

高效液相色谱法测定舒肝丸中木香及厚朴的 4 个特征成分

孙慧珠, 王晓蕾, 徐乐, 刘永利*

(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法同时测定舒肝丸中去氢木香内酯、木香羟内酯、和厚朴酚与厚朴酚 4 个成分的含量。**方法:** 采用 Acclaim C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 -0.05% 磷酸 (47:53) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 230 nm。**结果:** 和厚朴酚、木香羟内酯、去氢木香内酯、厚朴酚进样量分别在 0.020~0.401、0.025~0.499、0.051~1.029、0.040~0.796 μg 范围内线性关系良好, 相关系数均为 0.999 9; 平均回收率 (n=9) 分别为 99.1%、100.4%、100.8%、101.4%, RSD 分别为 1.4%、1.7%、1.7%、2.0%。10 批样品中和厚朴酚、木香羟内酯、去氢木香内酯及厚朴酚的含量范围分别为 0.058~0.400、0.105~0.280、0.200~0.568、0.229~0.816 mg · g⁻¹。**结论:** 该方法为舒肝丸的质量评价提供了更为全面的科学依据。

关键词: 舒肝丸; 去氢木香内酯; 木香羟内酯; 和厚朴酚; 厚朴酚; 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) 08-1535-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.08.27

Simultaneous determination of 4 active ingredients in Aucklandiae Radix and Magnoliae Officinalis Cortex in Shugan pills by HPLC

SUN Hui-zhu, WANG Xiao-lei, XU Le, LIU Yong-li*

(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for simultaneous determination of 4 active ingredients (dehydrocostuslactone, costunolide, honokiol, magnolol) in Shugan pills. **Methods:** The chromatographic separation was performed on an Acclaim C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with acetonitrile -0.05% phosphoric acid solution (47:53) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 230 nm. **Results:** The calibration curves were linear within the range of 0.020~0.400 μg for honokiol, 0.024~0.498 μg for costunolide, 0.051~1.029 μg for dehydrocostuslactone and 0.039~0.795 μg for magnolol. All ingredients showed a good linear relationship ($r=0.999\ 9$). The average recoveries ($n=9$) were 99.1%, 100.4%, 100.8% and 101.4%, respectively with RSDs of 1.4%, 1.7%, 1.7% and 2.0%, respectively. The contents of honokiol, costunolide, dehydrocostuslactone and magnolol in 10 samples were 0.058~0.400 mg · g⁻¹, 0.105~0.280 mg · g⁻¹, 0.200~0.568 and 0.229~0.816 mg · g⁻¹, respectively. **Conclusion:** The method provided a more comprehensive scientific basis for the quality evaluation of Shugan pills.

Keywords: Shugan pills; dehydrocostuslactone; costunolide; honokiol; magnolol; assay; HPLC

* 通信作者 Tel: (0311) 89892091; E-mail: liuyongli2008@126.com.

第一作者 Tel: (0311) 85212004-8020; E-mail: sunhuizhu@163.com;

舒肝丸由川楝子、姜厚朴、木香、醋延胡索等 13 味药组成,各药味经粉碎后,加入不同的辅料精制成大蜜丸、小蜜丸、水蜜丸或水丸。临床上主要用于舒肝和胃、理气止痛等。收载于中国药典 2015 年版一部^[1],且仅收载了芍药苷的含量测定。厚朴、木香具有和胃、止呕的作用,目前对这 2 味药材已进行了较为深入的研究,明确了其功效成分。厚朴药材中的主要成分和厚朴酚与厚朴酮常被用作厚朴的质量评价标准^[2-5];木香挥发油中的活性木香烯内酯和去氢木香内酯,具有松弛平滑肌和解痉作用,其含量可作为木香质量优劣的评价指标之一^[6-8]。因此为了更好地控制产品的内在质量,保证临床用药的安全有效,在相关多成分含量测定方法报道的基础上^[9-10],本研究以厚朴、木香为研究对象,采用反相高效液相色谱法同时测定舒肝丸中和厚朴酚、木香烯内酯、去氢木香内酯及厚朴酮 4 个成分的含量,方法准确,操作简便,为本品提供了更加全面有效的定量分析依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Thermo Acclaim C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm; 填料:十八烷基键合硅胶; Thermo 公司); AE240 型电子天平(上海梅特勒仪器有限公司)。

1.2 试剂

对照品:和厚朴酚(批号 110730-201313,含量 99.1%)、厚朴酚(批号 110729-200412)、去氢木香内酯(批号 111525-201209,含量 99.8%)、木香烯内酯(批号 111524-201208,含量 99.5%)购自中国食品药品检定研究院。

样品 10 批,购自市场,大蜜丸来自 4 个生产企业(批号分别为 4015087、15030921、395034、1506141),水蜜丸来自 3 个生产企业(批号分别为 2035292、3035527、20150501、20130701),小蜜丸来自 1 生产企业(批号分别为 150201、150401),编号 1~10。

甲醇、乙腈为色谱纯,水为去离子水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 精密称取和厚朴酚、木香烯内酯、去氢木香内酯、厚朴酚的对照品分别约 0.012、0.010、0.012、0.012 g,分别置 25 mL 量瓶中,加甲醇

适量使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得单一成分对照品储备液;分别精密量取上述的和厚朴酚、木香烯内酯、去氢木香内酯、厚朴酚的对照品储备液依次为 2、3、5、4 mL,置同一 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得和厚朴酚、木香烯内酯、去氢木香内酯、厚朴酚浓度分别为 10、12、25、20 μg 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取重量差异项下的本品,剪碎,取约 0.8 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称量,加热回流 90 min,取出,放冷,再称量,用甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方比例及处方工艺制备缺木香、缺厚朴的阴性样品,并按“2.1.2”项下方法制备溶液,即得。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Thermo Acclaim C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05% 磷酸(47:53); 检测波长: 230 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 进样量: 20 μL。理论板数按和厚朴酚峰计算应不低于 3 000; 各峰与相邻峰的分离度均大于 1.5。

2.3 专属性考察

分别取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样分析;结果样品色谱中,与对照品色谱相同保留时间处有色谱峰,而阴性样品色谱的相应位置无相应峰,不干扰测定。待测成分杂质分离度良好,结果见图 1。

2.4 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液 2 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得混合对照品溶液 II。精密吸取混合对照品溶液 II 5、10 μL 及混合对照品溶液 5、10、20 μL,分别注入液相色谱仪,按拟定的色谱条件测定,记录峰面积。以对照品进样量(μg)为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,进行线性回归。结果和厚朴酚、木香烯内酯、去氢木香内酯、厚朴酚线性方程分别为

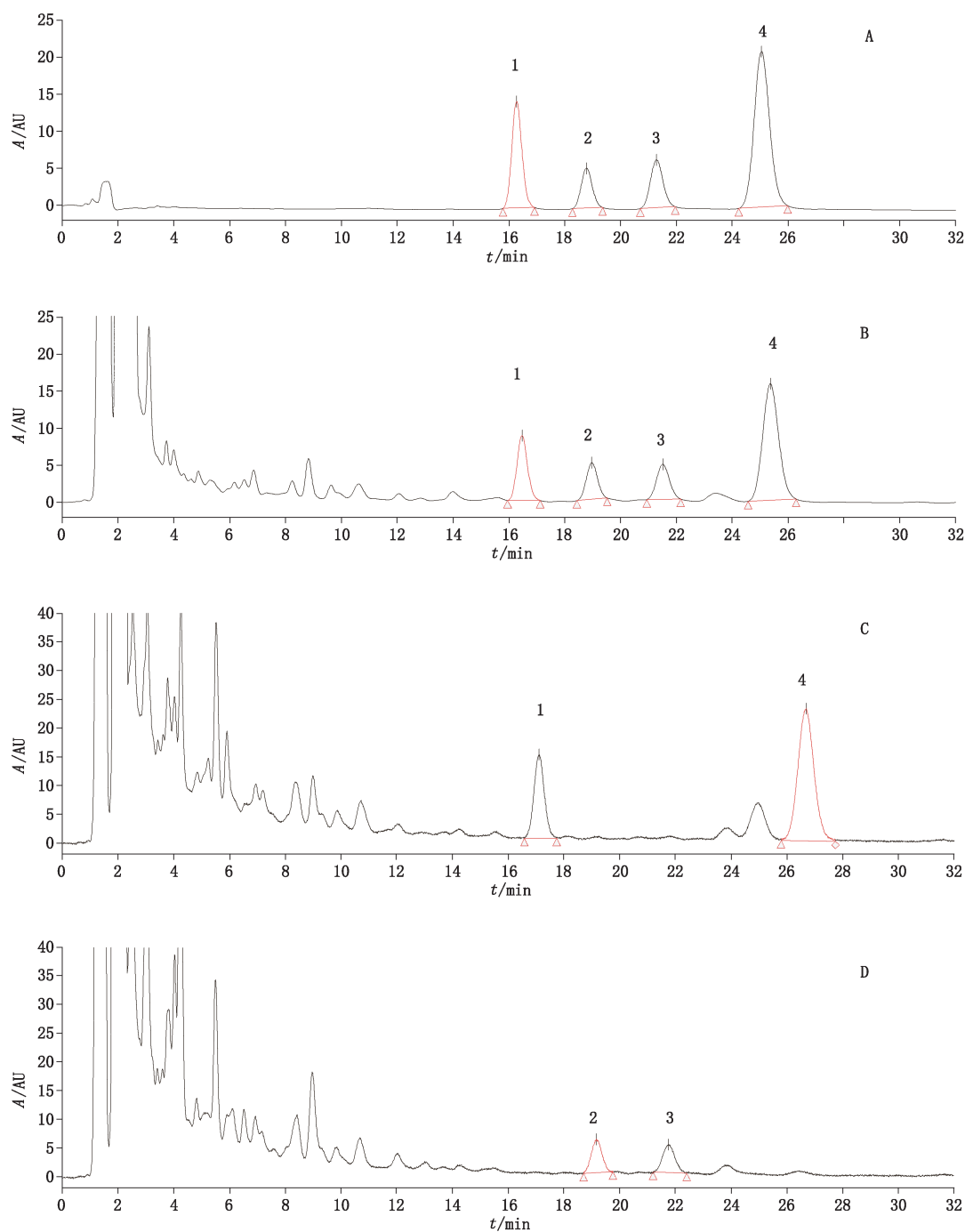
$$Y=3.724 \times 10^6 X - 5.70 \times 10^4$$

$$Y=1.650 \times 10^6 X - 1.55 \times 10^4$$

$$Y=1.131 \times 10^6 X - 2.16 \times 10^4$$

$$Y=5.315 \times 10^6 X - 3.98 \times 10^4$$

线性范围分别为 0.020~0.401、0.025~0.499、0.051~1.029、0.040~0.796 μg; 相关系数均为 0.999 9,表明各待测成分线性关系良好。



1. 和厚朴酚 (honokiol) 2. 木香羟内酯 (costunolide) 3. 去氢木香内酯 (dehydrocostuslactone) 4. 厚朴酚 (magnolol)

图1 对照品(A)、样品(B)、厚朴阴性样品(C)及木香阴性样品(D)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substances (A), sample (B), negative sample without Aucklandiae Radix (C) and negative sample without Magnoliae Officinalis Cortex (D)

2.5 重复性试验

取同一大蜜丸样品(编号1)约0.64、0.8、0.96 g各3份,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备9份供试品溶液,分别测定含量,结果样品中和厚朴酚、木香羟内酯、去氢木香内酯、厚朴酚的含量分别为0.106、

0.175、0.292、0.232 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为1.2%、1.3%、1.4%、1.1%,结果表明方法重复性良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液(编号1),分别在0、1、4、10、20和24 h进样测定,记录峰面积。结果RSD分

别为 1.2%、1.5%、1.2%、0.7%，表明供试品溶液中 4 个待测成分在室温放置 24 h 内基本稳定。

2.7 回收率试验

取“2.5”项下已知含量的样品 0.4 g，共 9 份，精密称定，分别置具塞锥形瓶中，精密加入不同浓度的对照品溶液各 25 mL 分别精密称取和厚朴酚、木香羟内酯、去氢木香内酯、厚朴酚对照品适量，以甲醇配制低浓度（含和厚朴酚 $1.203 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，木香羟内酯 $2.493 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，去氢木香内酯 $4.117 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，厚朴酚 $3.182 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）、中等浓度（含和厚朴酚 $1.503 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，木香羟内酯 $3.116 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，去氢木香内酯 $5.146 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，厚朴酚 $3.978 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）、高浓度（含和厚朴酚 $1.804 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，木香羟内酯 3.740

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，去氢木香内酯 $6.175 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，厚朴酚 $4.773 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ）对照品溶液适量，按“2.1.2”项下方法制备供试溶液，按“2.2”项下色谱条件进行分析，计算回收率，结果见表 1~4。和厚朴酚、木香羟内酯、去氢木香内酯、厚朴酚的平均回收率（ $n=9$ ）分别为 99.1%、100.4%、98.4%、101.4%，RSD 分别为 1.4%、1.7%、1.7%、2.0%，结果表明方法回收率良好，方法可行。

2.8 样品测定

取 10 批舒肝丸样品（大蜜丸、小蜜丸、水蜜丸），分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进行测定，记录峰面积，再用外标法分别计算各成分的含量，结果见表 5。

表 1 和厚朴酚回收率试验结果

Tab. 1 The results of the recovery tests of honokiol

取样量 (amount)/g	样品含量 (content in sample)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
0.400 8	0.042 44	0.030 06	0.072 09	98.6	99.1	1.4
0.402 6	0.042 64	0.030 06	0.072 61	99.7		
0.401 5	0.042 52	0.030 06	0.072 58	100.0		
0.402 7	0.042 65	0.037 58	0.079 49	98.0		
0.401 8	0.042 55	0.037 58	0.079 19	97.5		
0.403 0	0.042 68	0.037 58	0.079 57	98.2		
0.401 3	0.042 50	0.045 09	0.086 96	98.6		
0.401 0	0.042 47	0.045 09	0.087 37	99.6		
0.402 2	0.042 60	0.045 09	0.088 55	101.9		

表 2 木香羟内酯回收率试验结果

Tab. 2 The results of the recovery tests of costunolide

取样量 (amount)/g	样品含量 (content in sample)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
0.400 8	0.070 29	0.062 33	0.132 3	99.49	100.4	1.7
0.402 6	0.070 62	0.062 33	0.132 5	99.28		
0.401 5	0.070 43	0.062 33	0.133 3	100.87		
0.402 7	0.070 64	0.077 91	0.149 5	101.22		
0.401 8	0.070 48	0.077 91	0.146 5	97.57		
0.403 0	0.070 69	0.077 91	0.148 8	100.26		
0.401 3	0.070 39	0.093 49	0.163 6	99.70		
0.401 0	0.070 34	0.093 49	0.166 6	102.96		
0.402 2	0.070 55	0.093 49	0.166 3	102.42		

表 3 去氢木香内酯回收率试验结果

Tab. 3 The results of the recovery tests of dehydrocostuslactone

取样量 (amount)/g	样品含量 (content in sample)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
0.400 8	0.117 1	0.102 9	0.220 7	100.7	98.4	1.7
0.402 6	0.117 6	0.102 9	0.220 6	100.1		
0.401 5	0.117 3	0.102 9	0.217 9	97.8		
0.402 7	0.117 6	0.128 6	0.247 0	100.6		
0.401 8	0.117 4	0.128 6	0.245 9	99.9		
0.403 0	0.117 7	0.128 6	0.249 6	102.6		
0.401 3	0.117 2	0.154 4	0.271 5	99.9		
0.401 0	0.117 1	0.154 4	0.276 0	102.9		
0.402 2	0.117 5	0.154 4	0.275 8	102.5		

表 4 厚朴酚回收率试验结果

Tab. 4 The result of the recovery test of Magnolol

取样量 (amount)/g	样品含量 (content in sample)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
0.400 8	0.093 14	0.079 55	0.173 9	101.5	101.4	2.0
0.401 1	0.093 57	0.079 55	0.173 4	100.4		
0.401 2	0.093 31	0.079 55	0.174 1	101.6		
0.401 0	0.093 59	0.099 44	0.193 5	100.5		
0.402 0	0.093 38	0.099 44	0.192 7	99.9		
0.401 4	0.093 66	0.099 44	0.195 7	102.6		
0.401 5	0.093 27	0.119 3	0.210 3	98.1		
0.402 7	0.093 20	0.119 3	0.217 6	104.3		
0.400 4	0.093 48	0.119 3	0.217 5	104.0		

表 5 样品测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=2$)

Tab. 5 Contents of samples

规格 (formulation)	生产企业 (manufacturer)	样品编号 (No.)	厚朴酚 (magnolol)	和厚朴酚 (honokiol)	木香羟内酯 (costunolide)	去氢木香内酯 (dehydrocostuslactone)
大蜜丸 (big-honeyed pills)	I	1	0.232	0.106	0.175	0.292
	II	2	0.339	0.121	0.158	0.243
	III	3	0.297	0.217	0.241	0.335
	IV	4	0.229	0.114	0.142	0.220
水蜜丸 (water-honeyed pills)	I	5	0.662	0.166	0.168	0.268
	I	6	0.325	0.165	0.154	0.267
	V	7	0.456	0.194	0.280	0.568
	VI	8	0.816	0.400	0.153	0.357
小蜜丸 (small-honeyed pills)	VII	9	0.304	0.146	0.105	0.200
	VII	10	0.305	0.058	0.201	0.219

3 讨论

3.1 流动相的选择

样品处方中药味多,成分复杂,杂质多,性质相近的成分多,流动相以甲醇作为有机相时,未能得到良好分离,结合提取方法考察及色谱条件的考察,最终选择乙腈作为有机相,将流动相比例设定为乙腈-0.05% 磷酸溶液(47:53),各成分分离良好。

3.2 检测波长的选择

称取和厚朴酚、木香羟内酯、去氢木香内酯、厚朴酚的对照品适量,分别用甲醇配制成适宜浓度的对照品溶液,在 200~400 nm 进行光谱扫描。结果表明,厚朴酚与和厚朴酚在 210 nm 波长附近末端最大吸收,去氢木香内酯与木香羟内酯仅在 230 nm 以下有末端吸收。在 200~220 nm 波长下,对样品进行测定,结果待测成分与杂质峰分离较差,因此选用待测成分响应较强且无杂质峰干扰的 230 nm 作为测定波长,此波长下各待测成分与杂质峰分离良好,阴性无干扰。

3.3 小结

近年来,对中成药制剂的质量控制中仅控制单一指标不足以代表处方的整体作用。因此,制定多成分、多指标的含量测定方法^[11-14],可从多方面控制中药制剂的产品质量,使其疗效可靠、稳定。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版·一部[S]. 2015: 1600
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 1600
- [2] 陈斯,李佩,沈雨,等. 厚朴饮片有效成分含量测定与分级标准研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1964
CHEN S, LI P, SHEN Y, *et al.* Determination of effective components in Cortex Magnoliae Officinalis standard of classification [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2014, 25(8): 1964.
- [3] 薛珍珍,晏仁义,余盛贤,等. HPLC-DAD 测定厚朴中 6 种活性成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 45
XUE ZZ, YAN RY, YU SX, *et al.* Determination of six active compounds in commercial samples of Magnoliae Officinalis Cortex by HPLC-DAD [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2014, 20(22): 45
- [4] 张怡辰. 厚朴药材中厚朴酚与和厚朴酚的含量测定及化学模式识别[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(3): 20
ZHANG YC. Measuring of magnolol and honokiol of Magnoliae and studies of chemical pattern recognition [J]. Asia-Pacific Tradit Med, 2012, 8(3): 20
- [5] 杨红兵,石磊,李明明,等. 湖北恩施产厚朴叶中厚朴酚与和厚朴酚定量分析[J]. 湖北中医药大学学报, 2012, 14(1): 43
YANG HB, SHI L, LI MM, *et al.* Quantitative analysis of the content of magnolol and honokiol in the leaf of Magnolia Officinalis produced in Hubei Enshi [J]. Hubei Univ Chin Med, 2012, 14(1): 43
- [6] 李晓花,马小军,张忠廉,等. 不同干燥条件下云木香中木香羟内酯和去氢木香内酯含量的高效液相色谱法测定[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(3): 594
LI XH, MA XJ, ZHANG ZL, *et al.* Contents of costunolide and dehydrocostuslactone in *Saussurea costus* (Falc.) Lipech. with different drying temperature by HPLC [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2016, 27(3): 594
- [7] 胡益杰,刘爽,邓丽娜,等. 川木香药材 HPLC 指纹图谱及含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(11): 1946
HU YJ, LIU S, DENG LN, *et al.* HPLC fingerprint and determination method of herbal *Vladimiria souliei* (Franch.) Ling [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(11): 1946
- [8] 易跃能. 不同产地和采收时间木香药材中木香羟内酯和去氢木香内酯的测定[J]. 长沙医学院学报, 2016, 14(3): 16
YI YN. Determination of costunolide and dehydrocostuslactone in Aucklandiae Radix produced in different areas and time by HPLC [J]. J Changsha Med Univ, 2016, 14(3): 16
- [9] 蒋秋香,黄昊,蓝凤良. HPLC 法测定香砂养胃片中 4 种有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(9): 1669
JIANG QX, HUANG H, LAN FL. Simultaneous determination of four effective components in the Xiangsha Yangwei tablets by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(9): 1669
- [10] 黄澜,黄丽. RP-HPLC 法同时测定保济丸中厚朴酚、和厚朴酚、木香羟内酯及去氢木香内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(3): 396
HUANG L, HUANG L. RP-HPLC simultaneous determination of magnolol, honokiol, costunolide and dehydrocostuslactone in Baoji pills [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(3): 396
- [11] 王姿媛,胡惠兰. HPLC 法同时测定厚朴温中滴丸中 5 个有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1717
WANG ZY, HU HL. HPLC simultaneous determination of five bioactive-components in Houpu Wenzhong drop-pills [J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(9): 1717
- [12] 刘楚阳,刘韵. HPLC 法同时测定沉香舒郁丸中四种成分的含量[J]. 实用药物与临床, 2017(5): 569
LIU CY, LIU Y. Simultaneous determination of the content of four constituents in Chenxiang Shuyue pill by HPLC [J]. Pract Pharm Clin Rem, 2017(5): 569
- [13] 汪芳,林吉,邓丽红,等. HPLC 法同时测定加味穿心莲散中 6 种成分[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2521
WANG F, LIN J, DENG LH, *et al.* Simultaneous determination of six constituents in Jiawei Chuanxinlian powder by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(12): 2521
- [14] 丁晓菊,赵云丽,高晓霞,等. 高效液相色谱法同时测定厚朴温中胶囊中的 7 种有效成分[J]. 色谱, 2009, 27(1): 107
DING XJ, ZHAO YL, GAO XX, *et al.* Simultaneous determination of seven effective components in Houpu Wenzhong capsules using high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2009, 27(1): 107

(本文于 2016 年 8 月 15 日收到)