

## 超高效液相色谱法同时测定藿香正气水中 7 种成分含量

刘永利, 赵振霞, 李冬梅, 冯 丽\*

(河北省食品药品检验院, 石家庄 050011)

**摘 要** 利用超高效液相色谱同时测定藿香正气水中 7 种有效成分的含量。采用 Acquity BEH C<sub>18</sub> (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 磷酸溶液线性梯度洗脱, 柱温 35 °C, 流速 0.4 mL/min, 分别在 249, 284, 336 nm 测定 7 种有效成分含量, 12 min 内完成测试。结果显示, 甘草酸、欧前胡素、异欧前胡素、橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、苍术素等 7 种成分在各自线性范围呈良好的线性关系 ( $r > 0.999\ 9$ ), 加样回收率在 96.16% ~ 103.4% 之间。

**关键词** 超高效液相色谱; 藿香正气水; 含量测定

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2013)03-0249-04

## Simultaneous determination of seven components in *Huoxiang Zhengqi* liquid by ultra-performance liquid chromatography

LIU Yongli, ZHAO Zhenxia, LI Dongmei, FENG Li\*

Hebei Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China

**Abstract** An ultra-performance liquid chromatographic method was established for the simultaneous determination of seven active compounds in *Huoxiang Zhengqi* liquid. Seven compounds were analyzed simultaneously with an Acquity BEH C<sub>18</sub> column by gradient elution using acetonitrile-0.1% phosphoric acid as the mobile phase. The column was maintained at 35 °C; the flow rate was 0.4 mL/min; the detection wavelengths were set at 249, 284 and 336 nm, respectively. Good linearity ( $r > 0.999\ 9$ ) in the range of the test concentration was observed between concentration and chromatographic response of each compound, and the average recoveries of the method were between 96.16% and 103.4%.

**Key words** ultra performance liquid chromatography; *Huoxiang Zhengqi* liquid; determination

This study was supported by the Pharmaceutical Joint Research Fund of Natural Science Foundation of Hebei Province and CSPC (No. C2011320007)

藿香正气水为夏季常用解暑药物, 源自宋代《太平惠民和剂局方》, 主要由苍术、陈皮、厚朴、白芷、茯苓、大腹皮、生半夏、甘草浸膏、广藿香油、紫苏叶油等 10 味药组成, 具解表化湿、理气和中之功效, 被历代医家誉为经典名方、“祛湿圣药”。现代药理研究表明, 厚朴酚与和厚朴酚是中药厚朴的主要成分, 具强烈的中枢抑制作用<sup>[1]</sup>; 欧前胡素与异欧前胡素为白芷中主要成分, 具镇痛、消炎等作用<sup>[2]</sup>; 陈皮中化学成分主要为橙皮苷等黄酮类成分, 具有抗休克、抗动脉硬化、疏肝利胆、抗过敏及

抗菌等作用<sup>[3]</sup>; 苍术有效成分主要为苍术酮、苍术素等倍半萜与聚乙烯炔类等<sup>[4]</sup>; 甘草主要成分为甘草酸等三萜皂苷类化合物和甘草素等黄酮类化合物, 具有抗感染、抗病毒等作用<sup>[5]</sup>。为保证临床疗效, 需对其中多种有效成分含量进行测定, 目前关于藿香正气水中有效成分含量测定的文献报道较多<sup>[6-8]</sup>, 主要采用高效液相色谱法或气相色谱法, 未见采用超高效液相色谱法 (UPLC) 的报道。本文利用 UPLC 快速、分离度好、灵敏度高的特点, 在 12 min 内同时测定了其中 7 种有效成分含量,

\* 收稿日期 2012-11-29 通信作者 Tel: 0311-85210960 E-mail: jianyan882@sohu.com

基金项目 河北省自然科学基金-石药集团医药联合研究基金资助项目 (No. C2011320007)

大大提高了检验效率,节约了检验时间与成本。

## 1 材料

### 1.1 试剂与药品

甘草酸铵、欧前胡素、异欧前胡素、橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、苍术素等7种对照品均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为110731-201116、110826-201013、110827-201109、110721-201014、110729-200412、110730-201112、111924-201102。乙腈为色谱纯,水为去离子水,其他试剂均为分析纯。藿香正气水样品购自药店,为河北、北京、云南、四川、湖北等5个省市的11个药品生产企业生产。

### 1.2 仪器

Acquity UPLC 超高效液相色谱仪及附件(美国 Waters 公司);AE 240 电子天平(瑞士 Mettler 公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity BEH  $C_{18}$  (2.1 mm × 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈(A)与0.1%磷酸溶液(B)梯度洗脱:0~1 min, A 5%, 1~4 min, A 5%→35%, 4~6 min, A 35%→40%, 6~12 min, A 40%→75%;检测波长:249 nm(甘草酸、欧前胡素、异欧前胡素)、284 nm(橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚)、336 nm(苍术素);柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ ;流速:0.4 mL/min;进样量:2  $\mu\text{L}$ 。此条件下各色谱峰分离良好,见图1。

### 2.2 溶液制备

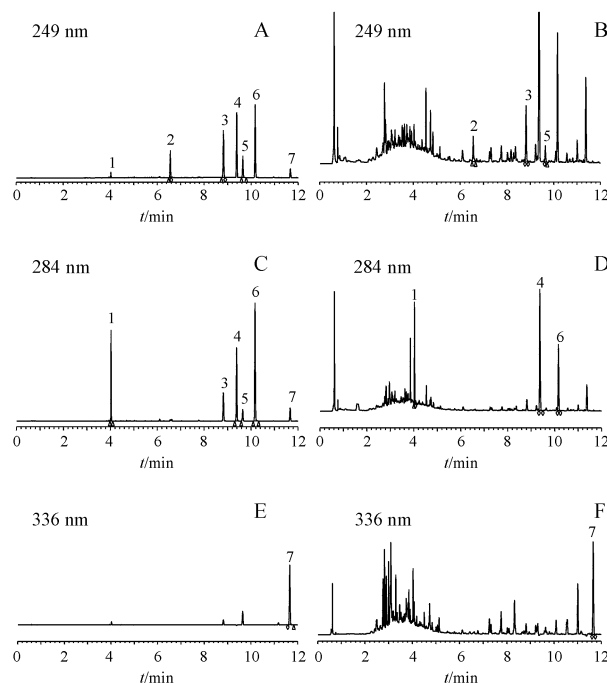
2.2.1 混合对照品溶液制备 取甘草酸铵(每克甘草酸铵相当于甘草酸1.0207 g)、欧前胡素、异欧前胡素、橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚和苍术素对照品适量,精密称定,加甲醇制成每毫升含甘草酸60  $\mu\text{g}$ 、欧前胡素20  $\mu\text{g}$ 、异欧前胡素10  $\mu\text{g}$ 、橙皮苷60  $\mu\text{g}$ 、厚朴酚0.2 mg、和厚朴酚0.1 mg、苍术素

10  $\mu\text{g}$ 的混合溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液制备 精密量取本品10 mL,置25 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用0.2  $\mu\text{m}$ 滤膜滤过,即得。

### 2.3 标准曲线与检测限

分别配制上述7种对照品不同浓度的系列溶液,精密吸取2  $\mu\text{L}$ ,进样测定,以浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。分别取各对照品溶液,用甲醇依次稀释制成一系列由高到低的梯度浓度溶液,测定峰面积为噪音3倍( $S/N=3$ )时进样浓度为检出限(LOD),结果见表1。



**Figure 1** UPLC chromatograms of mixed standards (A, C, E) and Huoxiang Zhengqi liquid (B, D, F)

1: Hesperidin; 2: Glycyrrhizic acid; 3: Imperatorin; 4: Honokiol; 5: Isoimperatorin; 6: Magnolol; 7: Atretylodine

**Table 1** Linear relation between peak area(A) and concentration(c)

Component	Regression equation	r	Linear range/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	LOD/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Glycyrrhizic acid	$A = 4.131 \times 10^3 c + 7.231 \times 10^3$	0.999 9	3.919-391.9	0.3
Imperatorin	$A = 2.504 \times 10^4 c + 6.172 \times 10^3$	0.999 9	1.263-101.1	0.1
Isoimperatorin	$A = 2.021 \times 10^4 c - 16.69$	0.999 9	1.278-102.3	0.05
Hesperidin	$A = 9.195 \times 10^3 c - 21.21$	0.999 9	5.627-225.1	0.1
Magnolol	$A = 7.798 \times 10^3 c + 50.11$	0.999 9	9.118-291.8	0.1
Honokiol	$A = 7.554 \times 10^3 c + 17.53$	0.999 9	22.01-704.3	0.2
Atretylodine	$A = 6.493 \times 10^4 c + 40.71$	0.999 9	0.469 3-50.06	0.05

2.4 进样精密度

分别精密吸取混合对照品溶液 2 μL,连续进样 6 次,甘草酸、欧前胡素、异欧前胡素、橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、苍术素峰面积的 RSD(%) 分别为 0.3,0.5,0.5,0.8,0.6,0.9,0.7,表明精密度良好。

2.5 重复性

按“2.2.2”方法平行制备 3 种浓度(取样量分别为 5,10,15 mL)9 份供试品溶液,测定 7 种成分含量,结果甘草酸、欧前胡素、异欧前胡素、橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、苍术素含量 RSD(%) 分别为 1.3,1.1,1.3,1.5,1.5,2.2,1.2,表明重复性良好。

2.6 稳定性

取同一份供试品溶液,分别在 0,1,2,3,6,12 h 进样测定,结果甘草酸、欧前胡素、异欧前胡素、橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、苍术素峰面积 RSD(%) 分别为 0.6,0.8,1.0,0.7,0.8,0.8,0.9,表明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.7 加样回收率

取同一批供试品溶液(甘草酸、欧前胡素、异

欧前胡素、橙皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、苍术素含量分别为 0.191 2,0.072 13,0.030 17,0.299 2,0.671 1,1.369 4,0.038 00 mg/mL)9 份,每份 5 mL,置 25 mL 量瓶中,分别加入低、中、高 3 种浓度的对照品溶液一定量,再加甲醇至刻度,摇匀,按“2.1”项色谱条件测定,计算回收率。结果见表 2。

Table 2 Average recoveries of seven components in Huoxiang Zhengqi liquid (n=3)

Component	Average recovery/%	RSD/%
Glycyrrhizic acid	98.82	2.50
Imperatorin	100.67	0.53
Isoimperatorin	98.18	2.20
Hesperidin	99.01	2.00
Magnolol	100.87	0.80
Honokiol	100.86	2.60
Atrectylodine	98.37	0.91

2.8 样品测定

取不同企业样品,按“2.2.2”项制备供试品溶液,测定样品中 7 种成分含量,结果见表 3。

Table 3 Contents of the seven compounds in Huoxiang Zhengqi liquid (n=2)

Batch No.	c(Glycyrrhizic acid)/(μg/mL)	c(Imperatorin)/(μg/mL)	c(Isoimperatorin)/(μg/mL)	c(Hesperidin)/(μg/mL)	c(Magnolol)/(μg/mL)	c(Honokiol)/(μg/mL)	c(Atrectylodine)/(μg/mL)
144874	152	62.1	19.3	300	421	1 021	4.11
20110301	187	69.0	28.1	310	540	1 453	38.1
100805	143	103	35.9	170	363	594	9.72
100507	127	19.2	4.36	40	332	668	ND
20110204	73.0	11.4	ND	270	406	979	ND
110701	194	5.15	ND	190	273	382	ND
100703	62.0	13.6	5.01	110	338	643	1.61
110306	274	6.12	ND	250	311	561	ND
100803	21.0	15.3	5.43	70	230	339	1.62
110304	549	34.7	11.1	250	300	636	1.33
100412	15.0	9.08	ND	130	433	611	ND

ND;not detected

3 讨 论

为使各成分获得最大灵敏度与分离度,同时又简化操作,用二极管阵列检测器(PDA)对 7 种成分在 200~400 nm 范围内进行光谱扫描,根据各成分最大吸收波长与含量多少,确定各成分检测波长。分别试验了甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸溶液等不同流动相及梯度洗脱比例,结果乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱基线平稳,各色谱峰分离度好。又对柱温

25,30,35,40 ℃与流速进行了考察,结果以流速 0.4 mL/min、柱温 35 ℃条件下各色谱峰分离度好、峰形对称,理论板数均在 1×10<sup>5</sup> 以上。

中药质量评价正由单一成分定量向多指标、多成分定量方向发展<sup>[9-10]</sup>,本实验在同一色谱条件下同时测定了藿香正气水中 7 种成分含量,通过对多个厂家的样品进行测试,各待测成分均能与其他杂质有效分离,表明建立方法具有良好的重复性与适用性,可较为全面地评价藿香正气水的质量。

## 参考文献

- [1] Zhang JH, Fu WY, Mo LE. Overview of magnolia and extraction process[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2004, **15**(5):313-314.
- [2] Zhang FQ, Nie H, Wei Y, et al. Advancement in chemical and pharmacological research on Radix Angelicae Dahuricae[J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* [南京中医药大学学报(自然科学版)], 2002, **18**(3):190-192.
- [3] Zhao XY, Lu WQ. Overview of tangerine peel[J]. *China Pharm* (中国药业), 2006, **15**(15):68-70.
- [4] Chen YM, Chen J, Yu GX. Research review on chemical constituent and pharmacological action of Rhizoma Atractylodis[J]. *Acta Univ Traditi Med Sin Pharmacol Shanghai* (上海中医药大学学报), 2006, **20**(4):95-98.
- [5] Tian QL, Guan YP, Zhang B, et al. Research advances on pharmacological activities of components in licorice[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2006, **18**(2):343-347.
- [6] Lu JQ, Sun MQ, Liu Y, et al. Simultaneous HPLC determination of five components in tincture *Huoxiang Zhengqi* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, **28**(5):742-744.
- [7] Liu LG, Lu JQ, Liu ZQ, et al. Determination of liquiritin, hesperidin, honokiol and magnolol in *Huoxiangzhengqi* water by HPLC [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2006, **17**(10):1947-1948.
- [8] Li HM, Ru X, Liang Y, et al. GC fingerprint characteristics of *Huoxiang Zhengqi* solution [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, **32**(1):6-10.
- [9] Li Y, Liu SX, Zhang TJ, et al. Determination of seven components in *Maren* soft capsula by HPLC [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, **42**(5):890-892.
- [10] Dong Y, Di LQ, Zhao XL, et al. Determination of chlorogenic acid, ferulic acid, peoniflorin, and cinnamic acid in *Xueyaping* spray by HPLC [J]. *China Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, **43**(2):296-298.

## · 新药信息 ·

## 2013 年十大在研抗肿瘤药物

## 1. Ibrutinib (PCI-32765)

类别: BTK 抑制剂

药物使用范围: B 细胞癌

开发商: Pharmacyclics 公司, 强生公司 (JNJ)

## 2. Nivolumab (BMS-936559)

类别: PD-1 抑制剂

药物使用范围: 实体瘤

开发商: 施贵宝 (BMY), 小野制药

## 3. Palbociclib (PD-0332991)

类别: 细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK4 和 CDK6 抑制剂

药物使用范围: 转移性乳腺癌

开发商: 辉瑞制药

## 4. Obinutuzumab (GA101)

类别: 抗 CD20 抗体

药物使用范围: 慢性淋巴细胞性白血病

开发商: 罗氏 Glycart

## 5. Lambrolizumab (MK-3475)

类别: 抗 PD-1 抗体

药物使用范围: 黑色素瘤

开发商: 默克

## 6. LDK378

类别: 间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 选择性抑制剂

药物使用范围: 非小细胞肺癌

开发商: 诺华 (NVS)

## 7. Talimogene laherparepvec (OncoVex)

类别: 抗肿瘤病毒

药物使用范围: 黑色素瘤

开发商: Amgen 公司

## 8. Daratumumab

类别: 人源化 CD38 单抗

药物使用范围: 多发性骨髓瘤

开发商: 强生公司/杨森, Genmab 公司

## 9. Delalisib (GS-1101)

类别: PI3K 抑制剂

药物使用范围: 慢性淋巴细胞白血病和惰性非霍奇金淋巴瘤

开发商: Gilead Sciences 公司

## 10. MPDL320A

类别: PD-1 配体通路抗体

药物使用范围: 肾、肺、结肠和胃的肿瘤

开发商: 基因泰克/罗氏

(米内网)