

双波长 HPLC 同时测定羚羊清肺散中 4 种有效成分的含量

崔生飞, 齐广才*, 谢凡凡, 吴江瑞, 刘珍叶
(延安大学 化学与化工学院, 陕西 延安 716000)

[摘要] **目的:**建立以高效液相色谱法同时测定羚羊清肺散中绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷的含量的方法。**方法:**采用双波长 HPLC 法, Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 327 nm(绿原酸), 237 nm(栀子苷、芍药苷、甘草苷)。**结果:**绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷 4 种成分进样量分别在 1.579 ~ 78.96 μg($r=0.9998$), 1.261 ~ 63.04 μg($r=1$), 0.364 ~ 18.2 μg($r=0.9999$), 0.329 6 ~ 16.48 μg($r=0.9999$) 与峰面积线性关系良好; 平均回收率分别为 97.6%, 97.6%, 97.1% 和 99.8%, RSD 分别为 1.0%, 0.7%, 1.2% 和 1.3%。**结论:**该方法简便、快速、准确, 可用于羚羊清肺散的质量控制。

[关键词] 羚羊清肺散; 高效液相色谱法; 双波长; 绿原酸; 栀子苷; 芍药苷和甘草苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0077-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130077

Simultaneous Determination of Four Effective Components in Lingyang Qingfei Powder by Double Wavelength HPLC

CUI Sheng-fei, QI Guang-cai*, XIE Fan-fan, WU Jiang-rui, LIU Zhen-ye
(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneously determining the contents of chlorogenic acid, gardenoside, paeoniflorin and liquiritin in Lingyang Qingfei powder. **Method:** A double wavelength HPLC method was performed on Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 28 °C. The detector wavelength was 327 nm for chlorogenic acid and 237 nm for gardenoside, paeoniflorin and liquiritin. **Result:** The chlorogenic acid, gardenoside, paeoniflorin and liquiritin showed good linear relationship with peak area at the sample size of 1.579-78.96 μg ($r=0.9998$), 1.261-63.04 μg ($r=1$), 0.364-18.2 μg ($r=0.9999$), and 0.329 6-16.48 μg ($r=0.9999$) respectively. The average recovery rate was 97.6%, 97.6%, 97.1% and 99.8% respectively for the above components, with RSD of 1.0%, 0.7%, 1.2% and 1.3%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, rapid and accurate, and can be used for the quality control of Lingyang Qingfei powder.

[Key words] Lingyang Qingfei powder; HPLC; double wavelength; chlorogenic acid; gardenoside; paeoniflorin; liquiritin

羚羊清肺散是市售广泛应用品种,由赤芍、板蓝根、金银花、甘草、栀子等 18 味药材制成,具有清热泻火、凉血解毒,化痰息风之功效。主要用于温热病,高热神昏,烦躁口渴,痉厥抽搐及小儿肺热咳嗽

等。金银花中含有绿原酸,具有增强机体免疫、抗菌、抗病毒、抗氧化、利胆降糖等功效^[1];栀子中含有栀子苷,具有抗菌、抗炎、抗氧化、保肝利胆等多种药理活性^[2];赤芍中含有芍药苷,具有神经保护、抗

[收稿日期] 20150614(002)

[第一作者] 崔生飞, 硕士, 从事色谱分析研究, Tel: 15929578923, E-mail: cuisf36@163.com

[通讯作者] * 齐广才, 教授, 硕士生导师, 从事色谱分析研究, Tel: 13909112788, E-mail: qigc@163.com

伤害性疼痛、抑制肿瘤、免疫调节等作用^[3]；甘草中含有甘草苷，具有抗肿瘤、抗溃疡、抗菌、改善肝功能、镇痛等作用^[4]。文献报道^[5]仅对其显微特征进行了鉴别，目前尚无羚羊清肺散定量分析报道。中药成分测定发展趋势是多指标同时测定^[6-7]，HPLC 法已广泛应用于药物中多组分的含量测定^[8-9]。本文通过优化样品提取条件和色谱分离条件，建立了双波长 HPLC 同时测定羚羊清肺散中绿原酸^[10]、栀子苷^[11]、芍药苷^[12]和甘草苷^[13]含量的方法，以期多指标综合评价该制剂质量，为更好的控制羚羊清肺散质量提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 1200 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies 公司), Vmini-1240 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司), AUY220 型电子分析天平(日本岛津公司), KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

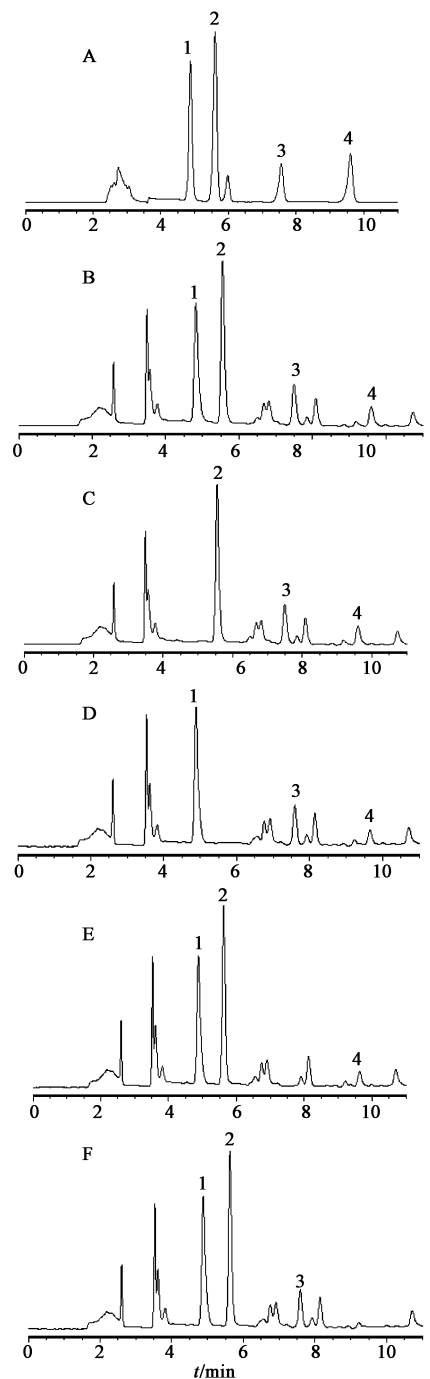
1.2 试剂 绿原酸(批号 110753-201314), 栀子苷(批号 110749-201316), 芍药苷(批号 110736-201438), 甘草苷(批号 111610-201106)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 羚羊清肺散(吉林省健今药业有限公司, 批号 20140503, 20140802, 20140101)。甲醇、乙腈色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 6 min, 18% ~ 24% A; 6 ~ 12 min, 24% ~ 35% A), 波长切换(0 ~ 5.2 min, 327 nm; 5.2 ~ 12 min, 237 nm), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 28 °C, 进样量 20 μL。色谱图见图 1。

2.2 溶液的制备 准确称取绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷对照品适量, 分别置于 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得质量浓度分别为 564, 394, 455, 412 mg·L⁻¹ 的单一成分对照品储备液。精密量取绿原酸对照品储备液 3.5 mL, 栀子苷对照品储备液 4.0 mL, 芍药苷对照品储备液 1.0 mL, 甘草苷对照品储备液 1.0 mL 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容制得混合对照品储备液 I (绿原酸 78.96 mg·L⁻¹, 栀子苷 63.04 mg·L⁻¹, 芍药苷 18.2 mg·L⁻¹, 甘草苷 16.48 mg·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 称取羚羊清肺散样品约 0.5 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 60 min,



A. 对照品; B. 样品; C. 缺金银花阴性对照; D. 缺栀子阴性对照; E. 缺甘草阴性对照; F. 缺芍药阴性对照; 1. 绿原酸; 2. 栀子苷; 3. 芍药苷; 4. 甘草苷

图 1 羚羊清肺散 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatography of Lingyang Qingfei powder

冷却至室温, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 再从中吸取 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 定容, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性溶液 按处方比例分别制备不含金银花、不含栀子、不含赤芍、不含甘草的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制成阴性溶液。

2.5 线性关系考察 精密量取对照品储备液 I 适量,制备绿原酸(1.579,3.158,6.317,15.79,31.58,78.96 mg·L⁻¹), 栀子苷(1.261, 2.522, 5.043, 12.61,25.22,63.04 mg·L⁻¹), 芍药苷(0.364 0, 0.728 0,1.456,3.640,7.280,18.20 mg·L⁻¹), 甘草苷(0.329 6,0.659 2, 1.318, 3.360, 6.592, 16.48 mg·L⁻¹)的系列溶液。再分别精密吸取 20 μL 注入色谱仪,以峰面积对进样浓度(mg·L⁻¹)进行线性回归。得绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷的回归方程分别为 $Y = 12.885X - 17.723 (r = 0.999 8)$, $Y = 20.873X + 1.474 9 (r = 1)$, $Y = 20.554X + 1.217 4 (r = 0.999 9)$, $Y = 31.268X + 2.179 (r = 0.999 9)$ 。结果表明,绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷的进样量分别在 1.579 ~ 78.96, 1.261 ~ 63.04, 0.364 ~ 18.2,0.329 6 ~ 16.48 μg, 与峰面积具有良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 20 μL,重复进样 6 次测定。结果绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷峰面积的 RSD 分别为 0.7%, 0.5%, 0.3%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μL,分别在 0,2,4,6,8,10 h 进样测定。结果绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷峰面积的 RSD 分别为 0.9%, 1.1%, 1.6%, 0.8%, 表明样品溶液在 10 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批号(批号 20130503)样品,按 2.3 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,测定峰面积,计算含量。结果绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷的平均质量分数分别为 3.629, 2.526, 0.636 3, 0.187 8 mg·g⁻¹, RSD 分别为 0.9%, 1.4%, 1.5%, 1.0%。表明本方法重复性良好。

2.9 回收率试验 取已知含量的样品 6 份,每份约 0.25 g,精密称定,分别精密加入相当于各成分含量 80%,100%,120% 的对照品溶液,按 2.3 项下方法制得供试品溶液,测定含量并计算,结果见表 1。

2.10 样品含量测定 取样品 3 批,按 2.3 项下方法分别制备供试品溶液,在 2.1 项色谱条件下进样测定,按外标法计算含量。结果见表 2。

3 讨论

3.1 流动相的选择 考察了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-磷酸水溶液等流动相系统,结果发现甲醇-水流动相使得系统压力明显高于乙腈-水,而且乙腈比甲醇有更好的洗脱能力,各成分峰形较好,达到满意的分离。在流动相中加入 0.1% 的磷酸作为改性剂,

表 1 羚羊清肺散中 4 种成分的加样回收率试验

Table 1 Recovery test of Lingyang Qingfei powder

成分	称样量 /g	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
绿原酸	0.250 3	908.3	733.2	1 617.0	96.7	97.6	1.0
	0.250 2	908.0	733.2	1 621.2	97.3		
	0.250 1	907.6	902.4	1 792.6	98.1		
	0.250 2	908.0	902.4	1 801.3	99.0		
	0.250 4	908.7	1 128	1 996.9	96.5		
	0.250 1	907.6	1 128	2 012.6	97.9		
栀子苷	0.250 3	632.3	512.2	1 129.6	97.1	97.6	0.7
	0.250 2	632.0	512.2	1 134.2	98.0		
	0.250 1	631.8	630.4	1 253.8	98.7		
	0.250 2	632.0	630.4	1 243.7	97.0		
	0.250 4	632.5	788.0	1 396.1	96.9		
	0.250 1	631.8	788.0	1 402.2	97.8		
芍药苷	0.250 3	159.3	127.4	283.1	97.2	97.1	1.2
	0.250 2	159.2	127.4	281.7	96.1		
	0.250 1	159.1	154.7	309.8	97.4		
	0.250 2	159.2	154.7	311.1	98.3		
	0.250 4	159.3	191.1	342.2	95.7		
	0.250 1	159.1	191.1	346.7	98.1		
甘草苷	0.250 3	47.01	41.20	89.10	102.2	99.8	1.3
	0.250 2	46.99	41.20	89.98	99.5		
	0.250 1	46.97	49.44	95.87	98.9		
	0.250 2	46.99	49.44	96.54	100.2		
	0.250 4	47.03	57.68	104.3	99.3		
	0.250 1	46.97	57.68	103.9	98.7		

表 2 羚羊清肺散样品中 4 种成分质量分数测定 (n=6)

Table 2 Determination of Lingyang Qingfei powder (n=6)

批号	绿原酸	栀子苷	芍药苷	甘草苷
20140503	3.629	2.526	0.636 3	0.187 8
20140802	3.449	2.142	0.416 4	0.091 2
20140101	4.091	5.000	0.573 0	0.132 5

分离效果得到了更好的改善。

3.2 检测波长的选择 应用紫外-可见分光光度计分别对绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷单一成分对照品溶液在 200 ~ 400 nm 进行扫描,结果发现绿原酸在 327 nm 处有最大吸收峰,栀子苷在 238 nm 处有最大吸收峰,芍药苷在 230 nm 处有最大吸收峰,甘草苷在 237 nm 处有最大吸收峰。因甘草苷峰面

积响应值较低,为了提高检测灵敏度,采用双波长测定法,327 nm 作为第一检测波长,237 nm 作为第二检测波长。

3.3 供试品溶液制备方法的选择 考察了 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% 甲醇溶液对羚羊清肺散 4 种有效成分提取率的影响,结果各组分均在 50% 甲醇条件下达到最大提取率。以 50% 甲醇做溶剂,选择不同超声提取时间(20, 40, 60, 80, 90 min),绿原酸和栀子苷均在 60 min 达到最大,芍药苷和甘草苷的变化不是很大,故选择 60 min 作为提取时间。

3.4 洗脱方式的选择 本药物为中药复方制剂,等度洗脱难以达到快速高效的分离,以乙腈-0.1% 磷酸水溶液等度洗脱时,有机相比比例超过 30%,绿原酸和栀子苷难以达到有效分离,有机相比比例低于 17%,各峰出峰时间太慢,峰形宽。通过优化流动相比比例,采用梯度洗脱,使绿原酸和栀子苷达到基线分离,大幅缩短了甘草苷的出峰时间,最终各组分均得到有效分离,峰形较好。

目前文献中仅有对羚羊清肺散的显微鉴别,尚未见对其指标成分含量测定的报道,本试验以羚羊清肺散中绿原酸、栀子苷、芍药苷和甘草苷为指标,通过双波长切换技术,建立高效液相色谱法同时测定以上 4 种成分含量的方法,经方法学考察,说明本方法简便、快速、准确,具有良好的准确性和重复性,为羚羊清肺散的多指标质量控制提供科学依据。

[参考文献]

[1] 周燕园. HPLC 测定五味子配方颗粒中的原儿茶酸和绿原酸[J]. 华西药理学杂志, 2014, 29(6): 688-690.
[2] 谢鹏, 赵洪梅. 高效液相色谱法测定栀姜口服液中栀子苷的含量[J]. 解放军医药杂志, 2014, 26(6): 94-96.

[3] 冯源, 王胤, 周浓, 等. HPLC 测定黄牡丹不同部位中芍药苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 139-134.
[4] 李克, 吴龙琴, 王曙东, 等. 双波长-HPLC 法同时测定甘草中甘草苷和甘草酸含量[J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(2): 62-65.
[5] 刘丽, 曲静, 康廷国. 羚羊清肺散的显微鉴别研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(10): 2097-2098.
[6] 周萃, 杨燕云, 张振秋, 等. 波长切换 HPLC 法同时测定甘草及其炮制品中 7 个物质的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2067-2072.
[7] 章军, 李宇政, 王跃生, 等. HPLC 同时测定葛根苓连汤中 12 个有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 58-62.
[8] 陈勇, 陆静娴, 祝明, 等. HPLC 同时测定乌灵胶囊中多组分的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 218-221.
[9] 蔡洪鲲, 刘小芬, 蒋范任, 等. 反相高效液相色谱法同时测定归脾丸(浓缩丸)中甘草苷、阿魏酸、甘草酸铵、去氢木香内酯的含量[J]. 中南药学, 2014, 12(12): 1242-1245.
[10] 桂署华, 陈军, 王林, 等. HPLC 法同时测定银翘柴桂颗粒中绿原酸、芍药苷和黄芩苷[J]. 中成药, 2011, 33(7): 1175-1178.
[11] 黄燕萍, 黄焜. HPLC 法同时测定栀子金花丸中栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 中国药事, 2010, 24(10): 1002-1004.
[12] 郝乘仪, 郭淑英, 冯波. HPLC 同时测定穹菊上清片中 5 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 74-77.
[13] 张科卫, 崔小兵, 吴皓. 双波长梯度洗脱法测定栀子柏皮汤制剂中栀子苷、甘草苷的含量[J]. 中成药, 2008, 30(11): 1629-1631.

[责任编辑 顾雪竹]