doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2020.17.022

# 高效液相色谱法同时测定利肝隆片中 5 种成分含量

吕情花,李永华

(湖南省娄底市食品药品检验检测所,湖南 娄底 417000)

**摘要:目的** 建立同时测定利肝隆片中(*R*,*S*)－告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵含量的高效液相色谱(HPLC)法。**方法** 色谱柱采用 Symmetry® $C_{18}$ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈－0.05%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 250 nm。**结果** (*R*,*S*)－告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵质量浓度分别在 1.062～21.240 μg/mL(*r*=0.999 8),3.884～77.680 μg/mL(*r*=0.999 9),2.244～44.880 μg/mL(*r*=0.999 7),1.329～26.390 μg/mL(*r*=0.999 9),2.026～40.530 μg/mL(*r*=0.999 9)范围内与峰面积线性关系良好;平均加样回收率分别为 99.13%,99.40%,100.10%,97.66%,98.39%(*n*=6),*RSD* 分别为 1.41%,2.00%,1.61%,1.57%,1.49%(*n*=6);4 批样品中(*R*,*S*)－告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵 5 种成分的含量分别为 168.46～191.83 μg/g,654.28～796.35 μg/g,221.24～293.44 μg/g,160.88～171.63 μg/g,388.74～403.81 μg/g。**结论** 该方法操作简便,结果准确,灵敏度高,重复性好,可用于利肝隆片的质量控制。

**关键词:**高效液相色谱法;(*R*,*S*)－告依春;绿原酸;五味子醇甲;紫丁香苷;甘草酸铵;利肝隆片

**中图分类号:**R932;R284.1;R286.0　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1006－4931(2020)17－0083－04

## Simultaneous Determination of 5 Components in Liganlong Tablets by HPLC－DAD

*LYU Qinghua, LI Yonghua*

(*Loudi Institute for Food and Drug Control, Loudi, Hunan, China 417000*)

**Abstract: Objective** To establish a high performance liquid chromatography(HPLC) method for simultaneous determination of (*R*,*S*)－goitrin, chlorogenic acid, schizandrin, syringin and ammonium glycyrrhizinate in Liganlong Tablets. **Methods** The Symmetry® $C_{18}$ column (250 mm×4.6 mm,5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile－0.05% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL/min in a gradient elution manner. The detection wavelength was 250 nm. **Results** The linear ranges of(R,S)－goitrin, chlorogenic acid, schizandrin, syringin and ammonium glycyrrhizinate were 1.062－21.240 μg/mL(*r*=0.999 8), 3.884－77.680 μg/mL(*r*=0.999 9), 2.244－44.880 μg/mL(*r*=0.999 7), 1.329－26.390 μg/mL(*r*=0.999 9), 2.026－40.530 μg/mL(*r*=0.999 9). The average recoveries were 99.13%, 99.40%, 100.10%, 97.66%. 98.39% with *RSD*s of 1.41%, 2.00%, 1.61%, 1.57%, 1.49%, respectively (*n*=6). The contents of(*R*, *S*)－goitrin, chlorogenic acid, schizandrin, syringin and ammonium glycyrrhizinate in the four batches of samples were 168.46－191.83 μg/g, 654.28－796.35 μg/g, 221.24－293.44 μg/g, 160.88－171.63 μg/g, 388.74－403.81 μg/g, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive and reproducible, which can be used for quality control of Liganlong Tablets.

**Key words:** high performance liquid chromatography; (*R*, *S*)－goitrin; chlorogenic acid; schizandrin; syringin; ammonium glycyrrhizinate; Liganlong Tablets

利肝隆片由板蓝根、茵陈、郁金、五味子、甘草、当归、黄芪、刺五加浸膏等中药组方,具有疏肝解郁、清热解毒等功效,用于治疗急、慢性肝炎,迁移性肝炎,慢性活动性肝炎,且对血清丙氨酸氨基转移酶、麝香草酚浊度、黄疸指标降低作用显著,对乙型肝炎表面抗原转阴有较好效果[1]。原标准中仅有化学鉴别项,无含量测定方法。目前,关于该品种的标准研究也较少,但方中单味药主要成分[如板蓝根中的(*R*,*S*)－告依春[2－4],茵陈中的绿原酸[5－7],五味子中的五味子醇甲[8－10],刺五加浸膏中的紫丁香苷[11],甘草中的甘草酸铵[12－13]]的研究报道很多。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定(*R*,*S*)－告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵的含量,建立了质量控制标准,可为全面地控制该制剂的质量提供参考。现报道如下。

## 1　仪器与试药

### 1.1　仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪,包括二极管阵列检测器(美国 Waters 公司);XS205 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为十万分之一);TP－1200 型电子天平(湘仪天平仪器设备有限公司,精度为千分之一);KQ5200DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 350 W,频率为 35 kHz)。

### 1.2　试药

(*R*,*S*)－告依春对照品(批号为 111753－201706),绿原酸对照品(批号为 110753－201817,含量为 96.8%),五味子醇甲对照品(批号为 110857－201714,含量为 99.9%),紫丁香苷对照品(批号为 111574－201605,含量为 95.2%),甘草酸铵对照品(批号为

**第一作者:**吕情花,女,大学本科,副主任药师,主要从事食品药品质量检验和标准研究工作,(电子信箱)374556425@qq.com。

110731－201720，含量为97.7%），均购自中国食品药品检定研究院；水为Ⅰ级纯化水；乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯；利肝隆片（承德天原药业股份有限公司，批号分别为1703007，1712001；黑龙江未名天人制药有限公司，批号为20181107；陕西制药有限责任公司，批号为20170505）。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱：Symmetry® $C_{18}$柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）－0.05%磷酸溶液（B），梯度洗脱，0～10 min时10% A，10～40 min时10% A→55% A，40～41 min时55% A→10% A，41～50 min时10% A；流速：1.0 mL/min；柱温：30 ℃；进样量：10 μL；检测波长：250 nm。

### 2.2 溶液制备

分别取（*R*，*S*）告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵对照品适量，精密称定，加70%甲醇制成每1 mL含相应对照品106.2，388.4，224.4，164.9，202.7 μg的溶液，即得各对照品贮备液；分别精密量取各对照品贮备液适量，置同一容量瓶中，加70%甲醇稀释成每1 mL含相应对照品21.24，77.68，44.88，19.79，40.53 μg的混合对照品溶液。取样品20片，除去包衣，研细，取细粉1 g，精密称定，置锥形瓶中，加70%甲醇25.00 mL，称定质量，超声（功率为350 W，频率为35 kHz）提取30 min，用70%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。按利肝隆片处方和制法分别制备缺板蓝根、茵陈、五味子、刺五加浸膏、甘草的阴性样品，并各取适量，按供试品溶液制备方法分别制备相应的阴性对照品溶液。

### 2.3 方法学考察

系统适用性试验：分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各10 μL，按拟订色谱条件进样测定。结果，各检测成分与相邻成分能完全分离，阴性对照无干扰，理论板数均大于5 000。色谱图见图1。

线性关系考察：精密吸取混合对照品溶液1，5，10，15，20 μL，按拟订色谱条件进样测定，以质量浓度（*X*）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得各被测成分回归方程和线性范围。详见表1。

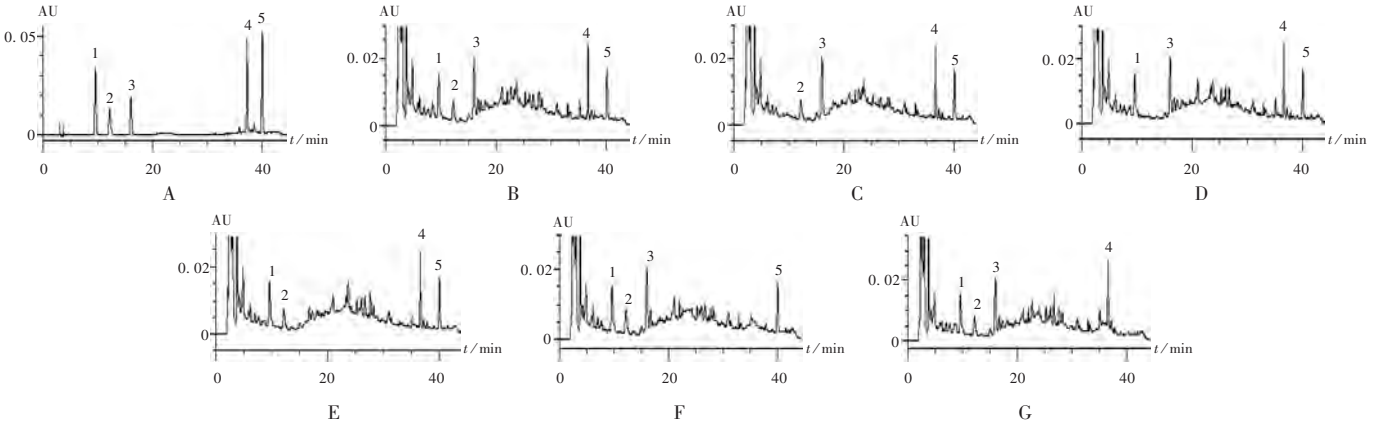
表1 5种成分的线性关系考察结果（$n=5$）

| 成分 | 回归方程 | *r* | 线性范围（μg/mL） |
|---|---|---|---|
| （*R*，*S*）－告依春 | $Y=2.76\times10^4X+5.57\times10^3$ | 0.999 8 | 1.062～21.240 |
| 绿原酸 | $Y=9.36\times10^3X-3.06\times10^2$ | 0.999 9 | 3.884～77.680 |
| 五味子醇甲 | $Y=1.57\times10^4X+6.49\times10^3$ | 0.999 7 | 2.244～44.880 |
| 紫丁香苷 | $Y=1.63\times10^4X-1.95\times10^3$ | 0.999 9 | 1.329～26.390 |
| 甘草酸铵 | $Y=1.24\times10^4X+2.11\times10^3$ | 0.999 9 | 2.026～40.530 |

精密度试验：取混合对照品溶液适量，连续进样7次，每次10 μL。结果（*R*，*S*）－告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵峰面积的*RSD*分别为0.27%，0.48%，0.29%，0.35%，0.11%（$n=7$），表明仪器精密度良好。

重复性试验：取同一批（批号为1703007）样品6份，依法制备供试品溶液，按拟订色谱条件进样测定。结果（*R*，*S*）－告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵的平均含量分别为170.2，797.7，292.8，169.2，405.6 μg/g，*RSD*分别为0.55%，0.73%，0.62%，0.98%，1.14%（$n=6$），表明方法重复性好。

稳定性试验：取同一批（批号为1703007）样品，依法制备供试品溶液，分别于0，6，12，18，24 h时各进样10 μL，按拟订色谱条件进样测定。结果（*R*，*S*）－告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵峰面积的*RSD*分别为0.87%，0.68%，1.35%，0.91%，1.01%




1.（*R*，*S*）－告依春 2. 紫丁香苷 3. 绿原酸 4. 甘草酸铵 5. 五味子醇甲

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 缺板蓝根阴性对照品溶液 D. 缺刺五加浸膏阴性对照品溶液 E. 缺茵陈阴性对照品溶液 F. 缺甘草阴性对照品溶液 G. 缺五味子阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

（$n=5$），表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

加样回收试验：取已知含量的样品（批号为 1703007），精密加入（*R*, *S*）-告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵对照品适量，依法制备供试品溶液，按拟订色谱条件进样测定，并计算回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果（$n=6$）

| 成分 | 取样量（g） | 样品含量（μg） | 加入量（μg） | 测得量（μg） | 回收率（%） | $\bar{X}$（%） | *RSD*（%） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| （*R*, *S*）-告依春 | 0.510 4 | 86.87 | 84.96 | 169.60 | 97.38 | | |
| | 0.508 3 | 86.51 | 84.96 | 170.62 | 99.00 | | |
| | 0.512 1 | 87.16 | 84.96 | 170.91 | 98.58 | 99.13 | 1.41 |
| | 0.498 5 | 84.84 | 84.96 | 170.48 | 100.80 | | |
| | 0.506 2 | 86.16 | 84.96 | 171.80 | 100.80 | | |
| | 0.501 7 | 85.39 | 84.96 | 168.82 | 98.20 | | |
| 绿原酸 | 0.510 4 | 407.15 | 407.82 | 807.63 | 98.20 | | |
| | 0.508 3 | 405.47 | 407.82 | 801.09 | 97.01 | | |
| | 0.512 1 | 408.50 | 407.82 | 810.61 | 98.60 | 99.40 | 2.00 |
| | 0.498 5 | 397.65 | 407.82 | 816.75 | 102.77 | | |
| | 0.506 2 | 403.80 | 407.82 | 809.99 | 99.60 | | |
| | 0.501 7 | 400.21 | 407.82 | 808.83 | 100.20 | | |
| 五味子醇甲 | 0.510 4 | 149.45 | 145.86 | 296.78 | 101.01 | | |
| | 0.508 3 | 148.83 | 145.86 | 293.22 | 98.99 | | |
| | 0.512 1 | 149.94 | 145.86 | 293.73 | 98.58 | 100.10 | 1.61 |
| | 0.498 5 | 145.96 | 145.86 | 290.36 | 99.00 | | |
| | 0.506 2 | 148.22 | 145.86 | 298.19 | 102.82 | | |
| | 0.501 7 | 146.90 | 145.86 | 293.05 | 100.20 | | |
| 紫丁香苷 | 0.510 4 | 86.36 | 82.45 | 166.78 | 97.54 | | |
| | 0.508 3 | 86.00 | 82.45 | 165.42 | 96.33 | | |
| | 0.512 1 | 86.65 | 82.45 | 168.59 | 99.38 | 97.66 | 1.57 |
| | 0.498 5 | 84.35 | 82.45 | 166.46 | 99.59 | | |
| | 0.506 2 | 85.65 | 82.45 | 165.75 | 97.15 | | |
| | 0.501 7 | 84.89 | 82.45 | 163.99 | 95.94 | | |
| 甘草酸铵 | 0.510 4 | 207.02 | 202.70 | 408.90 | 99.60 | | |
| | 0.508 3 | 206.17 | 202.70 | 401.51 | 96.37 | | |
| | 0.512 1 | 207.71 | 202.70 | 406.71 | 98.17 | 98.39 | 1.49 |
| | 0.498 5 | 202.19 | 202.70 | 398.82 | 97.01 | | |
| | 0.506 2 | 205.31 | 202.70 | 406.38 | 99.20 | | |
| | 0.501 7 | 203.49 | 202.70 | 406.19 | 100.00 | | |

### 2.4 样品含量测定

取 4 批样品，依法平行制备 2 份供试品溶液，按拟订色谱条件进样测定（*R*, *S*）-告依春、绿原酸、五味子醇甲、紫丁香苷、甘草酸铵的含量。结果见表 3。

表 3 4 批样品含量测定结果（μg/g，$n=2$）

| 批号 | （*R*, *S*）-告依春 | 绿原酸 | 五味子醇甲 | 紫丁香苷 | 甘草酸铵 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1703007 | 171.14 | 796.35 | 293.44 | 168.68 | 403.81 |
| 1712001 | 168.46 | 780.34 | 288.66 | 171.63 | 388.74 |
| 20181107 | 191.83 | 668.69 | 258.23 | 165.40 | 421.83 |
| 20170505 | 185.50 | 654.28 | 221.24 | 160.88 | 399.57 |

## 3 讨论

### 3.1 流动相选择

曾比较甲醇 -0.02% 磷酸溶液、乙腈 -0.1% 磷酸溶液、乙腈 -0.05% 磷酸溶液，结果表明，以乙腈 -0.05% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱时，各色谱峰的分离度、峰形、基线最好。另外，比较了初始比例，乙腈 -0.05% 磷酸溶液（15∶85，*V*/*V*）和乙腈 -0.05% 磷酸溶液（10∶90，*V*/*V*），结果（*R*, *S*）-告依春、紫丁香苷色谱峰保留时间基本一致，最终选择乙腈 -0.05% 磷酸溶液（10∶90，*V*/*V*）。

### 3.2 提取条件选择

曾考察不同提取时间（15，30，40 min）和不同体积分数提取溶剂（50%，60%，70%，80%，100% 甲醇）对样品中各成分溶出量的影响，结果五味子醇甲、紫丁香苷、绿原酸超声提取 30 min，在不同体积分数提取溶剂中溶出量基本一致，但（*R*, *S*）-告依春、甘草酸铵用 70% 甲醇提取溶出量最大，故选择用 70% 甲醇超声处理 30 min。

### 3.3 检测波长选择

曾采用 DAD 检测器在线采集了 5 个成分在 200 ~ 400 nm 波长范围内的吸收光谱图，结果显示，（*R*, *S*）-告依春、绿原酸、紫丁香苷、五味子醇甲、甘草酸铵分别在 245，327，265，250，250 nm 波长处有最大吸收，通过分析三维图谱，考虑待测成分的最大吸收及其他成分干扰，最终选择 250 nm 为检测波长，（*R*, *S*）-告依春、绿原酸、紫丁香苷在 250 nm 波长处虽无最大吸收，但也较强，可进行有效检测，且该波长下基线平稳。另外还比较了（*R*, *S*）-告依春（245 nm）、绿原酸（327 nm）、紫丁香苷（265 nm）各最大吸收波长处与 250 nm 波长处的测定值，结果相差不到 5%。可见，在 250 nm 波长处各成分的干扰小。故选择 250 nm 为检测波长。

**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（第二册）[M]. 北京：人民卫生出版社，1998：110.
[2] 孟文文，钟昆芮，周艳飞，等. 不同产地板蓝根药材中（*R*, *S*）-告依春含量测定与分析[J]. 北京农学院学报，2020，35（1）：1-6.
[3] 姜 雯，于 宁，金小越，等. HPLC 法测定复方一枝蒿速释微丸中（*R*, *S*）-告依春、一枝蒿酮酸、靛玉红的含量[J]. 药物分析杂志，2017，37（1）：142-147.
[4] 陈 路，吴无畏，刘 钰，等. 高效液相色谱法测定板山岗颗粒中（*R*, *S*）-告依春含量[J]. 中国药业，2019，28（12）：34-36.
[5] 王爱娜，冯 贞. 同时测定小儿咳喘灵颗粒中 4 种成分的方法研究[J]. 中国药事，2017，31（8）：933-939.
[6] 廖 彦，谌 攀，白 杨，等. 绵茵陈高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中南药学，2019，17（8）：1224-1228.