

HPLC 法同时测定四磨汤口服液中 5 种成分

张卫东， 戴国梁， 白永涛， 朱立静， 井 汶， 居文政*
(南京中医药大学附属医院临床药理科, 江苏 南京 210029)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定四磨汤口服液(木香、枳壳、槟榔等)中 5 种成分的含有量。**方法** 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 柱温 35 ℃; 检测波长 283 nm; 体积流量 1.0 mL/min。**结果** 辛弗林、去甲异波尔定、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷分别在 5.8~185.6 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、0.829~26.52 μg/mL ($r=1.000\ 0$)、9.775~312.8 μg/mL ($r=1.000\ 0$)、0.594~19 μg/mL ($r=0.999\ 5$)、5.2~166.4 μg/mL ($r=1.000\ 0$) 范围内呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 98.93%、98.95%、102.57%、99.67%、103.43%, RSD 分别为 1.85%、1.27%、0.52%、0.89%、0.43%。**结论** 该方法简便、快速、准确、重复性好, 可用于四磨汤口服液的质量控制。
关键词: 四磨汤口服液; 辛弗林; 去甲异波尔定; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; HPLC
中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)01-0114-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.022

Simultaneous determination of five constituents in Simotang Oral Liquid by HPLC

ZHANG Wei-dong, DAI Guo-liang, BAI Yong-tao, ZHU Li-jing, JING Wen, JU Wen-zheng*
(Department of Clinical Pharmacology, Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of five constituents in Simotang Oral Liquid (*Aucklandiae Radix*, *Aurantii Fructus*, *Arecae Semen*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 35 ℃ thermostatic Agilent Zorbax C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 283 nm. **RESULTS** Synephrine, norisoboldine, naringin, hesperidin and neohesperidin showed good linear relationships within the ranges of 5.8 – 185.6 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 0.829 – 26.52 μg/mL ($r=1.000\ 0$), 9.775 – 312.8 μg/mL ($r=1.000\ 0$), 0.594 – 19 μg/mL ($r=0.999\ 5$) and 5.2 – 166.4 μg/mL ($r=1.000\ 0$), whose average recoveries were 98.93%, 98.95%, 102.57%, 99.67% and 103.43% with the RSDs of 1.85%, 1.27%, 0.52%, 0.89% and 0.43%, respectively. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the rapid quality control of Simotang Oral Liquid.
KEY WORDS: Simotang Oral Liquid; synephrine; norisoboldine; naringin; hesperidin; neohesperidin; HPLC

四磨汤出自明代翁仲仁撰写的《痘疹金镜录》, 由木香、枳壳、槟榔、乌药 4 味中药组成^[1], 具有顺气降逆、消积止痛之功, 用于婴幼儿乳食内滞证、中老年气滞食积证、腹部手术后促进肠胃功能的恢复。研究显示, 四磨汤口服液对肠道细菌多样性^[2-3]、非特异性免疫功能^[4]、肝郁气

收稿日期: 2017-09-20
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573685)
作者简介: 张卫东(1987—), 男, 硕士生, 从事临床中药学研究。Tel: (025) 86617141, E-mail: 872994665@qq.com
* 通信作者: 居文政(1965—), 男, 教授, 主任药师, 博士生导师, 从事中药临床药理学研究。Tel: (025) 86617141, E-mail: wzhju333@163.com

滞型 IBS-C^[5-6]、小儿营养不良^[7-8]等具有显著作用。目前,国家药品标准仅对四磨汤口服液中的柚皮苷进行了 HPLC 定量测定,但其他黄酮类、生物碱类物质也具有重要的生物活性,其中辛弗林具有促胃肠动力作用^[9],去甲异波尔定能抑制 VEGF 诱导的内皮细胞迁移^[10],橙皮苷能诱导肺癌细胞 A549 的凋亡^[11],新橙皮苷具有调节糖脂代谢的作用^[12]。为了更全面地评价四磨汤口服液质量,并进行更深入的药理研究,本实验采用 HPLC 法同时测定辛弗林、去甲异波尔定、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含有量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪(配置脱气机、自动进样器、四元泵、柱温箱、紫外检测器)、ChemStation 色谱工作站(美国 Agilent 公司);CPA225D 电子天平(德国 Sartorius 公司);Milli-Q Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司);Legend Micro 17R 冷冻离心机(美国 Thermo 公司);KH5200E 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 辛弗林(批号 MUST-17041915)、去甲异波尔定(批号 MUST-17030605)、柚皮苷(批号 MUST-17040102)、橙皮苷(批号 MUST-17032502)、新橙皮苷(批号 MUST-17040707)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司。四磨汤口服液(湖南汉森制药股份有限公司,批号 1703318、1612313、1703320)。甲醇、乙腈为色谱纯;水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax 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(程序见表 1);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 283 nm;柱温 35 ℃;进样量 20 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution programs

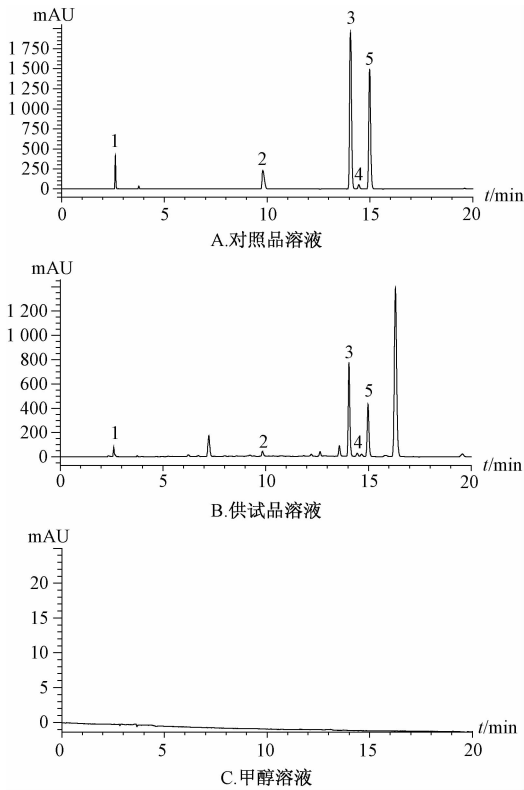
时间/min	A 乙腈/%	B 0.1% 甲酸/%
0~5	2	98
5~10	15	85
10~15	25	75
15~16	30	70
16~20	70	30

2.2 对照品溶液配制 精密称取辛弗林、去甲异波尔定、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、去氢木香内酯对照品适量,置于 10 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻

度,摇匀,作为贮备液,精密移取适量于同一 10 mL 量瓶中,50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 185.6、26.52、312.8、19.0、166.4 μg/mL 对照品溶液。

2.3 供试品溶液配制 取口服液 5 支,精密移取 0.625 mL 于 5 mL 量瓶中,50% 甲醇定容至刻度,摇匀,12 000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 专属性试验 在“2.1”项色谱条件下,辛弗林、去甲异波尔定、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、去氢木香内酯的保留时间分别约为 2.62、9.79、14.06、14.46、14.99 min,分离度良好,无其他成分干扰。色谱图见图 1。



1. 辛弗林 2. 去甲异波尔定 3. 柚皮苷 4. 橙皮苷
5. 新橙皮苷
1. synephrine 2. norisoboldine 3. naringin 4. hesperidin
5. neohesperidin

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品贮备液适量,倍比稀释成 6 个不同质量浓度,在“2.1”项色谱条件下进样 20 μL 测定。以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)进行回归,结果见表 2,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab.2 Linear relationships of various constituents				
成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
辛弗林	$Y=3.482\ 7X-3.663\ 7$	0.999 9	5.8~185.6	
去甲异波尔定	$Y=35.791X-2.505$	1.000 0	0.829~26.52	
柚皮苷	$Y=26.87X+11.341$	1.000 0	9.775~312.8	
橙皮苷	$Y=29.493X+7.445\ 7$	0.999 5	0.594~19.0	
新橙皮苷	$Y=32.077X-7.840\ 8$	1.000 0	5.2~166.4	

2.6 精密度试验 吸取“2.2”项下对照品溶液 20 μL ，连续进样 6 次，在“2.1”项色谱条件下测定，测得辛弗林、去甲异波尔定、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积 RSD 分别为 1.75%、0.56%、0.45%、0.46%、0.46%，表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取口服液（批号 1703318），按“2.3”项下方法制备供试品溶液，室温下于 0、1、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下测定，测得辛弗林、去甲异波尔定、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷峰面积 RSD 分别为 1.27%、2.81%、1.12%、2.48%、1.12%，表明溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 取口服液（批号 1703318），按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，测得辛弗林、去甲异波尔定、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含有量 RSD 分别为 0.47%、1.46%、1.21%、1.43%、1.27%，表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 取含有量已知的口服液 1 mL，加入适量对照品贮备液，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，平行 6 份，在“2.1”项色谱条件下测定，计算回收率，结果见表 3。

2.10 样品含有量测定 按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，计算含有量，结果见表 4。

3 讨论与结论

目前，采用 HPLC 法分别对四磨汤口服液中的黄酮类、生物碱类成分进行定量测定，但存在耗时较长的缺点，一般需要 35~40 min^[13]。本实验首次同时测定两者含有量，用时较短，在 20 min 内即可完成。

本实验对 215、226、235、283 nm 检测波长进行了考察，发现在 283 nm 波长下 5 种成分峰形良好，基线稳定，响应较高。再比较了稀释溶剂甲醇、50% 甲醇、纯水，最终确定最佳稀释溶剂为 50% 甲醇。

表 3 各成分加样回收率试验结果（*n* = 6）

Tab.3 Results of recovery tests for various constituents (<i>n</i> = 6)						
成分	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
辛弗林	67.34	67.32	134.08	99.14	98.93	1.85
	67.34	67.32	132.39	96.62		
	67.34	67.32	134.71	100.08		
	67.34	67.32	134.94	100.42		
	67.34	67.32	135.09	100.63		
去甲异波 尔定	67.34	67.32	132.44	96.71	98.95	1.27
	7.58	7.55	14.98	98.00		
	7.58	7.55	14.99	98.18		
	7.58	7.55	15.21	101.03		
	7.58	7.55	15.08	99.37		
柚皮苷	7.58	7.55	15.09	99.44	102.57	0.52
	7.58	7.55	14.95	97.66		
	135.40	135.32	273.16	101.80		
	135.40	135.32	273.54	102.08		
	135.40	135.32	274.09	102.49		
橙皮苷	135.40	135.32	274.85	103.05	99.67	0.89
	135.40	135.32	274.80	103.01		
	135.40	135.32	274.78	103.00		
	5.02	4.91	9.91	99.58		
	5.02	4.91	9.96	100.62		
新橙皮苷	5.02	4.91	9.97	100.75	103.43	0.43
	5.02	4.91	9.87	98.68		
	5.02	4.91	9.87	98.75		
	5.02	4.91	9.91	99.65		
	69.81	69.80	141.57	102.81		
	69.81	69.80	141.74	103.05		
	69.81	69.80	141.91	103.29		
	69.81	69.80	142.26	103.79		
	69.81	69.80	142.26	103.79		
	69.81	69.80	142.28	103.83		

表 4 各成分含有量测定结果（mg/mL，*n* = 3）

Tab.4 Results of content determination of various constituents (mg/mL, <i>n</i> = 3)					
批号	辛弗林	去甲异波尔定	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
1612313	0.668	0.053	1.244	0.038	0.647
1703318	0.680	0.059	1.146	0.042	0.589
1703320	0.505	0.049	1.042	0.035	0.500

综上所述，本实验建立了 HPLC 法同时测定四磨汤口服液中辛弗林、去甲异波尔定、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含有量，该方法灵敏、简便、快速、重复性好，可为其质量控制提供参考。

参考文献：

[1] 杨 华, 易小兰, 谢金华, 等. HPLC 同时测定四磨汤口服液中辛弗林、槟榔碱和去甲异波尔定的含量[J]. 中国实

验方剂学杂志, 2013, 19(22): 79-81.

[2] 赵先平. 四磨汤口服液对便秘小鼠肠道细菌多样性的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.

[3] 李丹丹, 贺璐, 张雪, 等. 四磨汤口服液对脾虚便秘小鼠肠道细菌多样性的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(6): 1103-1107.

[3] 邓艳玲, 肖新云, 李丹丹, 等. 四磨汤口服液对脾虚便秘小鼠非特异性免疫功能的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(12): 1373-1375.

[5] 韩棉梅. 四磨汤口服液治疗肝郁气滞型 IBS-C 的疗效分析和机理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.

[6] 鲍慧敏. 四磨汤口服液治疗肝郁气滞便秘型肠易激综合征的疗效分析 [J]. 现代诊断与治疗, 2013, 24(19): 4341.

[7] 覃江萍, 韦益. 儿童营养不良与生存干预措施 [J]. 中国卫生产业, 2013, 10(17): 163-165.

[8] 卓文娟, 罗青明, 陈育红. 四磨汤口服液联合酪酸梭菌活菌散辅助治疗儿童营养不良的临床观察 [J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(7): 1086-1088.

[9] 官福兰, 王如俊, 王建华. 枳壳及辛弗林对小鼠胃排空、小肠推进功能的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(11): 1001-1003.

[10] 卢乾. 去甲异波尔定通过 cAMP-PKA-NFκB/Notch1 途径抑制 VEGF 诱导内皮细胞迁移 [C] //全国中药药理学会联合会学术交流大会论文摘要汇编. 北京: 中国药理学会, 2012: 1.

[11] 樊佳新, 王帅, 孟宪生, 等. 基于微流控芯片技术橙皮苷抗肺肿瘤作用机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(9): 1260-1265.

[12] 阎优优. 新橙皮苷的体内外糖脂代谢调节作用及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.

[13] 罗晖明, 丁野, 李文莉, 等. 四磨汤口服液质量标准补充研究 [J]. 中国药事, 2014, 28(3): 268-273.

HPLC 法同时测定白芍配方颗粒中 5 种成分

钱珺¹, 谢凡², 石燕红³, 李文艳², 王瑞^{1*}

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海市浦东新区公利医院药剂科, 上海 200135; 3. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室暨上海市复方中药重点实验室, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定白芍配方颗粒 (白芍) 中 5 种成分的含有量。**方法** 该药的水提液的分析采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.05% 磷酸, 梯度洗脱; 检测波长 230 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃。**结果** 芍药苷、芍药内酯苷、芍药苷亚硫酸酯、没食子酸、苯甲酸分别在 0.020 ~ 0.639 mg/mL ($r=0.999\ 8$)、0.005 ~ 0.172 mg/mL ($r=0.999\ 9$)、0.020 ~ 0.652 mg/mL ($r=1.000\ 0$)、0.003 ~ 0.097 mg/mL ($r=0.999\ 8$)、0.002 ~ 0.058 mg/mL ($r=0.999\ 7$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.1%、98.3%、98.6%、98.1%、99.5%, RSD 分别为 1.86%、1.37%、1.69%、1.46%、2.26%。27 批样品中各成分含有量均有明显差异。**结论** 白芍配方颗粒中白芍质量不稳定, 应对其加以关注。

关键词: 白芍配方颗粒; 芍药苷; 芍药内酯苷; 芍药苷亚硫酸酯; 没食子酸; 苯甲酸; HPLC

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)01-0117-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.023

Simultaneous determination of five constituents in Baishao Formula Granules by HPLC

QIAN Jun¹, XIE Fan², SHI Yan-hong³, LI Wen-yan², WANG Rui^{1*}

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Pharmacy, Gongli Hospital of Shanghai Pudong New District, Shanghai 200135, China; 3. Ministry of Education Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines & Shanghai

收稿日期: 2017-03-22
基金项目: 国家自然科学基金 (81703698); 国家药品标准提高暨 2015 版药典科研任务 (2012)
作者简介: 钱珺 (1993—), 女, 硕士生, 从事中药活性成分与质量标准研究。Tel: (021) 51322181, E-mail: qianjun9334@163.com
* 通信作者: 王瑞 (1973—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础与质量标准研究。Tel: (021) 51322181, E-mail: ellewang@163.com