

# HPLC 同时测定消炎利胆片中 5 种活性成分的含量

周争道, 张莉, 周慧云, 蒋竞, 黄平<sup>\*</sup>(江西医学高等专科学校, 江西 上饶 334000)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 同时测定消炎利胆片中 5 种活性成分(绿原酸、迷迭香酸、穿心莲内酯、芹菜素、脱水穿心莲内酯)的方法。方法 采用 phenomonex<sup>®</sup>-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-0.4%的磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 330 nm(绿原酸、迷迭香酸、芹菜素)和 254 nm(穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯)。结果 绿原酸、迷迭香酸、穿心莲内酯、芹菜素和脱水穿心莲内酯检测浓度分别在 3.042~121.7 μg·mL<sup>-1</sup>、2.558~102.3 μg·mL<sup>-1</sup>、14.11~564.4 μg·mL<sup>-1</sup>、2.835~113.4 μg·mL<sup>-1</sup>、23.86~954.3 μg·mL<sup>-1</sup> 内与峰面积呈良好的线性关系( $r \geq 0.9996$ ), 平均加样回收率为 97.90%~101.75%, RSD 为 0.89%~1.66%, 仪器精密度、重复性、稳定性良好。结论 本试验所建立的方法准确可靠、重复性好, 可为消炎利胆片的质量控制提供科学的依据。

**关键词:** 消炎利胆片; 高效液相色谱法; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)12-1801-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.12.010

引用本文: 周争道, 张莉, 周慧云, 等. HPLC 同时测定消炎利胆片中 5 种活性成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(12): 1801-1804.

## Simultaneous Determination of Five Active Components in Xiaoyanlidan Tablets by HPLC

ZHOU Zhengdao, ZHANG Li, ZHOU Huiyun, JIANG Jing, HUANG Ping<sup>\*</sup> (Jiangxi Medical College, Shangrao 334000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method for simultaneous of chlorogenic acid, rosmarinic acid, andrographolide, apigenin and dehydroandrographolide in Xiaoyanlidan tablets by HPLC. **METHODS** The HPLC separation was achieved on a phenomonex<sup>®</sup>-C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile (A) and 0.4% phosphoric acid (B) solution with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was set at 330 nm (chlorogenic acid, rosmarinic acid and apigenin) and 254 nm (andrographolide, dehydroandrographolide). **RESULTS** The linear range of chlorogenic acid, rosmarinic acid, andrographolide, apigenin and dehydroandrographolide were 3.042–121.7 μg·mL<sup>-1</sup>, 2.558–102.3 μg·mL<sup>-1</sup>, 14.11–564.4 μg·mL<sup>-1</sup>, 2.835–113.4 μg·mL<sup>-1</sup>, 23.86–954.3 μg·mL<sup>-1</sup> respectively ( $r \geq 0.9996$ ); the average recoveries were 97.90%–101.75% and the corresponding RSD was 0.89%–1.66% respectively. The precision, repeatability and stability were good. **CONCLUSION** The established method is accurate, reliable and repeatable, which can provide a more comprehensive basis for quality control of Xiaoyanlidan tablets.

**KEYWORDS:** Xiaoyanlidan tablets; HPLC; content determination; quality control

消炎利胆片收载于中国药典 2015 年版一部, 是国家中药保护品种, 由穿心莲、溪黄草、苦木 3 味中药组成, 具有清热、祛湿, 利胆之功效<sup>[1]</sup>, 临床上主要用于治疗急慢性胆囊炎、胆结石<sup>[2-3]</sup>。

目前, 消炎利胆片的质量标准主要以穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯为指标成分进行含量测定; 也有研究采用薄层扫描法、毛细管电泳法、比色法、HPLC 以及 LC-MS 法测定单味药材穿心莲中内酯类、黄酮类成分或苦木中生物碱类成分<sup>[4-6]</sup>。据报道, 穿心莲中除含内酯类成分外, 还有绿原酸等酚酸类、芹菜素等黄酮类成分<sup>[7]</sup>, 溪黄草中含

有咖啡酸、迷迭香酸等酚酸类成分<sup>[8]</sup>, 苦木中含有生物碱类成分<sup>[9]</sup>。药理活性研究表明, 绿原酸具有广泛的抗菌、消炎、止血作用, 有利胆之功效<sup>[10]</sup>, 迷迭香酸具有抗炎、抗菌、抗病毒、免疫调节等生物活性<sup>[11]</sup>, 芹菜素具有抗炎、抗菌、抗病毒和抗肿瘤等作用<sup>[12-13]</sup>, 常作为中药及制剂质量控制的指标成分。鉴于中医治疗疾病强调用药的系统性和整体性, 中药复方疗效的发挥是方中多种成分协同作用的结果, 为全面反映制剂的内在质量, 有必要建立多指标、多类别成分的含量测定方法。故本试验在现行质量标准中测定穿心莲内酯和脱

作者简介: 周争道, 男, 副教授 Tel: (0793)7089002  
(0793)7089000 E-mail: huangping2489@163.com

E-mail: zhouzd2012@163.com

\*通信作者: 黄平, 女, 硕士, 讲师 Tel:

水穿心莲内酯含量的基础上,再增加绿原酸、芹菜素和迷迭香酸 3 种成分为指标成分,建立了消炎利胆片中绿原酸、迷迭香酸、穿心莲内酯、芹菜素、脱水穿心莲内酯的 HPLC 含量测定方法,可为进一步提高消炎利胆片的质量控制方法提供依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪:包括 PAD 检测器,Empower 工作站(美国 Waters 公司);CPA225D 型十万分之一电子天平(德国赛多利斯);KQ-500DE 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

绿原酸对照品(批号:110848-201711;纯度:99.4%)、迷迭香酸对照品(批号:111869-201608;纯度 99.1%)、穿心莲内酯对照品(批号:110881-201702;纯度:98.6%)、芹菜素对照品(批号:110531-201709;纯度:98.8%)、脱水穿心莲内酯对照品(批号:110773-201712;纯度:99.3%)均购自中国食品药品检定研究院;消炎利胆片(广东罗浮山国药股份有限公司,批号分别为 L15C092、L15D102、L16C061,规格:片心重 0.25 g;先锋药业,批号分别为 151101、201610303,规格:片心重 0.25 g);甲醇为色谱纯(Merck 公司);磷酸为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 phenomex<sup>®</sup>-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.4%的磷酸水溶液(B);流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温为 30 ℃;检测波长为 330 nm(绿原酸、迷迭香酸、芹菜素)和 254 nm(穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯);进样量为 10 μL。梯度洗脱,洗脱程序如下:0~25 min, 8%→23%A; 25~42 min, 23%→36%A; 42~55 min, 36%→60%A; 55~60 min, 60%→8%A。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 精密称取绿原酸 6.12 mg、迷迭香酸 5.16 mg、穿心莲内酯 28.62 mg、芹菜素 5.74 mg、脱水穿心莲内酯 48.05 mg,至 50 mL 的量瓶中,加 70%甲醇至刻度,制成 121.7, 102.3, 564.4, 113.4, 954.3 μg·mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取消炎利胆片 20 片,除去包衣,研细,取约 1.0 g,置 100 mL 量瓶中,加入 70%甲醇 25 mL,称重,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min,冷却,称重,用 70%甲醇补足减失质量,摇匀,即得。

**2.2.3 阴性对照溶液的制备** 依据处方制备缺穿心莲、溪黄草的阴性对照样品,按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液,摇匀,即得。

### 2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以穿心莲内酯峰计≥6 000。结果见图 1。

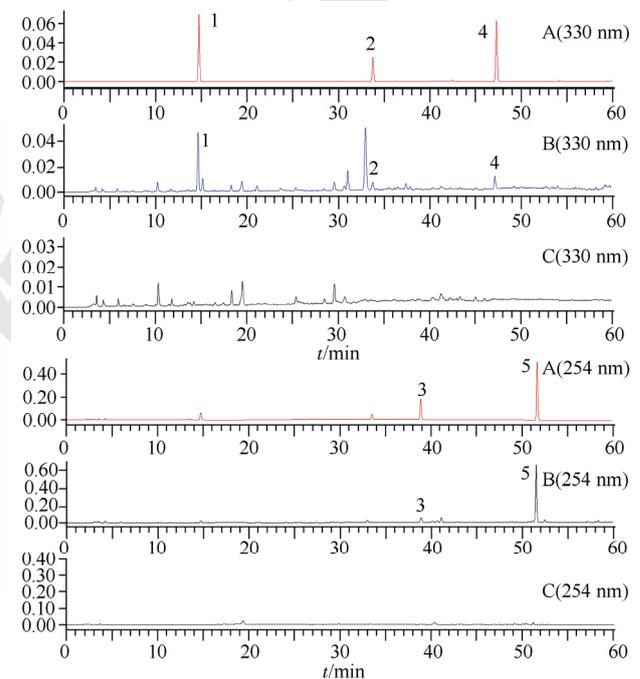


图 1 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; C-空白样品溶液; 1-绿原酸; 2-迷迭香酸; 3-穿心莲内酯; 4-芹菜素; 5-脱水穿心莲内酯。

### Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed standard solution; B-sample solution; C-blank solution; 1-chlorogenic acid; 2-rosmarinic acid; 3-andrographolide; 4-apigenin; 5-dehydroandrographolide.

### 2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容。分别精密吸取 10 μL 进样测定,以峰面积  $Y$  对进样浓度  $X$  进行回归方程计算。结果见表 1。

表 1 5 种被测成分的线性关系和线性范围

Tab.1 Linear regression data of the determined compounds

成分	线性方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$r$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
绿原酸	$Y=33\ 182X-34\ 022$	3.042~121.7	0.999 7	0.13	0.39
迷迭香酸	$Y=27\ 651X-12\ 611$	2.558~102.3	0.999 9	0.11	0.34
穿心莲内酯	$Y=5\ 257X+14\ 748$	14.110~564.4	0.999 9	0.61	2.02
芹菜素	$Y=26\ 731X+27\ 032$	2.835~113.4	0.999 6	0.12	0.37
脱水穿心莲内酯	$Y=20\ 712X-32\ 687$	23.860~954.3	0.999 9	0.92	2.85

### 2.5 定量限与检测限的考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量，逐级稀释，按“2.1”项下色谱条件进样，记录峰面积。当信噪比为 10:1 时，得定量限；当信噪比为 3:1 时，得检测限，结果见表 1。

### 2.6 仪器精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，记录峰面积并计算 RSD。结果显示绿原酸、迷迭香酸、穿心莲内酯、芹菜素、脱水穿心莲内酯的 RSD 分别为 1.35%，0.69%，1.42%，1.07%，1.32%，表明仪器精密度良好。

### 2.7 稳定性试验

取同一批号(L15C092)供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样分析，记录峰面积并计算 RSD。结果显示绿原酸、迷迭香酸、穿心莲内酯、芹菜素、脱水穿心莲内酯的 RSD 分别为 1.39%，1.96%，1.21%，1.05%，0.97%，表明 5 种成分在甲醇溶液中 24 h 内稳定。

### 2.8 重复性试验

取同一批号(L15C092)样品，按“2.2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分析，记录峰面积并计算样品含量。结果显示绿原酸、迷迭香酸、穿心莲内酯、芹菜素、脱水穿心莲内酯的 RSD 分别为 1.62%，1.91%，0.57%，1.62%，0.96%，表明方法重复性良好。

### 2.9 加样回收率试验

取已知含量(L15C092)样品 6 份，每份约 0.5 g，置 100 mL 量瓶中，精密加入质量浓度分别为 100.8, 16.04, 1 624.0, 30.56, 710.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的绿原酸、迷迭香酸、穿心莲内酯、芹菜素、脱水穿心莲内酯对照品溶液各 5 mL，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分析，计算回收率，结果见表 2。

表 2 加样回收率试验(n=6)

Tab.2 Recovery of the test(n=6)

成分	取样量/ g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
绿原酸	0.502 5	0.442 2	0.504 0	0.931 4	97.06	99.25	1.48
	0.513 2	0.451 6	0.504 0	0.947 3	98.35		
	0.501 2	0.441 1	0.504 0	0.951 1	101.20		
	0.500 6	0.440 5	0.504 0	0.943 8	99.86		
	0.507 3	0.446 4	0.504 0	0.951 3	100.17		
	0.514 3	0.452 6	0.504 0	0.950 8	98.85		
迷迭香酸	0.502 5	0.080 4	0.080 2	0.162 5	102.37	101.75	1.54
	0.513 2	0.082 1	0.080 2	0.162 1	99.74		
	0.501 2	0.080 2	0.080 2	0.160 3	99.89		
	0.500 6	0.080 1	0.080 2	0.162 7	103.00		
	0.507 3	0.081 2	0.080 2	0.163 1	102.16		
	0.514 3	0.082 3	0.080 2	0.165 2	103.38		
穿心莲内酯	0.502 5	8.401 8	8.120 0	16.681 4	101.97	99.97	1.62
	0.513 2	8.580 7	8.120 0	16.480 9	97.29		
	0.501 2	8.380 1	8.120 0	16.563 7	100.78		
	0.500 6	8.370 0	8.120 0	16.421 5	99.16		
	0.507 3	8.482 1	8.120 0	16.663 5	100.76		
	0.514 3	8.599 1	8.120 0	16.709 4	99.88		
芹菜素	0.502 5	0.140 7	0.152 8	0.287 9	96.34	97.90	1.66
	0.513 2	0.143 7	0.152 8	0.290 2	95.88		
	0.501 2	0.140 3	0.152 8	0.289 3	97.49		
	0.500 6	0.140 2	0.152 8	0.293 1	100.09		
	0.507 3	0.142 0	0.152 8	0.292 7	98.60		
	0.514 3	0.144 0	0.152 8	0.295 3	99.02		
脱水穿心莲内酯	0.502 5	3.678 3	3.550 0	7.311 5	102.34	101.41	0.89
	0.513 2	3.756 6	3.550 0	7.336 4	100.84		
	0.501 2	3.668 8	3.550 0	7.291 3	102.04		
	0.500 6	3.664 4	3.550 0	7.281 9	101.90		
	0.507 3	3.713 4	3.550 0	7.260 1	99.91		
	0.514 3	3.764 7	3.550 0	7.366 4	101.46		

2.10 样品含量测定 取不同批次样品，除去包衣，研细，取约 1.0 g，每个批次平行 3 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分析，以外标法计算含量，结果见表 3。

表3 样品含量测定结果(n=3)

批号	绿原酸	迷迭香酸	穿心莲内酯	芹菜素	脱水穿心莲内酯
L15C092	0.22	0.04	4.18	0.07	1.83
L15D102	0.16	0.04	3.94	0.05	1.53
151101	0.24	0.04	4.58	0.11	1.36
201610303	0.27	0.07	5.16	0.05	2.06
L16C061	0.22	0.06	3.85	0.08	2.77

### 3 讨论

#### 3.1 检测波长的选择

据文献报道,绿原酸的最大吸收波长为 330 nm<sup>[14]</sup>,迷迭香酸为 342 nm,芹菜素为 336 nm<sup>[15]</sup>,穿心莲内酯为 225 nm,脱水穿心莲内酯为 254 nm<sup>[1]</sup>,本试验使用的检测器为双波长检测器,故综合考虑吸收峰色谱图的对称因子、分离度、峰面积等因素后,确定以 330 nm(绿原酸、迷迭香酸、芹菜素)、254 nm(穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯)为最终检测波长。

#### 3.2 流动相的选择

本试验对不同比例的甲醇-水、甲醇-酸水、乙腈-水、乙腈-酸水流动相进行了考察,结果发现流动相中加入一定比例的磷酸有助于改善待测成分的峰型;这可能和被测化合物结构式中均含有羟基,酸可抑制羟基中氢离子的电离有关。本研究又考察了甲醇-0.4%磷酸水和乙腈-0.4%磷酸水,结果显示流动相为甲醇-0.4%磷酸水时,绿原酸和迷迭香酸均无法与相邻色谱峰达到完全分离,而采用乙腈-0.4%磷酸水为流动相时,能提高待测成分峰与杂质峰之间的分离度,达到测定要求。故最终选择乙腈-0.4%磷酸水为流动相进行测定。

#### 3.3 提取方法的选择

本试验通过对提取溶剂(甲醇、乙醇),溶剂浓度(50%, 70%),提取方法(超声、回流),提取时间(30, 60 min),料液比(1:25, 1:50)进行考察。结果显示,以 25 倍量的 70%甲醇溶液超声提取 30 min,各成分即可提取完全。

#### 3.4 小结

中国药典 2015 年版中对消炎利胆片规定:本品每片含穿心莲以穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总量计,不得少于 5.0 mg。其中,每片含穿心莲内酯不得少于 3.5 mg。本实验测得 5 个不同批次消炎利胆片中每片穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总量分别为 6.0, 5.5, 5.9, 7.2, 6.6 mg,穿心莲内酯含量分别为 4.2, 3.9, 4.6, 5.2, 3.8 mg,

符合中国药典要求。本试验在原有质量标准规定测定穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量外,还增加测定了绿原酸、芹菜素和迷迭香酸 3 种成分的含量,为后续研究制定消炎利胆片中其他类多成分、多指标的质量控制方法奠定基础,有利于进一步提高消炎利胆片的质量控制方法,全面保证消炎利胆片制剂的质量疗效。

### REFERENCES

- [1] 中国药典.一部[S]. 2015: 1416-1417.
- [2] XIAO D Y, WU N, SHI B B, et al. Observation of curative effect of Danshu Capsule combined with Xiaoyan Lidan Tablets in treatment of chronic cholecystitis of damp-heat type [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2015, 33(11): 2669-2671.
- [3] 段成刚. 手术联合消炎利胆片治疗老年胆结石患者临床效果评价[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(48): 93-94.
- [4] ZHANG Q M, DING Y Z, FENG S B. Simultaneous contents determination of andrographolide, dehydroandrographolide, and neoandrographolide in Xiaoyan Lidan tablets by HPLC [J]. Pharm Today(今日药学), 2015, 25(10): 700-703.
- [5] JIN Y R, SUN Y G, WANG X. Simultaneous quantitative determination of six chemical compositions in Xiaoyan Lidan Pian by HPLC-MS [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 2013, 36(2): 124-128.
- [6] ZHANG X M. Simultaneous determination of caffeic acid, isoschaftoside and schaftoside in Xiaoyan Lidan tablet by RP-HPLC [J]. China Pharm(中国药房), 2016, 27(18): 2582-2584.
- [7] JIN X, SHI S M, ZHANG D F, et al. Chemical constituents of *Andrographis paniculata* (II) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 33(11): 2669-2671.
- [8] WU G F, HUANG Q Q, XIE P D, et al. Determination of rosmarinic acid in herba rabdosiae serrae by HPLC [J]. China Pharm(中国药房), 2016, 27(24): 3422-3424.
- [9] 赵文娜, 张新新, 谢人明, 等. 苦木化学成分和药理作用研究进展[J]. 中药材, 2011, 34(7): 1149-1152.
- [10] 刘颖, 郭明晔, 白根本. 绿原酸的研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(7): 1180-1185.
- [11] ZHOU D, LIU A L, DU G H. Advance in pharmacological research of rosmarinic acid [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2011, 20(7): 594-598.
- [12] 郭霜, 张晚霞, 余薇. 芹菜素药理作用的研究进展[J]. 湖北科技学院学报, 2016, 30(3): 273-276.
- [13] SUN H R, YU W, WU J L. Inhibitory effects of apigenin on adriamycin induced cardiotoxicity in mice[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2016, 36(7): 531-535.
- [14] GUAN X Y, CHEN X L, WANG S H, et al. Simultaneous determination of 4 effective components in Fufang Yuxingcao Tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(9): 1300-1303.
- [15] HE D L, ZHANG X C, LI Q. Determination of linarin and apigenin in Cirsii Herba Dispensing granule by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(3): 410-412.

收稿日期: 2018-01-13

(本文责编:李艳芳)