个需要检测的成分不具有专属性,那么在后续的含量检测中则可能因为杂质的影响而造成偏差。假如在专属性试验中发现含有杂质,那么在杂质可获得的情况下,可以采用加入杂质到待测样品于未加入杂质的待测样品进行比较,考察杂质对目标成分含量测定是否存在干扰性<sup>[6-8]</sup>。基于前期研究条件如精密度、重复性、稳定性、线性考察和样品回收率等方法的反复试验调整了最佳 HPLC 色谱条件,显示多元指纹图谱是一种方法简便,且具有高灵敏度、高重复性和较强的专属性强的一种研究方法<sup>[9-12]</sup>;本研究结果 HPLC 色谱图显示复方鱼腥草胶囊中连翘苷和黄芩苷的专属性良好。

3.3 薄层色谱法与 HPLC 结合进行复方鱼腥草胶囊含量检测的意义 薄层色谱法(TLC)以涂布于硅胶板、玻璃板等支持剂上作为固定相并形成一个均匀的薄层,加入合适的展开剂作为其流动相,对样品具有分离、鉴别和定量的功能<sup>[13-17]</sup>,由于 TLC 对生物高分子的分离效果不够理想<sup>[18-19]</sup>,因此在定量性

研究中,目前的主流研究方法是采用 HPLC 进行<sup>[20-21]</sup>,本研究采用 TLC 与 HPLC 2 种方法相结合的方式,对复方鱼腥草胶囊中连翘苷和黄芩苷进行含量检测。复方鱼腥草胶囊的清热解毒功效好,它是植根于深厚的中医药传统理论基础,同时结合丰富的临床实践经验而被研发出来的中药复方制剂,在当今存在“抗生素类药物滥用”的情况下,《中华人民共和国药典》收录复方鱼腥草胶囊的这一举措,关注及肯定复方鱼腥草胶囊在临床的广泛适用性和部分替代抗生素的治疗价值的。研究中为控制复方鱼腥草胶囊的药物质量的安全性,在对连翘苷和黄芩苷含量检测之前,首先采用薄层色谱法结合处方药味所含化学成分及药理学活性,对连翘中的连翘苷、黄芩中的黄芩苷等进行了定性鉴别,研究结果显示 3 批不同的测试样本的色谱斑点清晰,重现性好,空白均无出现干扰;接着应用多元指纹图谱分析测定了复方鱼腥草胶囊制剂中连翘苷、黄芩苷的含量,本研究结果显示样品 1 连翘苷含量 0.51 mg, RSD 为 1.72%,黄芩苷含量 14.6 mg, RSD 为 4.95%;而样品 2 连翘苷 0.50 mg, RSD 为 1.69%,黄芩苷含量 14.3 mg, RSD 为 4.92%;2 组复方鱼腥草胶囊样品中连翘苷和黄芩苷的含量差异无统计学意义。

#### 参考文献

- [1] 潘先东. 基于 JAK/STAT-SOCS 通路的复方鱼腥草对糖尿病肾损伤的干预作用及机制研究[D]. 上海:上海中医药大学,2015.
- [2] 张彦洁. 复方鱼腥草合剂联合头孢克洛对肺炎患儿症状缓解及生化指标的影响[J]. 临床医学,2016,36(12):120-121.
- [3] 刘泽静,薛生玲,夏雪,等. 鱼腥草不同部位生物活性物质和抗氧化能力分析[J]. 浙江农业学报,2016,28(6):992-998.
- [4] 李雪,严全鸿. 有关鱼腥草素钠与合成鱼腥草素质量标准的探析[J]. 中国药品标准,2016,17(1):15-18.
- [5] 李锐,黄依玲. HPLC 同时测定复方鱼腥草合剂中绿原酸黄芩苷

- 和汉黄芩素的含量[J]. 解放军药学报,2015,31(4):341-343.
- [6] 刘莹,邓安璐,李喜凤,等. 粉防己专属性对照物质的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(15):1943-1948.
- [7] 秦海林,李志宏,王鹏,等. 黄连专属性对照物质及其指纹图谱的创建[J]. 中国医学科学院学报,2004,26(6):622-627.
- [8] 陈祥胜,容艳芬,刘苗苗,等. 苍术麸炒前后的专属性 HPLC 特征指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(19):23-26.
- [9] 李万娟,郭艳玲,商春丽,等. 北苍术苍术素、苍术酮、 $\beta$ -桉叶醇测定及特征图谱研究[J]. 中草药,2016,47(2):330-335.
- [10] 封淑华,胡伟杰,赵志军,等. 含单味药材参类保健食品功效成分测定方法的专属性研究[J]. 中国药业,2012,21(16):39-41.
- [11] 宋光华,严莉容,孔祥瑞,等. HPLC 测定氢溴酸沃赛汀中的有关物质[J]. 华西药理学杂志,2017,32(6):643-645.
- [12] 纪海莹,洪阁,苏喆,等. RP-HPLC 法测定四取代四苯基卟啉衍生物的含量[J]. 中国药房,2016,27(9):1254-1256.
- [13] 邓勇,张杰良,王兰英,等. 薄层色谱法分析不同虫草多糖的单糖组成[J]. 药物分析杂志,2018,38(1):13-21.
- [14] 姚令文,石岩,孙冬梅,等. 人工牛黄薄层指纹图谱多元图像分析及化学计量学研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(11):2117-2122.
- [15] 陈媛,邹献武,黄洛华,等. 10 批次伪品沉香鉴别方法的相关性[J]. 林业科学,2017,53(4):113-120.
- [16] 木尼热·阿布都艾尼,吐尔洪·买买提,博塔·拜合提汗,等. 中空纤维三相液相微萃取-薄层色谱分离同步荧光法测定酱油中的色胺含量[J]. 分析测试学报,2017,36(1):86-90.
- [17] 朱迪,谭丹,谢玉敏,等. 不同产地天麻药材薄层色谱指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(5):75-78.
- [18] 夏媛媛,陈英杰,杨沮勤,等. 五味子薄层色谱用对照提取物的研制与应用[J]. 中华中医药杂志,2017,32(7):3231-3234.
- [19] 张协光,彭祖茂,张涵,等. 薄层色谱联用气相色谱法研究食用植物油中 sn-2 位脂肪酸的分布[J]. 中国油脂,2017,42(7):35-39.
- [20] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [21] 刘慧,张秋燕,王家龙,等. 8 种药材中 6 种有机酸类成分的 HPLC 含量测定[J]. 中药材,2017,40(5):1130-1133.

(2018-03-30 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第 3185 页)

(穗花杉双黄酮),8 号(扁柏双黄酮)峰为主,此方法可用于控制侧柏叶加泥土的掺伪。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委. 中华人民共和国药典[S]. 1 部. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 22.
- [2] 顾臣贤,朱华荣,管伦兴,等. 五灵脂药用研究进展[J]. 亚太传统医药,2014,10(5):55-56.
- [3] 曹望弟,陈雪琴,郭耀武. 五灵脂本草考证、养殖和临床应用探讨[J]. 中国药师,2012,15(12):1803-1804.
- [4] 屈庆玲,满博文. 谈中药醋制的作用[J]. 河南中医,2004,24(6):40-40.

- [5] 闵凡印. 五灵脂炮制方法的探讨[J]. 中国药学杂志,1984,19(9):26-28.
- [6] 吴用琼. 五灵脂炮制方法的探讨与临床应用[C]//2011 全国民族医药学术交流会. 2011.
- [7] 李江东. 中药五灵脂炮制方法的改进[J]. 中国中药杂志,1988,13(10):125.
- [8] 刘文霖,刘倩平,李庆明,等. 五灵脂及其炮制品的微量元素含量测定[J]. 广东微量元素科学,2002,9(11):59-60.
- [9] 缪刘萍,王鑫杰,周海凤,等. 双黄酮类化合物药理作用研究[J]. 世界临床药物,2012,33(6):369-374.
- [10] 单鸣秋,钱雯,高静,等. UPLC-MS 分析侧柏叶中黄酮类化合物[J]. 中国中药杂志,2011,36(12):1626-1629.

(2018-11-13 收稿 责任编辑:徐颖)