

[2]

张晓文, 温爱平. RP-HPLC 谱法测定克感额日敦片中栀子苷的含量[J]. 中国药师, 2005, 8(4): 310-311.

[3]

张晓文, 温爱平. 用 HPLC 法测定克感额日敦片中苦参碱的含量[J]. 药学服务与研究, 2006, 6(4): 300-301.

[4]

王顺利, 李改莲, 杨树青. 薄层扫描法测定蒙药克感额日敦片中土木香内酯的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(3): 45.

[5]

红霞, 旭红. HPLC 法测定蒙成药克感额日敦片中栀子苷的含量[J]. 中国民族医药杂志, 2015, 21(2): 59-60.

[6]

王欣, 覃瑶, 王德江, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用进展[J]. 中成药, 2016, 38(2): 395-402.

[7]

胡瑞雪, 梁元昊, 徐文丽, 等. 一测多评法在中药中的应用及研究进展[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 1968-1979.

[8]

朱晶晶, 王智民, 高慧敏, 等. 一测多评法在中药质量评价中的应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16): 220-228.

[9]

秦昆明, 杨冰, 胡静, 等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考[J]. 中草药, 2018, 49(3): 725-731.

[10]

杨志欣, 李霞, 刘明玉, 等. 苦参总黄酮抗菌提取物中 7 种黄酮成分的结构鉴定及含量测定研究[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(24): 2169-2174.

[11]

张嫚丽, 霍长虹, 刘丽, 等. 土木香药材 HPLC 指纹图谱研究及土木香内酯和异土木香内酯测定[J]. 中草药, 2010, 41(9): 1539-1542.

[12]

付小梅, 彭水梅, 刘婧, 等. HPLC 法同时测定栀子类药材中 10 个主要有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(4): 615-621.

[13]

钱珺, 石燕红, 陈绍成, 等. UPLC 法测定栀子中的 4 种成分[J]. 中成药, 2016, 38(3): 708-711.

[14]

吴亚超, 杨文静, 张磊, 等. 栀子中栀子苷等 7 个化学成分测定及质量评价[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(10): 841-847.

[15]

马鸿雁, 周婉珊, 褚夫江, 等. 苦参中黄酮类成分的高效液相指纹图谱及 5 种成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2690-2695.

[16]

王金, 李素霞, 赵永明, 等. 正交试验法优化土木香根中土木香内酯和异土木香内酯的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 38-40.

HPLC 法同时测定退赤胶囊中 8 种成分

朱应成, 余静, 刘亮镜, 徐斌*
(芜湖市中医医院制剂中心, 安徽 芜湖 241000)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定退赤胶囊(金银花、菊花、甘草等)中绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、甘草苷、芦丁、连翘酯苷 A、黄芩苷、连翘苷的含有量。**方法** 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(含 0.1% 磷酸)-水(含 0.1% 磷酸), 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 20 ℃; 检测波长 277、330 nm。**结果** 8 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999\ 1$), 平均加样回收率 96.9%~103.9%, RSD 0.7%~2.5%。**结论** 该方法简便可靠, 重复性好, 可用于退赤胶囊的质量控制。

关键词: 退赤胶囊; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)10-2575-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.007

Simultaneous determination of eight constituents in Tuichi Capsules by HPLC

ZHU Ying-cheng, YU Jing, LIU Liang-jing, XU Bin*
(Preparation Center, Wuhu Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 241000, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, liquiritin, rutin, forsythoside A, baicalin and phillyrin in Tuichi Capsules (*Lonicerae japonicae Flos*, *Chrysanthemi Flos*, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 20 ℃ thermostatic Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column

收稿日期: 2020-06-11

作者简介: 朱应成(1984—), 男, 硕士, 主管中药师, 从事中药制剂分析与质量控制研究。E-mail: whszyzyzyc@163.com

* 通信作者: 徐斌(1973—), 男, 副主任中药师, 从事中药饮片质量控制及中医经方开发研究。E-mail: 337264650@qq.com

(4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile (containing 0.1% phosphoric acid) -water (containing 0.1% phosphoric acid) flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 277, 330 nm. **RESULTS** Eight constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r\geq0.999\ 1$), whose average recoveries were 96.9%–103.9% with the RSDs of 0.7%–2.5%. **CONCLUSION** This simple, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Tuichi Capsules.

KEY WORDS: Tuichi Capsules; chemical constituents; HPLC

退赤胶囊具有清热、明目、退翳之功效，临床上主要用于治疗目赤肿痛、畏光、流泪之结膜炎、角膜炎、角膜云翳等外障眼疾^[1]，为本课题组联合芜湖市中医医院眼科专家根据多年临床经验总结创制而成，是由金银花、菊花、连翘、黄芩、桔梗、木贼、密蒙花、谷精草、蒺藜、车前子、甘草 11 味药材经现代制药技术加工而成的纯中药制剂（皖药制字 Z20050017）。方中君药金银花、菊花及臣药连翘均具有清热解毒、疏散风热的功效，主治风热上攻之目赤肿痛^[2-3]；臣药黄芩含有黄芩苷，具有抗菌、抗病毒的药理作用^[4-5]。

退赤胶囊组方药味较多，化学成分较复杂，但该制剂现行质量标准仅对连翘酯苷 A 进行定量分析，无法全面反映其内在质量，难以实现有效监控。因此，本实验采用 HPLC 法同时测定退赤胶囊中绿原酸^[6-8]、咖啡酸^[6-7]、阿魏酸^[8]、芦丁^[6-8]、连翘酯苷 A^[9]、连翘苷^[9]、黄芩苷^[4]、甘草苷^[10]的含有量，以期保障该制剂质量的均一性和临床疗效的稳定性。

1 材料

Waters e2695 型高效液相色谱仪，配置二极管阵列检测器（PDA）（美国 Waters 公司）；XP-205 型电子分析天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；KQ-500B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

退赤胶囊（自制，批号 181101、181102、181103、181104、181201、181202）。绿原酸（批号 110753-201314，纯度 96.6%）、咖啡酸（批号 110885-200102，纯度 100%，置于五氧化二磷减压干燥器中干燥 12 h 后使用）、阿魏酸（批号 110773-201313，纯度 99.6%，置于五氧化二磷减压干燥器中干燥 12 h 后使用）、甘草苷（批号 111610-201106，纯度 93.7%）、芦丁（批号 100080-201409，纯度 91.9%）、连翘酯苷 A（批号 111810-201707，纯度 97.2%）、黄芩苷（批号 110715-201318，纯度 93.3%）、连翘苷（批号

110821-201112，纯度 96.8%）对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯；水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm, 5 μm）；流动相乙腈（含 0.1% 磷酸）（A）-水（含 0.1% 磷酸）（B），梯度洗脱（0~22 min, 9% A；22~23 min, 9%~14% A；23~55 min, 14% A；55~85 min, 14%~28% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 20 ℃；检测波长 277 nm（甘草苷、黄芩苷、连翘苷）、330 nm（绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、芦丁、连翘酯苷 A）；进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

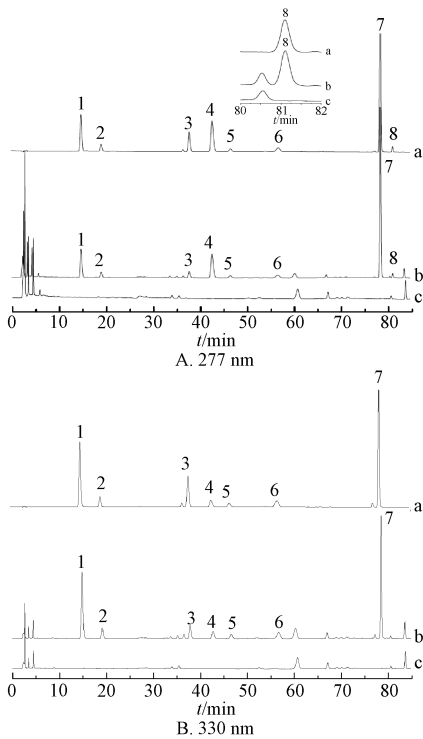
2.2.1 对照品溶液 精密称取咖啡酸、甘草苷、绿原酸、连翘酯苷 A、阿魏酸、芦丁、黄芩苷、连翘苷对照品适量，甲醇稀释，摇匀，滤过，即得（各成分质量浓度分别为 7.71、18.45、31.03、17.19、5.50、8.18、93.94、9.38 μg/mL），在 4 ℃下避光保存。

2.2.2 供试品溶液 取胶囊内容物适量，取约 2 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 70% 甲醇，称定质量，超声处理 30 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，即得，在 4 ℃下避光保存。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方比例，制备缺菊花、金银花、甘草、连翘、黄芩的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 系统适应性考察与专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定，结果见图 1。由此可知，各成分色谱峰峰形良好，阴性无干扰。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1、3、5、10、15、20 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 1，可知各成分



注：a~c 分别为对照品、供试品、阴性样品。
1. 绿原酸 2. 咖啡酸 3. 阿魏酸 4. 甘草苷 5. 芦丁 6. 连翘酯苷 A 7. 黄芩苷 8. 连翘苷
1. chlorogenic acid 2. caffeic acid 3. ferulic acid 4. liquiritin
5. rutin 6. forsythoside A 7. baicalin 8. phillyrin

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
绿原酸	$Y=34\,522X-8\,897.1$	0.999 1	3.103~62.06
咖啡酸	$Y=23\,271X-1\,528.7$	0.999 2	0.771~15.42
阿魏酸	$Y=40\,746X-1\,763.9$	0.999 1	0.55~11.00
甘草苷	$Y=34\,335X-4\,942.0$	0.999 2	1.845~36.90
芦丁	$Y=11\,688X-2\,985.1$	0.999 4	0.818~16.36
连翘酯苷 A	$Y=11\,933X-4\,355.3$	0.999 6	1.719~34.38
黄芩苷	$Y=29\,922X-2\,996.8$	0.999 1	9.394~187.88
连翘苷	$Y=5\,242.5X-570.1$	0.999 6	0.938~18.76

2.9 样品含有量测定 取 6 批胶囊，按“2.2” 下进样测定，外标法计算含有量，结果见表 2。
项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件

表 2 各成分含有量测定结果 ($\mu\text{g/g}$)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents ($\mu\text{g/g}$)

批号	绿原酸	咖啡酸	阿魏酸	甘草苷	芦丁	连翘酯苷 A	黄芩苷	连翘苷
181101	374.09	104.35	91.36	89.85	148.45	191.24	1 414.1	121.60
181102	374.07	104.50	91.89	89.72	148.87	191.25	1 417.1	121.85
181103	374.58	104.32	91.44	90.47	148.45	190.28	1 420.0	121.97
181104	375.51	104.03	91.51	90.21	148.22	189.69	1 411.6	120.12
181201	372.42	104.41	91.58	90.46	148.49	190.10	1 415.1	121.43
181202	373.22	104.15	91.22	90.16	148.47	189.00	1 409.1	121.33
平均值	373.98	104.29	91.50	90.14	148.49	190.26	1 414.5	121.38

在各自范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得各成分峰面积 RSD 均小于 2.0%，表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液，于 0、2、4、6、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得各成分峰面积 RSD 均小于 2.0%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 精密称取同一批胶囊（批号 181101）2 g，共 6 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得各成分含有量 RSD 均小于 2.0%，表明该方法重复性好。

2.8 加样回收率试验 取各成分含有量已知的胶囊（批号 181101）内容物约 1 g，共 6 份，精密称定，置于 50 mL 锥形瓶中，加入对照品溶液适量，再精密加入 50 mL 70% 甲醇，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、甘草苷、芦丁、连翘酯苷 A、黄芩苷、连翘苷平均加样回收率（RSD）分别为 101.8%（0.7%）、102.6%（1.8%）、103.9%（1.5%）、96.9%（2.2%）、101.8%（0.9%）、99.9%（2.4%）、101.3%（2.5%）、102.8%（2.2%）。

3 讨论

3.1 检测波长筛选 本实验采用 PDA 检测器，在 210~400 nm 波长处进行扫描，发现甘草苷、黄芩苷、连翘苷在 277 nm 处有较强吸收，而绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、芦丁、连翘酯苷 A 在 330 nm 处有较强吸收。因此，确定检测波长为 277、330 nm。

3.2 流动相筛选 本实验考察了乙腈-磷酸^[11]、甲醇-磷酸^[12-13]、甲醇-冰醋酸^[14]、甲醇-甲酸^[9]等流动相，发现以乙腈-水（含 0.1% 磷酸）洗脱时各成分均实现良好分离，与相邻峰无干扰。另外，在乙腈中加入 0.1% 磷酸后各成分色谱峰峰形更对称，系统稳定性更好，可应用于分析时间较长的多成分含有量测定^[15]。

3.3 供试品溶液制备方法筛选 本实验比较了不同提取溶剂（70% 甲醇、90% 甲醇）、提取方法（超声、加热回流）、提取时间（30 min、1 h）的效果，发现 2 种提取方法下各成分含有量相差不大，从操作简便的角度考虑，选择超声提取；70% 甲醇提取时，各成分提取率最高；2 种超声时间对提取影响不大。最终确定，供试品溶液制备方法为 70% 甲醇超声提取 30 min。

4 结论

本实验采用 HPLC 法同时测定退赤胶囊中绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、甘草苷、芦丁、连翘酯苷 A、黄芩苷、连翘苷的含有量，该方法简便可靠，重复性好，可用于该制剂质量控制。

参考文献：

[1] 晋毓香, 何锡兵. 退赤胶囊治疗干眼症临床观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 2008, 18(10): 598-599.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 170-171.

[3] 吴 娇, 王 聪, 于海川. 金银花中的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4): 225-234.

[4] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.

[5] 龙 宇, 向 燕, 谭裕君, 等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6142-6148.

[6] 黄艳梅, 石 岩, 胡云飞, 等. HPLC 结合化学计量学对不同产地菊花中化学成分的比较分析[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(11): 1941-1951.

[7] 王春秋, 李雯霞. RP-HPLC 法同时测定金银花中 10 种化学成分[J]. 中成药, 2015, 37(9): 1973-1977.

[8] 宋亚玲, 倪付勇, 赵祎武, 等. 金银花化学成分研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(24): 3656-3664.

[9] 梁 军, 郭信东, 夏永刚, 等. UPLC 法同时测定不同产地连翘中 8 种成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 68-72.

[10] 王子凌云, 梁 琨, 李国文. HPLC 法测定芩杏清热止咳颗粒中 8 种成分[J]. 中成药, 2019, 41(5): 995-999.

[11] 王慧竹, 王肃樊, 邓博文, 等. HPLC 法同时测定清肺抑火丸中 9 种成分的含量[J]. 中药材, 2018, 41(3): 652-656.

[12] 郝乘仪, 昌 盛. 高效液相色谱法同时测定牛黄清宫丸中 5 种成分的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 80-83.

[13] 郭 琪, 李向阳, 李桂本. 双波长 HPLC 同时测定防风通圣丸中 7 个成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 79-83.

[14] 谭雄斯. HPLC 法同时测定五粒回春丸中 8 种成分[J]. 中成药, 2018, 40(1): 110-113.

[15] 田 刚, 杨学芳, 李 超, 等. UPLC 同时检测小儿豉翘清热颗粒中 9 种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 2081-2085.