

HPLC 法同时测定肠胃散中 5 种成分

陈 锋， 杨海船*， 何春欢， 李 嘉
(广西壮族自治区中医药研究院, 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西 南宁 530022)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定肠胃散(吴茱萸、陈皮、艾叶等)中 5 种成分的含有量。**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-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃; 检测波长 215、283 nm。**结果** 橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、吴茱萸碱、吴茱萸次碱分别在 45.16~451.6、0.244~2.444、5.07~50.7、2.036~20.36、2.579~25.79 μg/mL 范围内线性关系良好($r>0.999\ 0$), 平均加样回收率 98.85%~101.26%, RSD 0.62%~1.19%。**结论** 该方法简便准确, 重复性好, 可用于肠胃散的质量控制。

关键词: 肠胃散; 橙皮苷; 肉桂酸; 桂皮醛; 吴茱萸碱; 吴茱萸次碱; HPLC

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)02-0309-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.008

Simultaneous determination of five constituents in Changwei Powder by HPLC

CHEN Feng, YANG Hai-chuan*, HE Chun-huan, LI Jia
(Guangxi Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Guangxi Zhuang Autonomous Regional Institute for Chinese Medicine & Pharmaceutical Sciences, Nanning 530022, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of five constituents in Changwei Powder (*Euodiae Fructus*, *Citri reticulatae Pericarpium*, *Artemisiae argyi Folium*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 25 ℃ thermostatic Agilent C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.2% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 215, 283 nm. **RESULTS** Hesperidin, cinnamic acid, cinnamaldehyde, evodiamine and rutaecarpine showed good linear relationships within the ranges of 45.16–451.6, 0.244–2.444, 5.07–50.7, 2.036–20.36 and 2.579–25.79 μg/mL ($r>0.999\ 0$), whose average recoveries were 98.85%–101.26%, with the RSDs of 0.62%–1.19%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Changwei Powder.

KEY WORDS: Changwei Powder; hesperidin; cinnamic acid; cinnamaldehyde; evodiamine; rutaecarpine; HPLC

肠胃散是由肉桂叶、吴茱萸、陈皮、艾叶、砂仁、丁香、茯苓、岗松、大叶桉 9 味药材组成的外用贴剂, 具有温中散寒、燥湿止泻功效, 用于寒湿蕴结所致泄泻、腹痛肠鸣, 临床辅助治疗腹泻疗效显著, 安全性高^[1]。

中药复方虽然临床效果确切, 但其成分繁多复杂, 对单味药材或单一成分的质量控制往往不具有代表性。中药配伍有“君臣佐使”“七情合和”的

收稿日期: 2019-06-05

基金项目: 广西重点研发计划(桂科 AB16380311); 广西科技重大专项(桂科 AA17195006)

作者简介: 陈 锋(1982—), 男, 助理研究员, 从事植物化学、药物分析及工艺研究。Tel: (0771) 5868986, E-mail: 120765361@qq.com

* 通信作者: 杨海船(1986—), 男, 助理研究员, 从事植物化学、药物分析研究。Tel: (0771) 5868986, E-mail: 810040681@qq.com

概念, 复方在应用过程中常有增减调整, 药性发挥有众多因素, 量效关系成为其质量优劣的重要判定指标, 而有效成分组在一定程度上反映了中药复杂的物质基础^[2-3]。

目前, 尚无对肠胃散中成分含有量测定的研究, 难以对其质量进行准确客观的评价。因此, 本实验针对该方主要药材肉桂叶、吴茱萸、陈皮等进行考察, 其性味相近, 尤其在治疗肠胃疾病中起到明显的协同作用^[4]。同时, 桂皮醛、肉桂酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱、橙皮苷是上述药材指标性成分, 具有与功能主治相关的药理活性^[5-7], 故采用HPLC法同时测定5种成分的含有量, 以期对肠胃散质量控制提供依据。

1 材料

Waters e2695 系列四元梯度泵高效液相色谱仪, 配置PDA检测器(美国Waters公司); XS205 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); B2200S 超声波清洗器(上海必能信超声有限公司)。橙皮苷(110721-201818)、肉桂酸(110786-201604)、桂皮醛(110710-201720)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 吴茱萸碱(A0266)、吴茱萸次碱(A0267)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司。肠胃散(批号201812081、201812082、201812071、201812072、201812073、201812061、201812062、201812063、201812051、201812052)由广西源安堂药业有限公司提供。乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 水为纯净水。

2 方法与结果

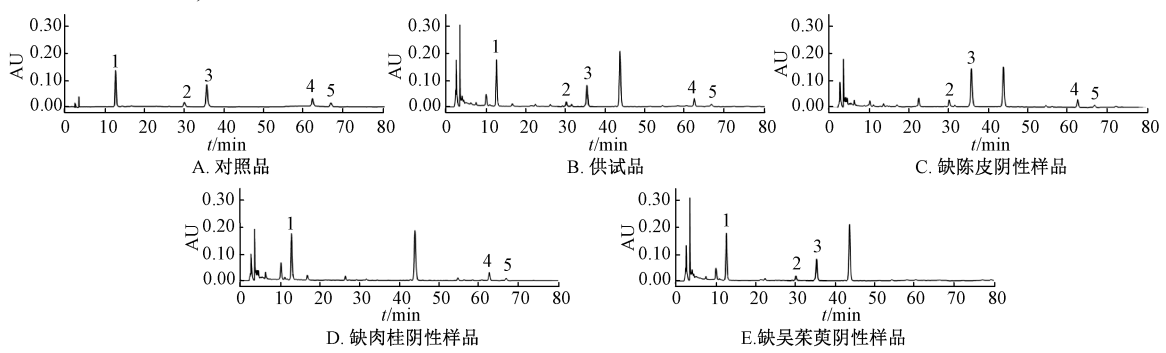
2.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.2%磷酸(B), 梯度洗脱(0~10 min, 20% A; 10~60 min, 20%~45% A, 60~80 min, 45% A); 体积流量1.0 mL/min; 0~60 min时在283 nm波长下检测橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛, 60~80 min时在215 nm波长下检测吴茱萸碱、吴茱萸次碱; 柱温25℃; 进样量10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 置于量瓶中, 甲醇溶解后定容, 即得(含橙皮苷112.90 μg/mL、肉桂酸0.61 μg/mL、桂皮醛12.68 μg/mL、吴茱萸碱5.09 μg/mL、吴茱萸次碱6.45 μg/mL)。

2.3 供试品溶液制备 精密称取本品内容物0.5 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入25 mL甲醇, 称定质量, 超声提取(80 W、50 kHz)30 min, 放冷至室温, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 上清液过滤, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性样品溶液制备 按本品处方, 分别制备不含陈皮、肉桂叶、吴茱萸的阴性样品, 按“2.3”项下方法制备, 即得。

2.5 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图1。由此可知, 各成分分离度符合要求, 理论塔板数均大于9 000, 阴性无干扰。



1. 橙皮苷 2. 肉桂酸 3. 桂皮醛 4. 吴茱萸碱 5. 吴茱萸次碱
1. hesperidin 2. cinnamic acid 3. cinnamaldehyde 4. evodiamine 5. rutaecarpine

图1 各成分HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of various constituents

2.6 线性关系考察 精密称取各对照品适量, 置于量瓶中, 甲醇溶解定容, 制成分别含橙皮苷451.60 μg/mL、肉桂酸2.444 μg/mL、桂皮醛50.70 μg/mL、吴茱萸碱20.36 μg/mL、吴茱萸次

碱25.79 μg/mL的对照品溶液, 精密移取1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL于10 mL量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标(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	<i>r</i>	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
橙皮苷	$Y=1.359\ 7\times10^4X-41\ 476$	0.999 7	45.16~451.60	
肉桂酸	$Y=2.198\ 8\times10^5X-4\ 389$	0.999 6	0.244~2.444	
桂皮醛	$Y=7.924\ 6\times10^4X-34\ 457$	0.999 7	5.07~50.70	
吴茱萸碱	$Y=9.750\ 8\times10^4X-30\ 482$	0.999 7	2.036~20.36	
吴茱萸次碱	$Y=7.068\ 5\times10^4X-15\ 111$	0.999 6	2.579~25.79	

2.7 精密度试验 精密吸取“2.2”项下对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积 RSD 分别为 0.20%、0.73%、0.30%、0.23%、0.25%, 表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一批本品(批号 201812081)

6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、吴茱萸碱、吴茱萸次碱含有量 RSD 分别为 0.59%、1.05%、1.45%、1.27%、1.15%, 表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号 201812081), 室温下分别于 0、4、8、12、16、24 h, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、吴茱萸碱、吴茱萸次碱峰面积 RSD 分别为 1.26%、1.03%、0.95%、1.14%、1.23%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10 加样回收率试验 称取含有量已知的本品(批号 201812081) 约 0.25 g, 共 6 份, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 对照品溶液, 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, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 各成分加样回收率试验结果 (*n*=6)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (<i>n</i> =6)						
成分	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/% (RSD/%)
橙皮苷	0.258 6	3.181 0	2.822 5	5.991 5	99.58	99.38 (1.17)
	0.257 3	3.165 0	2.822 5	5.994 4	100.25	
	0.251 5	3.093 7	2.822 5	5.915 1	99.96	
	0.253 7	3.120 7	2.822 5	5.882 2	97.84	
	0.254 2	3.126 9	2.822 5	5.965 8	100.58	
肉桂酸	0.251 7	3.096 1	2.822 5	5.863 5	98.05	99.22 (0.93)
	0.258 6	0.016 0	0.015 3	0.031 3	100.02	
	0.257 3	0.015 9	0.015 3	0.031 1	99.21	
	0.251 5	0.015 6	0.015 3	0.030 5	97.79	
	0.253 7	0.015 7	0.015 3	0.030 9	99.30	
桂皮醛	0.254 2	0.016 0	0.015 3	0.031 3	100.33	101.26 (0.62)
	0.251 7	0.015 6	0.015 3	0.030 6	98.66	
	0.258 6	0.334 2	0.316 9	0.653 5	100.73	
	0.257 3	0.332 6	0.316 9	0.651 4	100.63	
	0.251 5	0.325 1	0.316 9	0.647 4	101.72	
吴茱萸碱	0.253 7	0.327 9	0.316 9	0.647 2	100.76	100.22 (1.19)
	0.254 2	0.333 7	0.316 9	0.655 7	101.60	
	0.251 7	0.325 3	0.316 9	0.648 9	102.11	
	0.258 6	0.125 1	0.127 3	0.250 2	98.21	
	0.257 3	0.124 5	0.127 3	0.251 4	99.71	
吴茱萸次碱	0.251 5	0.121 7	0.127 3	0.250 3	101.02	98.85 (0.99)
	0.253 7	0.122 8	0.127 3	0.250 0	99.94	
	0.254 2	0.124 9	0.127 3	0.253 5	100.97	
	0.251 7	0.121 8	0.127 3	0.250 9	101.45	
	0.258 6	0.139 9	0.161 2	0.301 0	99.94	
	0.257 3	0.139 1	0.161 2	0.299 0	99.15	
	0.251 5	0.136 0	0.161 2	0.292 5	97.06	
	0.253 7	0.137 2	0.161 2	0.296 1	98.60	
	0.254 2	0.139 6	0.161 2	0.299 5	99.18	
	0.251 7	0.136 1	0.161 2	0.296 0	99.16	

2.11 样品含有量测定 取本品 10 批, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件

下进样测定, 计算含有量, 结果见表 3。

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=2)

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

批号	橙皮苷	肉桂酸	桂皮醛	吴茱萸碱	吴茱萸次碱
201812051	10.468 9	0.060 0	1.724 9	0.385 6	0.385 7
201812052	10.520 9	0.062 1	1.552 0	0.440 7	0.482 1
201812061	10.052 6	0.070 7	2.015 3	0.460 0	0.500 9
201812062	9.746 3	0.066 9	1.872 8	0.447 3	0.479 7
201812063	10.528 6	0.094 2	1.609 4	0.384 8	0.416 6
201812071	10.088 5	0.069 8	1.957 4	0.497 5	0.494 6
201812072	9.928 1	0.068 4	1.972 2	0.454 1	0.482 1
201812073	11.699 1	0.062 1	2.082 5	0.428 3	0.453 6
201812081	12.300 9	0.062 0	1.291 3	0.483 4	0.540 3
201812082	10.693 9	0.057 8	2.217 5	0.475 6	0.488 8
平均值	10.602 8	0.067 4	1.829 5	0.445 7	0.472 4

3 讨论

3.1 流动相选择 本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2% 磷酸,发现乙腈-0.2% 磷酸洗脱时橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛峰形及分离度较乙腈-水均有所改善,而且对吴茱萸碱、吴茱萸次碱无影响,便于检测,故选择其作为流动相^[8-10]。

3.2 检测波长选择 经全波长扫描发现,橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛对照品溶液在 283 nm 处均有较大吸收,与在各自最大吸收波长处测定的含有量差异不大,同时参考 2015 年版《中国药典》,确定其检测波长为 283 nm;根据文献 [11] 报道,确定吴茱萸碱、吴茱萸次碱检测波长为 215 nm。

3.3 提取条件选择 本实验考察了提取溶剂(甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇)和提取时间(20、30、40 min),发现以甲醇为提取溶剂时,橙皮苷、吴茱萸碱、吴茱萸次碱含有量明显升高,而其他成分无明显变化;超声提取 30、40 min 时各成分含有量变化不大,但均高于提取 20 min 时。最终确定,最优提取条件为甲醇超声提取 30 min。

4 结论

中药成分复杂,药效多样,HPLC 是最常用的分析手段^[12],故本实验采用该方法同时测定肠胃散中橙皮苷、肉桂酸、桂皮醛、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含有量,发现其简便准确,重复性好,可为该制剂质量控制提供参考。然而,该方法也有局限性,如肠胃散中含有丁香酚,它不仅具有相关药理活性,也在贴剂经皮给药过程中发挥着重要作用^[13],其含有量较高,但在复方中并无专属性,不适合 HPLC 分析。另外,肠胃散是透皮贴剂,含有多种挥发性成分,它们也是重要的药效物质,故相关研究对质量控制、透皮规律、机制阐述都有参考价值^[14]。

中药质量标准现代化、国际化对分析手段提出了更高的要求,多种评价体系被广泛应用,技术涵盖色谱、光谱、生物、代谢等多个领域,质量控制模式的多元化正成为发展方向^[15]。本实验初步体现了这一点,今后也需要研究人员继续加以探索。

参考文献:

[1] 李 刚. 肠胃散小儿外用贴剂佐治疗婴幼儿腹泻的疗效观察[J]. 临床医药文献杂志 (电子版), 2015, 2(14): 2748.

[2] 陈海锦, 陈子珺, 都广礼. 中药复方配伍规律的现代研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(12): 2835-2841.

[3] 李 镇, 容悦莹, 王淑美, 等. 中药组方配伍的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7): 223-226.

[4] 李廷保. 基于敦煌医方半夏汤与古代医籍中同名方组方配伍相关性研究[J]. 陕西中医药大学学报, 2016, 39(6): 136-139.

[5] 张 恒, 饶坤林, 向 韩. 橙皮苷药理活性研究进展[J]. 中南药学, 2016, 14(10): 1097-1100.

[6] 陈 旭, 刘 畅, 马宁辉, 等. 肉桂的化学成分、药理作用及综合应用研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(18): 2581-2584.

[7] 战光绪, 吴大正, 胡之璧. 吴茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(2): 62-64.

[8] 康四和, 周 锐, 聂 晶. HPLC 测定小儿消积止咳口服液中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量[J]. 中成药, 2010, 32(12): 2088-2091.

[9] 刘 威, 李红娟, 张 帅, 等. HPLC 测定不同商品规格桂枝中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 134-138.

[10] 吴蔚苗, 罗锦莹. UPLC 法同时测定不同产地吴茱萸中绿原酸、吴茱萸碱、吴茱萸次碱的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(24): 3446-3448.

[11] 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.

[12] 王 燕, 金 杨, 刘振琪. 中药质量标准研究中存在的问题及建议[J]. 大理学院学报, 2012, 11(12): 1-3.

[13] 孙晓彤, 刘善新, 苏 韶, 等. 丁香酚透皮吸收的研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(11): 1579-1581.

- [14] 王艳宏, 刘书博, 王 锐, 等. 中药挥发油促透皮吸收及透皮吸收作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(3): 192-199.
- [15] 陈振华, 刘苏珍, 周 斌, 等. 浅谈中药质量标准现状与几种质量评价方法[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(3): 694-696.

IP-RP-HPLC 法同时测定感冒清片中 3 种成分

朱链链¹, 王丽琼^{2*}

(1. 乐山职业技术学院, 四川 乐山 614000; 2. 乐山市食品药品检验检测中心, 四川 乐山 614000)

摘要: **目的** 建立离子对反相高效液相色谱 (IP-RP-HPLC) 法同时测定感冒清片 (南板蓝根、大青叶、对乙酰氨基酚等) 中 3 种成分的含有量。**方法** 该药物 25% 甲醇提取物的分析采用 Waters XTerra C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 215 nm。然后, 按照 2015 年版《中国药典》四部方法计算含有量均匀度。**结果** 对乙酰氨基酚、盐酸吗啉胍、马来酸氯苯那敏分别在 96.66~966.63 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、95.48~954.80 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、4.08~40.84 μg/mL ($r=1.000\ 0$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 100.9%、99.5%、99.6%, RSD 分别为 1.2%、0.9%、1.2%。**结论** 该方法简便、快速、准确, 可用于感冒清片的质量控制。

关键词: 感冒清片; 对乙酰氨基酚; 盐酸吗啉胍; 马来酸氯苯那敏; IP-RP-HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)02-0313-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.009

Simultaneous determination of three constituents in Ganmaoqing Tablets by IP-RP-HPLC

ZHU Lian-lian¹, WANG Li-qiong^{2*}

(1. Leshan Vocational and Technical College, Leshan 614000, China; 2. Leshan Food and Drug Inspection Center, Leshan 614000, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an ion-pair reverse-phase high performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC) method for the simultaneous content determination of three constituents in Ganmaoqing Tablets (*Baphicacanthis cusiae Rhizoma et Radix, Isatidis Folium, paracetamol, etc.*). **METHODS** The analysis of 25% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Waters XTerra C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.02 mol/Lpotassium dihydrogen phosphate flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 215 nm. Subsequently, the content uniformity was calculated according to Chinese Pharmacopoeia (2015 Edition, Part IV) method. **RESULTS** Paracetamol, moroxydine hydrochloride and chlorphenamine maleate showed good linear relationships within the ranges of 96.66–966.63 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 95.48–954.80 μg/mL ($r=0.999\ 8$) and 4.08–40.84 μg/mL ($r=1.000\ 0$), whose average recoveries were 100.9%, 99.5% and 99.6% with the RSDs of 1.2%, 0.9% and 1.2%, respectively. **CONCLUSION** This simple, rapid and accurate method can be used for the quality control of Ganmaoqing Tablets.

KEY WORDS: Ganmaoqing Tablets; paracetamol; moroxydine hydrochloride; chlorphenamine maleate; IP-RP-HPLC

收稿日期: 2019-05-29

作者简介: 朱链链 (1986—), 女, 硕士生, 讲师, 研究方向为药物分析。E-mail: 406083528@qq.com

* 通信作者: 王丽琼 (1986—), 女, 硕士, 主管药师, 从事药物分析及药品质量控制研究。E-mail: 527414762@qq.com