

基于多指标成分定量评价复方鱼腥草胶囊

王燕鸽¹ 张志琴² 郭富礼¹ 贺卫国¹

(1 鹤壁煤业(集团)有限责任公司总医院药剂科,鹤壁,458000; 2 鹤壁市人民医院药学部,鹤壁,458030)

摘要 目的:基于多指标成分定量评价分析复方鱼腥草胶囊,为复方鱼腥草胶囊的质量控制提供参考。方法:首先制备复方鱼腥草胶囊供试品溶液及槲皮苷、表告依春、绿原酸、连翘苷、黄芩苷对照品溶液,色谱条件采用 CAPCELL-PAK-MG-C₁₈ 色谱柱(5 μm,规格:4.6 mm × 250 mm),柱温以 35 ℃ 为宜,进样量为 10 μL,流速为 1.0 mL/min 进行高效液相色谱(HPLC)检测,以流动相 A(乙腈)和流动相 B(水+0.01%磷酸)为条件进行梯度洗脱,优化高效液相(HPLC)的方法学严谨性,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,多指标成分定量分析样品中槲皮苷、表告依春、绿原酸、连翘苷和黄芩苷的含量。结果:1)采用 HPLC 色谱法对复方鱼腥草胶囊中鱼腥草、板蓝根、金银花、连翘、黄芩等进行专属性试验,结果显示复方鱼腥草胶囊中鱼腥草、板蓝根、金银花、连翘、黄芩专属性良好。2)线性范围考察结果显示槲皮苷对照品、连翘苷对照品、绿原酸对照品在 4~201 μg/mL 范围内、表告依春对照品、黄芩苷对照品在 12~601 μg/mL 范围内的线性关系均良好。3)精密度试验结果显示槲皮苷、连翘苷、绿原酸、表告依春对照品、黄芩苷峰面积相对标准偏差(RSD)分别是 0.45%、0.52%、0.66%、0.59%、0.31%,结果表明此色谱条件下的 HPLC 仪器精密度良好。4)稳定性试验结果显示复方鱼腥草胶囊供试品溶液相对峰面积 RSD 是 1.33%,表明 24 h 内复方鱼腥草胶囊供试品溶液基本稳定。5)重复性试验结果显示复方鱼腥草胶囊供试品溶液相对峰面积 RSD 为 0.92%,表明该 HPLC 方法的重复性良好。6)结果显示槲皮苷、表告依春、绿原酸、连翘苷和黄芩苷的平均回收率分别为 99.10%、99.26%、99.07%、98.05%、98.82%、98.32%,RSD 为 1.81%、1.49%、0.94%、1.58%、1.01%,表明回收率较好。7)基于多指标成分定量测定结果显示不同厂家不同批次的复方鱼腥草胶囊中有效成分槲皮苷、表告依春、绿原酸、连翘苷和黄芩苷的含量存在较大差异。结论:基于多指标成分定量测定结果显示不同厂家不同批次的复方鱼腥草胶囊中有效成分槲皮苷、表告依春、绿原酸、连翘苷和黄芩苷的含量存在较大差异。

关键词 多指标成分定量;高效液相;复方鱼腥草胶囊;槲皮苷;表告依春;绿原酸;连翘苷;黄芩苷

Quantitative Evaluation of Compound Herba Houttuyniae capsules Based on Multi Index Components

Wang Yange¹, Zhang Zhiqin², Guo Fuli¹, He Weiguo¹

(1 Hebi Coal Industry (Group) Co. Ltd. General Hospital Pharmacy, Hebi 458000, China;

2 Hebi City People's Hospital Department of Pharmacy, Hebi 458030, China)

Abstract Objective: Based on the quantitative evaluation and analysis of compound Houttuynia cordata capsule based on multi-index components, it provides a reference for the quality control of compound Houttuynia cordata capsule. **Methods:** First, the compound Houttuynia capsule sample solution and quercetin were prepared, including Yichun, chlorogenic acid, forsythrin, baicalin reference solution, The chromatographic conditions were determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with CAPCELL-PAK-MG-C₁₈ column (5 μm, specification: 4.6 mm × 250 mm), column temperature 35 ℃, injection volume 10 μL, flow rate 1.0 mL/min). Gradient eluting was carried out under the conditions of mobile phase A (acetonitrile) and mobile phase B (water 0.01% phosphate). Optimize the methodological rigour of high performance liquid phase (HPLC), carry out linear regression, precision, reproducibility, stability, specificity test and sample recovery test, quantitative analysis of quercetin in samples with multiple index components, Quercetin, chlorogenic acid, The contents of phillyrin and baicalin. **Results:** 1) the specific tests of Houttuynia cordata, Radix Isatidis, Flos Lonicerae, Forsythia suspensa and Scutellaria baicalensis were carried out by HPLC chromatography. the results showed that Houttuynia cordata, Radix Isatidis, Flos Lonicerae and Forsythia suspensa were found in the compound Houttuynia cordata capsule. Scutellaria baicalensis Georgi has a good specificity. 2) the linear range of quercetin, phillyrin and chlorogenic acid were within the range of 4 ≤ 201 μg/mL, and the linear range of baicalin and baicalin were 12 μg/mL and 601 μg/mL, respectively. the linear range of quercetin, phillyrin and chlorogenic acid was 4 ≤ 201 μg/mL. 3) the results of precision test showed that the relative standard deviation (RSD) of quercetin, phillyrin, chlorogenic acid and baicalin peak area were 0.45%, 0.52%, 0.66%, 0.59%, 0.31%, 0.51%, 0.52%, 0.56%, 0.59%, 0.31%, 0.52%, 0.62%, 0.59% and 0.31%, respectively. The results show that the precision of HPLC instrument under this chromatographic condition is good. 4) The results of stability test showed that the relative peak area RSD of compound Houttuynia capsule solution was 1.33%, which in-

indicated that the solution of compound *Houttuynia* capsule was basically stable within 24 hours. 5) The results of reproducibility test showed that the relative peak area RSD of compound *Houttuynia* capsule solution was 0.92%, which indicated that the HPLC method had good reproducibility. 6) The results showed that the average recovery of quercetin, eichun, chlorogenic acid, phillyrin and baicalin were 99.10%, 99.26%, 99.07%, 98.05%, 98.82%, 98.32%, 1.81% and 1.49%, respectively. 0.94%, 1.58%, 1.01%, indicating that the recovery is good. 7) The results of quantitative determination based on multi-index components showed that the contents of quercetin, chlorogenic acid, phillyrin and baicalin in different batches of compound *Houttuynia cordata* Thunb capsules from different manufacturers were quite different. **Conclusion:** The results of quantitative determination based on multi-index components showed that the contents of quercetin, chlorogenic acid, phillyrin and baicalin in different batches of compound *Houttuynia cordata* Thunb capsules from different manufacturers were quite different.

Key Words Quantitative analysis of multiple index components; High performance liquid phase; Compound *Houttuynia* capsule; Quercetin; Biguoyichun; Chlorogenic acid; Forsythrin; Baicalin

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.05.013

复方鱼腥草胶囊是对复方鱼腥草片进行工艺改进研发的^[1],近年来作为《中华人民共和国药典》新增品种收载的中药复方制剂,无论是复方鱼腥草片还是复方鱼腥草胶囊的药物组成都是以下5味中药:鱼腥草、板蓝根、黄芩、连翘和金银花,其功效以清热解毒为主^[2],对因外感风热而起咽喉疼痛、急性扁桃体炎、急性咽炎等^[3-4]病症具有良好的临床疗效,因此临床生产和使用量均较大,然而目前关于复方鱼腥草胶囊的质量控制的文献报道较少^[5-6],因此本研究基于多指标成分定量分析评价复方鱼腥草胶囊,以为复方鱼腥草胶囊提供质量控制的提供参考。复方鱼腥草胶囊中以鱼腥草为君药清热解毒,其有效成分为槲皮苷^[7];黄芩、板蓝根为臣药,清热泻火、凉血解毒,其有效成分分别为黄芩苷^[8]和表告依春^[9];连翘和金银花助君臣清散风热为佐使药,其有效成分分别为连翘苷^[10]和绿原酸^[11]。采用多指标成分定量测定复方鱼腥草胶囊中各个药物的主要有效成分并行含量定量检测,以满足患者不同服药需求和为复方胶囊质量控制提供基础研究参考,现将结果报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(型号:SHIMADZU LC-20AD,厂家:日本岛津有限公司);二极管阵列(DAD)检测器(型号:Prominence SPD-M20A,厂家:日本岛津有限公司);超声波清洗仪(型号:DS1027HT/HTD,厂家:天津市富城达科技有限公司)。

1.2 试剂 色谱 HPLC 乙腈和色谱 HPLC 甲醇购于德国 MERCK 公司,色谱 HPLC 冰醋酸、色谱 HPLC 磷酸和色谱 HPLC 无水乙醇均购于天津百伦斯生物有限公司;中国食品药品检定研究院提供的槲皮苷对照品(批号:111538-201405)、表告依春对照品(批号:1072-93-113531)、黄芩苷对照品(批号:

0715-9909)、连翘苷对照品(批号:110821-201514)、绿原酸对照品(批号:110753-201314)。

1.3 分析样品 随机选取10个不同厂家生产不同批次的复方鱼腥草胶囊。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 CAPCELL-PAK-MG-C₁₈ 色谱柱(5 μm,规格:4.6 mm × 250 mm),柱温以 35 °C 为宜,进样量为 10 μL,流速为 1.0 mL/min 进行高效液相色谱(HPLC)检测,以流动相 A(乙腈)和流动相 B(水+0.01%磷酸)为条件进行梯度洗脱,梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序表(检测波长为330 nm)

时间(min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0 ~ 12	9	91
12 ~ 15	9→15	91→85
15 ~ 32	15	85
32 ~ 48	15→29	85→71
48 ~ 60	29	71

2.2 对照品溶液的制备 首先将槲皮苷对照品、表告依春对照品、黄芩苷对照品、连翘苷对照品、绿原酸对照品均分别放置于 60 °C 真空干燥至恒重,然后分别精密称取 10.00 mg,其中,表告依春对照品置于 100 mL 量瓶中以甲醇定容,槲皮苷对照品和绿原酸对照品置于 50 mL 量瓶中以甲醇定容,连翘苷对照品置于 25 mL 量瓶中加入 50% 甲醇定容,黄芩苷对照品置于 25 mL 量瓶中加入无水乙醇适量,均超声溶解,即制备得对照品溶液。精密量取所制备 2 mL 槲皮苷对照品溶液和绿原酸对照品溶液、3 mL 连翘苷对照品溶液、10 mL 黄芩苷对照品溶液、25 mL 表告依春对照品溶液于 50 mL 量瓶中,甲醇定容,超声混合均匀,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取出复方鱼腥草胶囊的

内容物,并精密称取 3.0 g 于 20 mL 的锥形瓶中,加入适量甲醇定容后以软木塞塞紧瓶口,摇晃促进内容物充分溶解均匀后记录重量,超声处理(功率 500 W)30 min 后,并记录溶液冷却后重量,计算两次重量差,以甲醇补齐致两次重量相等,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 色谱法对复方鱼腥草胶囊中鱼腥草、板蓝根、金银花、连翘、黄芩等进行专属性试验,结果显示复方鱼腥草胶囊中鱼腥草、板蓝根、金银花、连翘、黄芩专属性良好。(由于图谱较多,此处仅以黄芩作为代表,详细见图 1)。

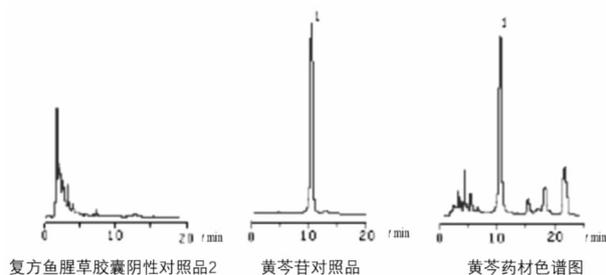


图 1 黄芩专属性试验 HPLC 色谱图

2.5 线性关系考察 槲皮苷对照品、连翘苷对照品和绿原酸对照品分别精密称取 10.00 mg 置于 50 mL 量瓶中,以甲醇定容,表告依春对照品、黄芩苷对照品 30.00 mg 置于 50 mL 量瓶中,以甲醇定容,均超声溶解,均匀混合各对照品溶液即制备得混合对照品溶液。精密量 1.0、2.0、5.0、10.0、25.0 mL 混合对照品溶液分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇晃使其混合均匀。精密吸取 10 μL,根据 2.1 色谱条件采用 HPLC 色谱法,记录峰面积;以对照品的浓度(μg/mL)为横坐标(X),所测得的峰面积积分为纵坐标(Y),绘制标准曲线,槲皮苷回归方程 $y = 170\ 121X + 867$, $r = 0.999\ 9$ ($n = 5$);绿原酸回归方程 $y = 31\ 109X + 353$, $r = 0.999\ 8$ ($n = 5$);表告依春回归方程 $y = 17\ 112X + 42.41$, $r = 0.999\ 7$ ($n = 5$);连翘苷回归方程 $y = 33\ 909X + 265$, $r = 0.999\ 8$ ($n = 5$);黄芩苷回归方程 $y = 95\ 042X + 198$, $r = 0.999\ 9$ ($n = 5$),结果表明,槲皮苷对照品、连翘苷对照品、绿原酸对照品在 4 ~ 201 μg/mL 范围内、表告依春对照品、黄芩苷对照品在 12 ~ 601 μg/mL 范围内的线性关系均良好。

2.6 精密度试验 精密吸取 10 μL 按照 2.2 配制的混合对照品溶液,根据 2.1 的色谱条件连续进样 6 次,结果显示槲皮苷、连翘苷、绿原酸、表告依春对照品、黄芩苷峰面积相对标准偏差(RSD)分别是

0.45%、0.52%、0.66%、0.59%、0.31%,结果表明此色谱条件下的 HPLC 仪器精密度良好。

2.7 供试品溶液稳定性试验 在室温下精密吸取 10 μL 同一份根据 2.3 配制的复方鱼腥草胶囊供试品溶液,配置后分别放置 0、1、4、8、12、24 h 后进样检测,结果显示复方鱼腥草胶囊供试品溶液相对峰面积 RSD 是 1.33%,表明 24 h 内复方鱼腥草胶囊供试品溶液基本稳定。

2.8 重复性试验 精密吸取 10 μL 同一批次根据 2.3 制备的复方鱼腥草胶囊供试品溶液,在相同 2.1 的色谱条件下,在固定的高效液相分析仪上进样测定,重复检测 5 次,结果显示复方鱼腥草胶囊供试品溶液相对峰面积 RSD 为 0.92%,表明该 HPLC 方法的重复性良好。

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,计算结果显示槲皮苷、表告依春、绿原酸、连翘苷和黄芩苷的平均回收率分别为 99.10%、99.26%、99.07%、98.05%、98.82%、98.32%,RSD 为 1.81%、1.49%、0.94%、1.58%、1.01%,表明回收率较好。见表 2 ~ 6。

表 2 槲皮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 (%)	RSD (%)
1	0.555 3	0.500 6	1.053 32	99.45		
2	0.555 3	0.500 6	1.048 24	97.20		
3	0.555 3	0.500 6	1.045 70	98.41	99.10	1.81
4	0.555 3	0.500 6	1.053 51	100.76		
5	0.555 3	0.500 6	1.056 89	101.13		

表 3 表告依春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 (%)	RSD (%)
1	0.725 6	0.722 5	0.844 3	97.87		
2	0.725 6	0.722 5	0.850 2	101.36		
3	0.725 6	0.722 5	0.846 0	98.42	99.26	1.49
4	0.725 6	0.722 5	0.844 9	97.46		
5	0.725 6	0.722 5	0.847 8	99.13		

表 4 绿原酸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 (%)	RSD (%)
1	0.611 2	0.613 5	1.233 2	99.75		
2	0.611 2	0.613 5	1.282 4	97.39		
3	0.611 2	0.613 5	1.257 0	98.04	98.05	0.94
4	0.611 2	0.613 5	1.235 1	97.98		
5	0.611 2	0.613 5	1.268 9	97.36		

表 5 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 (%)	RSD (%)
1	1.778 1	1.579 5	3.332 4	99.56		
2	1.778 1	1.579 5	3.351 2	100.26		
3	1.778 1	1.579 5	3.361 7	100.88	99.82	1.58
4	1.778 1	1.579 5	3.301 1	96.87		
5	1.778 1	1.579 5	3.368 9	100.94		

表 6 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 (%)	RSD (%)
1	10.705 8	10.307 4	19.561 2	98.38		
2	10.705 8	10.307 4	19.628 4	99.64		
3	10.705 8	10.307 4	20.915 0	98.77	98.32	1.01
4	10.705 8	10.307 4	19.635 1	98.86		
5	10.705 8	10.307 4	20.068 9	97.13		

2.10 样品测定结果 复方鱼腥草胶囊基于多指标成分定量结果可见,不同厂家不同批次的复方鱼腥草胶囊中有效成分槲皮苷、表告依春、绿原酸、连翘苷和黄芩苷的含量存在较大差异。见表 7。

表 7 复方鱼腥草胶囊中有效成分含量测定结果 (mg)

检查项目	槲皮苷	表告依春	绿原酸	连翘苷	黄芩苷
样品 1	0.34	0.59	0.37	1.06	6.35
样品 2	0.11	0.34	0.15	0.52	3.42
样品 3	0.12	0.77	0.53	0.28	2.64
样品 4	0.35	0.83	0.49	0.77	3.71
样品 5	0.26	0.91	0.34	0.56	4.23
样品 6	0.09	0.29	0.18	0.44	2.55
样品 7	1.03	1.94	0.74	0.72	5.66
样品 8	0.36	0.66	0.53	0.51	3.08
样品 9	1.06	2.41	1.08	1.05	5.82
样品 10	0.41	0.99	0.76	0.68	4.03

3 讨论

复方鱼腥草胶囊中所含的药物均具有清热解毒的功效,鱼腥草、板蓝根、连翘、金银花和黄芩等 5 味药物,相辅相成,相互作用,共奏清热解毒的作用。在中医的复方组成中,方中的每一味药物都是不可或缺,至关重要的,因此在多指标成分的选择上,本研究选择测定每一味药物的有效成分,即鱼腥草的槲皮苷、板蓝根的表告依春、金银花的绿原酸、连翘的连翘苷和黄芩的黄芩苷,而测定每一味药物的有效成分含量,对中药复方的质量优劣判定和质量控制是极其重要的^[12]。因此在药物提取溶剂的选择上采用甲醇、70% 甲醇、乙醇、70% 乙醇作为预实验摸索条件,提取时间以 0.5 h、1.0 h 和 1.5 h 作为摸

索条件,提取方式选择超声提取和回流提取 2 种摸索条件^[13],结果显示在超声提取下 70% 甲醇,提取 1 h 对 5 种药物的 5 种有效成分的提取效率最高。另外本研究中设计 HPLC 色谱法对复方鱼腥草胶囊的专属性进行鉴别研究以对其 5 味药物的组成进行定性的质量评价。由于组方的有效成分较多,若这些成分不具有专属性,则在其他有效成分存在的情况下,对后续成分含量的检测过程中就可能因为成分的相互影响而不可避免的造成结果偏差^[14],故而在综合样品回收率、稳定性、可重复性、精密度、线性考察的基础上,对 HPLC 的最佳色谱条件进行反复的试验和调整。本研究结果 HPLC 色谱图显示复方鱼腥草胶囊中槲皮苷、表告依春、绿原酸、连翘苷和黄芩苷的专属性良好;且在复方鱼腥草胶囊的样品检测中结果显示有效成分槲皮苷、表告依春、绿原酸、连翘苷和黄芩苷的含量存在较大差异。

参考文献

[1] 李金玉. 复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷的测定及指纹图谱的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 56(12): 65-69.

[2] 游思湘, 符晨星, 瞿俊勇, 等. 复方鱼腥草制剂的体外抑菌及耐药抑制作用研究[J]. 中国兽医杂志, 2014, 33(11): 63-66.

[3] 张华静. 复方鱼腥草颗粒治疗小儿急性扁桃体炎风热证的临床研究[J]. 医学理论与实践, 2013, 26(2): 194-195.

[4] 史耀勋. 复方鱼腥草滴丸治疗慢性肾炎合并急性咽炎、扁桃体炎[J]. 中国民间疗法, 2014, 22(8): 48-49.

[5] 李莹, 秦献辉, 李旭东, 等. 复方鱼腥草胶囊抗炎作用及机制实验研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(5): 371-373, 388.

[6] 罗璇, 李小琴, 杨岳隆, 等. 复方鱼腥草软胶囊的鉴别和含量测定方法研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(7): 702-704.

[7] 关潇滢, 陈雪莲, 王淑红, 等. HPLC 同时测定复方鱼腥草片中 4 个有效成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 31(9): 1300-1303.

[8] 余星云, 欧荔枝. 复方鱼腥草滴丸中黄芩苷的 HPLC 含量测定[J]. 今日药学, 2011, 21(7): 437-439.

[9] 黄舒丽. 复方鱼腥草软胶囊中(R,S)-告依春含量测定方法的研究[J]. 中国医药导报, 2011, 8(35): 70-72.

[10] 虞利东, 吴健, 徐斌, 等. 复方鱼腥草合剂中连翘苷的含量测定[J]. 医药导报, 2016, 35(z1): 93-94.

[11] 曹金枝, 苏志刚. HPLC 法测定复方鱼腥草片中绿原酸的含量[J]. 首都医药, 2014, 18(20): 93-94.

[12] 李莹, 秦献辉, 李旭东, 等. 复方鱼腥草胶囊的抗炎及免疫功能调节作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(4): 297-300.

[13] 匡钊. 高效液相色谱法测定复方鱼腥草颗粒中黄芩苷和黄芩素含量[J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(6): 91-94.

[14] 李金玉. 复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷的测定及指纹图谱的建立[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 54(12): 65-69.