

# HPLC法同时测定鼻炎灵片中绿原酸、黄芩苷和欧前胡素的含量<sup>Δ</sup>

邱红梅<sup>1\*</sup>, 杨林<sup>2</sup>, 何丹<sup>1#</sup> (1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 2. 重庆医药高等专科学校药理学系, 重庆 401331)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)12-1605-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.12.05

**摘要** 目的: 建立同时测定鼻炎灵片中绿原酸、黄芩苷和欧前胡素含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters SunFire C<sub>18</sub>, 流动相为甲醇-0.20% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μL。结果: 绿原酸、黄芩苷和欧前胡素的检测质量浓度线性范围分别为 1.618~16.18、1.624~16.24、1.762~17.62 μg/mL (*r* 均为 0.999 9); 定量限分别为 2.67、2.03、1.87 μg/mL, 检测限分别为 1.34、1.06、0.98 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0%; 加样回收率分别为 98.01%~101.80% (RSD=1.38%, *n*=9)、98.38%~101.40% (RSD=1.26%, *n*=9)、98.06%~101.40% (RSD=1.28%, *n*=9); 耐用性试验的 RSD 均小于 2.0%。结论: 该方法操作简便、准确, 精密性、稳定性、重复性、耐用性好, 可用于鼻炎灵片中绿原酸、黄芩苷和欧前胡素含量的同时测定。

**关键词** 高效液相色谱法; 鼻炎灵片; 绿原酸; 黄芩苷; 欧前胡素; 含量测定

## Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Baicalin and Imperatorin in Bianling Tablets by HPLC

QIU Hongmei<sup>1</sup>, YANG Lin<sup>2</sup>, HE Dan<sup>1</sup> (1. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Dept. of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin and imperatorin in Bianling tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on a Waters SunFire C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-0.20% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 280 nm and column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: Linear ranges of chlorogenic acid, baicalin and imperatorin were 1.618-16.18 μg/mL, 1.624-16.24 μg/mL and 1.762-17.62 μg/mL (*r* were 0.999 9), respectively. The limits of quantitation were 2.67, 2.03, 1.87 μg/mL, and the limits of detection were 1.34, 1.06, 0.98 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 98.01%-101.80% (RSD=1.38%, *n*=9), 98.38%-101.40% (RSD=1.26%, *n*=9) and 98.06%-101.40% (RSD=1.28%, *n*=9), respectively. RSDs of tolerance tests were all lower than 2.0%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, precise, stable, reproducible and durable. It can be used for simultaneous determination of chlorogenic acid, baicalin and imperatorin in Bianling tablets.

**KEYWORDS** HPLC; Bianling tablet; Chlorogenic acid; Baicalin; Imperatorin; Content determination

鼻炎灵片是由炒苍耳子、辛夷、白芷、黄芩、川贝母、细辛、淡豆豉、薄荷脑等 8 味中药材经提取制成的口服制剂, 具有通窍消肿、祛风退热的功效, 临床上多用于慢性鼻窦炎、鼻炎及鼻塞头痛、浊涕臭气、嗅觉失灵等症的治疗<sup>[1]</sup>。该制剂收载于 2015 年版《中国药典》(一部), 现有标准采用薄层色谱法对白芷、黄芩和川贝母进行鉴别, 以高效液相色谱法(HPLC)测定黄芩苷的含量, 并规定每片含黄芩以黄芩苷计不得少于 2.4 mg<sup>[1]</sup>。苍耳子、黄

芩、白芷为该方的主要药材, 因此该制剂的质量控制应采用多指标成分控制。苍耳子主要含有绿原酸、原儿茶酸等酚酸类成分<sup>[2-3]</sup>, 具有降血糖、抗过敏、抗菌、抗炎、镇痛等作用<sup>[4]</sup>; 黄芩主要含有黄芩苷等成分<sup>[5]</sup>, 具有抗炎、抗菌、镇静、解热、降血压、降血脂及降胆固醇等作用<sup>[6]</sup>; 白芷中主要含有欧前胡素和异欧前胡素等香豆素类成分<sup>[7]</sup>, 具有抗炎、抗疟、抗菌、抗肿瘤等作用<sup>[8]</sup>。目前, 文献报道的质量控制方法多以 HPLC 法分别测定该制剂中黄芩苷<sup>[9]</sup>、绿原酸<sup>[10]</sup>、木兰脂素<sup>[11]</sup>和欧前胡素<sup>[12]</sup>的其中 1 种或 2 种成分的含量, 但未见同时测定该制剂中绿原酸、黄芩苷和欧前胡素含量的报道。本研究采用 HPLC 法建立了同时测定鼻炎灵片中上述 3 种成分含量的方法, 旨在为该制剂的质量控制提供参考。

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.31400881); 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(No.cstc2017cyjAX0211)

\* 副教授。研究方向: 中药药理学、中药分析。E-mail: qiu hongmei@cqmu.edu.cn

# 通信作者: 副教授。研究方向: 药物分析。E-mail: ildocor@163.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20型HPLC仪,包括SPD-20A紫外-可见分光检测器(日本Shimadzu公司);AG135型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-1100DE型超声波清洗机(昆山舒美超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

鼻炎灵片(江西南昌制药有限公司,批号:170306、170402、170508,规格:0.3 g/片);绿原酸对照品(批号:110753-201415,纯度:≥99.0%)、黄芩苷对照品(批号:110896-200001,纯度:≥99.0%)、欧前胡素对照品(批号:110826-201013,纯度:≥99.0%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Waters SunFire C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.20%磷酸溶液,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process

t, min	A, %	B, %
0	25	75
1	25	75
25	90	10
26	25	75
30	25	75

### 2.2 溶液的制备

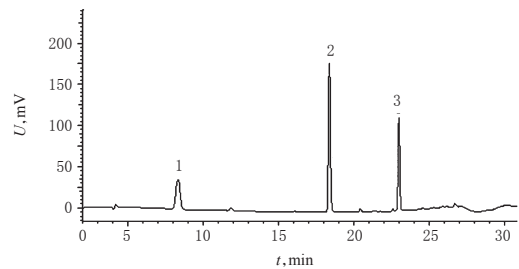
2.2.1 混合对照品溶液 精密称取绿原酸对照品10.11 mg、黄芩苷对照品10.15 mg、欧前胡素对照品11.01 mg,各置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得各自单一对照品贮备液。分别量取上述3种单一对照品贮备液各1.0 mL,置于同一25 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得绿原酸、黄芩苷和欧前胡素质量浓度分别为16.18、16.24、17.62 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品20片,除去包衣,精密称定,研细,取约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入流动相50 mL,密塞,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)处理40 min,放冷,再次称定质量,用流动相补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

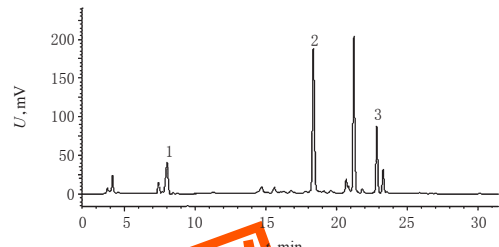
2.2.3 阴性对照溶液 按鼻炎灵片处方和工艺制备缺炒苍耳子、白芷、黄芩的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

### 2.3 专属性试验

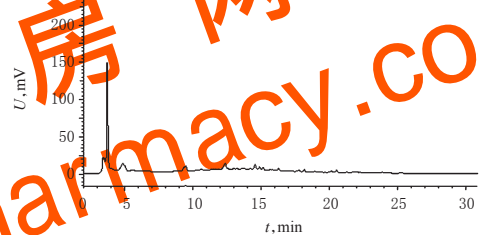
取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,阴性对照在与绿原酸、黄芩苷和欧前胡素保留时间相同处无色谱峰干扰,表明专属性良好。



A.混合对照品



B.供试品



C.阴性对照

注:1.绿原酸;2.黄芩苷;3.欧前胡素

Note: 1. chlorogenic acid; 2. baicalin; 3. imperatorin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液1、2、4、6、8、10 mL,分别置于10 mL量瓶中,加流动相定容,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以绿原酸、黄芩苷和欧前胡素质量浓度(x, μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得绿原酸、黄芩苷和欧前胡素回归方程分别为 $y=17\ 386x+50\ 694$ ( $r=0.999\ 9$ )、 $y=45\ 610x+56\ 650$ ( $r=0.999\ 9$ )、 $y=22\ 240x+31\ 953$ ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,绿原酸、黄芩苷和欧前胡素检测质量浓度线性范围分别为1.618~16.18、1.624~16.24、1.762~17.62 μg/mL。

### 2.5 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,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,绿原酸、黄芩苷和欧前胡素的定量限分别为2.67、2.03、1.87  $\mu\text{g/mL}$ ,检测限分别为1.34、1.06、0.98  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 2.6 精密度的试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,1 d内按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,绿原酸、黄芩苷和欧前胡素峰面积的RSD分别为1.32%、1.18%、0.98% ( $n=6$ ),表明日内精密度良好。取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续3 d进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、黄芩苷和欧前胡素峰面积的RSD分别为1.48%、1.35%、1.28% ( $n=3$ ),表明日间精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:170306)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、黄芩苷和欧前胡素峰面积的RSD分别为1.25%、1.08%、1.18% ( $n=6$ ),表明供试品溶液室温放置10 h内基本稳定。

## 2.8 重复性试验

精密称取样品细粉(批号:170306)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果,绿原酸、黄芩苷和欧前胡素含量平均值分别为2.330、4.412、3.526 mg/片,RSD分别为1.50%、1.27%、1.19% ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品细粉(批号:170306)适量,共9份,分别加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 2 Results of recovery tests ( $n=9$ )

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.250 1	1.165	0.978	2.130	98.71	99.26	1.38
	0.250 9	1.169	0.978	2.127	98.01		
	0.251 2	1.170	0.978	2.141	99.28		
	0.250 7	1.168	1.133	2.321	101.80		
	0.250 6	1.167	1.133	2.284	98.53		
	0.251 0	1.169	1.133	2.285	98.50		
	0.250 8	1.168	1.456	2.645	101.40		
	0.250 3	1.166	1.456	2.598	98.38		
	0.250 9	1.169	1.456	2.606	98.71		
	0.250 5	1.167	1.456	2.622	98.50		
黄芩苷	0.250 1	2.206	1.786	3.966	98.53	99.28	1.26
	0.250 9	2.213	1.786	3.972	98.50		
	0.251 2	2.216	1.786	4.027	101.40		
	0.250 7	2.211	2.274	4.448	98.38		
	0.250 6	2.210	2.274	4.455	98.71		
	0.251 0	2.214	2.274	4.477	99.51		
	0.250 8	2.212	2.598	4.847	101.40		
	0.250 3	2.208	2.598	4.768	98.56		
	0.250 9	2.213	2.598	4.773	98.53		
	0.250 5	2.213	2.598	4.773	98.53		
欧前胡素	0.250 1	1.763	1.41	3.152	98.53	99.20	1.28
	0.250 9	1.769	1.41	3.158	98.54		
	0.251 2	1.771	1.41	3.200	101.40		
	0.250 7	1.767	1.762	3.508	98.78		
	0.250 6	1.767	1.762	3.506	98.71		
	0.251 0	1.769	1.762	3.505	98.51		
	0.250 8	1.768	2.114	3.912	101.40		
	0.250 3	1.764	2.114	3.837	98.06		
	0.250 9	1.769	2.114	3.859	98.88		
	0.250 5	1.769	2.114	3.859	98.88		

## 2.10 耐用性试验

2.10.1 色谱柱考察 取样品细粉(批号:170306)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,再按“2.1”项下色谱条件[色谱柱分别为Waters SunFire C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Thermo C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Cosmocore C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )]进样测定,记录峰面积并计算含量,结果见表3。结果表明,色谱柱一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

表3 耐用性试验结果

Tab 3 Results of durability tests

项目	分项	绿原酸			黄芩苷			欧前胡素		
		含量, mg/片	平均值, mg/片	RSD, %	含量, mg/片	平均值, mg/片	RSD, %	含量, mg/片	平均值, mg/片	RSD, %
色谱柱	Waters SunFire C <sub>18</sub>	2.370	2.397	1.27	4.389	4.342	0.97	3.499	3.467	1.37
	Thermo C <sub>18</sub>	2.430			4.327			3.412		
	Cosmocore C <sub>18</sub>	2.390			4.309			3.489		
流动相	0.20%磷酸溶液	2.370	2.417	1.70	4.389	4.323	1.56	3.499	3.454	1.70
	0.15%磷酸溶液	2.446			4.254			3.388		
	0.10%磷酸溶液	2.434			4.325			3.476		
流速	0.8 mL/min	2.420	2.410	1.50	4.344	4.348	0.89	3.468	3.460	1.28
	1.0 mL/min	2.370			4.389			3.499		
	1.2 mL/min	2.440			4.312			3.412		
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$	2.390	2.393	1.02	4.358	4.363	0.54	3.423	3.443	1.43
	30 $^{\circ}\text{C}$	2.370			4.389			3.499		
	35 $^{\circ}\text{C}$	2.418			4.343			3.407		

2.10.2 流动相考察 取样品细粉(批号:170306)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,再按“2.1”项下色谱条件(流动相磷酸溶液体积分数分别为0.20%、

0.15%、0.10%)进样测定,记录峰面积并计算含量,结果见表3。结果表明,流动相一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

2.10.3 流速考察 取样品细粉(批号:170306)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,再按“2.1”项下色谱条件(流速分别为0.8、1.0、1.2 mL/min)进样测定,记录峰面积并计算含量,结果见表3。结果表明,流速一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

2.10.4 柱温考察 取样品细粉(批号:170306)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液1份,再按“2.1”项下色谱条件(柱温别为25、30、35 ℃)进样测定,记录峰面积并计算含量,结果见表3。结果表明,柱温一定程度波动能满足试验要求,本方法耐用性良好。

### 2.11 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 4 Results of content determination of samples ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

批号	绿原酸		黄芩苷		欧前胡素	
	含量,mg/片	RSD,%	含量,mg/片	RSD,%	含量,mg/片	RSD,%
170306	2.330		4.412		3.562	
170402	2.370	1.50	4.389	1.27	3.499	1.19
170508	2.401		4.496		3.483	

### 3 讨论

由于绿原酸、黄芩苷和欧前胡素极性差别较大,故笔者采用梯度洗脱,并在流动相优化过程中分别采用不同体积分数的磷酸溶液,结果发现在0.20%磷酸溶液条件下,上述3种成分峰形对称,可满足测定要求。在检测波长优化过程中笔者选用280 nm和328 nm两个波长进行比较,发现在280 nm波长处上述3种成分的色谱峰峰形较好,且整个基线更为平稳。笔者还曾以甲醇、50%甲醇作为提取溶剂,可能是制剂中某些辅料的干扰所致,结果不理想;而后发现流动相作为提取溶剂提取最

为完全,加样回收率符合规定。

综上所述,本方法操作简便、准确,精密度、稳定性、重复性、耐用性好,可用于鼻炎灵片中绿原酸、黄芩苷和欧前胡素含量的同时测定。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1686
- [2] JIANG H, YANG L, LIU C, et al. Four new glycosides from the fruit of *Xanthium sibiricum* Patr[J]. *Molecules*, 2013, 18(18):12464-12473.
- [3] 姜海,张妍妍,张颖.苍耳子化学成分研究[J].*中医药信息*,2016,33(3):8-10.
- [4] 刘玉红,郝震峰.苍耳子的化学成分和药理作用研究概述[J].*南京中医药大学学报*,2017,33(4):22-23.
- [5] 徐丹洋,陈佩东,张丽,等.黄芩的化学成分研究[J].*中国实验方剂学杂志*,2011,17(1):78-80.
- [6] 文敏,李雪,付守延.黄芩苷药理作用研究新进展[J].*沈阳药科大学学报*,2008,25(2):158.
- [7] 张建方,黄健,叶优苗.HPLC法测定利鼻片中欧前胡素的含量[J].*中国药学*,2013,24(12):1135-1136.
- [8] 夏令先,王玉斌,黄文龙,等.香豆素类化合物的抗肿瘤作用研究进展[J].*中国新药杂志*,2013,22(20):2392-2402.
- [9] 郝晶晶,甄会贤,赵正保.鼻炎灵片中黄芩苷含量测定方法的研究[J].*山西中医学院学报*,2013,14(1):38-40.
- [10] 孙亮,郑巍,陆萍,等.鼻炎灵胶囊中绿原酸和黄芩苷的含量测定及指纹图谱研究[J].*药学服务与研究*,2016,16(3):196-199.
- [11] 夏清山.HPLC测定鼻炎片中木兰脂素的含量[J].*鄂州大学学报*,2010,17(5):18-19.
- [12] 越春香,梁蕊,互丽娜.HPLC法测定鼻炎灵片中欧前胡素的含量[J].*中草药*,2004,35(6):642-643.

(收稿日期:2017-10-23 修回日期:2018-01-09)

(编辑:张静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅