

# HPLC 同时测定肺宁制剂中 4 种成分的含量

程世云, 张亚中\*, 韩玲玲, 王浩, 王满媛, 周志凌(安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 同时测定肺宁颗粒、肺宁胶囊和肺宁片中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和金丝桃苷 4 种成分的含量。方法 采用 Waters XBridge™ C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长 327, 353 nm; 柱温 30 °C。结果 4 种成分在各自范围内线性关系良好( $r>0.999 0$ ), 平均加样回收率 96.1%~104.7%, RSD 为 0.4%~1.6%。结论 该方法准确、可靠, 重复性好, 可用于肺宁制剂的质量控制。

**关键词:** 肺宁颗粒; 肺宁胶囊; 肺宁片; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 金丝桃苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)22-2814-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.22.013

引用本文: 程世云, 张亚中, 韩玲玲, 等. HPLC 同时测定肺宁制剂中 4 种成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(22): 2814-2817.

## Simultaneous Determination of Four Constituents in Feining Preparation by HPLC

CHENG Shiyun, ZHANG Yazhong\*, HAN Lingling, WANG Hao, WANG Manyuan, ZHOU Zhiling(*Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China*)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and hyperin in Feining granules, Feining capsules and Feining tablets. **METHODS** Preparation was performed on a 30 °C Waters XBridge™ C<sub>18</sub> column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.4% phosphoric acid flowing at 1.0 mL·min<sup>-1</sup> in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 327, 353 nm. **RESULTS** Four constituents showed good linear relationships with their own ranges( $r>0.999 0$ ), while the average recoveries were 96.1%~104.7% with the RSDs of 0.4%~1.6%. **CONCLUSION** This accurate, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Feining preparation.

**KEYWORDS:** Feining granules; Feining capsules; Feining tablets; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; hyperin; HPLC

肺宁制剂包括肺宁颗粒、肺宁胶囊和肺宁片等剂型。肺宁颗粒原名为返魂草冲剂, 由返魂草单味药材制成, 具有清热祛痰、镇咳平喘的功效, 用于肺内感染、慢性支气管炎、喘息性支气管炎、急性呼吸道感染等, 标准现收载于卫生部药品标准中药成方制剂第 4 册<sup>[1]</sup>。肺宁胶囊和肺宁片均根据肺宁颗粒改剂型而来, 药材处理工艺和每日服用量相对于生药量均相同, 功能主治亦同肺宁颗粒。返魂草为菊科千里光属植物 *Senecio cannabifolius* Less. 的干燥地上部分, 包括单叶返魂草 [*Senecio cannabifolius* Less.var.*integrifolius* (Koidz.)Kitag.] 和宽叶返魂草(别名麻叶千里光, *Senecio cannabifolius* Less.)<sup>[2]</sup>, 具有清热解毒、止咳平喘、散瘀止痛的功效<sup>[3]</sup>, 主要成分有酚酸类及黄酮类成分<sup>[4]</sup>。肺宁颗粒现行质量标准只有常规检查和返魂草的薄层色谱鉴别, 无相关含量测定控

制指标, 肺宁胶囊和肺宁片除了常规检查和返魂草的薄层色谱鉴别外, 增加了绿原酸的含量测定项。为了更加全面地控制该系列制剂的内在质量, 保证临床用药的有效性, 通过系统研究, 本实验建立了肺宁颗粒、肺宁胶囊、肺宁片中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和金丝桃苷 4 种成分的含量测定方法, 为肺宁颗粒、肺宁胶囊和肺宁片的质量控制提供参考。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

SPD-M20A 高效液相色谱仪(日本岛津, DAD 检测器); XP205 电子天平、XP26 电子天平(Mettler Toledo 公司); HT-350A 型超声波中药处理机(山东济宁亨通电子设备厂)。

#### 1.2 试药

肺宁颗粒、肺宁胶囊、肺宁片生产厂家: A

基金项目: 2018 年国家药品抽检计划项目(食药监药化监[2017]131 号)

作者简介: 程世云, 女, 硕士, 副主任中药师 Tel: (0551)63358053  
主任中药师 Tel: (0551)63358053 E-mail: 13956985695@139.com

E-mail: live781210@sina.com \*通信作者: 张亚中, 男, 博士,

厂家为吉林华康药业股份有限公司、B 厂家为修正药业集团股份有限公司、C 厂家为吉林益民堂制药有限公司、D 厂家为吉林省罗邦药业有限公司、E 厂家为吉林显锋科技制药有限公司、F 厂家为吉林吉春制药股份有限公司、G 厂家为吉林省通化博祥药业股份有限公司、H 厂家为长春银诺克药业有限公司、I 厂家为秦皇岛市山海关药业有限责任公司、J 厂家为吉林省百年六福堂药业有限公司、K 厂家为吉林省正和药业集团股份有限公司、L 厂家为长春万德制药有限公司。

绿原酸对照品(批号: 110753-201314; 供含量测定用, 含量以 96.6%计)、金丝桃苷对照品(批号: 111521-200303; 供含量测定用)均购自中国食品药品检定研究院; 新绿原酸对照品(批号: PS000975; 含量>98.0%)、隐绿原酸对照品(批号: PS001109; 含量>98.0%)均购自成都普思生物科技股份有限公司。

乙腈为色谱纯, 磷酸、甲醇、甲酸均为分析纯, 均由国药集团化学试剂有限公司生产; 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液制备

**2.1.1 混合对照品溶液的制备** 精密称取各对照品适量, 加 70%甲醇制成每 1 mL 含新绿原酸 0.029 018 mg、绿原酸 0.042 031 mg、隐绿原酸 0.038 494 mg 和金丝桃苷 0.032 05 0mg 的混合溶液, 即得。

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取肺宁颗粒适量, 研细, 取约 1 g, 精密称定; 或取肺宁胶囊内容物适量, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定; 或取肺宁片 20 片, 除去包衣, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定。肺宁颗粒精密加入 70%甲醇 10 mL, 称定质量; 或肺宁胶囊和肺宁片精密加入 70%甲醇 25 mL, 称定质量。超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷, 再称定质量, 用 70%甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 滤过, 即得。

**2.1.3 阴性对照溶液的制备** 取不含返魂草的辅料制成肺宁阴性制剂, 并按“2.1.2”项下方法制备阴性对照溶液。

### 2.2 色谱条件及系统适用性

色谱柱: Waters XBrige™ C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 35 °C; 检测器: DAD 检测器; 新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸检测波长为 327 nm, 金丝桃苷检测波长为 353 nm。流动相:

乙腈(A)-0.4%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 3%→5%A; 10~26 min, 5%→11%A; 26~30 min, 11%→14%A; 30~50 min, 14%A), 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

在上述色谱条件下新绿原酸、绿原酸及隐绿原酸的色谱峰均与相邻成分色谱峰达到基线分离, 分离度均>1.5; 理论板数以绿原酸峰计≥10 000。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 线性关系的考察** 分别精密量取混合对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 μL, 注入液相色谱仪, 按“2.2”项下色谱条件分析, 以峰面积积分为纵坐标(Y), 以进样质量(μg)为横坐标(X), 进行线性回归, 得到回归方程, 结果见表 1。

表 1 回归方程和线性范围

Tab. 1 Regression equations and linear ranges

成分	线性范围/μg	回归方程	r
新绿原酸	0.029 018~0.290 18	Y=2 940 327.31X-2 522.58	0.999 9
绿原酸	0.042 031~0.840 62	Y=3 072 979.53X-1 940.91	0.999 9
隐绿原酸	0.038 494~0.769 88	Y=2 683 434.28X-820.46	0.999 9
金丝桃苷	0.032 050~0.641 00	Y=2 060 083.09X-944.76	0.999 9

**2.3.2 仪器精密度试验** 吸取混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 分别测定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和金丝桃苷的峰面积, 并计算各峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.2%, 0.2%及 0.4%。结果表明仪器精密度良好。

**2.3.3 重复性试验** 肺宁颗粒: 取同一批肺宁颗粒(吉林益民堂制药有限公司, 批号: 20171027)的样品 6 份按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定供试品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和金丝桃苷的含量分别为 0.124 6, 0.184 0, 0.173 2, 0.138 2 mg·g<sup>-1</sup>; RSD 分别为 0.8%, 0.6%, 0.6%和 1.0%。

肺宁胶囊: 取同一批肺宁胶囊(长春银诺克药业有限公司, 批号: 20170901)的样品 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定供试品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和金丝桃苷的含量分别为 0.814 1, 1.318 6, 1.1350, 1.531 5 mg·g<sup>-1</sup>; RSD 分别为 0.5%, 0.5%, 0.5%和 0.4%。

肺宁片: 取同一批肺宁片(吉林吉春制药股份有限公司, 批号: 171004)的样品 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条

件测定供试品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和金丝桃苷的含量分别为 0.357 7, 1.241 0, 0.537 1, 0.458 1 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 分别为 0.3%, 0.4%, 0.2%和 0.6%。

结果表明本方法重复性良好。

**2.3.4 稳定性试验** 分别取同一肺宁颗粒供试品溶液(吉林益民堂制药有限公司,批号:20171027)、肺宁胶囊供试品溶液(长春银诺克药业有限公司,批号:20170901)、肺宁片供试品溶液(吉林吉春制药股份有限公司,批号:171004),在配制后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h, 进样 10 μL, 按“2.2”项下色谱条件分别测定。结果所有色谱峰峰面积的 RSD 均<1.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

**2.3.5 专属性试验** 取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液,按“2.2”项下色谱条件分析,各进样 10 μL, 色谱图见图 1。在本研究条件下,供试品溶液取得了较好的分离效果,新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸与其他组分均达到基线分离,阴性对照溶液在此条件下无干扰。

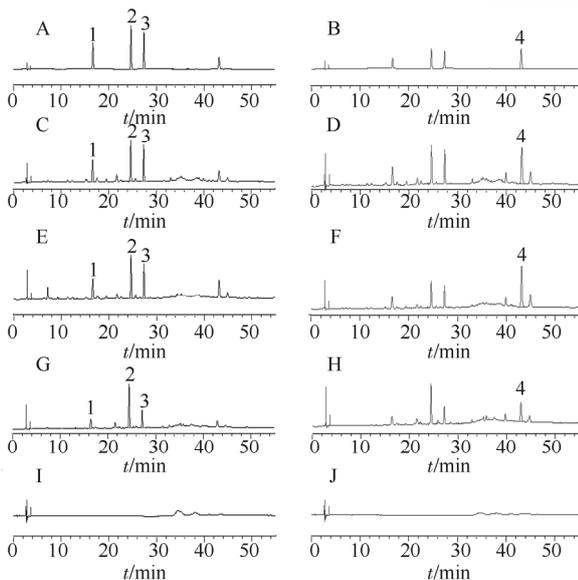


图 1 HPLC 色谱图

A-对照品(327 nm); B-对照品(353 nm); C-肺宁颗粒样品(327 nm); D-肺宁颗粒样品(353 nm); E-肺宁胶囊样品(327 nm); F-肺宁胶囊样品(353 nm); G-肺宁片样品(327 nm); H-肺宁片样品(353 nm); I-缺返魂草的阴性对照(327 nm); J-缺返魂草的阴性对照(353 nm); 1-新绿原酸; 2-绿原酸; 3-隐绿原酸; 4-金丝桃苷。

Fig. 1 HPLC chromatogram

A-reference solution by 327 nm; B-reference solution by 353 nm; C-Feining granule's test sample by 327 nm; D-Feining granule's test sample by 353 nm; E-Feining capsule's test sample by 327 nm; F-Feining capsule's test sample by 353 nm; G-Feining tablet's test sample by 327 nm; H-Feining tablet's test sample by 353 nm; I-blank test by 327 nm; J-blank test by 353 nm; 1-neochlorogenic acid; 2-chlorogenic acid; 3-cryptochlorogenic acid; 4-hyperin.

**2.3.6 回收率试验** 取已知含量的肺宁颗粒样品(吉林益民堂制药有限公司,批号:20171027)适量,研细,称取 6 份,每份 0.5 g,精密称定,置锥形瓶中;取已知含量的肺宁胶囊(长春银诺克药业有限公司,批号:20170901)样品 6 份,每份 0.25 g,精密称定,置锥形瓶中;取已知含量的肺宁片(吉林吉春制药股份有限公司,批号:171004)样品 6 份,每份 0.25 g,精密称定,置锥形瓶中。分别加入供试品所含成分的对照品适量,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件测定,记录 4 种成分的峰面积并计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 4 种成分的回收率实验结果

Tab. 2 Results of recovery tests of four constituents

剂型	成分	样品中平均含量/mg	加入量/mg	平均测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
肺宁颗粒	新绿原酸	0.062 4	0.072 5	0.134 5	99.4	0.4
	绿原酸	0.092 1	0.105 1	0.196 2	99.0	0.4
	隐绿原酸	0.086 7	0.096 2	0.182 2	99.2	0.4
	金丝桃苷	0.069 2	0.080 1	0.148 8	98.9	0.6
肺宁胶囊	新绿原酸	0.204 8	0.235 0	0.438 9	99.6	0.6
	绿原酸	0.331 8	0.319 6	0.651 1	99.9	0.6
	隐绿原酸	0.285 6	0.155 2	0.440 2	99.6	1.0
	金丝桃苷	0.385 4	0.422 0	0.802 8	98.9	0.8
肺宁片	新绿原酸	0.089 9	0.122 7	0.218 3	104.7	0.9
	绿原酸	0.311 8	0.312 2	0.614 7	97.0	0.7
	隐绿原酸	0.134 9	0.154 5	0.283 4	96.1	1.0
	金丝桃苷	0.115 1	0.150 8	0.261 1	96.8	1.6

## 2.4 样品的含量测定

取 5 个厂家 175 批次的肺宁颗粒、4 个厂家 39 批次的肺宁胶囊和 5 个厂家 35 批次的肺宁片,按“2.2”项下色谱条件进行试验,按外标法计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸和金丝桃苷 4 种成分的含量,结果见表 3。

## 3 讨论

### 3.1 测定波长的选择

对各主要成分进行波长扫描,发现绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸均在 325~327 nm 处有最大吸收,金丝桃苷在 353 nm 处有最大吸收,再参考部分文献<sup>[5-6]</sup>,最终选择双波长进行含量测定,即选择 327 nm 作为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸的检测波长,353 nm 作为金丝桃苷的检测波长。

### 3.2 流动相的确定

本研究在建立含量测定方法时,分别考察了不同流动相(甲醇-0.2%磷酸溶液系统、乙腈-0.4%磷酸系统、甲醇-0.1%冰醋酸系统)下新绿原酸、绿

表 3 各成分含量测定结果范围(n=2)

Tab. 3 Result ranges of content determination of various constituents(n=2)

厂家	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	金丝桃苷
颗粒厂家 A(6 批)	0.07~0.12	0.07~0.18	0.09~0.16	0.05~0.14
颗粒厂家 B(62 批)	0.04~0.21	0.05~0.29	0.05~0.27	0.01~0.11
颗粒厂家 C(71 批)	0.07~0.33	0.09~0.42	0.10~0.42	0.05~0.46
颗粒厂家 D(60 批)	0.02~0.43	0.03~0.23	0.03~0.19	0.01~0.15
颗粒厂家 E(2 批)	0.08~0.19	0.11~0.29	0.11~0.21	0.10~0.22
胶囊厂家 F(1 批)	0.62	1.36	1.04	0.26
胶囊厂家 G(1 批)	0.77	2.30	1.27	0.23
胶囊厂家 C(26 批)	0.63~1.29	0.86~2.03	0.83~1.94	0.29~1.09
胶囊厂家 H(11 批)	0.34~0.84	1.06~1.74	0.48~1.14	0.84~1.52
片剂厂家 F(1 批)	0.36	1.18	0.54	0.44
片剂厂家 I(1 批)	0.85	1.26	1.03	1.64
片剂厂家 J(2 批)	0.14~0.38	1.02~1.21	0.24~0.52	0.00~0.02
片剂厂家 K(6 批)	0.76~1.03	1.41~1.81	1.30~1.81	0.11~0.24
片剂厂家 L(25 批)	0.00~0.35	0.47~0.84	0.00~0.38	0.00~0.02

原酸、隐绿原酸和金丝桃苷 4 种成分分离情况,发现采用乙腈-0.4%磷酸溶液梯度洗脱时,样品中 4 种成分分离效果好,分离度达到要求,无杂质峰干扰。

### 3.3 样品提取方法的确定

肺宁颗粒、肺宁胶囊和肺宁片均为返魂草水提制得的制剂,为了得到更好的提取效果,分别考察了水、50%甲醇、70%甲醇及甲醇等溶剂的提取效果,结果显示,在相同条件下,以 70%甲醇为溶剂时,4 种成分的提取率比其他溶剂的提取率略高,且色谱峰峰型较好,故确定 70%甲醇为提取溶剂。

### 3.4 含量测定结果分析

含量测定结果显示,不同厂家之间以及相同厂家不同批次之间 4 种成分的含量均相差较大。由于肺宁制剂的原料药返魂草来源于单叶返魂草和宽叶返魂草,此次研究过程中分别收集了单叶返魂草和宽叶返魂草各 10 批,并同时药材中这 4 种成分进行检测,发现不同基源的返魂草药材 4 种成分含量之间无明显差异。因此,造成肺宁制剂 4 种成分含量测定结果相差较大的原因可能与不同厂家不同批次所用的返魂草药材质量不同有关。其中部分厂家生产的部分批次样品金丝桃苷

含量较低或未检出,分析原因可能与生产工艺或未按处方足量投料有关。

## 4 结论

关于返魂草药材及肺宁制剂的含量测定方法已有多篇文献报道<sup>[7-12]</sup>,但未见同时对肺宁颗粒、肺宁胶囊和肺宁片 3 种制剂含量测定研究的报道。本实验建立的含量测定方法样品分离度良好,重复性好,阴性无干扰,结果准确可靠,为提高和完善该系列制剂的质量标准以及更加科学有效地控制其内在质量提供了方法和依据。

## REFERENCES

- [1] 卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂第四册: 82.
- [2] 中国药典. 四部[S]. 2015: 421.
- [3] 吉林省中药材地方标准[S]. DBY-22-JLYC-001-2017.
- [4] 孙佳丹, 张治然, 王晓波, 等. 返魂草主要成分及其提取物的药理作用研究进展[J]. 解放军药学报, 2016, 32(3): 266-268.
- [5] JIANG Y, LIU Q, FENG S G, et al. Effects of environmental factors on the content of flavonoids and chlorogenic acid in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(2): 225-230.
- [6] ZHOU Z D, ZHANG L, ZHOU H Y, et al. Simultaneous determination of five active components in Xiaoyanlidan tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(12): 1801-1804.
- [7] ZHAO H, WANG X B, WANG Y Y, et al. Determination method of four phenolic acid in *Senecio cannabifolius* Less and Feining granule by HPLC [J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2017, 13(6): 29-32.
- [8] ZHAO C F, LI Q J, WANG L P, et al. High performance liquid chromatographic fingerprint and active ingredient assay of *Senecio cannabifolius* Less [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2013, 41(1): 133-136.
- [9] MA H Y, YANG L, WANG C H, et al. Studies on HPLC fingerprint of *Senecio cannabifolius* [J]. Chine J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(13): 101-104.
- [10] 姜振邦, 刘有平, 李小童, 等. RP-HPLC 法同时测定返魂草中 3 种酚酸类成分[J]. 中草药, 2009, 40(11): 1819-1821.
- [11] MA H Y, CHU F J, YIN Y Q. Simultaneous determination of hyperoside and chlorogenic acid in *Fanhuncao* by HPLC [J]. J Guangdong Coll Pharm(广东药学院学报), 2013, 29(3): 277-280.
- [12] MA H Y, YANG L, WANG C H, et al. Simultaneous determination of six active components in *Fanhuncao* granule by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2012, 34(8): 1496-1500.

收稿日期: 2019-01-24

(本文责编: 李艳芳)