

HPLC 法同时测定五味藿香片中 6 种成分

王 娇¹, 徐家怡¹, 左雅敏², 孙宜春³, 周 宁³, 伍 庆^{1*}

[1. 贵州师范大学贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州 贵阳 550001; 2. 湖北医药学院基础医学院, 湖北 十堰 442000; 3. 国药集团同济堂(贵州)制药有限公司, 贵州 贵阳 550018]

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定五味藿香片(广藿香、陈皮、草豆蔻等)中芹菜素-7-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、橘皮素、橙皮苷、川陈皮素、香草酸、原儿茶酸的含量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 270 nm; 柱温 30 ℃。**结果** 6 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 96.6% ~ 98.1%, RSD 0.47% ~ 2.73%。**结论** 该方法准确可靠, 重复性好, 可用于五味藿香片的质量控制。

关键词: 五味藿香片; 芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷; 橘皮素; 橙皮苷; 川陈皮素; 香草酸; 原儿茶酸; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)10-2198-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.10.016

Simultaneous determination of six constituents in Wuwei Huoxiang Pills by HPLC

WANG Jiao¹, XU Jia-yi¹, ZUO Ya-min², SUN Yi-chun³, ZHOU Ning³, WU Qing^{1*}

[1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Mountainous Environment Information System and Environment Protection, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; 3. Sinopharm Tongjitang (Guizhou) Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550018, China]

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of apigenin-7-*O*-β-*D*-glucopyranoside, tangeretin, hesperidin, nobiletin, vanillic acid and protocatechuic acid in Wuwei Huoxiang Pills (*Pogostemonis Herba*, *Citri reticulatae Pericarpium*, *Alpiniae katsumadai Semen*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 270 nm. **RESULTS** Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r>0.999\ 0$), whose average recoveries were 96.6% – 98.1% with the RSDs of 0.47% – 2.73%. **CONCLUSION** This accurate, reliable and reproducible method can be used for quality control of Wuwei Huoxiang Pills.

KEY WORDS: Wuwei Huoxiang Pills; apigenin-7-*O*-β-*D*-glucopyranoside; tangeretin; hesperidin; nobiletin; vanillic acid; protocatechuic acid; HPLC

五味藿香片由广藿香、陈皮、草豆蔻、苍术、豆蔻 5 味药材组成, 是王永炎院士在传统名方解郁丸的基础上依据五神脏理论研制而得, 具有醒脾化湿、理气解郁之功效, 主要用于湿浊困脾、气机郁

滞所致的情绪郁闷、低落、倦怠乏力、思维迟钝^[1-3], 其中芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷是君药广藿香主要成分, 具有抗菌消炎、抗焦虑作用^[4-6]; 臣药陈皮中的橙皮苷、橘皮素、川陈皮素均具有祛痰

收稿日期: 2018-02-28
基金项目: 国家新药创制重大专项-中药经典名方开发子课题 (2015ZX09101043-007); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-GZ-10); 喀斯特地区生物与信息技术协同创新中心 (黔教合协同创新字 [2014] 04)
作者简介: 王 娇 (1993—), 女, 硕士生, 研究方向为药用植物的开发与利用。Tel: 13343932713, E-mail: wj957560777@163.com
* 通信作者: 伍 庆 (1970—), 男, 教授, 研究方向为分析化学。Tel: 13984029735, E-mail: wq0851@126.com

平喘、和胃止吐等药理活性^[7-8]；原儿茶酸及香草酸是君药广藿香，臣药陈皮、草豆蔻，佐药苍术的共同成分，具有抗氧化、促进消化液分泌、抗炎之功效^[9-13]，以上 6 种成分均与该制剂功能主治相同，但目前相关质量研究报道较少，仅对其中的橙皮苷含量进行测定^[14]。为了进一步发挥中药药效多组分间的协同作用，并保证产品质量的均一、稳定、可控^[15-17]，本实验建立 HPLC 法同时测定五味藿香片中芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、香草酸、原儿茶酸、橙皮苷、橘皮素、川陈皮素的含量，为其质量标准建立提供理论依据和实验基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪（配置在线脱气机、四元泵、自动进样器、DAD 检测器）、Agilent 色谱工作站（美国安捷伦科技公司）；CH-250 超声波清洗机（北京创新德超声电子研究所）；XS-105 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；移液枪（20~200、100~1 000 μL，德国 Eppendorf 公司）。

1.2 试药 芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷（批号 wkq16080705）对照品购自四川省维克奇生物科技有限公司；香草酸（批号 Y26M7C15276）、原儿茶酸（批号 Z30M6L1）、橙皮苷（批号 M03J8S39169）、川陈皮素（批号 H22M8K32109）、橘皮素（批号 H09M7K14409）对照品均购自上海源叶生物科技有限公司。五味藿香片（批号 20171001、20171002、20171003）购自国药集团同济堂（贵州）制药有限公司。乙腈、无水乙醇为色谱纯；甲醇、磷酸为分析纯；水为超纯水（自制）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1% 磷酸（B），梯度洗脱（0~30 min，5%~19% A；30~40 min，19%~20% A；40~50 min，20%~29% A；50~85 min，29%~54% A）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 270 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素对照品适量，甲醇溶解，制得 1.160、1.262、0.722、0.840 mg/mL 贮备液；精密称取香草酸、原儿茶酸对照品适量，无水乙醇溶解，制得 2.260、2.440 mg/mL 贮备液。精密量取各贮备液适量，甲醇稀释成含芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 0.034 8 mg/mL、橙皮苷 0.706 7 mg/mL、川陈皮素 0.101 1 mg/mL、橘皮素 0.084 mg/mL、香草酸 0.027 1 mg/mL、原儿茶酸 0.040 mg/mL 的溶液，即得。

2.2.2 供试品溶液 取片剂适量，研细后精密称取约 0.5 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 10 mL，密塞，称定质量，超声（300 W、40 kHz）30 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.3 阴性供试品溶液 按照片剂处方比例及生产工艺，分别制备缺广藿香，缺陈皮，缺广藿香、草豆蔻、陈皮、苍术的阴性供试品，按“2.2.2”项下方法制备，即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性供试品溶液各 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，发现各成分色谱峰与相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，理论塔板数均大于 5 000。色谱图见图 1。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下芹菜素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷贮备液 50、100、150、200、250 μL，置于 5 个 5 mL 量瓶中，分别加入香草酸 20、40、60、80、100 μL，原儿茶酸 25、50、75、100、125 μL，橙皮苷 4.0、3.0、2.0、1.0、0.5 mL、川陈皮素 0.1、0.4、0.7、1.0、1.3 mL、橘皮素 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mL，甲醇定容，摇匀，各取 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标（Y），各成分质量浓度为横坐标（X）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	<i>r</i>	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
芹菜素-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y = 12\,304X + 0.610\,3$	0.999 3	0.011 6~0.058 0
香草酸	$Y = 20\,761X - 1.462$	0.999 7	0.009 0~0.045 2
原儿茶酸	$Y = 9\,572.9X + 114.89$	0.999 4	0.001 2~0.061 0
橙皮苷	$Y = 7\,808.8X - 165.05$	0.999 1	0.126 2~0.901 0
川陈皮素	$Y = 22\,904X - 37.426$	0.999 5	0.014 4~0.187 7
橘皮素	$Y = 32\,252X - 45.494$	0.999 2	0.016 8~0.151 2

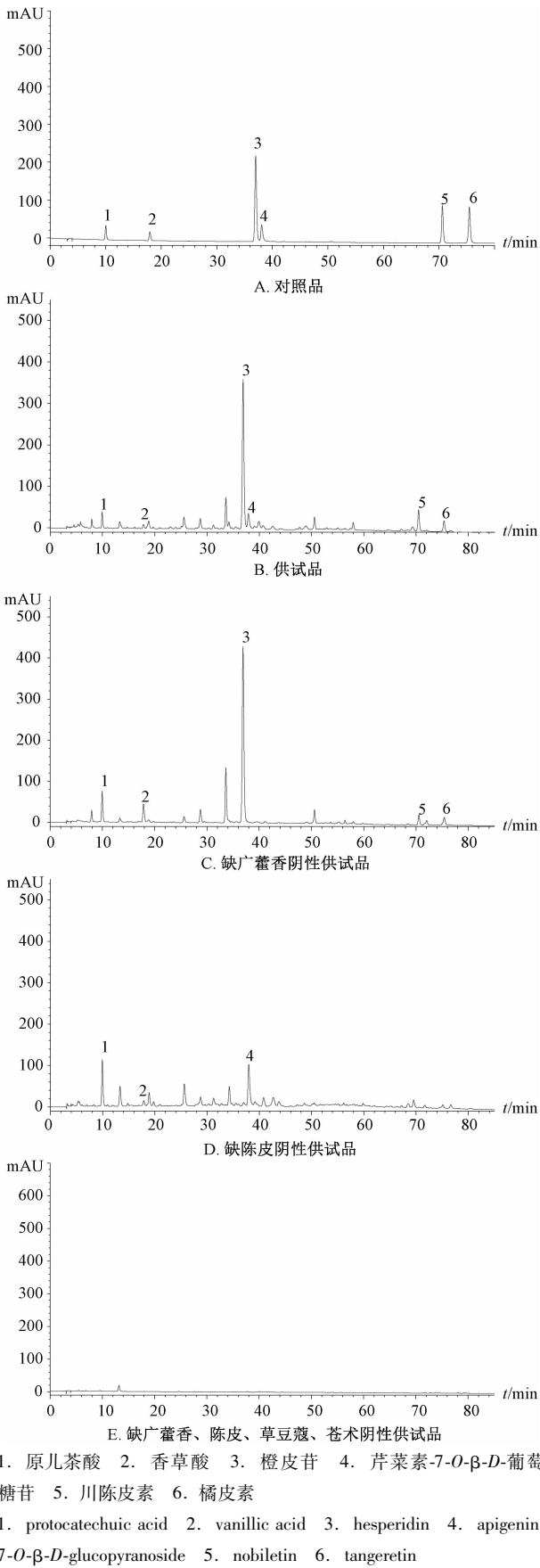


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2200

2.3.3 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 10 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、橘皮素、橙皮苷、川陈皮素、香草酸、原儿茶酸峰面积 RSD 分别为 1.1%、0.7%、1.4%、1.2%、0.9%、1.8%，表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批片剂（批号 20171001），按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、橘皮素、橙皮苷、川陈皮素、香草酸、原儿茶酸含有量 RSD 分别为 2.1%、0.7%、1.4%、2.1%、1.8%、1.1%，表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取“2.3.4”项下供试品溶液（20171001），在“2.1”项色谱条件下于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，测得芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷、橘皮素、橙皮苷、川陈皮素、香草酸、原儿茶酸峰面积 RSD 分别为 1.4%、0.9%、1.1%、1.5%、2.1%、2.3%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率实验 取含有量已知的片剂（批号 20171001）适量，研细，精密称取约 0.25 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入适量贮备液（芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷 1.160 mg/mL、香草酸 2.260 mg/mL、原儿茶酸 2.440 mg/mL、橙皮苷 1.262 mg/mL、川陈皮素 0.722 mg/mL、橘皮素 0.840 mg/mL），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，各成分平均加样回收率分别为芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷 97.8%、香草酸 97.4%、原儿茶酸 96.6%、橙皮苷 98.1%、川陈皮素 96.9%、橘皮素 97.8%，RSD 分别为 0.47%、1.67%、2.73%、0.95%、1.41%、1.12%。

2.4 样品含有量测定 取 3 批片剂，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，每批平行 3 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 2。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法选择 本实验考察了超声提取、水浴回流提取对各成分提取率的影响，发现两者无显著差异，故选择操作更简便的超声提取。再通过正交试验对提取溶剂（甲醇、乙醇、稀乙醇）、料液比（1：5、1：10、1：20）、提取时间（20、30、40 min）进行优化，最终确定为 10 mL

表 2 各成分含有量测定结果 (mg/片, n=3)

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

批号	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷	香草酸	原儿茶酸	橙皮苷	川陈皮素	橘皮素
20171001	0.150 2	0.097 0	0.159 8	3.628 1	0.370 4	0.181 5
20171002	0.150 5	0.097 4	0.158 7	3.627 3	0.369 8	0.182 1
20171003	0.150 3	0.098 0	0.156 4	3.626 7	0.368 9	0.182 3
平均值	0.150 3	0.097 5	0.158 3	3.627 4	0.369 7	0.182 0

甲醇超声 30 min。

3.2 色谱条件优化 本实验考察了流动相甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸,最终确定乙腈-0.1% 磷酸,此时各成分色谱峰分离效果最佳,而且配比简单。同时还发现,在 270 nm 波长下 6 种成分的响应值均较高,而且色谱峰峰型良好,分离度理想,故选择其作为检测波长。

3.3 检测方法选择 目前,对五味藿香片中君药广藿香的研究大多集中在采用 GC 法对不同产地药材中挥发性成分指纹图谱的质量控制,鲜有非挥发性成分黄酮苷的报道。前期课题组通过 LC-MS 法发现,黄酮苷类成分芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷为广藿香活性物质,故本实验通过 HPLC 法测定其含有量,可为更全面地控制该药材质量、挖掘其药理活性提供参考依据。

参考文献:

[1] 黄璐琦,付梅红,杨桦,等. 治疗抑郁症的药物制剂及其制备方法: 中国, CN1736472A[P]. 2006-02-22.

[2] 黄璐琦,付梅红,杨桦,等. 治疗抑郁症的药物制剂的质量控制方法: 中国, CN1824238A[P]. 2006-08-30.

[3] 石捷,陶建青,曾强,等. 解郁丸治疗轻中度抑郁症 68 例[J]. 陕西中医, 2008, 29(11): 1486-1488.

[4] 黄木土. 广藿香水提物 HPLC 指纹图谱的再研究[D]. 广州: 广东药学院, 2008.

[5] Kumar D, Bhat Z A. Apigenin 7-glucoside from *Stachys tibetica* Vatke and its anxiolytic effect in rats [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(7): 1010-1014.

[6] Miguel F G, Cavalheiro A H, Spinola N F, *et al.* Validation of a RP-HPLC-DAD method for chamomile (*Matricaria recutita*)

preparations and assessment of the marker, apigenin-7-glucoside, safety and anti-inflammatory effect[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 828437.

[7] 王春燕. 浅谈陈皮的药理作用及临床应用[J]. 中国中医药现代远程教育, 2013, 11(3): 120, 131.

[8] 郑国栋, 蒋林, 杨得坡, 等. HPLC 法同时测定不同产地广陈皮中 5 种活性黄酮成分[J]. 中草药, 2010, 41(4): 652-655.

[9] 许海森. 茅苍术水提物中 6 种单体化合物对雷公藤内酯醇减毒增效研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016.

[10] Xu G H, Chen J C, Liu D H, *et al.* Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water[J]. *J Food Sci*, 2008, 73(1): C11-C18.

[11] 唐俊. 草豆蔻和姜黄的化学成分研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2010.

[12] Harborne J B. Introduction to ecological biochemistry[M]. New York: Academic Press, 1982.

[13] Kris-Etherton P M, Hecker K D, Bonanome A, *et al.* Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer[J]. *Am J Med*, 2002, 113(Suppl 9B): 71S-88S.

[14] 付梅红, 方婧, 杨桦, 等. 郁枢达片中橙皮苷的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(24): 2671-2672.

[15] 董乙文, 李天雪, 褚朝森, 等. UPLC-MS/MS 法同时定量测定补中益气丸中的 15 种化合物[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(7): 1228-1233.

[16] 黄平, 毛坤军, 叶颖俊. HPLC 法同时测定胃肠宁片中 5 个活性成分含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1530-1534.

[17] 叶隽, 陈斌, 余岳林, 等. 高效液相色谱法同时测定清肺抑火片中 8 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 968-974.