

HPLC 法同时测定厚朴排气合剂中 和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚的含量

杨佩磊¹, 蔡咏梅²

(1. 浙江大学医学院附属妇产科医院药剂科, 杭州 310000; 2. 桐乡市第一人民医院药剂科, 桐乡 314500)

摘要 目的: 建立 HPLC 法同时测定厚朴排气合剂中和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚。方法: 采用 Synchronis C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇 (A)–0.1% 磷酸水 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~15 min, 80%A → 85%A; 15~40 min, 85%A → 95%A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。结果: 和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚的保留时间分别为 13.1、19.0、24.1 和 32.1 min, 线性范围分别为 0.73~8.76、1.06~12.69、0.09~1.04、0.29~3.48 mg·mL⁻¹; 平均回收率分别为 100.1%、105.2%、103.2% 和 97.5%, RSD 分别为 5.7%、3.4%、6.0% 和 2.3%。5 批厚朴排气合剂中和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚含量分别为 17.26~18.05、25.34~26.11、2.01~2.10 和 1.72~1.81 mg·mL⁻¹。结论: 本法可为厚朴排气合剂的质量控制提供参考。

关键词: 厚朴排气合剂; 厚朴; 木香; 枳实; 大黄; 和厚朴酚; 厚朴酚; 大黄素; 大黄酚; 含量测定; 高效液相色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 05-0922-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.05.26

Simultaneous determination of honokiol, magnolol, emodin and chrysophanol in Houpopaiqi mixture by HPLC

YANG Pei-lei¹, CAI Yong-mei²

(1. Department of Pharmacy, Women's Hospital School of Medicine Zhejiang University, Hangzhou 310000, China;

2. Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Tongxiang, Tongxiang 314500, China)

Abstract Objective: To study an HPLC method for simultaneous determination of honokiol, magnolol, and chrysophanol in Houpopaiqi mixture by HPLC. **Methods:** The chromatographic separation was performed on a Synchronis C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with the mobile phase of methanol (A)–0.1% aqueous phosphoric acid (B) by gradient elution (0–15 min, 80%A → 85%A; 15–40 min, 85%A → 95%A). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 254 nm. The column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results:** The retention time of honokiol, magnolol, emodin and chrysophanol were 13.1, 19.0, 24.1 and 32.1 min, respectively; the linear ranges were 0.73–8.76 mg·mL⁻¹, 1.06–12.69 mg·mL⁻¹, 0.09–1.04 mg·mL⁻¹ and 0.29–3.48 mg·mL⁻¹, respectively; the recoveries were 100.1%, 105.2%, 103.2% and 97.5% and the RSDs were 5.7%,

3.4%, 6.0% and 2.3%, respectively. The contents of honokiol, magnolol, emodin and chrysophanol in 5 Houpopaiqi mixture were 17.26–18.05 mg · mL⁻¹, 25.34–26.11 mg · mL⁻¹, 2.01–2.10 mg · mL⁻¹ and 1.72–1.81 mg · mL⁻¹, respectively. **Conclusion:** The method can be used as a reference for the quality control of Houpopaiqi mixture.

Keywords: Houpopaiqi mixture; Magnoliae Officinalis Cortex; Aucklandiae Radix; Aurantii Immaturus Fructus; Rhei Radix et Rhizoma; honokiol; magnolol; emodin; chrysophanol; content determination; HPLC

厚朴排气合剂收载于国家药品标准《新药转正标准第 82 册》^[1],其处方组成为厚朴、木香、枳实和大黄,具有行气消胀、宽中除满的功效,临床常用于腹部非胃肠吻合术后早期肠麻痹,症见腹部胀满,胀痛不适,腹部膨隆,无排气排便,舌质淡红,舌苔薄白或薄腻^[2,3]。厚朴排气合剂的标准目前仅为薄层鉴别和大黄的含量测定项,对君药厚朴没有进行相关规定^[4]。国家食品药品监督管理局于 2009 年向生产企业下发的药品标准颁布件中,仅对厚朴的和厚朴酚与厚朴酚进行了含量规定,未对其他成分有要求,在厚朴排气合剂的质量控制上存在一定的缺陷,而 2015 年中国药典也未收载该品种,因此建立厚朴排气合剂主要成分检测方法对控制成药质量势在必行。厚朴主含和厚朴酚与厚朴酚,是厚朴排气合剂理气作用的主要有效成分^[5],大黄中的大黄素和大黄酚是排气排便的主要成分^[6-7],本文拟采用 HPLC 法同时检测厚朴排气合剂中的上述 4 种成分,为厚朴排气合剂的质量控制提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱仪,安捷伦科技公司; OV-2001 柱温箱,赛默飞世尔科技公司; Synchronis C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 填料: 十八烷基硅烷基键合硅胶) 色谱柱, Thermo 公司; XS-205 电子分析天平,梅特勒-托利多公司; AS3120A 型超声提取器,天津奥特赛恩斯仪器有限公司; 3K15 离心机, Sigma 公司。

1.2 试药

对照品和厚朴酚(批号 110730-20020)、厚朴酚(批号 110729-20020)、大黄素(批号 110756-200110)和大黄酚(批号 110796-201017)均由中国食品药品检定研究院提供。厚朴排气合剂,规格为每瓶 50 mL,国药准字 Z20050563,瑞阳制药有限公司生产,批号 15011501、15012301、15060801、15080301 和 15101601。甲醇为色谱纯、磷酸和乙酸乙酯均为分析

纯,重蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Synchronis C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.1% 磷酸水(B),梯度洗脱(0~15 min, 80%A → 85%A; 15~40 min, 85%A → 95%A); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 254nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取由五氧化二磷减压干燥至恒重的和厚朴酚、厚朴酚、大黄素与大黄酚的对照品适量,置于 50 mL 棕色量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含和厚朴酚 194.67 mg,厚朴酚 282.00 mg,大黄素 23.07 ng 和大黄酚、77.33 mg,即得混合对照品储备液。精密量取储备液 3 mL,置于 20 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含和厚朴酚 29.20 mg,厚朴酚 42.31 mg,大黄素 3.46 mg 和大黄酚 11.61 mg 的混合对照品溶液。对照品储备液及混合对照品溶液均置于 4 °C 冰箱密闭保存。

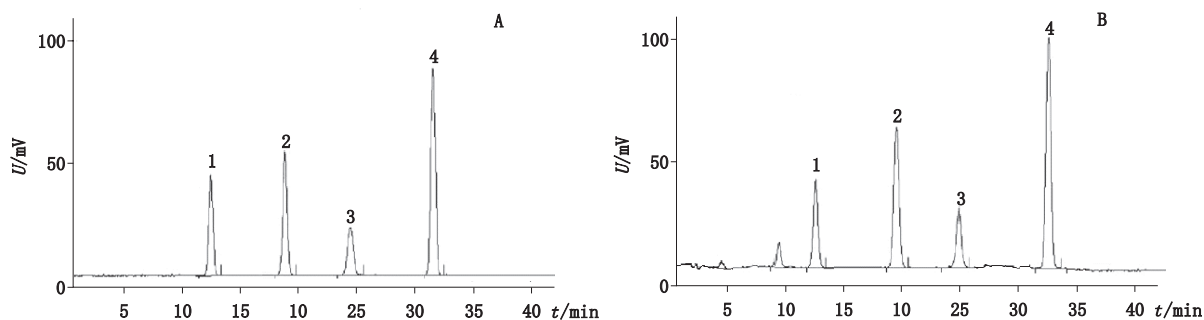
2.2.2 供试品溶液 取厚朴排气合剂 5 mL,用乙酸乙酯振摇提取 3 次,每次 10 min,每次用乙酸乙酯 20 mL,合并乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至 20 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 专属性

取混合对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,按上述色谱条件,进行 HPLC 分析,和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚的保留时间分别为 13.1、19.0、24.1 和 32.1 min,见图 1。

2.4 线性关系考察

精密量取混合对照品储备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 和 6.0 mL,分别置于 20 mL 量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,记录色谱图,以质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标作图,进行线性回归,结果见表 1。



1. 和厚朴酚 (honokiol) 2. 厚朴酚 (magnolol) 3. 大黄素 (emodin) 4. 大黄酚 (chrysophanol)

图1 混合对照品 (A) 及厚朴排气合剂 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed reference substances (A) and Houpopaiqi mixture (B)

表1 回归方程、相关系数 (r) 及线性范围

Tab. 1 The regression equations, correlation coefficients (r) and linear ranges

待测物 (reference substance)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
和厚朴酚 (honokiol)	$Y=479.5X-24.9$	0.999 0	0.73~8.76
厚朴酚 (magnolol)	$Y=438.6X-61.4$	0.999 0	1.06~12.69
大黄素 (emodin)	$Y=6.215 \times 10^3 X+514.7$	0.999 5	0.09~1.04
大黄酚 (chrysophanol)	$Y=6.987 \times 10^3 X-467.3$	0.999 5	0.29~3.48

2.5 精密度试验

将混合对照品溶液连续进样 5 次, 记录色谱图, 记录和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚的峰面积并计算 RSD, 结果分别为 3.2%、3.1%、3.2% 和 2.8%, 表明精密度较好。

2.6 稳定性试验

取批号为 15011501 的厚朴排气合剂制成供试品溶液, 每隔 1 h 进样 1 次, 获得 6 次进样的和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚峰面积, 计算 RSD 分别为 3.2%、3.1%、3.4% 和 2.9%, 表明供试品溶液中稳定性较好。

2.7 重复性试验

取批号为 15011501 的厚朴排气合剂 5 份, 按“2.2.2”项下方法操作, 进样测定和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚峰面积, 计算平均含量分别为 17.26、25.41、2.01 和 1.81 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 分别为 3.1%、3.0%、3.2% 和 2.6%, 表明本法的重复性较好。

2.8 加样回收率试验

分别精密量取批号为 15011501 的厚朴排气合剂 4 份各 1 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 分别精密加入和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚的混合对照品溶

液 (和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚的浓度分别为 1.46、2.12、0.17 和 0.87 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1.0、3.0 和 5.0 mL, 各 2 份, 用溶剂稀释至刻度, 混匀, 每个溶液连续进 3 次, 测定和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚加样回收率, 结果见表 2。

2.9 含量测定

取 5 个批号的厚朴排气合剂, 分别按“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 进样测定, 以回归方程计算含量, 结果见表 3。

3 讨论

3.1 流动相的选择

等度洗脱很难将和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚 4 种极性有差别的成分同时分离, 因此采用梯度洗脱。依据大黄和厚朴中有效成分的分离文献^[8-12], 分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸水、甲醇-0.1% 醋酸、乙腈-1% 醋酸及乙腈-0.2% 磷酸梯度洗脱法, 结果显示采用甲醇-0.1% 磷酸水的梯度洗脱法, 各个峰的分离效果较好, 分离度均 >1.5 。

3.2 检测波长的选择

参考文献^[13-15]并结合和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚 4 个化合物的全波长扫描, 分析在 324、

表 2 和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚回收率

Tab. 2 The recovery of honokiol, magnolol, emodin and chrysophanol

成分 (compound)	加入量 (added content)/mg	检测量 (detected content)/mg	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
和厚朴酚 (honokiol)	1.46	1.56	100.1	5.7
	4.38	4.26		
	7.30	7.06		
厚朴酚 (magnolol)	2.12	2.31	105.2	3.4
	6.35	6.48		
	10.58	11.06		
大黄素 (emodin)	0.17	0.19	103.2	6.0
	0.52	0.51		
	0.87	0.87		
大黄酚 (chrysophanol)	0.58	0.58	97.5	2.3
	1.74	1.68		
	2.90	2.78		

表 3 5 批样品含量测定结果 (mg · mL⁻¹)

Tab. 3 Determination results of 5 samples

批号 (lot No.)	和厚朴酚 (honokiol)	厚朴酚 (magnolol)	大黄素 (emodin)	大黄酚 (chrysophanol)
15011501	17.26	25.41	2.01	1.81
15012301	17.34	26.04	2.08	1.75
15060801	18.05	25.34	2.10	1.72
15080301	17.68	26.11	2.06	1.72
15101601	18.02	25.39	2.07	1.78

262 和 254 nm 波长处各色谱峰的强度,结果显示 4 个化合物的色谱峰在 254 nm 处均有较大吸收,因此选择 254 nm 为检测波长。

3.3 提取溶剂的选择

分别考察以甲醇、乙醇、含水甲醇、含水乙醇及乙酸乙酯为提取溶剂的提取效果,结果采用乙酸乙酯提取的杂质峰较少,有效去除干扰成分,且不影响 4 个待测物的测定,因此选择乙酸乙酯为厚朴排气合剂的提取溶剂。

3.4 小结

目前公开的厚朴排气合剂的质量控制仅见于

厚朴的和厚朴酚与厚朴酚含量测定,2015 年版中国药典也未对厚朴排气合剂进行相关的质量规定,而本品在消化外科应用较广,因此有必要提高该制剂的质量标准,从有效成分的含量切入常常是质量标准提高的重要研究部分。本课题检测了上市品种的 5 批厚朴排气合剂中和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚含量,结果显示各批次的上述 4 个成分均可检测到,方法回收率高,重复性好,可见 HPLC 同时检测厚朴排气合剂中的和厚朴酚、厚朴酚、大黄素和大黄酚成分是可行性的,本法可为厚朴排气合剂、原材料或中间品的质量控制标准的建立提供参考。

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局. YBZ20442005-2009Z 厚朴排气合剂标准. 新药转正标准第 82 册[S]. 2009: 84
State Food and Drug Administration. YBZ20442005-2009Z Standard of Houpopaiqi mixture. Standardization for New Drugs. No. 82[S]. 2009: 84
- [2] 马士存,李云云,杜明芬. 厚朴排气合剂的临床应用[J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(5): 84
MA SC, LI YY, DU MF. The clinical application of Houpopaiqi mixture[J]. Res Pract Chin Med, 2014, 28(5): 84
- [3] KIM BM, LEE SB, KIM JY, *et al.* A multivariate receptor modeling study of air-borne particulate PAHs: Regional contributions in a roadside environment[J]. Chemosphere, 2016, 144(2): 1270
- [4] 田金苗. 厚朴排气合剂 HPLC 指纹图谱的建立[J]. 中国药师, 2014, 16(3): 389
TIAN JM. Establishment of HPLC fingerprint of Houpopaiqi mixture[J]. China Pharm, 2014, 16(3): 389
- [5] 李健. 中药材厚朴治疗肠麻痹的疗效观察及药理分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(1): 185
LI J. Study on houpo in treatment of intestinal paralysis and pharmacological effect[J]. World Latest Med Inf, 2016, 16(1): 185
- [6] 于建玉,廖欣,丁厚伟,等. 中药大黄药理作用研究进展及其临床应用[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(11): 286
YU JY, LIAO X, DING HW, *et al.* The pharmacological effects of traditional Chinese medicine rhubarb research progress and its clinical application[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2016, 10(11): 286
- [7] ARVINDEKAR A, MORE T, PAYGHAN PV, *et al.* Evaluation of anti-diabetic and alpha glucosidase inhibitory action of anthraquinones from Rheumemodi[J]. Food Funct, 2015, 6(8): 2693
- [8] 弓晓东,谈瑄忠,毛春芹,等. RP-HPLC 法同时测定大黄厚朴颗粒中 7 种成分[J]. 中成药, 2012, 35(3): 479

- GONG XD, TAN XZ, MAO CQ, *et al.* Simultaneous determination of 7 components in Dahuang Houpu granules by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 2012, 35(3): 479
- [9] 杨跃华, 胡春丽, 张洪霞, 等. RP-HPLC 法同时测定利胆排石片中 5 种有效成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(5): 373
- YANG YH, HU CL, ZHANG HX, *et al.* Simultaneous determination of 5 effective components in Lidan Paishi tablets by RP-HPLC [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2012, 29(5): 373
- [10] 经雅昆, 宋潇, 柴欣, 等. UPLC-UV-MS 法应用于胃肠安丸中 11 个活性成分的定性与定量分析[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1165
- JING YK, SONG X, CHAI X, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of 11 active ingredients in gastrointestinal pill by UPLC-UV-MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(7): 1165
- [11] 翁德会, 刘先琼, 许腊英, 等. 不同等级厚朴饮片质量评价指标的系统聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(23): 6
- WENG DH, LIU XQ, XU LY, *et al.* Systematic cluster analysis on quality evaluation index of different grades of *Magnolia officinalis* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2016, 22(23): 6
- [12] 谢剑琳, 张振秋, 梁朔, 等. HPLC 波长切换法同时测定大黄、牡丹皮药对提取物中 11 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 103
- XIE JL, ZHANG ZQ, LIANG S, *et al.* Simultaneous determination of the 11 components in the combination extracts of Rhei Radix et Rhizoma and Moutan Cortex by HPLC wavelength switching method [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(1): 103
- [13] 历淑芬, 杜伟锋, 赵耀东, 等. 大承气汤的质量控制研究[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(22): 2674
- LI SF, DU WF, ZHAO YD, *et al.* Quality control of Dachengqi decoction [J]. Chin J New Drugs, 2012, 21(22): 2674
- [14] 王婧宁, 王梦瑶, 张振秋, 等. HPLC 法同时测定大黄、厚朴药对提取物中 7 个成分的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(4): 763
- WANG JN, WANG MY, ZHANG ZQ, *et al.* Simultaneous determination of 7 components in combination extracts of Rhei Radix et Rhizoma and Magnoliae Officinalis Cortex by HPLC [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2014, 41(4): 763
- [15] 申峰云, 魏惠珍, 孙勇兵, 等. UPLC-MS/MS 同时测定大承气汤大鼠血浆中 9 种活性成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2345
- SHEN FY, WEI HZ, SUN YB, *et al.* Simultaneous determination of 9 active components of Dachengqi decoction in rat plasma by UPLC-MS/MS [J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(12): 2345

(本文于 2016 年 10 月 7 日收到)