

## HPLC 法同时测定金兰消炎片中 4 种成分

华之卉<sup>1</sup>, 刘 栋<sup>2\*</sup>, 李明春<sup>3</sup>

(1. 郑州人民医院药学部, 河南 郑州 450003; 2. 解放军第 153 中心医院制剂室, 河南 郑州 450042; 3. 解放军第 401 医院药剂科, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 目的 建立 HPLC 法同时测定金兰消炎片(金银花、赤芍、丹参等)中 4 种成分的含有量。方法 该药物 80% 甲醇提取液的分析采用 Wondasil C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 327、230、286、250 nm。结果 绿原酸、芍药苷、丹酚酸 B、甘草酸分别在 46.48~464.84 μg/mL ( $r=0.999\ 5$ )、20.28~202.75 μg/mL ( $r=0.999\ 1$ )、12.44~124.35 μg/mL ( $r=0.999\ 6$ )、15.09~150.89 μg/mL ( $r=0.999\ 9$ ) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.30%、99.10%、99.38%、100.27%, RSD 分别为 1.35%、1.37%、1.28%、0.86%。结论 该方法简单准确, 重复性好, 可用于金兰消炎片的质量控制。

**关键词:** 金兰消炎片; 绿原酸; 芍药苷; 丹酚酸 B; 甘草酸; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1097-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.018

## Simultaneous determination of four constituents in Jinlan Xiaoyan Tablets by HPLC

HUA Zhi-hui<sup>1</sup>, LIU Dong<sup>2\*</sup>, LI Ming-chun<sup>3</sup>

(1. Department of Pharmacy, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, China; 2. Department of Preparation, NO. 153 Central Hospital of PLA, Zhengzhou 450042, China; 3. Department of Pharmacy, NO. 401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Jinlan Xiaoyan Tablets (*Lonicerae japonicae Flos*, *Paeoniae Radix Rubra*, *Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of 80% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Wondasil C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 327, 230, 286 and 250 nm. **RESULTS** Chlorogenic acid, paeoniflorin, salvianolic acid B and glycyrrhizic acid showed good linear relationships within the ranges of 46.48 - 464.84 μg/mL ( $r = 0.999\ 5$ ), 20.28 - 202.75 μg/mL ( $r = 0.999\ 1$ ), 12.44 - 124.35 μg/mL ( $r = 0.999\ 6$ ) and 15.09 - 150.89 μg/mL ( $r = 0.999\ 9$ ), whose average recoveries were 99.30%, 99.10%, 99.38% and 100.27% with the RSDs of 1.35%, 1.37%, 1.28% and 0.86%, respectively. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Jinlan Xiaoyan Tablets.

**KEY WORDS:** Jinlan Xiaoyan Tablets; chlorogenic acid; paeoniflorin; salvianolic acid B; glycyrrhizic acid; HPLC

收稿日期: 2017-12-26

基金项目: 军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题重点项目(14ZJZ02)

作者简介: 华之卉(1984—), 女, 硕士, 主管药师, 从事医院药学研究。Tel: (0371) 67079917, E-mail: zhihui19998@126.com

\* 通信作者: 刘 栋(1983—), 男, 硕士, 主管药师, 从事医院制剂研发与质量控制研究。Tel: (0371) 60653569, E-mail: liudong13673546650@163.com

金兰消炎片清热凉血、消肿止痛，作为解放军第一五三中心医院的院内制剂 [批准文号总制字(2016) F403006]，在临床上广泛用于慢性胆囊炎、病毒性心肌炎、痈肿等多种炎症，具有标本兼治、不易复发等优点。该制剂由金银花、赤芍、丹参、甘草等14味药材加工制成，方中金银花清热解毒、疏散风寒，绿原酸为其主要抗炎成分之一<sup>[1]</sup>；赤芍清热凉血、散瘀止痛，其指标成分芍药苷具有显著的抗炎活性<sup>[2]</sup>；丹参活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈，其指标成分丹酚酸B通过多种途径发挥抗炎活性<sup>[3]</sup>；甘草补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药，其指标成分甘草酸具有抗炎、抗溃疡、抗过敏、抗氧化、免疫调节、抗病毒、保肝等多种作用，以抗炎为主<sup>[4]</sup>。

由于绿原酸在该制剂中的含有量较高，而且抗炎作用确切，故现行质量标准将其作为测定项目，但中药复方制剂药味较多，化学成分复杂，单一或少数几种指标成分并不能全面反映其内在质量<sup>[5-6]</sup>。根据2015年版《中国药典》对单味中药的质量标准要求<sup>[7]</sup>，从多种有效成分同时监控的角度出发<sup>[8-9]</sup>，本实验建立HPLC法同时测定金兰消炎片中绿原酸、芍药苷、丹酚酸B、甘草酸的含有量，以期为其质量标准的提高提供依据。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津高效液相色谱仪，配置二元泵、手动进样器、柱恒温箱、SPD-10A紫外检测器、LC-solutionLite色谱工作站（日本岛津公司）；BT125D型电子分析天平（十万分之一，德国Sartorius公司）；AS3120A型超声波清洗器（天津Auto-science公司）。

1.2 试剂 绿原酸（批号110753-201314，含有量96.6%）、芍药苷（批号110736-201136，含有量96.0%）、丹酚酸B（批号111562-201313，含有量97.0%）、甘草酸铵（110731-201619，含有量93.0%）对照品均购自中国食品药品检定研究院。金兰消炎片（48片/盒，批号160511、160824、170308，解放军第一五三中心医院制剂室）。乙腈为色谱纯；甲醇和磷酸为分析纯；水为重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量，加甲醇制成每1 mL含绿原酸464.84 μg、芍药苷202.75 μg、丹酚酸B 124.35 μg、甘草酸铵

154.01 μg的贮备液，精密吸取2 mL，置于5 mL棕色量瓶中，甲醇定容，摇匀，即得每1 mL含绿原酸185.94 μg、芍药苷81.10 μg、丹酚酸B 49.74 μg、甘草酸铵61.60 μg的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取金兰消炎片20片，除去包衣，研细，精密称取粉末约2 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入80%甲醇25 mL，密塞，称定质量，超声（120 W、40 kHz）30 min，放冷，80%甲醇补足减失的质量，摇匀，过滤，取续滤液，即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按片剂处方和工艺，分别制备缺金银花、蒲公英、鱼腥草、穿心莲、紫花地丁、当归、车前草，缺赤芍，缺丹参，缺甘草的阴性样品，按“2.1.2”项下方法制备，即得。

2.2 色谱条件 Wondasil C<sub>18</sub>色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1%磷酸（B），梯度洗脱（0~5 min，12% A；5~30 min，12% → 32% A；30~36 min，32% → 36% A；36~42 min，36% → 45% A；42~50 min，45% → 50% A）；检测波长327 nm（0~15 min，绿原酸）、230 nm（15~30 min，芍药苷）、286 nm（30~42 min，丹酚酸B）、250 nm（42~50 min，甘草酸）；体积流量1.0 mL/min；柱温30 ℃；进样量10 μL。

2.3 系统适用性与专属性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液各10 μL，在“2.2”项色谱条件下进样测定，结果见图1。由图可知，各成分均能达到基线分离，分离度>1.5，理论塔板数以各指标峰计均>5 000，阴性无干扰。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下对照品贮备液适量，甲醇倍比稀释成6个质量浓度，在“2.2”项色谱条件下进样测定。以质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行线性回归，结果见表1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

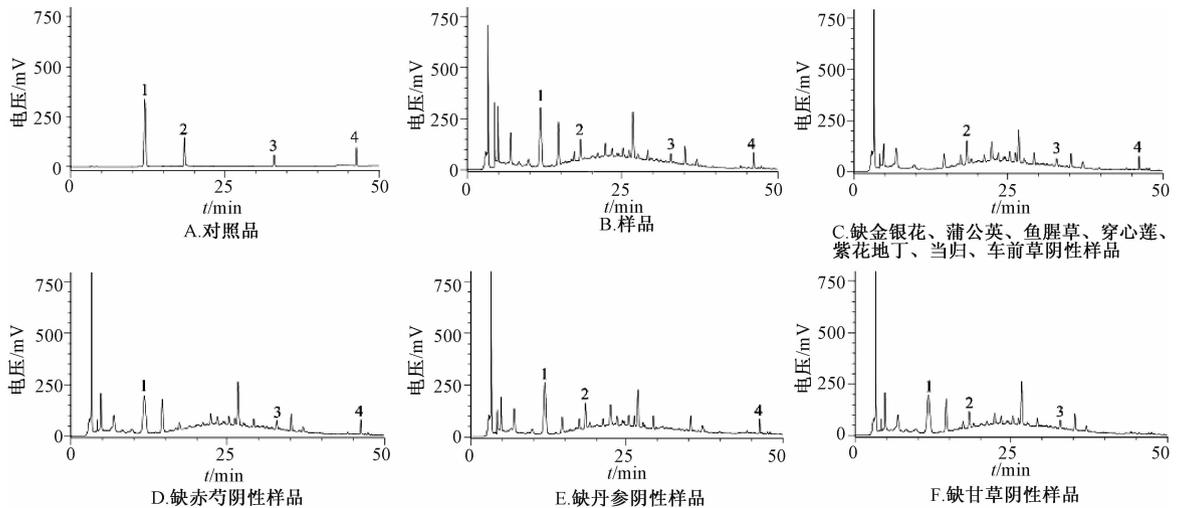
表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> )	r
绿原酸	$Y = 31\ 404X + 232\ 245.47$	46.48 ~ 464.84	0.999 5
芍药苷	$Y = 17\ 469X + 68\ 325.93$	20.28 ~ 202.75	0.999 1
丹酚酸B	$Y = 11\ 817X + 23\ 148.30$	12.44 ~ 124.35	0.999 6
甘草酸	$Y = 9\ 180X + 11\ 377.00$	15.09 ~ 150.89	0.999 9

注：甘草酸质量 = 甘草酸铵质量 / 1.020 7

2.5 精密度试验 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液10 μL，在“2.2”项色谱条件下进样测定6次，测得绿原酸、芍药苷、丹酚酸B、甘草酸峰面积RSD分别为0.78%、1.23%、0.74%、



1. 绿原酸 2. 芍药苷 3. 丹酚酸 B 4. 甘草酸  
1. chlorogenic acid 2. paeoniflorin 3. salvianolic acid B 4. glycyrrhizic acid

图1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

0.66%，表明仪器精密良好。

2.6 重复性试验 精密称取样品（批号 170308）粉末 6 份，每份约 2 g，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，测得绿原酸、芍药苷、丹酚酸 B、甘草酸含有量 RSD 分别为 1.15%、1.35%、0.93%、0.83%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液（批号 170308），于室温下 0、2、4、8、12、24 h 在“2.2”项色谱条件下进样测定，测得绿原酸、芍药苷、丹酚酸 B、甘草酸峰面积 RSD 分别为 1.36%、0.96%、1.09%、0.63%，表明溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的样品（批号 170308）粉末 6 份，每份约 1 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入“2.1.1”项下对照品贮备液 5 mL，再精密加入 80% 甲醇 20 mL，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 2。

2.9 样品含有量测定 取 3 批样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样测定，结果见表 3。

### 3 讨论

3.1 流动相选择 本实验考察了多种流动相系统，包括乙腈-磷酸<sup>[10-12]</sup>、乙腈-甲酸<sup>[13]</sup>、甲醇-水<sup>[14]</sup>，同时考察了磷酸体积分数（0.05%、0.1%、0.2%）对分离的影响，最终选择乙腈-0.1% 磷酸，

表 2 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

成分	称样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
绿原酸	1.021 3	2.352	2.324	4.643	98.58	99.30 (1.35)
	1.007 9	2.321	2.324	4.601	98.10	
	1.036 6	2.387	2.324	4.677	98.52	
	0.982 3	2.262	2.324	4.606	100.85	
	1.017 1	2.342	2.324	4.633	98.56	
	1.028 9	2.370	2.324	4.721	101.18	
芍药苷	1.021 3	0.942	1.014	1.939	98.36	99.10 (1.37)
	1.007 9	0.929	1.014	1.923	98.00	
	1.036 6	0.956	1.014	1.979	100.91	
	0.982 3	0.906	1.014	1.901	98.16	
	1.017 1	0.938	1.014	1.936	98.45	
	1.028 9	0.949	1.014	1.971	100.82	
丹酚酸 B	1.021 3	0.587	0.622	1.201	98.67	99.38 (1.28)
	1.007 9	0.580	0.622	1.206	100.72	
	1.036 6	0.596	0.622	1.208	98.39	
	0.982 3	0.565	0.622	1.173	97.78	
	1.017 1	0.585	0.622	1.207	100.03	
	1.028 9	0.592	0.622	1.219	100.87	
甘草酸	1.021 3	0.765	0.754	1.523	100.54	100.27 (0.86)
	1.007 9	0.755	0.754	1.519	101.34	
	1.036 6	0.776	0.754	1.522	98.88	
	0.982 3	0.736	0.754	1.493	100.43	
	1.017 1	0.762	0.754	1.522	100.82	
	1.028 9	0.771	0.754	1.522	99.60	

既能确保各指标成分的分离度达到要求 (>1.5)，又可保证各峰型对称、理论塔板数较高。

表3 各成分含有量测定结果 (mg/片, n=3)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/tablet, n=3)

批号	绿原酸	芍药苷	丹酚酸 B	甘草酸
160511	0.514	0.237	0.141	0.191
160824	0.551	0.221	0.135	0.194
170308	0.576	0.231	0.144	0.187
平均值	0.547	0.230	0.140	0.191

3.2 提取方法选择 在金兰消炎片的制备工艺中有水提无醇沉,故水溶性成分含有量较高。但预实验结果显示,以水为提取溶剂时,提取液比较黏稠,不容易过滤,并且杂质成分多,指标成分的分度差。本实验考察了不同体积分数甲醇(50%、80%、100%)作为提取溶剂,并对提取方式(超声、回流)、提取溶剂用量(15、25、40 mL)、提取时间(20、30、45 min)进行研究。在确保提取率的基础上,综合考虑成本、提取时间等因素,确定最佳提取方法为2 g样品加25 mL 80% 甲醇超声提取30 min。

3.3 绿原酸阴性样品制备<sup>[15-16]</sup> 经检测原药材可知,金兰消炎片中金银花、蒲公英、鱼腥草、穿心莲、紫花地丁、当归、车前草均含有绿原酸,故制备其阴性样品时上述药材均不添加。

参考文献:

[1] 宋亚玲,王红梅,倪付勇,等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究[J]. 中草药, 2015, 46(4): 490-495.  
 [2] 陆小华,马 骁,王 建,等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(4): 595-602.

[3] 孙仁弟,徐向阳,宋燕青. 丹酚酸 B 的药理研究进展[J]. 药物流行病学杂志, 2012, 21(9): 458-462.  
 [4] 张明发,沈雅琴. 甘草酸及其衍生物的抗炎和抗变态反应研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(5): 359-364.  
 [5] 郭 琪,王海波,李向阳,等. HPLC 法同时测定利胆排石片中 14 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4): 631-638.  
 [6] 田宇柔,麻景梅,王鑫国,等. 一测多评法同时测定山茱萸配方颗粒中 5 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(9): 1845-1849.  
 [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 76, 86, 158, 221.  
 [8] 陈纪龙. HPLC 法同时测定金嗓利咽胶囊中 8 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(7): 1402-1405.  
 [9] 崔俊凤,赵 卫,刘晓鹏,等. HPLC-DAD 法同时测定栀苓清热合剂中 4 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(9): 1954-1957.  
 [10] 吴振起,刘光华,平 静,等. HPLC 法同时测定清燥救肺汤中 3 种成分含量[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(5): 978-980.  
 [11] 蔡建明,欧阳臻,赵 明,等. HPLC 法同时测定参梅养胃颗粒中 4 种成分[J]. 中成药, 2016, 38(11): 2391-2395.  
 [12] 孙慧珠,王晓蕾,徐 乐,等. HPLC 法同时测定舒肝丸中 4 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(9): 1850-1854.  
 [13] 冯丽敏,赵瑞芝,卢传坚. HPLC 同时测定芍苓消银片中芍药苷、落新妇苷、绿原酸、迷迭香酸和甘草酸的含量[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(9): 1097-1101.  
 [14] 姚万龙,刘 娅,姚 喆,等. UPLC-TOF-MS 分析乐脉颗粒的化学成分[J]. 中药材, 2014, 37(12): 2286-2288.  
 [15] 靳 鑫,时圣明,张东方,等. 穿心莲化学成分的研究[J]. 中草药, 2012, 43(1): 47-50.  
 [16] 华之卉,刘 栋,李明春. 双波长 HPLC 法同时测定板柴口服液中 (R, S) -告依春和绿原酸的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(27): 3853-3855.