

HPLC同时测定加味香薷口服液中6种主要活性成分的含量

李柯¹, 卢茂芳^{2*}, 陈丹³, 侯茜¹, 李若存¹

(1. 湖南省中医药研究院, 长沙 410013; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208;
3. 湘潭卫医职业技术学院, 湖南湘潭 411102)

[摘要] 目的:建立同时测定加味香薷口服液(葛根、香薷、厚朴、陈皮、蚕沙、白扁豆)中葛根素、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷、大豆苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。采用 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 乙腈-0.01% 冰乙酸溶液(梯度洗脱), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 277 nm, 柱温 30 ℃。结果:葛根素、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷、大豆苷分别在 0.384~4.80 μg(*r*=0.999 3), 0.048~0.60 μg(*r*=0.999 7), 0.015 6~0.195 μg(*r*=0.999 8), 0.018 2~0.227 5 μg(*r*=0.999 2), 0.226~2.825 μg(*r*=0.999 6), 0.228~2.850 μg(*r*=0.999 5) 进样量与峰面积呈良好的线性关系;平均加样回收率分别是葛根素 97.98%, RSD 2.1%, 麝香草酚 98.88%, RSD 1.8%, 香荆芥酚 98.10%, RSD 2.1%, 和厚朴酚 100.12%, RSD 1.5%, 橙皮苷 100.40%, RSD 2.6%, 大豆苷 96.70%, RSD 1.6%。结论:该方法操作简便、稳定、重复性好,可用于加味香薷口服液中葛根素、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷、大豆苷含量的同时测定。

[关键词] 葛根素; 麝香草酚; 香荆芥酚; 和厚朴酚; 橙皮苷; 大豆苷; 高效液相色谱法; 加味香薷口服液

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0061-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200061

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1048.066.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:48

Simultaneous Determination of Six Main Active Ingredients in Jiawei Xiangru Oral Liquid by HPLC

LI Ke¹, LU Mao-fang^{2*}, CHEN Dan³, HOU Xi¹, LI Ruo-cun¹

(1. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410013, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3. Xiangtan Medical and Health Vocational and Technical College, Xiangtan 411102, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneously determining the contents of puerarin, thymol, carvacrol, honokiol, hesperidin and daidzin in Jiawei Xiangru oral liquid (Puerariae Lobatae Radix, Moslae Herba, Magnoliae Officinalis Cortex, Citri Reticulatae Pericarpium, Bombyx Mori Linnacus and Lablab Semen Alabum). **Method:** High performance liquid chromatography (HPLC) was performed on Hypersil C₁₈ chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with mobile phase of acetonitrile-0.01% glacial acetic acid (gradient elution) at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 277 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Result:** Puerarin, thymol, carvacrol, honokiol, hesperidin and daidzin showed good linear relationship between injection volume and peak area within the range of 0.384-4.800 μg (*r*=0.999 3), 0.048-0.600 μg (*r*=0.999 7), 0.015 6-0.195 0 μg (*r*=0.999 8), 0.018 2-0.227 5 μg (*r*=0.999 2), 0.226-2.825 μg (*r*=0.999 6), and 0.228-2.850 μg (*r*=0.999 5), respectively. The average recovery rate was 97.98%, 98.88%,

[收稿日期] 20170309(017)

[基金项目] 湖南省科技厅计划项目(2013FJ3049);湖南省中医药管理局中医药科研计划(201231)

[第一作者] 李柯, 硕士, 工程师, 从事中药新药研究与开发工作, Tel:0731-88807491, E-mail:17848689@qq.com

[通讯作者] * 卢茂芳, 硕士, 讲师, 从事药物化学研究工作, Tel:13507452642, E-mail:79403002@qq.com

98.10%, 100.12%, 100.40% and 96.70%, respectively for puerarin, thymol, carvacrol, honokiol, hesperidin and daidzin, with RSDs of 2.1%, 1.8%, 2.1%, 1.5%, 2.6%, and 1.6%. **Conclusion:** The method is simple, stable and reproducible, and it can be used for the simultaneous determination of puerarin, thymol, carvacrol, honokiol, hesperidin and daidzin contents in Jiawei Xiangru oral liquid.

[**Key words**] puerarin; thymol; carvacrol; honokiol; hesperidin; daidzin; HPLC; Jiawei Xiangru oral liquid

加味香薷口服液是由宋代《太平惠民和剂局方》中的香薷散(香薷、厚朴、陈皮)加葛根、蚕沙、陈皮研制的中药 6 类新药,具有解表化湿、和中止泄的功效,用于外感风寒、内伤湿浊所致的恶寒、发热、腹胀、腹痛、呕吐、泄泻、身重、乏力、头晕、头痛、鼻塞流涕等,上呼吸道感染见上述证候者。本品已获国家食品药品监督管理总局(CFDA)临床研究批件,目前正在临床进行。香薷为方中君药,所含麝香草酚、香荆芥酚是其主要有效成分,具有抗菌、抗病毒、止泻、止痛作用,近年的研究表明香薷挥发油及香荆芥酚对金黄色葡萄球菌生物被膜的形成有较强的抑制作用,对成熟的金黄色葡萄球菌生物被膜有较好的清除作用^[1-3]。葛根、厚朴为方中臣药,葛根中所含葛根素、大豆苷具有退热、止泻、镇静和使冠状动脉血流量增加的作用,对垂体后叶素引起的急性心肌出血有保护作用^[4-5];厚朴中的和厚朴酚具有抗菌、抗病毒、抗氧化及镇痛作用,能抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜的形成^[6-7]。陈皮为方中佐药,所含的橙皮苷有抗炎、抑菌、止咳祛痰、抗氧化应激、改善功能性消化不良的胃肠功能与抗过敏等作用^[8-9]。药效学研究表明本品有抗菌、抗病毒、抗炎、发汗、解热、镇咳、止泻、免疫调节作用^[10]。目前已报道对含香薷、厚朴、葛根、陈皮的复方制剂中成分含量测定的文献,多是以一类组分作为检测目标,未见同时测定多类组分含量的报道^[11-18]。本实验建立了 HPLC 同时测定加味香薷口服液中葛根素、大豆苷、橙皮苷、香荆芥酚、麝香草酚、和厚朴酚含量的方法,既能为加味香薷口服液的质量控制标准和安全性提供科学依据,也为同类中药制剂中成分含量测定方法提供参考。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括 SPD-20A 型紫外检测器),XPE105 型 1/10 万电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司),HX-06 型超声波清洗器(武汉恒信世纪科技有限公司)。

对照品葛根素(批号 110752-201514),麝香草酚(批号 100508-200902),香荆芥酚(批号 111691-

201103),和厚朴酚(批号 110730-201614),橙皮苷(批号 110721-201316),大豆苷(批号 111738-201603),均购自中国食品药品检定研究院。加味香薷口服液(本课题组自制,批号 20160905, 20160913, 20160921, 20161118, 20161125, 20161202)。实验用所有原药材均购自湖南上药九旺医药有限公司,经湖南省中医药研究院李若存研究员鉴定,蚕沙药材符合《中华人民共和国卫生部药品标准·中药材》1992 年版第一册规定,其余药材符合《中国药典》2015 年版规定。乙腈为色谱纯(美国 Tedia 公司),冰乙酸、甲醇为分析纯(长沙市汇虹化玻仪器设备有限公司),水为怡宝纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用依利特 Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈(A)-0.01% 冰乙酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0 ~ 20 min, 10% ~ 20% A; 20 ~ 30 min, 20% A; 30 ~ 35 min, 20% ~ 50% A; 35 ~ 50 min, 50% A),流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 277 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL。在上述色谱条件下,理论板数以葛根素、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷、大豆苷计不少于 2 000。

2.2 溶液的制备

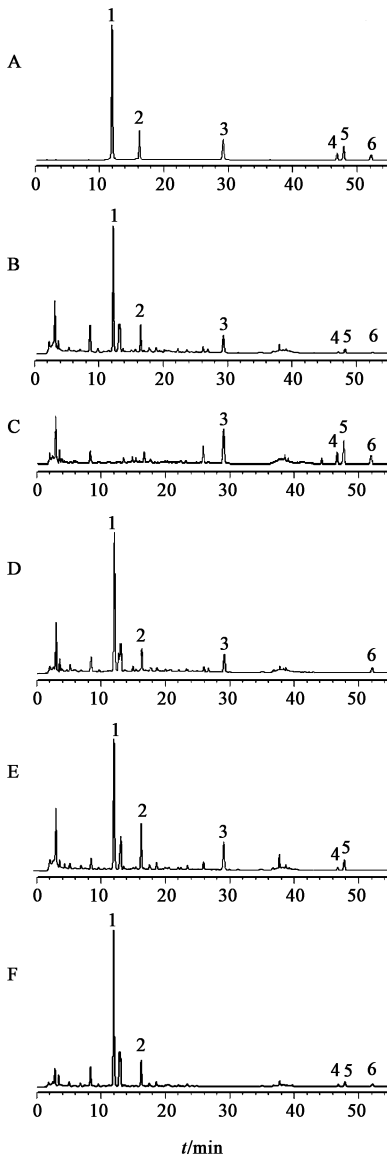
2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取葛根素 19.2 mg,大豆苷 11.4 mg,麝香草酚 12.0 mg,香荆芥酚 7.8 mg,和厚朴酚 9.1 mg,橙皮苷 11.3 mg,分别加甲醇稀释并制成每 1 mL 含葛根素 1.92 mg,大豆苷 1.14 mg,麝香草酚 0.24 mg,香荆芥酚 0.078 mg,和厚朴酚 0.091 mg,橙皮苷 1.13 mg 的对照品贮备液。

分别精密量取上述对照品贮备液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释并制成每 1 mL 含葛根素 0.192 mg,大豆苷 0.114 mg,麝香草酚 0.024 mg,香荆芥酚 0.007 8 mg,和厚朴酚 0.009 1 mg,橙皮苷 0.113 mg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取加味香薷口服液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,过滤(0.45 μm 的微孔滤膜),初滤液弃去,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按照加味香薷口服液处方、工艺制备缺香薷、缺厚朴、缺葛根、缺陈皮的阴性制剂,并按 2.2.2 项下方法分别制成缺香薷、缺厚朴、缺葛根及缺陈皮的阴性样品溶液。

2.2.4 专属性试验 分别取混合对照品溶液、供试品溶液与阴性样品溶液各 10 μL ,按 2.1 项下色谱条件进样。高效液相色谱图见图 1。阴性样品在与供试品中葛根素、大豆苷、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷相应的保留时间处无色谱峰,说明本方法专属性良好。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 缺葛根的阴性样品; D. 缺香薷的阴性样品; E. 缺厚朴的阴性样品; F. 缺陈皮的阴性样品; 1. 葛根素; 2. 大豆苷; 3. 橙皮苷; 4. 香荆芥酚; 5. 麝香草酚; 6. 和厚朴酚

图 1 加味香薷口服液 HPLC

Fig. 1 HPLC of Jiawei Xiangru oral liquid

2.3 线性关系考察 精密量取 2.2.1 项下各对照

品贮备液 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度(约相当于葛根素 0.384, 0.960, 1.920, 2.880, 3.840, 4.800 μg ; 麝香草酚 0.048, 0.120, 0.240, 0.360, 0.480, 0.600 μg , 香荆芥酚 0.015 6, 0.039 0, 0.078 0, 0.117 0, 0.156, 0.195 0 μg ; 和厚朴酚 0.018 2, 0.045 5, 0.091 0, 0.136 5, 0.182 0, 0.227 5 μg ; 橙皮苷 0.226, 0.565, 1.130, 1.695, 2.260, 2.825 μg ; 大豆苷 0.228, 0.570, 1.140, 1.710, 2.280, 2.850 μg), 摇匀, 进样 10 μL , 记录峰面积, 将进样量(X)与峰面积(Y)进行线性回归, 得回归方程葛根素 $Y = 2.46 \times 10^6 X - 6.72 \times 10^5$ ($r = 0.999 3$), 麝香草酚 $Y = 1.54 \times 10^6 X + 1.63 \times 10^3$ ($r = 0.999 7$), 香荆芥酚 $Y = 1.72 \times 10^6 X - 1.74 \times 10^3$ ($r = 0.999 8$), 和厚朴酚 $Y = 1.64 \times 10^6 X - 1.18 \times 10^4$ ($r = 0.999 2$), 橙皮苷 $Y = 1.71 \times 10^6 X - 3.09 \times 10^4$, ($r = 0.999 6$), 大豆苷 $Y = 1.67 \times 10^6 X + 3.00 \times 10^4$ ($r = 0.999 5$)。结果表明葛根素、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷、大豆苷检测进样量线性范围分别为 0.384 ~ 4.800, 0.048 ~ 0.600, 0.015 6 ~ 0.195 0, 0.018 2 ~ 0.227 5, 0.226 ~ 2.825, 0.228 ~ 2.850 μg 。

2.4 精密度试验 取混合对照品溶液连续进样测定 6 次, 以葛根素、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷、大豆苷峰面积计, 结果 RSD 分别为 0.8%, 1.2%, 1.4%, 1.0%, 1.2%, 1.0%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取批号为 20160905 的加味香薷口服液, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 室温下分别放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 以葛根素、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷、大豆苷峰面积计, 结果 RSD 分别为 1.0%, 1.4%, 1.6%, 1.5%, 1.1%, 0.9%, 表明室温条件下, 供试品溶液 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验 取批号为 20160905 的加味香薷口服液, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 测定, 记录峰面积, 计算。结果, 葛根素、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷、大豆苷平均质量分数分别为 3.520, 0.220, 0.076, 0.084, 1.140, 1.120 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 分别为 1.2%, 1.3%, 1.6%, 1.6%, 1.6%, 1.5%, 表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 精密量取已知含量, 批号为 20160905 的加味香薷口服液 6 份, 每份 0.5 mL, 分别精密加入葛根素对照品溶液(1.75 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 麝香草酚对照品溶液(0.12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 香荆芥酚对照品溶

液(0.036 g · L⁻¹),和厚朴酚对照品溶液质量浓度(0.041 g · L⁻¹),橙皮苷对照品溶液(0.56 g · L⁻¹),大豆苷对照品溶液(0.55 g · L⁻¹)各 1 mL,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,计算各成分含量,并计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 加味香薷口服液中 6 种有效成分加样回收率试验

Table 1 Results of recovery test of six effective components of Jiawei Xiangru oral liquid

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率/%	RSD /%
葛根素	1.760 0	1.750 0	3.459 4	97.11	97.98	2.1
	1.760 0	1.750 0	3.442 6	96.15		
	1.760 0	1.750 0	3.511 8	100.10		
	1.760 0	1.750 0	3.467 8	97.59		
	1.760 0	1.750 0	3.439 7	95.98		
	1.760 0	1.750 0	3.526 1	100.92		
麝香草酚	0.110 0	0.120 0	0.225 8	96.50	98.88	1.8
	0.110 0	0.120 0	0.231 8	101.50		
	0.110 0	0.120 0	0.229 2	99.33		
	0.110 0	0.120 0	0.228 6	98.83		
	0.110 0	0.120 0	0.229 6	99.67		
	0.110 0	0.120 0	0.226 9	97.42		
香荆芥酚	0.038 0	0.036 0	0.073 4	98.33	98.10	2.1
	0.038 0	0.036 0	0.074 4	101.11		
	0.038 0	0.036 0	0.073 9	99.72		
	0.038 0	0.036 0	0.073 0	97.22		
	0.038 0	0.036 0	0.072 8	96.67		
	0.038 0	0.036 0	0.072 4	95.56		
和厚朴酚	0.042 0	0.041 0	0.082 9	99.76	100.12	1.5
	0.042 0	0.041 0	0.084 0	102.44		
	0.042 0	0.041 0	0.082 6	99.02		
	0.042 0	0.041 0	0.082 7	99.27		
	0.042 0	0.041 0	0.083 6	101.46		
	0.042 0	0.041 0	0.082 5	98.78		
橙皮苷	0.570 0	0.560 0	1.123 3	98.80	100.40	2.6
	0.570 0	0.560 0	1.145 2	102.71		
	0.570 0	0.560 0	1.140 4	101.86		
	0.570 0	0.560 0	1.117 2	97.71		
	0.570 0	0.560 0	1.149 5	103.48		
	0.570 0	0.560 0	1.117 8	97.82		
大豆苷	0.560 0	0.550 0	1.097 5	97.73	96.70	1.6
	0.560 0	0.550 0	1.105 6	99.20		
	0.560 0	0.550 0	1.083 4	95.16		
	0.560 0	0.550 0	1.087 8	95.96		
	0.560 0	0.550 0	1.091 9	96.71		
	0.560 0	0.550 0	1.085 0	95.45		

注:取样量均为 0.5 mL。

2.8 加味香薷口服液 6 种成分含量测定 取批号为 20160905, 20160913, 20160921, 20161118, 20161125, 20161202 的加味香薷口服液,分别测定葛根素、麝香草酚、香荆芥酚、和厚朴酚、橙皮苷、大豆苷含量,结果见表 2。

表 2 加味香薷口服液中 6 种有效成分的含量

Table 2 Determination results of six effective components in different batch number of samples g · L⁻¹

批号	葛根素	麝香草酚	香荆芥酚	和厚朴酚	橙皮苷	大豆苷
20160905	3.522	0.224	0.076	0.084	1.145	1.129
20160913	3.470	0.262	0.069	0.090	1.211	1.170
20160921	3.551	0.266	0.071	0.081	1.122	1.113
20161118	3.414	0.231	0.064	0.078	1.183	1.149
20161125	3.575	0.228	0.061	0.082	1.190	1.166
20161202	3.456	0.254	0.079	0.091	1.202	1.172

3 讨论

3.1 本研究同时测定 6 种成分 加味香薷口服液由 6 味药材组成,其制备工艺是香薷、陈皮采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,挥发油用羟丙基倍他环糊精包合;厚朴用 60% 乙醇提取;香薷、陈皮蒸馏挥发油后的药渣再与葛根、蚕沙、白扁豆用水提取。所以本研究对挥发油部分以麝香草酚、香荆芥酚为指标进行含量测定,水提部分用葛根素、大豆苷、橙皮苷为指标进行含量测定,厚朴醇提部分以和厚朴酚为指标进行含量测定,能较好地控制本品的质量。和厚朴酚与厚朴酚虽然结构相似,但和厚朴酚比厚朴酚极性大,厚朴酚提后再用水溶解时,和厚朴酚比厚朴酚转移率高,再加上厚朴药材量在本品处方中比例小,在同一条件下测定其他成分时虽然可检出厚朴酚,但含量很低,所以研究时未将厚朴酚作为本品定量指标。

3.2 检测波长的选择 加味香薷口服液成分较为复杂,本文中所测定的 6 种主要活性成分的最大吸收波长分别为葛根素 250 nm,麝香草酚 277 nm,香荆芥酚 278 nm,和厚朴酚 294 nm,橙皮苷 283 nm,大豆苷 250 nm,试验中分别采用 250,277,283,294 nm 对上述 6 种成分进行测定,结果 277 nm 波长处检出的各色谱峰灵敏度、峰型、分离度均优于其他各波长,且各成分在各自最大吸收波长下与 277 nm 测定的含量差异不大,所以 6 种成分均采用 277 nm 作为测定波长。

3.3 流动相的选择 参照《中国药典》2015 年版一部份别采用各药材项下的流动相如甲醇-水、甲醇-

乙酸-水、甲醇-0.1%甲酸水进行等度洗脱,结果葛根素与其后色谱峰分离效果不好,根据分离情况设立梯度洗脱,色谱峰峰型不好,参照文献[17],采用乙腈-0.01%冰乙酸水溶液设立梯度洗脱,各色谱峰分离效果较好,峰型良好,所以采用乙腈-0.01%冰乙酸水作为流动相。

[参考文献]

[1] 李敏,苗明三. 香薷的化学药理与临床应用特点分析[J]. 中医学报,2015,30(4):578-579.

[2] 江岁,唐华,肖深根. 香薷的临床应用研究[J]. 中医药导报,2015,21(9):95-97.

[3] 李知敏,王妹,彭亮. 江香薷挥发油的化学成分分析及其对金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制作用[J]. 食品科学,2016,37(14):138-143.

[4] 尹乐斌,夏秋良,赵良忠,等. 葛根药理作用研究进展[J]. 现代农业科技,2016(4):68-75.

[5] 李国辉,张庆文,王一涛. 葛根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(23):3156-3159.

[6] 林琳. 和厚朴酚最新药理学研究进展与评述[J]. 中药药理与临床,2011,26(1):110-113.

[7] 乔瑞红,谢鲲鹏,谢明杰. 和厚朴酚抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物被膜形成[J]. 微生物学报,2016,56(8):1266-1271.

[8] 张明智,隋海娟,张玲玲,等. 橙皮苷对功能性消化不良大鼠胃肠运动及 Chrelin 表达的影响[J]. 中药药理与临床,2014,30(2):30-34.

[9] 蒲鹏. 橙皮苷改善肥胖小鼠糖脂代谢的机制研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(17):3290-3295.

[10] 李柯,李若存,陈丹,等. 一种治疗感冒的中药组合物及其制备方法:中国,CN104523929[P]. 2015-04-22.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1726.

[12] 沈健,张诚贤. HPLC 梯度洗脱法同时测定小儿暑感宁糖浆中的香荆芥酚、麝香草酚、和厚朴酚及厚朴酚[J]. 中国药物应用与监测,2016,13(4):217-220.

[13] 刘颖新,刘利利. RP-HPLC 法测定香薷散中厚朴酚与和厚朴酚含量[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(4):59-60.

[14] 刘颖新,刘利利,孔兴欣,等. HPLC 测定香薷散中不同煎液中香荆芥酚和麝香草酚的含量及体外抗菌作用比较[J]. 药物分析杂志,2014,34(6):1006-1010.

[15] 李凤丽,高文远,李进,等. 高效液相色谱法同时测定暑热宁口服液中葛根素和氯原酸的含量[J]. 辽宁中医杂志,2015,42(1):146-148.

[16] 谢婷. HPLC 法测定复方香薷水中麝香草酚、香荆芥酚、木香烯内酯、去氢木香内酯和迷迭香酸[J]. 中成药,2014,36(6):1217-1222.

[17] 李凤丽,高文远,李进,等. 暑热宁口服液中百秋李醇、广藿香醇、香薷水中麝香草酚、香荆芥酚 GC 测定及条件的优化[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(14):65-68.

[18] 陈丹,李柯,胡慧冰,等. 高效液相色谱法测定显脉旋覆花药材中麝香草酚和异丁酸百里香酯的含量[J]. 中国民族民间医药,2012,21(21):45-46,48.

[责任编辑 顾雪竹]