

# HPLC法测定清咽利喉口服液中绿原酸和芍药苷的含量<sup>△</sup>

曹伟国<sup>1,2,3\*</sup>,陶燕铎<sup>4</sup>,颜学伟<sup>1</sup>,谈利红<sup>1</sup>,张丹<sup>1#</sup>(1.重庆医科大学中医药学院,重庆 401331;2.重庆医科大学中医药研究室,重庆 400016;3.重庆医科大学中医药实验教学中心,重庆 401331;4.中国科学院西北高原生物研究所,西宁 810000)

中图分类号 R283.61;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2924-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.16

**摘要** 目的:建立测定清咽利喉口服液中绿原酸和芍药苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Hypersil ODS2 C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),检测波长为323 nm(绿原酸)和230 nm(芍药苷)。结果:绿原酸、芍药苷的进样量分别在0.16~1.60、0.20~2.00 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(*r*分别为0.999 8、0.999 5);二者精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率分别为97.87%、98.42%,RSD分别为2.2%、1.7%(*n*均为6)。结论:该方法简便、灵敏、准确,可用于清咽利喉口服液的质量控制。

**关键词** 清咽利喉口服液;绿原酸;芍药苷;高效液相色谱法;含量测定

## Content Determination of Chlorogenic Acid and Paeoniflorin in Qingyan Lihou Oral Liquid by HPLC

CAO Wei-guo<sup>1,2,3</sup>, TAO Yan-duo<sup>4</sup>, YAN Xue-wei<sup>1</sup>, TAN Li-hong<sup>1</sup>, ZHANG Dan<sup>1</sup>(1.College of TCM, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China; 2.Lab of TCM, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3.TCM Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China; 4.The Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for content determination of chlorogenic acid and paeoniflorin in Qingyan lihou oral liquid. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Hypersil ODS2 C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution). The detection wavelength was set at 323 nm for chlorogenic acid and 230 nm for paeoniflorin. RESULTS: The linear range of chlorogenic acid and paeoniflorin were 0.16-1.60 μg(*r*=0.999 8) and 0.20-2.00 μg(*r*=0.999 5), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. Average recoveries were 97.87% (RSD=2.2%, *n*=6) for chlorogenic acid, and 98.42% (RSD=1.7%, *n*=6) for paeoniflorin. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and accurate, and can be used for the quality control of Qingyan lihou oral liquid.

**KEYWORDS** Qingyan lihou oral liquid; Chlorogenic acid; Paeoniflorin; HPLC; Content determination

清咽利喉口服液是由金银花、连翘、穿心莲、赤芍、玄参等10味中药组成的医院制剂,具有疏风、清热、滋阴、利咽喉之功效,临床用于治疗风热外感、风热喉痹、风热乳蛾等证。金银花为方中君药,赤芍为臣药,且金银花与赤芍为常用中药药对,因此笔者选取金银花与赤芍所含的主要有效成分绿原酸和芍药苷<sup>[1-4]</sup>作为该制剂的质量控制指标,建立了以高效液相色谱(HPLC)法测定该制剂中绿原酸和芍药苷含量的方法,旨在为该制剂质量标准的建立与提高提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括LC solution色谱工作站、SPD-20A紫外-可见检测器(日本岛津公司);XS105DU型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

### 1.2 药品与试剂

△ 基金项目:国家科技支撑计划课题(No.2007BAI45B01)

\* 副教授,硕士。研究方向:中药与天然药物研发。电话:023-65712062。E-mail: cwgzd2001@sohu.com

# 通信作者:副教授,硕士。研究方向:中药资源开发与利用。电话:023-65712062。E-mail: danzhang01234567@sina.com

清咽利喉口服液(重庆市北碚区中医院提供,批号:20110401、20110402、20110403);绿原酸、芍药苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110753-200413、110736-201035,供含量测定用);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验<sup>[5-7]</sup>

色谱柱:Hypersil ODS2 C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;柱温:室温;检测波长:323 nm(绿原酸)、230 nm(芍药苷);进样量:20 μl。理论板数按芍药苷峰计算应不低于5 000;在此条件下各组分能得到良好分离,阴性对照无干扰。色谱见图1。

### 2.2 对照品贮备液的制备

分别精密称取绿原酸8.0 mg、芍药苷10.0 mg,各置100 ml量瓶中,加50%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液(质量浓度分别为0.08、0.10 mg/ml)。

### 2.3 供试品溶液的制备

将清咽利喉口服液摇匀,精密吸取0.3 ml,加50%甲醇稀释至10 ml,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 The gradient elution process of mobile phase

时间,min	乙腈,%	0.1%磷酸溶液,%
0~13	11→11	89→89
>13~26	11→18	89→82
>26~30	18→23	82→77
>30~40	23→11	77→89

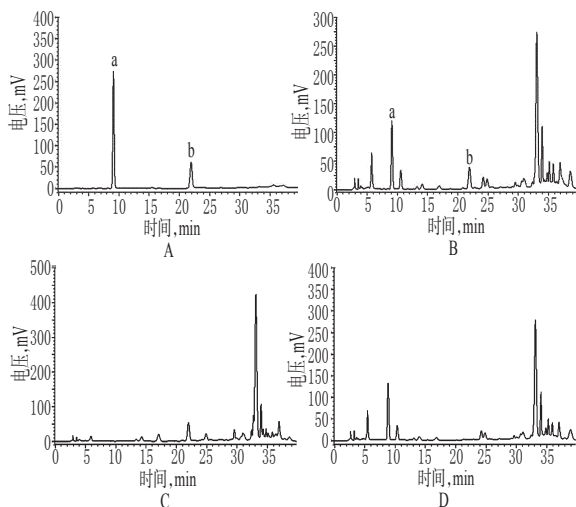


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品; B.供试品; C.缺金银花阴性对照; D.缺赤芍阴性对照; a.绿原酸; b.芍药苷

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample; C. negative control without *Lonicera japonica*; D. negative control without *Paeonia veitchii*; a. chlorogenic acid; b. paeoniflorin

#### 2.4 线性关系考察

精密量取绿原酸对照品贮备液(质量浓度为0.08 mg/ml)梯度稀释,制成质量浓度分别为8、16、32、48、64、80 μg/ml的对照品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(A)为纵坐标,对照品进样量(m)为横坐标,绘制标准曲线,得绿原酸的回归方程为 $A=3.288 \times 10^6 m - 2.298 \times 10^4$  ( $r=0.9998, n=6$ )。结果表明,绿原酸进样量在0.16~1.60 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

精密量取芍药苷对照品贮备液(质量浓度为0.10 mg/ml)梯度稀释,制成质量浓度分别为10、20、40、60、80、100 μg/ml的对照品溶液,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积积分值(A)为纵坐标,对照品进样量(m)为横坐标,绘制标准曲线,得芍药苷的回归方程为 $A=1.704 \times 10^6 m + 1.505 \times 10^4$  ( $r=0.9995, n=6$ )。结果表明,芍药苷进样量在0.20~2.00 μg范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

#### 2.5 精密度试验

在上述色谱条件下,精密吸取绿原酸对照品溶液(质量浓度为48 μg/ml)与芍药苷对照品溶液(质量浓度为80 μg/ml)各20 μl,连续进样测定6次,记录峰面积。结果,绿原酸与芍药苷的RSD分别为1.6%、1.9% ( $n$ 均为6),表明仪器精密度较好。

#### 2.6 重复性试验

精密量取同一批清咽利喉口服液(批号:20110402)适量,

共6份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算样品含量。结果,样品中绿原酸的平均质量浓度为0.948 mg/ml, RSD=1.6% ( $n=6$ );芍药苷的平均质量浓度为1.456 mg/ml, RSD=1.8% ( $n=6$ ),表明本方法重复性较好。

#### 2.7 稳定性试验

精密吸取于室温放置的同一批供试品溶液(批号:20110402)适量,分别于0、2、4、6、8、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸与芍药苷的RSD分别为1.8%、1.7% ( $n$ 均为6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

#### 2.8 加样回收率试验

精密量取已知绿原酸与芍药苷含量的同一批样品(批号:20110401)0.15 ml,共6份,分别置10 ml量瓶中,各加入绿原酸(质量浓度为80 μg/ml)与芍药苷(质量浓度为100 μg/ml)对照品溶液适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果分别见表2、表3。

表2 绿原酸的加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 2 Results of recovery test of chlorogenic acid ( $n=6$ )

取样量,ml	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率,%	$\bar{x}$ , %	RSD, %
0.15	139.80	140.00	273.88	95.77		
0.15	139.80	140.00	277.87	98.62		
0.15	139.80	140.00	281.96	101.54	97.87	2.2
0.15	139.80	140.00	276.05	97.32		
0.15	139.80	140.00	273.94	95.81		
0.15	139.80	140.00	277.24	98.17		

表3 芍药苷的加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 3 Results of recovery test of paeoniflorin ( $n=6$ )

取样量,ml	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率,%	$\bar{x}$ , %	RSD, %
0.15	220.50	220.00	432.00	96.14		
0.15	220.50	220.00	438.23	98.97		
0.15	220.50	220.00	433.45	96.80	98.42	1.7
0.15	220.50	220.00	438.39	99.04		
0.15	220.50	220.00	436.58	98.22		
0.15	220.50	220.00	443.53	101.38		

#### 2.9 样品含量测定

精密吸取3批清咽利喉口服液样品各适量,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样20 μl,测定峰面积,重复3次,以外标法计算样品中绿原酸与芍药苷的含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab 4 Results of content determination of samples ( $n=3$ )

批次	绿原酸,mg/ml	芍药苷,mg/ml
20110401	0.932	1.468
20110402	0.948	1.456
20110403	0.969	1.457

### 3 讨论

有关绿原酸与芍药苷含量测定的方法报道较多,本试验所选用的色谱条件参考了《中国药典》及相关文献<sup>[8-10]</sup>,但预试验中发现绿原酸与芍药苷极性相差较大,等度洗脱条件下两者保留时间差别较大。为缩短分析时间,本试验采用梯度洗脱法处理,可在保证分离度的前提下于40 min内完成检测。由于芍药苷色谱峰易拖尾,本试验比较了乙腈-0.05%磷酸溶液和乙腈-0.1%磷酸溶液两种流动相的洗脱效果,发现使用乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相时,绿原酸和芍药苷色谱峰的分离

# HPLC法同时测定裸花紫珠药材中3种黄酮类成分的含量<sup>Δ</sup>

刘勇<sup>1\*</sup>, 张鹏威<sup>2#</sup>, 许立强<sup>2</sup>, 苏文琴<sup>2</sup>, 刘晓<sup>3</sup>(1.温州医科大学附属第二医院, 浙江温州 325027; 2.海南医学院药学院, 海口 571199; 3.温州市中医院, 浙江温州 325000)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2926-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.17

**摘要** 目的: 建立同时测定裸花紫珠药材中芦丁、木犀草素和槲皮素含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为Dikma Diamondsil C<sub>18</sub>(2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为0.8 ml/min, 检测波长为257 nm。结果: 芦丁、木犀草素和槲皮素的进样量分别在65.28~587.52、9.28~83.52、5.22~46.94 ng范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系( $r$ 分别为0.999 9、0.999 7、0.999 9); 三者精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2%; 平均加样回收率分别为99.58%、99.31%和99.24%, RSD分别为1.46%、1.64%和1.41%( $n$ 均为6)。结论: 该方法准确、精密度高、重复性好, 可用于裸花紫珠药材中芦丁、木犀草素和槲皮素含量的同时测定。

**关键词** 裸花紫珠; 高效液相色谱法; 芦丁; 木犀草素; 槲皮素; 含量测定

## Simultaneous Determination of 3 Kinds of Flavone in *Callicarpa nudiflora* by HPLC

LIU Yong<sup>1</sup>, ZHANG Peng-wei<sup>2</sup>, XU Li-qiang<sup>2</sup>, SU Wen-qin<sup>2</sup>, LIU Xiao<sup>3</sup>(1.The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang Wenzhou 325027, China; 2.School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571199, China; 3.Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Wenzhou 325000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish an HPLC method for simultaneous determination of rutin, luteolin and quercetin in *Callicarpa nudiflora*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Dikma Diamondsil C<sub>18</sub>(2) column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 257 nm. RESULTS: The liner range were 65.28-587.52 ng for rutin ( $r=0.999 9$ ), 9.28-83.52 ng for luteolin ( $r=0.999 7$ ) and 5.22-46.94 ng for quercetin ( $r=0.999 9$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. Average recoveries were 99.58% (RSD=1.46%,  $n=6$ ), 99.31% (RSD=1.64%,  $n=6$ ) and 99.24% (RSD=1.41%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is accurate, precise and reproducible, and can be used for the determination of rutin, luteolin and quercetin in *C. nudiflora*.

**KEYWORDS** *Callicarpa nudiflora*; HPLC; Rutin; Luteolin; Quercetin; Content determination

离度和峰形均较好, 故选其作为流动相。

综上所述, 本方法简便、灵敏、准确, 可用于清咽利喉口服液的质量控制。

### 参考文献

- [1] 彭鹏, 程雪梅, 郭英, 等. 野菊花栓剂质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 81.
- [2] 王明星, 于秀华, 刘永强, 等. 抗感利咽胶囊的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 90.
- [3] 蓝鸣生, 陈路, 覃成芳, 等. 五淋散胶囊中梔子苷和芍药苷的HPLC含量测定[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(14): 1 281.
- [4] 王岩, 彭红英, 周莉玲, 等. 追风透骨胶囊的质量标准研究[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(19): 1 910.
- [5] 董宇, 狄留庆, 赵晓莉, 等. HPLC法测定血压平喷雾剂中绿原酸、阿魏酸、芍药苷、肉桂酸[J]. 中草药, 2012, 43(2): 296.
- [6] 王巧梅, 薛桂蓬, 邢建国, 等. 芪天胶囊中红景天苷和芍药苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 88.
- [7] 王新娣, 石晓峰, 沈薇, 等. 双波长HPLC法同时测定安乳散结丸中芍药苷与迷迭香酸的含量[J]. 中国药房, 2013, 24(19): 1 795.
- [8] 刘亚蓉, 宋霞, 刘海青. 双波长RP-HPLC法同时测定妇科十味片中芍药苷、阿魏酸[J]. 中成药, 2013, 35(6): 1 222.
- [9] 冯川, 刘唯芬, 慕善学, 等. RP-HPLC法测定清胰利胆颗粒中绿原酸和芍药苷的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(3): 219.
- [10] 靳淑敏, 杨维, 王伟华, 等. 多波长RP-HPLC法测定抗感宁合剂中绿原酸、葛根素和芍药苷[J]. 中成药, 2009, 31(1): 75.

(收稿日期: 2014-04-18 修回日期: 2014-06-06)

<sup>Δ</sup> 基金项目: 浙江省公益性技术应用研究计划项目(No.2012C23082); 海南省重点科技计划项目(No.ZDXM20120095); 海南医学院科研培育基金立项项目(No.HY2010-011)

\* 中药师, 硕士。研究方向: 中药制剂开发。电话: 0577-88002568。E-mail: lyssm@126.com

# 通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 药物制剂开发和药物质量标准。电话: 0898-66894429。E-mail: zpw0803@163.com