HPLC法测定清咽利喉口服液中绿原酸和芍药苷的含量Δ

曹纬国[1,2,3]*，陶燕铎[4]，颜学伟[1]，谈利红[1]，张　丹[1#]（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_{18}（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[1,2,3], TAO Yan-duo[4], YAN Xue-wei[1], TAN Li-hong[1], ZHANG Dan[1]（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_{18}（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[1-4]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

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[5-7]

色谱柱：Hypersil ODS2 C_{18}（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

Δ 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

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

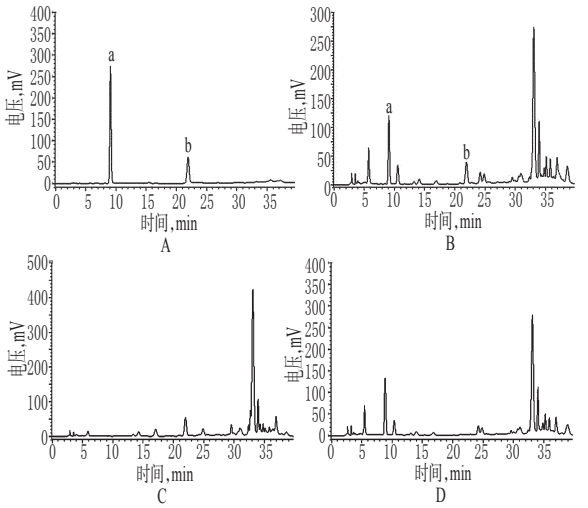

图1　高效液相色谱图

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，制备成质量浓度分别为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$A=3.288\times10^6m-2.298\times10^4$（$r=0.999\ 8$，$n=6$）。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，制备成质量浓度分别为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$A=1.704\times10^6m+1.505\times10^4$（$r=0.999\ 5$，$n=6$）。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[8-10]，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

HPLC法同时测定裸花紫珠药材中3种黄酮类成分的含量Δ

刘　勇[1*],张鹏威[2#],许立强[2],苏文琴[2],刘　晓[3](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_{18}(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[1],ZHANG Peng-wei[2],XU Li-qiang[2],SU Wen-qin[2],LIU Xiao[3](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_{18}(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.五淋散胶囊中栀子苷和芍药苷的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)

Δ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