RP-HPLC 法同时测定清肺化痰丸中 4 种成分

陆丽娜[1]， 董加花[2]， 左艳华[2]， 师永清[1]， 吴光云[1]
（1. 西北民族大学化工学院，甘肃省高校环境友好复合材料及生物质利用省级重点实验室，甘肃 兰州 730030；2. 青岛大学附属医院药剂科，山东 青岛 266003）

摘要：目的 建立 RP-HPLC 法同时测定清肺化痰丸（麻黄、苦杏仁、陈皮等）中 4 种成分的含有量。**方法** 清肺化痰丸甲醇提取液的分析采用 Agilent TC-$C_{18(2)}$ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相 0.2% 磷酸-乙腈，梯度洗脱；柱温 25 ℃；体积流量 0.8 mL/min；检测波长 207 nm（麻黄碱、苦杏仁苷）和 278 nm（橙皮苷、黄芩苷）。**结果** 麻黄碱、苦杏仁苷、橙皮苷和黄芩苷分别在 0.158～3.950、0.216～5.400、0.164～4.100、0.160～4.000 μg 范围内线性关系良好，加样回收率（RSD）分别为 99.68%（1.90%）、99.27%（1.15%）、98.83%（1.31%）、98.70%（1.09%）。**结论** 该方法简便快速，灵敏准确，重复性好，可用于清肺化痰丸的质量控制。

关键词：清肺化痰丸；麻黄碱；苦杏仁苷；橙皮苷；黄芩苷；HPLC
中图分类号：R927.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2016)09-1956-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.09.017

Simultaneous determination of four constituents in Qinfei Huatan Pills by RP-HPLC

LU Li-na[1], DONG Jia-hua[2], ZUO Yan-hua[2], SHI Yong-qing[1], WU Guang-yun[1]
(*1. School of Chemical Engineering, Northwest University for Nationalities; Key Laboratory for Utility of Environment-Friendly Composite Material and Biomass in Universities of Gansu Province, Lanzhou 730030, China; 2. Department of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China*)

ABSTRACT: AIM To establish an RP-HPLC method for the simultaneous determination of four constituents in Qinfei Huatan Pills (for resolving sputum due to lung conditions) (*Ephedrae Herba*, *Armeniacae Semen Amarum*, *Citri Reticulatae Pericarpium*, *etc.*). **METHODS** The analysis of Qinfei Huatan Pills methanolic extract was performed on a 25 ℃ thermostatic Agilent TC-$C_{18(2)}$ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.2% phosphoric acid flowed at 0.8 mL/min in a gradient elution manner. And the detection wavelengths were set at 207 nm for ephedrine and laetrile, and 278 nm for hesperidin and baicalin. **RESULTS** Ephedrine, laetrile, hesperidin and baicalin showed good linear relationships within the ranges of 0.158－3.950 μg, 0.216－5.400 μg, 0.164－4.100 μg and 0.160－4.000 μg, whose recoveries were 99.68%, 99.27%, 98.83% and 98.70% with the RSDs of 1.90%, 1.15%, 1.15% and 1.09%, respectively. **CONCLUSION** This accurate, sensitive and well reproducible method is easily practicable for the rapid quality control of Qingfei Huatan Pills.
KEY WORDS: Qingfei Huatan Pills; ephedrine; laetrile; hesperidin; baicalin; HPLC

清肺化痰丸为中药复方制剂，收载于《中华人民共和国卫生部药品标准（中药成方制剂）》第 12 册[1]，制法为将麻黄、苦杏仁、陈皮、胆南星、黄芩、川贝母、桔梗、法半夏、枳壳、白苏子、瓜蒌子、莱菔子、款冬花、茯苓、甘草 15 味药材粉碎成细粉，加入辅料蜂蜜和适量水制成棕黑色水蜜丸，主要用于肺热咳嗽、痰多气喘、痰涎壅盛、肺气不畅[2-4]。其中，麻黄碱为从麻黄属植物中提取得到的生物碱，具有止咳、平喘、祛痰的功效[5]；苦杏仁苷为从苦杏仁中提取得到，俗称维生素 B_{17}，

收稿日期：2015-10-28
基金项目：西北民族大学中央高校基本科研业务费专项资金重点项目（31920150016）
作者简介：陆丽娜（1983—），女，硕士，讲师，从事中药分析与质量控制研究。Tel：18089383587，E-mail：lulina1113@163.com

亦有降气、止咳、平喘的作用[6]；橙皮苷为从陈皮中提取的双氢黄酮苷类活性成分，可对抗组胺引起的血管通透性增加[7]；黄芩苷为从黄芩根中提取的黄酮类化合物，其生理效应为抑菌抗炎、利尿、解痉和较强的抗癌活性[8]。目前，该制剂原标准中仅有常规项检查、显微鉴别和黄芩薄层色谱鉴别，无含有量测定内容，而文献［9］采用 HPLC 法测定制剂中橙皮苷、黄芩苷、柚皮苷的含有量。参照文献［10-12］，本实验建立 HPLC 法同时定量测定清肺化痰丸中麻黄碱、苦杏仁苷、橙皮苷和黄芩苷的含有量，为完善该制剂质量标准提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1200 高效液相色谱仪，配备在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱和 PDA 检测器（美国 Agilent 公司）；Advanced-I-24L 型超纯水机（成都艾柯水处理设备有限公司）；AS3120 型超声波清洗器（奥特恩斯仪器有限公司）；FW135 型中草药粉碎机（天津市泰斯特仪器有限公司）；AB204-S 型电子分析天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1.2 试药 麻黄碱（批号 110749-200410）、苦杏仁苷（批号 110749-200410）、橙皮苷（批号 110736-200933）和黄芩苷（批号 110715-201016）对照品均购自中国食品药品检定研究院。清肺化痰丸（6 g/袋，昆明中药厂有限公司，批号 140101、140143、140235）。乙腈、甲醇均为色谱纯（山东禹王实业有限公司化工分公司）；磷酸为分析纯（烟台市双双化工有限公司）；水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-$C_{18(2)}$ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；柱温 25 ℃；流动相 0.2% 磷酸水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0 ~ 5 min，100% A；5 ~ 10 min，97% A；10 ~ 11 min，95% A；11 ~ 20 min，98% A；20 ~ 25 min，92% A；25 ~ 30 min，80% A；30 ~ 45 min，80% A；45 ~ 50 min，75% A）；体积流量 0.8 mL/min；检测波长 207 nm（麻黄碱、苦杏仁苷）和 278 nm（橙皮苷、黄芩苷）。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取麻黄碱、苦杏仁苷、橙皮苷、黄芩苷对照品适量，甲醇制成 0.790 0、1.080、0.820 0、0.800 0 g/L 对照品贮备液，4 ℃下保存。吸取适量，甲醇配成 0.158 0、0.216 0、0.164 0、0.160 0 g/L 混合对照品溶液，4 ℃下保存，备用。

2.2.2 供试品溶液 精密称取清肺化痰丸 2 g，置于研钵中充分研细，15 mL 甲醇定量转移至 50 mL 量瓶中，超声提取 20 min，过滤，滤渣加入 15 mL 甲醇，超声提取 20 min，过滤，剩余滤渣再用 15 mL甲醇超声提取 20 min，收集 3 次滤液，冷却至室温，甲醇定容至 50 mL，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，4 ℃下冷藏备用。

2.2.3 阴性对照溶液 按本品处方和制法，制备缺麻黄、苦杏仁、陈皮、黄芩的阴性对照样品，按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液，摇匀，过滤，取续滤液，4 ℃下冷藏备用。

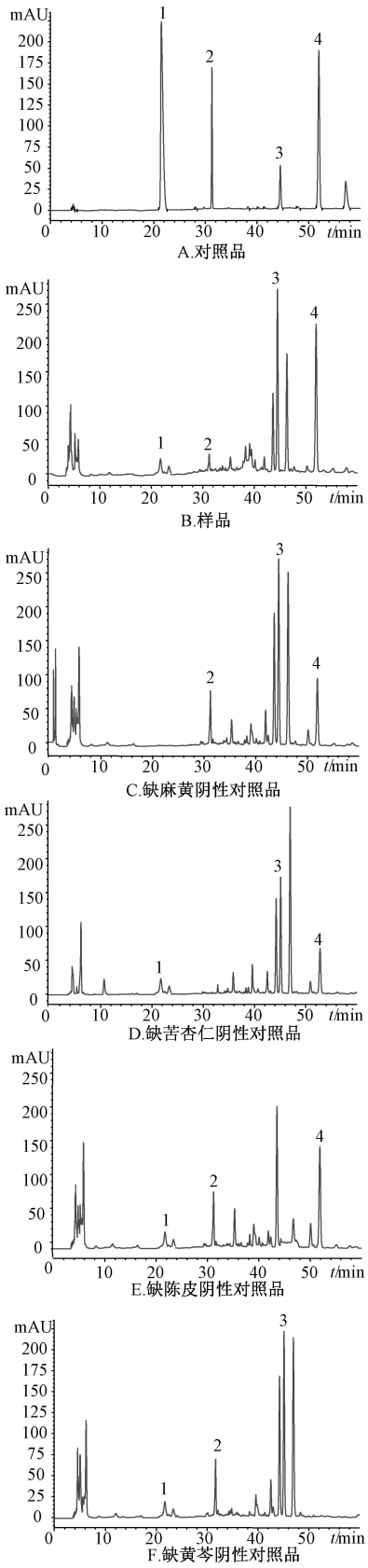
2.3 系统适应性及专属性试验 精密吸取混合对照品溶液 6 μL、供试品溶液 10 μL、阴性对照溶液 10 μL，在“2.1”项色谱条件下测定。结果，各成分与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，对称因子均在 0.95 ~ 1.05 之间，理论塔板数以各成分色谱峰计均大于 20 000，其他组分不干扰 4 种成分的测定，方法专属性良好，见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1、3、6、9、12、15、20、25 μL，注入液相色谱仪，在“2.1”项色谱条件下测定，以峰面积为纵坐标（Y），进样量为横坐标（X）进行回归，得到麻黄碱、苦杏仁苷、橙皮苷和黄芩苷的回归方程分别为 $Y = 3\ 001.6X - 80.029$（$r = 0.999\ 8$）、$Y = 1\ 039.6X - 21.673$（$r = 0.999\ 9$）、$Y = 1\ 495.1X - 36.154$（$r = 0.999\ 7$）、$Y = 3\ 367.7X - 21.080$（$r = 0.999\ 4$），分别在 0.158 ~ 3.950、0.216 ~ 5.400、0.164 ~ 4.100、0.160 ~ 4.000 μg 范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 6 μL，注入液相色谱仪，在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次，测得麻黄碱、苦杏仁苷、橙皮苷和黄芩苷峰面积 RSD 分别为 0.24%、1.29%、1.25%、1.20%，表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密量取同一批清肺化痰丸（批号 140101）6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定，测得麻黄碱、苦杏仁苷、橙皮苷和黄芩苷平均含有量分别为 0.428 3、1.334 8、7.911 5、4.688 9 mg/g，RSD 分别为 0.58%、2.99%、2.29%、2.91%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 精密称取清肺化痰丸样品（批号 140143）1 份，按“2.2.2”项下方法制备供试



1. 麻黄碱 2. 苦杏仁苷 3. 橙皮苷 4. 黄芩苷
1. ephedrine 2. laetrile 3. hesperidin 4. baicalin

图 1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

品溶液，于 0、2、4、6、8、10 h 在“2.1”项色谱条件下测定，测得麻黄碱、苦杏仁苷、橙皮苷和黄芩苷峰面积 RSD 分别为 3.94%、4.03%、2.39% 和 3.20%。表明供试品溶液在 10 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（麻黄碱 0.428 3 mg/g、苦杏仁苷 1.334 8 mg/g、橙皮苷 7.911 5 mg/g、黄芩苷 4.688 9 mg/g）的清肺化痰丸（批号 140101）1 g，平行 6 份，置于研钵中，精密加入各对照品溶液（0.158 g/L 麻黄碱 3 mL、0.216 g/L 苦杏仁苷 6 mL、0.820 g/L 橙皮苷 9 mL、0.800 g/L 黄芩苷 6 mL），7.5 mL 甲醇定量转移至 50 mL 量瓶中，超声提取 20 min，过滤，滤渣加入 7.5 mL 甲醇，超声提取 20 min，过滤，滤渣再用 7.5 mL 甲醇超声提取 20 min，收集 3 次滤液，冷却至室温，甲醇定容至 50 mL，即得加样供试品溶液，0.45 μm 微孔滤膜过滤。精密吸取 10 μL，注入液相色谱仪，在“2.1”项色谱条件下计算回收率，结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果（$n=6$）

Tab. 1 Results of recovery tests（$n=6$）

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/%）
麻黄碱	1.001 2	0.428 8	0.474 0	0.902 9	100.02	99.68
	1.002 3	0.429 3	0.474 0	0.913 3	102.11	（1.90）
	1.001 8	0.429 1	0.474 0	0.902 3	99.84	
	1.002 0	0.429 2	0.474 0	0.895 0	98.28	
	1.000 9	0.428 7	0.474 0	0.887 6	96.82	
	1.001 8	0.429 1	0.474 0	0.907 8	101.00	
苦杏仁苷	1.001 2	1.336 4	1.296 0	2.648 0	101.20	99.27
	1.002 3	1.337 9	1.296 0	2.628 0	99.55	（1.15）
	1.001 8	1.337 2	1.296 0	2.628 9	99.67	
	1.002 0	1.337 5	1.296 0	2.608 9	98.10	
	1.000 9	1.336 0	1.296 0	2.609 7	98.28	
	1.001 8	1.337 2	1.296 0	2.618 0	98.83	
橙皮苷	1.001 2	7.921 0	7.380 0	15.302 0	100.01	98.83
	1.002 3	7.929 7	7.380 0	15.290 3	99.74	（1.31）
	1.001 8	7.925 7	7.380 0	15.311 9	100.08	
	1.002 0	7.927 3	7.380 0	15.088 7	97.04	
	1.000 9	7.918 6	7.380 0	15.178 6	98.37	
	1.001 8	7.925 7	7.380 0	15.138 9	97.74	
黄芩苷	1.001 2	4.694 5	4.800 0	9.396 0	97.95	98.70
	1.002 3	4.699 7	4.800 0	9.496 7	99.94	（1.09）
	1.001 8	4.697 3	4.800 0	9.385 3	97.67	
	1.002 0	4.698 3	4.800 0	9.413 6	98.24	
	1.000 9	4.693 1	4.800 0	9.408 9	98.25	
	1.001 8	4.697 3	4.800 0	9.505 7	100.17	

2.9 *样品含有量测定* 精密称取 3 批清肺化痰丸适量，每批 3 份，按“2.2.2”项下方法制备供试

品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样 10 μL 测定，计算含有量，结果见表 2。

表 2 含有量测定结果（n =3）

Tab. 2 Results of content determination（n =3）

批号	麻黄碱/（mg·g^{-1}）	RSD/%	苦杏仁苷/（mg·g^{-1}）	RSD/%	橙皮苷/（mg·g^{-1}）	RSD/%	黄芩苷/（mg·g^{-1}）	RSD/%
140101	0.428 3	0.58	1.334 8	2.99	7.911 5	2.29	4.688 9	2.91
140143	0.504 1	1.29	1.458 4	2.26	8.836 3	1.04	4.183 3	1.36
140235	0.419 0	0.86	1.401 2	0.79	7.514 0	0.66	4.500 2	0.97

3 讨论

3.1 *检测波长的确定* 采用 PDA 检测器检测对照品和供试品，发现麻黄碱的最大吸收波长在 207 nm处，苦杏仁苷在 195 nm 和 245 nm 处，橙皮苷在 275 nm 处，黄芩苷在 278 nm 处，而且苦杏仁苷在 207 nm、橙皮苷在 278 nm 处亦有较强吸收，而且干扰峰较少。综合以上因素，确定检测波长为 207 nm（麻黄碱和苦杏仁苷）和 278 nm（橙皮苷和黄芩苷）。

3.2 *提取方法的选择* 本实验先用浸渍法，精密称取样品 0.700 0 g，置于研钵中研成细小粉末，甲醇定量转移至 25 mL 量瓶中，超声提取 30 min，定容，上清液用微孔滤膜过滤，制得样品溶液，但发现该方法提取率较低，达不到含有量测定的要求。再使用甲醇加热回流法提取，提取时间 1 h，提取液减压蒸干，甲醇定容，提取效果较好，但操作繁琐，对提取率稳定性影响较大。最终，将清肺化痰丸置于研钵中研细，精密称取适量，置于 50 mL量瓶中，15 mL 甲醇超声提取 20 min，过滤，再重复操作两次，弃去滤渣，收集 3 次滤液，甲醇定容至 50 mL，制得样品溶液，该方法提取效果较好，提取时间 1 h，操作简单方便，可满足清肺化痰丸含有量测定的要求。

3.3 *流动相的选择* 考察乙腈、水、0.2% 磷酸水溶液和甲醇对混合对照品中 4 种成分的分离和出峰情况，发现乙腈洗脱能力最强，相对保留时间较短；甲醇洗脱能力较弱，相对保留时间比乙腈长；以水为流动相时，相对保留时间最长；选择水-乙腈作为流动相时，乙腈比例越高，洗脱能力越强；当流动相改为 0.2% 磷酸水溶液-乙腈时，峰的拖尾情况得到改善，但比例过高会导致各成分相对保留时间过短，不符合分离度要求。最终，通过梯度洗脱法使得各成分先后洗脱，未见其他成分干扰。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准（中药成方制剂）：第 12 册[S]. 北京：人民卫生出版社，1996：176.

[2] 孙 蓉，田婷婷，钱 进. 清肺化痰丸的质量标准研究[J]. 中国民族民间医药，2014，23(13)：16-18.

[3] 杨莉丽，罗永静，吝 伟，等. 红外光谱法结合化学计量学对小儿咳喘类药物的定性鉴别研究[J]. 中成药，2012，34(3)：517-520.

[4] 朱艳琴，殷勤红. 高效液相色谱法测定清肺化痰丸中苦杏仁苷的含量[J]. 光谱实验室，2012，27(1)：264-267.

[5] 苏 丹，宋永贵，魏斌斌，等. RRLC 法快速测定克咳胶囊中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱和吗啡[J]. 中成药，2013，35(11)：2407-2410.

[6] 张 伟，林 彤，江英桥. RRLC 法同时测定橘红痰咳颗粒中苦杏仁苷和柚皮苷[J]. 中成药，2012，34(5)：865-868.

[7] 张冬松，高慧媛，吴立军. 橙皮苷的药理活性研究进展[J]. 中国现代中药，2006，8(7)：25-27.

[8] 云 云，汪长中，桂 丽，等. 黄芩苷经由 TLR4 信号转导通路抗呼吸道合胞病毒作用的研究[J]. 中成药，2013，35(6)：1116-1120.

[9] 朱艳琴，王文辉，杨 俊. RP-HPLC 同时测定清肺化痰丸中 3 种成分含量[J]. 中成药，2009，31(11)：1705-1707.

[10] 宋剑锋，冯敬骞，胡建华，等. HPLC 法同时测定常山胡柚花中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的量[J]. 中草药，2014，45(6)：854-856.

[11] 师永清，康淑荷，王爱军. HPLC 法同时测定导赤丸中栀子苷、芍药苷、黄芩苷和盐酸小檗碱[J]. 中成药，2013，35(7)：1462-1465.

[12] 夏卉莉，刘 力，倪嘉纳. HPLC 法同时测定红藤颗粒中苦杏仁苷、香蒲新苷及异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷[J]. 中成药，2013，35(3)：525-528.