

## HPLC 法同时测定香连化滞丸中 10 种成分

王晓玲<sup>1</sup>, 赵力辉<sup>2\*</sup>

1. 天津医科大学第二医院 药学部, 天津 300211

2. 中国医学科学院生物医学工程研究所, 天津 300193

**摘要:** **目的** 建立同时测定香连化滞丸中芍药苷、甘草苷、厚朴酚、阿魏酸、橙皮苷、木香烯内酯、去氢木香烯内酯、辛弗林、黄芩苷、盐酸小檗碱 10 种成分的 HPLC 方法。**方法** 采用 RP-HPLC 法, 色谱柱为 Waters Symmetry-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-水 (50 : 45 : 5, A) 和甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (4 : 96, B), 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 45 °C。**结果** 待测定的 10 种指标成分中芍药苷在 1.5~15.0 μg/mL、甘草苷在 0.5~5.0 μg/mL、厚朴酚在 1.0~10.0 μg/mL、阿魏酸在 0.5~5.0 μg/mL、橙皮苷在 12.5~125.0 μg/mL、木香烯内酯在 2.5~25.0 μg/mL、去氢木香烯内酯 2.5~25.0 μg/mL、辛弗林在 0.75~7.5 μg/mL、黄芩苷在 1.5~15.0 μg/mL、盐酸小檗碱在 0.75~7.5 μg/mL 线性关系良好; 精密度良好, RSD 均小于 2.0%; 重复性良好, RSD 均小于 2.0%; 在室温条件下 12 h 内稳定; 平均加样回收率在 98.5%~101.4%, RSD 均小于 2.0%。**结论** 方法准确、灵敏、可靠, 重现性较好, 可用于香连化滞丸的质量控制。

**关键词:** 香连化滞丸; HPLC; 芍药苷; 甘草苷; 厚朴酚; 阿魏酸; 橙皮苷; 木香烯内酯; 去氢木香烯内酯; 辛弗林; 黄芩苷; 盐酸小檗碱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)21-3190-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.011

## Simultaneous determination of ten components in Xianglian Huazhi Pill by HPLC

WANG Xiao-ling<sup>1</sup>, ZHAO Li-hui<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

2. Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of paeoniflorin, liquiritin, magnolol, ferulic acid, hesperidin, costunolide, dehydrocostus lactone, synephrine, baicalin, and berberine in Xianglian Huazhi Pill. **Methods** The chromatographic separation was achieved on a Waters Symmetry-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) column with methanol-acetonitrile-waters (50 : 45 : 5, A) and methanol-0.1% phosphoric acid (4 : 96, B) as mobile phases for gradient elution, at the flow rate of 1.0 mL/min; The column temperature was 45 °C. **Results** The results showed that the ten active components were well separated and showed good linearity, paeoniflorin (1.5—15.0 μg/mL), liquiritin (0.5—5.0 μg/mL), magnolol (1.0—10.0 μg/mL), ferulic acid (0.5—5.0 μg/mL), hesperidin (12.5—125.0 μg/mL), costunolide (2.5—25.0 μg/mL), dehydrocostus lactone (2.5—25.0 μg/mL), synephrine (0.75—7.5 μg/mL), baicalin (1.5—15.0 μg/mL), and berberine (0.75—7.5 μg/mL). The precision was good and RSD was less than 2.0%. The repeatability was good, and RSD was less than 2.0%. The stability was good in 12 h. The average recoveries were between 98.5%—101.4%, and RSD was less than 2.0%. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, credible, and repeatable. It can be applied to the quality control of Xianglian Huazhi Pill.

**Key words:** Xianglian Huazhi Pill; HPLC; paeoniflorin; liquiritin; magnolol; ferulic acid; hesperidin; costunolide; dehydrocostus lactone; synephrine; baicalin; berberine

香连化滞丸是由黄连、木香、黄芩、枳实(麸炒)、陈皮、青皮(醋炙)、厚朴(姜炙)、槟榔(炒)、滑石、白芍(炒)、当归、甘草 12 味中药组成, 方

中黄连、黄芩清热燥湿为主药; 木香、陈皮、青皮、枳实、厚朴行气止痛, 滑石清热利湿, 槟榔行气导滞共为辅药; 白术健脾燥湿, 当归养血活血为佐药;

收稿日期: 2015-06-11

作者简介: 王晓玲 Tel: 13821358873 E-mail: lingling861209@126.com

\*通信作者 赵力辉 E-mail: ZLHpumc@hotmail.com

甘草调和诸药为使药。该中成药具有清热利湿、行血化滞的功效，用于湿热凝滞引起的里急后重，腹痛下痢；分别收载于《吉林省药品标准 1977》《卫生部药品标准中药成方制剂第七册》《国家中成药标准汇编内科脾胃分册》《中国药典》2010年版第二增补本<sup>[1-4]</sup>。《国家中成药标准汇编内科脾胃分册》中采用 TLC 法测定了盐酸小檗碱；《中国药典》2010年版第二增补本中采用 HPLC 法测定了盐酸小檗碱；中药尤其是复方中药，其发挥作用的物质基础是活性物质群，经多途径的整合而发挥疗效<sup>[5]</sup>，特别是近年来对于中药的质量控制多采用 HPLC 法多指标控制的方法<sup>[6-8]</sup>。

对于香连化滞丸仅测定盐酸小檗碱的量并不能完全反映香连化滞丸的质量。为了更好地控制香连化滞丸的质量，根据组方中的中药组成，本实验采用梯度洗脱建立了同时测定香连化滞丸中芍药苷（白芍）<sup>[9]</sup>、甘草苷（甘草）、厚朴酚（厚朴）、阿魏酸（当归）、橙皮苷（陈皮、青皮）、木香烯内酯（木香）、去氢木香烯内酯（木香）、辛弗林（枳实）、黄芩苷（黄芩）、盐酸小檗碱（黄连）10种成分的 HPLC 法，所测 10 种成分的色谱峰与相邻色谱峰均能得到良好的分离，对香连化滞丸的质量控制奠定了基础。

## 1 仪器与材料

FINNIGAN 液相色谱仪，美国 Finnigan 公司；DL-360D 智能超声波清洗器，上海之信仪器有限公司；BP211D 型电子分析天平，德国 Sartorius 公司。

对照品芍药苷（批号 110736-201337，质量分数 94.9%）、橙皮苷（批号 110721-201316，质量分数 95.3%）、甘草苷（批号 111610-201106，质量分数 93.7%）、厚朴酚（批号 110729-200412，质量分数 98%）、阿魏酸（批号 110773-201313，质量分数 99.6%）、木香烯内酯（批号 111524-201208，质量分数 99.5%）、去氢木香烯内酯（批号 111514-201206，质量分数 99.5%）、辛弗林（批号 110727-201107，质量分数 99.4%）、黄芩苷（批号 110715-201318，质量分数 93.3%）、盐酸小檗碱（批号 110713-201212，质量分数 86.7%）均购于中国食品药品检定研究院。甲醇与乙腈为色谱纯，均购自美国 Fisher 公司。流动相用水为双蒸水（自制），其余试剂均为分析纯。香连化滞丸（西安正大制药有限公司，水丸，每 10 丸质量 0.3 g，批号 20130528、20130529、20130530、20130611、20130612、20130613）。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Symmetry-C<sub>18</sub>（150 mm×4.6 mm，3.5 μm）；流动相为甲醇-乙腈-水（50：45：5，A）和甲醇-0.1%磷酸水溶液（4：96，B），梯度洗脱：0~12.0 min，85% B；12.0~20.0 min，85%~55% B；20.0~28.0 min，55%~35% B；28.0~38.0 min，5% B；体积流量 1.0 mL/min；分段变波长测定：0~13.0 min 为 230 nm，13.0~16.0 min 为 316 nm，16.0~20.0 min 为 345 nm，20.0~38.0 min 为 280 nm；柱温 45 °C；进样量 10 μL。

### 2.2 对照品溶液的制备

分别称取芍药苷、甘草苷、厚朴酚、阿魏酸、橙皮苷、木香烯内酯、去氢木香烯内酯、辛弗林、黄芩苷、盐酸小檗碱对照品适量，精密称定，置于 25 mL 量瓶中，加甲醇-乙腈-水（50：45：5）至刻度，摇匀，制成质量浓度分别为 60、20、40、20、500、100、100、30、60、30 μg/mL 混合对照品溶液。混合对照品溶液色谱图见图 1。

### 2.3 供试品溶液的制备

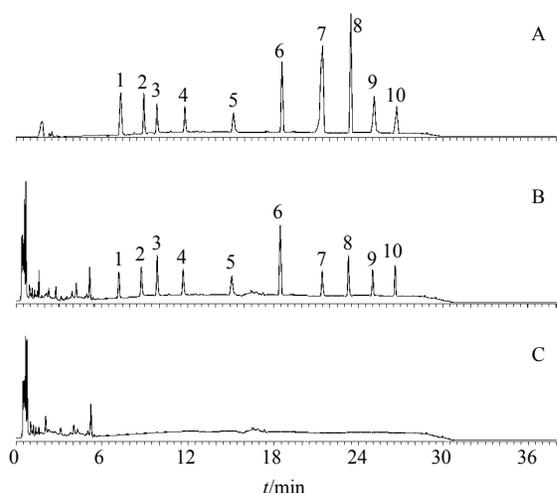
取质量差异项下的水丸，剪碎，取约 1g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入甲醇-乙醇-水（50：25：25）溶液 50 mL，称定质量，加热回流 120 min，放冷，再称定质量，用上述混合溶液补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。色谱图见图 1。

### 2.4 阴性样品溶液的制备

制备缺相应药材的阴性样品，按“2.3”项方法操作，即得。阴性样品溶液色谱图见图 1。

### 2.5 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL，分别置 10 mL 量瓶中，用甲醇-乙腈-水（50：45：5）定容至刻度，制成不同质量浓度的混合对照品溶液。分别精密吸取 10 μL，进样测定，以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行线性回归，得回归方程：芍药苷  $Y=11.451 X+265.13$ ， $r=0.999 2$ ；甘草苷  $Y=23.111 X-21.729$ ， $r=0.999 1$ ；厚朴酚  $Y=17.815 X-13.529 8$ ， $r=0.999 3$ ；阿魏酸  $Y=76.211 X+87.361$ ， $r=0.999 5$ ；橙皮苷  $Y=81.253 X-2.735 2$ ， $r=0.999 1$ ；木香烯内酯  $Y=56.238 X-34.222 9$ ， $r=0.999 5$ ；去氢木香烯内酯  $Y=11.343 X-6.246 6$ ， $r=0.999 2$ ；辛弗林  $Y=34.765 X-12.235 5$ ， $r=0.999 2$ ；黄芩苷  $Y=12.333 X+17.341$ ， $r=0.999 1$ ；盐酸小檗碱  $Y=$



1-芍药苷 2-木香烃内酯 3-去氢木香烃内酯 4-甘草苷 5-阿魏酸  
6-盐酸小檗碱 7-黄芩苷 8-橙皮苷 9-辛弗林 10-厚朴酚  
1-paeoniflorin 2-costunolide 3-dehydrocostus lactone 4-liquiritin  
5-ferulic acid 6-berberine 7-baicalin 8-hesperidin 9-synephrine  
10-magnolol

图1 混合对照品(A)、样品(B)与阴性样品(C)溶液的HPLC图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), sample (B), and negative sample (C)

56.812  $X$  - 23.482 1,  $r = 0.999 2$ ; 表明芍药苷在 1.5~15.0  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷在 0.5~5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、厚朴酚在 1.0~10.0  $\mu\text{g/mL}$ 、阿魏酸在 0.5~5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷在 12.5~125.0  $\mu\text{g/mL}$ 、木香烃内酯在 2.5~25.0  $\mu\text{g/mL}$ 、去氢木香烃内酯在 2.5~25.0  $\mu\text{g/mL}$ 、辛弗林在 0.75~7.5  $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷在 1.5~15.0  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸小檗碱在 0.75~7.5  $\mu\text{g/mL}$  线性关系良好。

## 2.6 方法学考察

**2.6.1 精密度试验** 精密吸取“2.2”项制备的混合对照品溶液 2 mL, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇-乙腈-水 (50:45:5) 定容至刻度, 制成含芍药苷 24.0  $\mu\text{g/mL}$ 、甘草苷 8.0  $\mu\text{g/mL}$ 、厚朴酚 16.0  $\mu\text{g/mL}$ 、阿魏酸 8.0  $\mu\text{g/mL}$ 、橙皮苷 200  $\mu\text{g/mL}$ 、木香烃内酯 40.0  $\mu\text{g/mL}$ 、去氢木香烃内酯 40.0  $\mu\text{g/mL}$ 、辛弗林 12.0  $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩苷 24.0  $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸小檗碱 12.0  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液。精密吸取制备的混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 进样, 连续进样 6 次, 在上述色谱条件下测定, 记录峰面积, 计算得芍药苷、甘草苷、厚朴酚、阿魏酸、橙皮苷、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、辛弗林、黄芩苷、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 1.11%、1.24%、1.42%、1.73%、1.82%、1.28%、0.95%、1.02%、1.49%、0.65%。

**2.6.2 稳定性试验** 取样品 (批号 20130521-1) 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 在上述色谱条件下测定, 结果芍药苷、甘草苷、厚朴酚、阿魏酸、橙皮苷、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、辛弗林、黄芩苷、盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 1.23%、1.62%、1.11%、0.86%、0.82%、0.91%、1.38%、0.72%、0.79%、1.24%, 表明供试品溶液中 10 种有效成分在室温条件下 12 h 内稳定。

**2.6.3 重复性试验** 取样品 (批号 20130521-1) 6 份, 按照供试品溶液制备方法制备, 在上述色谱条件下分别进样 10  $\mu\text{L}$  测定。结果供试品中芍药苷、甘草苷、厚朴酚、阿魏酸、橙皮苷、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、辛弗林、黄芩苷、盐酸小檗碱质量分数的 RSD 分别为 0.64%、0.99%、1.22%、0.85%、1.10%、1.47%、1.49%、1.45%、1.03%、0.69%。

**2.6.4 加样回收率试验** 称取批号 20130521-1 的供试品 9 份, 精密称定, 每份 1.0 g, 每 3 份加入相同量的芍药苷、甘草苷、厚朴酚、阿魏酸、橙皮苷、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、辛弗林、黄芩苷、盐酸小檗碱对照品, 按“2.3”项下方法操作, 制备供试品溶液, 按“2.1”项条件测定, 结果平均回收率分别为 98.5%、101.1%、99.5%、101.4%、101.3%、99.7%、100.9%、100.1%、99.2%、100.4%, RSD 分别为 1.21%、1.23%、1.22%、1.62%、1.51%、1.49%、1.64%、1.28%、1.78%、1.25%。

## 2.7 样品测定

取 6 批香连化滞丸, 照“2.3”项下操作制备供试品溶液, 每批平行 3 份, 精密吸取供试品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 进样, 每份进样 3 次, 计算每批样品中各成分的量, 结果见表 1。

## 3 讨论

首次建立 HPLC 同时测定香连化滞丸中 10 种活性成分的方法, 方法简便、结果可靠, 可作为香连化滞丸多指标定量测定方法, 可用于香连化滞丸的质量控制。

在选择指标成分时, 根据组成药物的单味中药中的指标成分进行了梳理, 根据《中国药典》对于每一种中药的检测指标, 白芍的指标成分为芍药苷, 木香的指标成分为木香烃内酯与去氢木香烃内酯, 当归的指标成分为阿魏酸, 甘草的指标成分为甘草苷, 陈皮与青皮的指标成分为橙皮苷, 黄芩的指标成分为黄芩苷, 厚朴的指标成分为厚朴酚, 枳实的

表1 香连化滞丸中指标性成分的质量分数 ( $n=3$ )Table 1 Contents of target components in Xianglian Huazhi Pill ( $n=3$ )

批号	质量分数/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )									
	芍药苷	甘草苷	厚朴酚	阿魏酸	橙皮苷	木香炔内酯	去氢木香炔内酯	辛弗林	黄芩苷	盐酸小檗碱
20130528	0.66	0.73	2.37	0.28	6.17	1.45	1.86	0.54	8.62	2.94
20130529	0.61	0.69	2.31	0.29	6.26	1.49	1.98	0.59	8.72	3.12
20130530	0.59	0.69	2.33	0.32	6.21	1.52	1.99	0.65	8.89	3.04
20130611	0.53	0.80	2.45	0.33	6.34	1.42	1.79	0.61	8.61	3.23
20130612	0.52	0.81	2.56	0.37	6.38	1.48	1.84	0.69	8.59	3.30
20130613	0.57	0.84	2.21	0.35	6.24	1.54	1.85	0.71	8.83	3.35

指标成分为辛弗林, 黄连的指标成分为小檗碱, 确定了芍药苷、甘草苷、厚朴酚、阿魏酸、橙皮苷、木香炔内酯、去氢木香炔内酯、辛弗林、黄芩苷、盐酸小檗碱 10 个成分控制该中成药的质量。

在提取方式上, 对提取溶剂与加热回流时间进行了较为详细的考察, 分别考察了不同比例的甲醇-乙醇-水的提取效率, 最后确定提取溶剂为甲醇-乙醇-水 (50:25:25)。同时考察了 20、40、60、120、180 min 的加热回流时间, 确定加热回流时间 120 min 较为合适。在波长选择上, 根据每个指标成分的最大吸收波长, 确定了检测波长, 用分段变波长测定药物中各个指标的量。

#### 参考文献

[1] 吉林省药品标准 [S]. 1977.

[2] 卫生部药品标准中药成方制剂第七册 [S]. 1993.

[3] 国家中成药标准汇编内科脾胃分册 [S]. 2002.

[4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[5] 安益强, 贾晓斌, 袁海建, 等. 板蓝根抗病毒物质基础研究思路 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 616-619.

[6] 郭倩, 田成旺, 朱月信, 等. HPLC 法同时测定疏风解毒胶囊中 7 种活性成分 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1174-1177.

[7] 石伟, 李家春, 刘汉清, 等. 基于多成分定量测定的六味地黄浓缩丸质量分析 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1002-1006.

[8] 陈晓虎, 苏晶, 王慧, 等. UPLC 法同时测定栀子金花丸中 11 种成分 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 955-959.

[9] 李玉仿. RP-HPLC 法测定香连化滞丸中芍药苷的含量 [J]. 天津药学, 2007, 19(3): 8-10.