

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.028

# 反相高效液相色谱法同时测定瓜蒌宽肠胶囊中厚朴酚、阿魏酸和延胡索乙素含量\*

高 珊, 彭丽艳, 尹树旺, 于桂兰, 王春艳

(河北省唐山市妇幼保健院药剂科, 河北 唐山 063000)

**摘要:**目的 建立同时测定瓜蒌宽肠胶囊中厚朴酚、阿魏酸和延胡索乙素3种活性成分含量的反相高效液相色谱法。方法 色谱柱为Shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温为30℃, 检测波长为297 nm, 进样量为25 μL, 流动相为乙腈(A)-0.3%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱。外标法定量。结果 厚朴酚、阿魏酸和延胡索乙素质量浓度均在0.4~20.0 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好, 平均加样回收率分别为99.05%, 99.41%, 99.89%, RSD分别为1.77%, 1.69%, 1.65% (n=6)。结论 该方法操作简单, 检测速度快, 重复性和精密度的结果准确, 可用于瓜蒌宽肠胶囊中厚朴酚、阿魏酸和延胡索乙素的含量测定。

**关键词:**反相高效液相色谱法; 瓜蒌宽肠胶囊; 厚朴酚; 阿魏酸; 延胡索乙素

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)05-0108-04

## RP-HPLC Method for Content Determination of Magnolol, Ferulic Acid and Tetrahydropalmatine in Gualou Kuanchang Capsules

GAO Shan, PENG Liyan, YIN Shuwang, YU Guilun, WANG Chunyan

(Department of Pharmacy, Tangshan Maternal and Child Health Hospital, Tangshan, Hebei, China 063000)

**Abstract: Objective** To establish a reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for determining the active components of magnolol, ferulic acid and tetrahydropalmatine in Gualou Kuanchang Capsules. **Methods** The chromatographic column was a Shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the column temperature was 30℃, the detection wavelength was 297 nm, the injection volume was 25 μL, and the mobile phase was acetonitrile (A)-0.3% phosphoric acid in water (B), gradient elution. External standard method was selected for quantitative detection. **Results** The concentrations of magnolol, ferulic acid and tetrahydropalmatine all had good linear relationships with the peak area in the range of 0.4-20.0 μg/mL, the average recoveries were 99.05%, 99.41%, 99.89%, respectively, and the RSDs were 1.77%, 1.69%, 1.65%, respectively (n=6). **Conclusion** The method is simple in operation, fast in detection speed, accurate in reproducibility and precision, which can be used for the content determination of magnolol, ferulic acid and tetrahydropalmatine in Gualou Kuanchang Capsules.

**Key words:** reverse phase high performance liquid chromatography; Gualou Kuanchang Capsules; magnolol; ferulic acid; tetrahydropalmatine

瓜蒌宽肠胶囊是我院自制制剂(冀药制字Z20051575),由瓜蒌、厚朴、延胡索、川芎、当归、莱菔子、大黄等10味药材经提取、浓缩等工艺加工制成的复方中药制剂,具有宽肠理气、除胀止痛的功效,临床常用于治疗气血失调、腑气不通所致的腹胀痛、便秘恶心及腹部手术后腹胀痛患者。方中川芎具有活血行气、祛风止痛等功效<sup>[1-4]</sup>,延胡索具有活血、行气、止痛等功效<sup>[5-8]</sup>,厚朴具有燥湿消痰、下气除满等功效<sup>[9-12]</sup>。瓜蒌宽肠胶囊虽已广泛用于我院治疗术后腹部胀痛患者,但原质量标准中无含量测定项。有关厚朴酚、阿魏酸和延胡索乙素的含量测定方法已有较多报道<sup>[13-19]</sup>,但同时测定的方法目前尚未见报道。为有效控制瓜蒌宽肠胶囊的制剂质量,本研究中建立了同时检测瓜蒌宽肠胶囊中厚朴酚、阿魏酸和延胡索乙素3种活性成分的反相高效液相色谱(RP-HPLC)法。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

岛津LC-20AD型高效液相色谱仪,配备LC-20AT泵、SL-20A自动进样器、SPD-20A紫外可见光检测器、岛津LC solution色谱工作站,UV-2501PC型紫外可见分光光度计,Shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub>液相色谱柱,均购自日本岛津公司;BP211D型电子分析天平(德国赛多利斯公司,精度为十万分之一);DL-360A型超声波清洗器(上海之信仪器公司);Milli-Q integral 5型超纯水系统(美国密理博公司)。

#### 1.2 试剂

阿魏酸对照品(批号为110773-201614,含量以99.0%计),延胡索乙素对照品(批号为110726-201819,含量以99.8%计),厚朴酚对照品(批号为110729-201714,含量以100.0%计),均购自中国食品

\*基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目[2019207]。

第一作者:高珊,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)miaobao869617@163.com。

药品检定研究院;瓜蒌宽肠胶囊(唐山市妇幼保健院制剂室制备,批号分别为180717,180905,181016,规格为每粒0.5 g);乙腈、甲醇为HPLC级(美国Tedia公司);水为超纯水(自制);磷酸为分析纯(国药集团化学试剂厂)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);检测波长:297 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:25 μL;流动相:乙腈(A)-0.3%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~7 min时18% A,7~29 min时18% A~74% A,29~30 min时74% A~18% A,30~35 min时18% A)。

### 2.2 溶液制备

对照品溶液:取阿魏酸对照品25.25 mg、延胡索乙素对照品25.05 mg、厚朴酚对照品25.0 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加95%甲醇溶解定容至刻度,摇匀,即得对照品贮备溶液(阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚质量浓度均为1.0 mg/mL)。精密量取对照品贮备溶液1.0 mL,置100 mL容量瓶中,加95%甲醇定容至刻度,摇匀,即得。阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚质量浓度均为10.0 μg/mL。

供试品溶液:取样品20粒,倒出内容物,取约1.0 g,精密称定,置25 mL容量瓶中,加95%甲醇约15 mL,超声提取约25 min(超声功率150 W,频率70 Hz),放冷,加95%甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm滤膜过滤,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按瓜蒌宽肠胶囊制备方法和药材配比比例,制备缺川芎、延胡索和厚朴的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备,即得。

### 2.3 方法学考察

专属性试验:分别取2.2项下3种溶液,按拟订色谱条件,稳定后分别进样分析,记录色谱图。结果阴性对照无干扰峰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:取2.2项下对照品贮备溶液,精密量取适量,制成阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚质量浓度

分别为0.4,1.0,2.0,5.0,10.0,20.0 μg/mL的标准曲线溶液,加95%甲醇定容至刻度,摇匀,按拟订色谱条件,稳定后分别进样分析,记录色谱图;以质量浓度(X)为横坐标、待测成分峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线。结果见表1。

表1 线性关系考察结果(n=6)

| 成分 | 回归方程                     | 范围(μg/mL) | 相关系数(r <sup>2</sup> ) |
|----|--------------------------|-----------|-----------------------|
| A  | $Y = 231.772X + 104.168$ | 0.4~20.0  | 0.999 1               |
| B  | $Y = 118.495X + 291.037$ | 0.4~20.0  | 0.999 5               |
| C  | $Y = 29.596X + 152.603$  | 0.4~20.0  | 0.999 4               |

注:A为阿魏酸,B为延胡索乙素,C为厚朴酚。下表同。

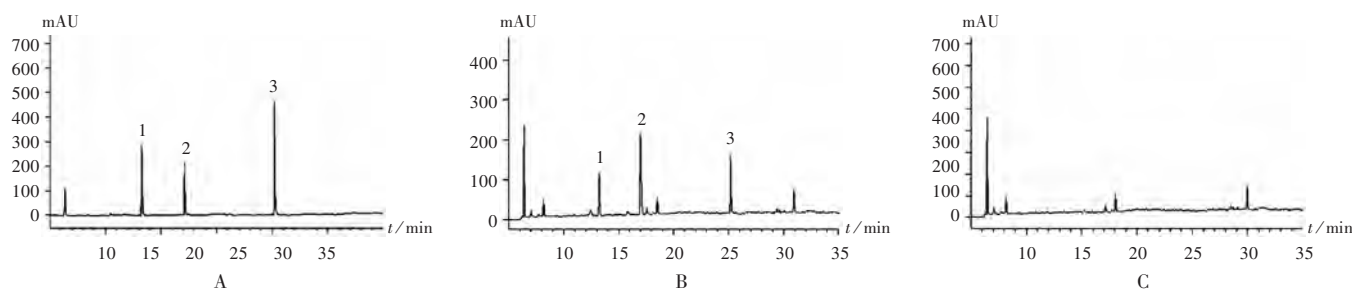
检测限和定量限考察:取2.2项下对照品溶液,逐级稀释,按拟订色谱条件,稳定后分别连续进样6次,记录色谱图。以信噪比(S/N)=3:1时计算检测限,以S/N=10:1时计算定量限。结果阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚的检测限分别为0.08,0.11,0.06 μg/mL,定量限分别为0.22,0.32,0.18 μg/mL。

稳定性试验:取同一批(批号为180717)供试品溶液,室温下放置,按拟订色谱条件分别于0,2,4,6,12,24 h时进样分析。结果阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚的峰面积的RSD分别为1.0%,1.4%,1.1%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为180717)样品,依法制备6份供试品溶液,按拟订色谱条件,稳定后分别进样分析,记录色谱图。结果阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚含量的RSD分别为3.2%,4.1%,1.9%(n=6),表明方法重复性良好。

精密度试验:取2.2项下同一对照品溶液,按拟订色谱条件,稳定后进样分析,连续进样6次,记录色谱图。结果阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚峰面积的RSD分别为1.3%,1.1%,0.8%(n=6),表明仪器精密度良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为180717)20粒,倒出内容物,取约1.0 g,精密称定,置25 mL容量瓶中,共称取6份;分别加入一定量2.2项下对照品贮备溶液,后续按供试品溶液进行处理,得样品加标溶



1. 阿魏酸 2. 延胡索乙素 3. 厚朴酚  
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

表2 加样回收试验结果( $n=6$ )

| 取样量<br>(mg) | 样品含量(mg) |         |         | 加入量(mg) |     |     | 测得量(mg) |         |         | 回收率(%) |        |        | $\bar{X}$ (%) |       |       | RSD(%) |      |      |
|-------------|----------|---------|---------|---------|-----|-----|---------|---------|---------|--------|--------|--------|---------------|-------|-------|--------|------|------|
|             | A        | B       | C       | A       | B   | C   | A       | B       | C       | A      | B      | C      | A             | B     | C     | A      | B    | C    |
| 1.024 3     | 0.573 4  | 1.103 1 | 2.147 4 | 1.0     | 1.0 | 1.0 | 1.541 1 | 2.122 3 | 3.124 2 | 96.77  | 101.92 | 97.68  |               |       |       |        |      |      |
| 1.103 1     | 0.492 2  | 1.118 2 | 2.016 8 | 1.0     | 1.0 | 1.0 | 1.486 4 | 2.115 7 | 3.021 1 | 99.42  | 99.75  | 100.43 |               |       |       |        |      |      |
| 0.998 6     | 0.528 3  | 1.057 4 | 1.993 1 | 1.0     | 1.0 | 1.0 | 1.535 3 | 2.028 4 | 2.977 7 | 100.70 | 97.10  | 98.46  | 99.05         | 99.41 | 99.89 | 1.77   | 1.69 | 1.65 |
| 0.989 2     | 0.553 5  | 1.120 3 | 1.875 7 | 1.0     | 1.0 | 1.0 | 1.544 3 | 2.106 1 | 2.874 6 | 99.08  | 98.58  | 99.89  |               |       |       |        |      |      |
| 1.005 7     | 0.519 8  | 1.081 3 | 2.077 9 | 1.0     | 1.0 | 1.0 | 1.492 2 | 2.085 6 | 3.101 2 | 97.24  | 100.43 | 102.33 |               |       |       |        |      |      |
| 1.052 9     | 0.507 6  | 1.106 2 | 1.951 3 | 1.0     | 1.0 | 1.0 | 1.518 2 | 2.092 8 | 2.956 8 | 101.06 | 98.66  | 100.55 |               |       |       |        |      |      |

液6份。按拟订色谱条件在溶液稳定后分别进样分析,记录色谱图,计算回收率。结果见表2。

#### 2.4 样品含量测定

取3批样品(批号为180717,180905,181016),依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件在溶液稳定后分别进样分析,记录色谱图,根据峰面积计算含量。结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/g)

| 批号     | 阿魏酸   | 延胡索乙素 | 厚朴酚   |
|--------|-------|-------|-------|
| 180717 | 0.513 | 1.095 | 2.134 |
| 180905 | 0.608 | 1.271 | 2.216 |
| 181016 | 0.586 | 1.185 | 2.089 |

### 3 讨论

#### 3.1 检测方法选择

中药成方制剂中常用的活性成分检测方法有滴定法、紫外可见分光光度法和液相色谱法。前两者需要对待测物质进行提纯,否则易受到其他成分的干扰,方法专属性较差,检测结果准确度偏低。HPLC法采用色谱柱进行分离,依据外标法进行定量检测,专属性强,检测结果准确度高。3种待测成分阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚均具有较强的紫外吸收,故选择液相色谱法最适宜。

#### 3.2 检测波长选择

取阿魏酸对照品10 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加95%甲醇溶解定容至刻度,精密移取1.0 mL上述溶液,置10 mL容量瓶中,加95%甲醇定容至刻度,摇匀,得阿魏酸检查溶液;同法配制延胡索乙素和厚朴酚检查溶液。上述溶液在190~400 nm波长范围内进行光谱扫描,结果阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚最大吸收波长分别在319,280,293 nm附近。为使3种待测物具有良好的响应,最终确定检测波长为297 nm。试验证明,选择297 nm作为检测波长时,3种待测成分响应良好,定量结果准确。

#### 3.3 流动相选择

分别考察甲醇-水、甲醇-0.3%磷酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.3%磷酸水溶液作为流动相体系,保持拟订色谱条件不变,对对照品溶液和供试品溶液进行洗脱,考察3种待测物分离效果和分离时间。结果采用甲醇-

水和甲醇-0.3%磷酸水溶液体系时,厚朴酚保留时间较长,检测效率偏低;采用乙腈-水体系时,厚朴酚出现峰分叉现象;采用乙腈-0.3%磷酸水溶液体系时,3种待测成分分离效果良好,峰形尖锐,定性定量结果准确。故选择乙腈-0.3%磷酸水溶液作为流动相体系。

#### 3.4 提取方法优化

试验中分别选择甲醇、95%甲醇、75%甲醇和50%甲醇作为提取溶液,对样品中阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚的提取效果进行了比较。结果以95%甲醇作为提取溶剂时,阿魏酸、延胡索乙素和厚朴酚的提取效果最佳,最终确定采用95%甲醇作为提取溶剂。

#### 参考文献:

- [1] 华芳,赵玉玲,李莞,等.川芎及其中成药抗凝血作用测定方法的研究[J].中草药,2019,50(7):1698-1702.
- [2] 张培,赵林华,张海宇,等.川芎临床应用及其用量[J].吉林中医药,2019,39(3):309-312.
- [3] 赵凌云.中药川芎的鉴定及临床安全用药研究进展[J].中国处方药,2019,17(4):20-21.
- [4] ZHANG X, HAN B, FENG ZM, et al. Ferulic acid derivatives from *Ligusticum chuanxiong*[J]. Fitoterapia, 2018, 12(5):147-154.
- [5] 尚坤,李敬文,常美月,等.延胡索药理作用研究[J].吉林中医药,2019,39(1):108-110.
- [6] 马宁宁,李欣,金华,等.延胡索不同提取物抗炎作用的谱效关系及机制研究[J].中草药,2019,50(10):2413-2419.
- [7] 宋洪伟,毛睿,李丽红,等.延胡索炮制前后多组分质量控制方法的研究[J].天津中医药大学学报,2019,38(1):63-67.
- [8] TAN CN, ZHANG Q, LI CH, et al. Potential target-related proteins in rabbit platelets treated with active monomers dehydrocorydaline and canadine from *Rhizoma corydalis*[J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2019, 54(11):231-239.
- [9] 罗斯满,杜刚,泽郎哈姆,等.厚朴酚对胃癌细胞增殖及凋亡的影响及机制研究[J].中华普外科手术学杂志:电子版,2019,13(3):259-261.
- [10] 张晓文,范娜,郭耀东,等.厚朴酚对高脂饮食诱导的动脉粥样硬化大鼠脂代谢和免疫反应的调节作用[J].中国临床药理学杂志,2019,35(7):647-650.
- [11] 任珊,宫蕊,杜全胜,等.厚朴排气合剂对腹腔感染术后患者胃肠功能恢复的影响研究[J].现代中西医结合杂志,