

HPLC 法同时测定二陈合剂中 8 种成分

魏 清

(三峡大学第一临床医学院-宜昌市中心人民医院药学部, 湖北 宜昌 443003)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定二陈合剂(陈皮、茯苓、半夏等)中柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘红素、去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸的含量。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈-0.1% 甲酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 35 °C。结果 8 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 96.94% ~ 99.69%, RSD 0.88% ~ 1.76%。结论 该方法准确可靠、重复性好, 可用于二陈合剂的质量控制。

关键词: 二陈合剂; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)07-1406-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.017

Simultaneous determination of eight constituents in Erchen Mixture by HPLC

WEI Qing

(Department of Pharmacy, Yichang Central People's Hospital & The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443003, China)

ABSTRACT: AIM To develop an HPLC method for the simultaneous content determination of narirutin, hesperidin, nobiletin, 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptemthoxyflavone, tangeratin, dehydrotumulosic acid, dehydropachymic acid and pachymic acid in Erchen Mixture (*Citri reticulatae Pericarpium*, *Poria*, *Pinelliae Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 35 °C thermostatic Agilent TC-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 0.9 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Eight constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r > 0.999 0$), whose average recoveries were 96.94% -99.69% with the RSDs of 0.88% -1.76%. **CONCLUSION** This accurate, reliable and reproducible method can be used for the quality control of Erchen Mixture.

KEY WORDS: Erchen Mixture; chemical constituents; HPLC

二陈合剂源于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第7册, 由陈皮、茯苓、半夏(姜制)、甘草(蜜炙)、生姜5味药材加工而成, 具有燥湿化痰、理气和胃的功效, 对咳嗽痰多、胸脘胀闷、恶心呕吐等症状的治疗效果显著, 但该标准中仅对其性状和相对密度作了规定^[1]。魏淑梅等^[2]采用 TLC 法对陈皮、半夏(姜制)进行了定性鉴别, 刘菁等^[3]采用 HPLC 法测定了橙皮苷含量, 但尚无多成分同时定量测定的报道。陈皮具有燥湿化痰、理气健脾的功效, 用于咳嗽痰多、脘腹胀满、

食少吐泻等症状的治疗^[4], 其主要含黄酮(橙皮苷、柚皮芸香苷)、多甲氧基黄酮(川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘红素等)、生物碱和挥发油^[5]; 茯苓具有利水渗湿、健脾、宁心的功效, 主要用于痰饮眩悸、脾虚食少、便溏泄泻等症状的治疗^[4], 其主要成分为去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸等。本实验采用 HPLC 法同时测定二陈合剂中柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘红素、去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸的含量, 为提

收稿日期: 2017-02-05

作者简介: 魏 清 (1971—), 女, 副主任药师, 从事中药质量分析和医院药学研究。Tel: 13986766681, E-mail: weiqing6681@163.com

高该方质量标准提供依据, 以确保临床用药安全有效。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 系列四元梯度泵高效液相色谱仪, 配置四元梯度泵、自动进样器、柱恒温箱、可变波长检测器(美国安捷伦公司); 电子分析天平(十万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司); KQ-250B 超声波发生器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药 二陈合剂购自浙江惠松制药有限公司(每瓶装 120 mL)。去氢土莫酸(6754-16-1)、去氢茯苓酸(2798-20-1)、茯苓酸对照品(29070-92-6)购自南京森贝伽生物科技有限公司; 柚皮芸香苷(14259-46-2)、橙皮苷(520-26-3)、川陈皮素对照品(478-01-3)购自上海纯优生物科技有限公司; 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮(33390-42-0)、橘红素(481-53-8)对照品购自四川省维克奇生物科技有限公司。乙腈为色谱纯; 甲酸和甲醇均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘红素、去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸对照品适量, 甲醇制成每 1 mL 含 2.728、2.964、0.912、0.718、0.672、0.756、0.424、0.478 mg 各成分的对照品贮备液。吸取适量, 置于同一 100 mL 量瓶中, 甲醇稀释并制成 0.204 6、0.222 3、0.045 6、0.035 9、0.016 8、0.018 9、0.010 6、0.023 9 mg/mL 对照品溶液。

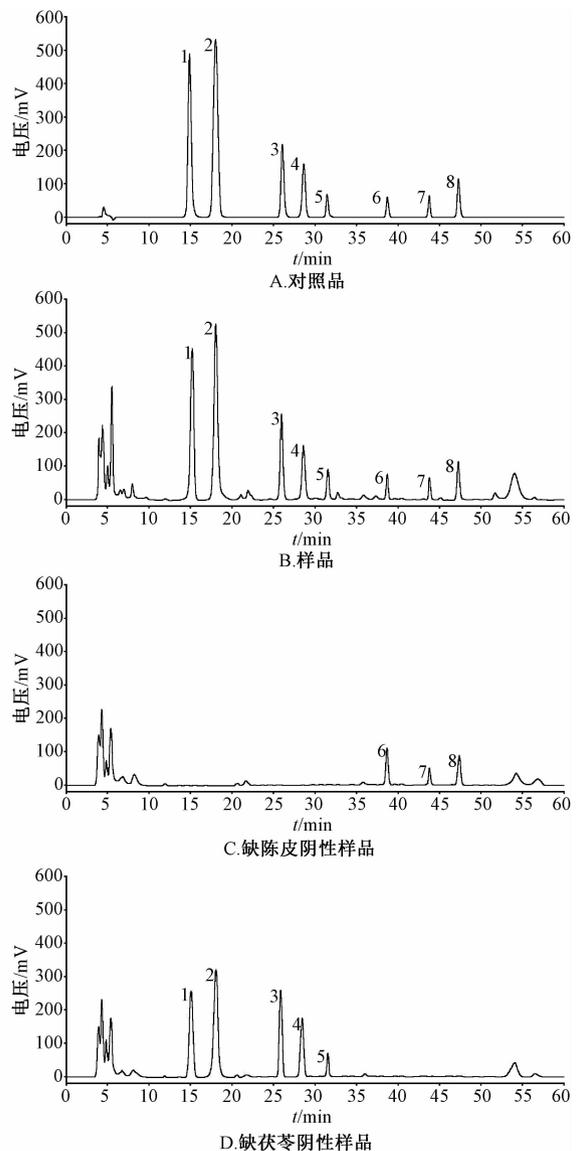
2.1.2 供试品溶液制备 精密吸取二陈合剂 5.0 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 超声 10 min, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液制备 按处方和生产工艺, 分别制备不含茯苓、陈皮的阴性样品, 按“2.1.2”项下方法制备, 即得。

2.2 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸(B), 梯度洗脱(0~11 min, 26.0% A; 11~23 min, 26.0% → 51.0% A; 23~34 min, 51.0% → 72.0% A; 34~51 min, 72.0% → 90.0% A; 51~60 min, 90.0% → 26.0% A); 0~34 min 时在 300 nm 波长下检测柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮和橘红素^[6-7],

34~60 min 时在 210 nm 波长下检测去氢土莫酸、去氢茯苓酸和茯苓酸^[8]; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。

2.3 专属性试验 精密吸取“2.1.1”~“2.1.3”项下溶液适量, 在“2.2”项色谱条件下分析, 发现在各对照品保留时间处均有相应成分的吸收峰, 阴性无干扰, 各色谱峰之间的分离度均大于 1.5。色谱图见图 1。



1. 柚皮芸香苷 2. 橙皮苷 3. 川陈皮素 4. 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮 5. 橘红素 6. 去氢土莫酸 7. 去氢茯苓酸 8. 茯苓酸

1. narirutin 2. hesperidin 3. nobiletin 4. 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptemthoxyflavone 5. tangeratin 6. dehydrotumulosic acid 7. dehydropachymic acid 8. pachymic acid

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下对照品贮备液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL，置于 20 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，即得 6 个质量浓度对照品溶液，在“2.2”项色谱条件

下测定。以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，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/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	r
柚皮芸香苷	$Y = 1.0985 \times 10^6 X + 296.4$	13.64 ~ 272.8	0.9999
橙皮苷	$Y = 1.3016 \times 10^6 X + 455.3$	14.82 ~ 296.4	0.9995
川陈皮素	$Y = 1.5871 \times 10^6 X - 360.0$	4.560 ~ 91.20	0.9992
3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	$Y = 1.2146 \times 10^6 X - 468.9$	3.590 ~ 71.80	0.9997
橘红素	$Y = 8.5173 \times 10^5 X - 325.6$	3.360 ~ 67.20	0.9991
去氢土莫酸	$Y = 6.9429 \times 10^5 X + 391.3$	3.780 ~ 75.60	0.9999
去氢茯苓酸	$Y = 8.3516 \times 10^5 X + 195.7$	2.120 ~ 42.40	0.9996
茯苓酸	$Y = 9.9517 \times 10^5 X - 245.8$	2.390 ~ 47.80	0.9993

2.5 精密度试验 取“2.1.1”项下对照品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定，连续 6 次，测得柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘红素、去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸峰面积 RSD 分别为 0.82%、0.76%、1.01%、0.59%、1.15%、1.32%、0.87%、1.13%，表明仪器精密度良好。

量取样品 (批号 150910) 9 份，每份 2.5 mL，置于 50 mL 量瓶中，精密加入上述对照品溶液 1.0 mL (3 份)、2.0 mL (3 份)、3.0 mL (3 份)，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定，测得各成分平均加样回收率 (RSD) 分别为 98.93% (1.25%)、97.92% (0.91%)、96.94% (1.19%)、98.34% (1.53%)、97.66% (0.88%)、99.01% (1.76%)、99.69% (1.52%)、98.21% (1.33%)。

2.6 重复性试验 取样品 (批号 150910) 6 份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定，测得柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘红素、去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸含有量 RSD 分别为 1.22%、0.83%、1.46%、1.07%、0.95%、1.61%、1.70%、0.63%，表明该方法重复性良好。

2.9 样品含有量测定 取样品 3 批，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下测定，结果见表 2。

表 2 各成分含有量测定结果 ($n=3$, mg/g)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents ($n=3$, mg/g)

成分	批号		
	150910	151108	160306
柚皮芸香苷	1.729	1.556	1.900
橙皮苷	1.986	1.827	2.163
川陈皮素	0.494	0.468	0.533
3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	0.319	0.335	0.285
橘红素	0.185	0.166	0.190
去氢土莫酸	0.176	0.193	0.155
去氢茯苓酸	0.117	0.101	0.135
茯苓酸	0.214	0.203	0.240

2.7 稳定性试验 将供试品溶液 (批号 150910) 在室温下放置 0、2、4、6、8、10、12 h，在“2.2”项色谱条件下测定，测得柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘红素、去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸峰面积 RSD 分别为 0.92%、0.83%、1.05%、1.14%、1.20%、0.71%、1.16%、1.27%，表明供试品溶液在室温下 12 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取各对照品适量，甲醇溶解，制成每 1 mL 含柚皮芸香苷 2.161 mg、橙皮苷 2.483 mg、川陈皮素 0.617 mg、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮 0.398 mg、橘红素 0.232 mg、去氢土莫酸 0.219 mg、去氢茯苓酸 0.147 mg、茯苓酸 0.266 mg 的对照品溶液。精密

3 讨论

3.1 检测波长确定 本实验在 190 ~ 450 nm 波长范围内对各成分进行紫外扫描，兼顾最大吸收及色谱峰之间分离情况，同时参考文献 [6-8]，确定去氢土莫酸、去氢茯苓酸和茯苓酸的检测波长为 210 nm，柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5,

6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮和橘红素的检测波长为 300 nm。

3.2 流动相选择 本实验首先考察了乙腈-水和甲醇-水^[9], 发现前者更优, 但两者均存在部分成分分离效果差、峰形拖尾严重的现象。然后, 考察了乙腈-0.05% 磷酸^[10-11]、乙腈-0.1% 甲酸^[6]和乙腈-0.5% 醋酸^[12-13], 发现以乙腈-0.1% 甲酸为流动相梯度洗脱时, 各成分峰形对称, 所测色谱峰与其他杂质峰均能达到有效分离, 并且基线平稳。

4 结论

本实验建立了 HPLC 法同时测定二陈合剂中柚皮芸香苷、橙皮苷、川陈皮素、3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮、橘红素、去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸的含有量, 8 种成分在 60 min 内均可被检测到, 而且该方法准确可靠、重复性好, 对该方的质量控制具有重要意义。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂): 第7册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 2.

[2] 魏淑梅, 洪 军, 郑 翔. 二陈合剂的质量标准研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(5): 397.

[3] 刘 菁, 何培根, 李志浩, 等. HPLC 测定二陈合剂中橙皮苷含量方法研究[J]. 国际中医中药杂志, 2014, 36

(10): 909-911.

[4] 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: 191, 240.

[5] 张志海, 王彩云, 杨天鸣, 等. 陈皮的化学成分及药理作用研究进展[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(1): 47-48.

[6] 封宇飞, 张宏武, 邹忠梅, 等. HPLC 法同时测定陈皮饮片中 5 种黄酮类化合物的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 10-15.

[7] 庄泽荣, 梁咏倩, 秦 楠, 等. 超高效液相色谱法测定陈皮藿香汤中 4 种成分的含量[J]. 广东药学院学报, 2016, 32(4): 439-443.

[8] 张靓琦, 贾 英, 罗 洁, 等. 超高效液相色谱法同时测定茯苓中去氢土莫酸等 6 种活性成分的含量[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(13): 1080-1083.

[9] 魏 莹, 李文东, 杨武亮. 不同包装贮藏方式对广陈皮质量的影响[J]. 中医药信息, 2016, 33(4): 67-71.

[10] 车 爽, 李 清, 霍艳双, 等. 波长转换 RP-HPLC 法同时测定茯苓不同部位中 5 种三萜酸含量[J]. 药学报, 2010, 45(4): 494-497.

[11] 沈玉萍, 杨 欢, 陈 斌, 等. 反相高效液相色谱法测定中药茯苓中 4 种三萜酸的含量[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(5): 388-390.

[12] 于能江, 郭继芬, 张永祥, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测-质谱法鉴定茯苓中的三萜成分[J]. 分析化学, 2004, 32(7): 866-870.

[13] 邱蓉丽, 吴玉兰, 乐 巍. 陈皮、青皮中 4 种黄酮成分的比较研究[J]. 中成药, 2015, 37(1): 149-153.