

HPLC 同步测定咳喘平散中 4 个成分的含量^{*}王丽萍, 段晓颖^{**}

(河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

摘要 目的: 建立 HPLC 法同时测定咳喘平散中芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素含量。**方法:** 采用 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.08 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠水溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长为 286 nm (芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素)、220 nm (五味子甲素、五味子乙素)。**结果:** 芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素线性范围为 0.238~1.789、0.061~0.457、0.071~0.533 和 0.069~0.521 μg; 平均回收率为 98.7%~101.8%, RSD 为 1.6%~1.8%。3 批样品中芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素和五味子乙素 4 个成分的含量分别为 1.508~1.566、0.470~0.497、0.398~0.420、0.470~0.553 mg · g⁻¹。**结论:** 本法可为咳喘平散及其类似组方制剂的质量评价提供研究基础。**关键词:** 咳喘平散; 外用复方制剂; 白芥子; 细辛; 五味子; 芥子碱硫氰酸盐; 细辛脂素; 五味子甲素; 五味子乙素; 定量分析; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 06-1023-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.14

Simultaneous determination of four compounds in Kechuanping^{*}WANG Li-ping, DUAN Xiao-ying^{**}

(The First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China)

Absrtact Objective: To establish an HPLC method for determination of sinapine thiocyanate, asarinin, deoxyschizandrin and schizandrin B in Kechuanping powder. **Methods:** A ZORBAX SB-AQ C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used, the mobile phase consisted of acetonitrile-0.08 mol · L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate aqueous solution with gradient elution at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The column temperature was set at 30 °C, and multiple detection wavelengths were set at 286 nm for sinapine thiocyanate and asarinin and 220 nm for deoxyschizandrin and schizandrin B. **Results:** The linear ranges of sinapine thiocyanate, asarinin, deoxyschizandrin and schizandrin B were 0.238-1.789 μg, 0.061-0.457 μg, 0.071-0.533 μg and 0.069-0.521 μg, respectively; the average recovery rates were 98.7%-101.8%, RSD were 1.6%-1.8%. The contents of above 4 components in 3 tested samples were in the ranges of 1.508-1.566 mg · g⁻¹ for sinapine thiocyanate, 0.470-0.497 mg · g⁻¹ for asarinin, 0.398-0.420 mg · g⁻¹ for deoxyschizandrin and 0.470-0.553 mg · g⁻¹ for schisandrin B

* 河南中医学院科研苗圃工程项目, 项目编号: MP2014-03

** 通信作者 Tel: 13783531353; E-mail: luckkids@163.com

第一作者 Tel: 13939039028; E-mail: luckkid@126.com

in Kechuanping powder. **Conclusion:** The study provides scientific basis for the quality evaluation of Kechuanping powder and preparations of the same kind.

Keywords: Kechuanping powder; topical compound preparation; Semen Sinapis Albae; Asari Radix et Rhizoma; Schisandrae Chinensis Fructus; sinapine thiocyanate; asarinin; deoxyschizandrin; schizandrin B; quantitative analysis; HPLC

咳喘平散是由细辛、五味子、白芥子、僵蚕、麻黄、炒白果仁 6 味药材组成的外用复方制剂,主要用于小儿风寒咳嗽、气喘等症。其中细辛具有温肺化饮功效,临床用于治疗痰饮喘咳等;五味子具有收敛固涩之功,临床可用于久嗽虚喘^[1-2];细辛配伍五味子功擅温肺化饮,止咳平喘,两者一散一敛,令邪气去而不伤正,二者配伍具有抗哮喘活性^[3]。同时现代药理研究表明:白芥子具有明显的镇咳、祛痰、平喘作用^[4],芥子碱硫氰酸盐通过舒张平滑肌具有平喘作用^[5];本试验选取白芥子、细辛、五味子中的主要成分芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素进行含量测定,以便对咳喘平散的质量进行多方位控制。

目前咳喘平散的医院制剂质量标准中只建立了芥子碱硫氰酸盐的 TLC 定性鉴别方法,为了有效、全面地控制该产品的质量,以上述成分为指标成分,建立了相应的 HPLC 含量测定方法。作者查阅相关文献,上述 4 种成分的含量测定目前主要采用 HPLC 法;其中单个或部分成分进行含量测定的方法已有文献报道^[6-7];但同时测定上述 4 种成分者未见报道。作者参考相关文献^[8-16]建立了同步测定该制剂 4 种成份含量的 HPLC 方法,结果表明该方法简便,结果准确,重复性好,可用于咳喘平散的质量控制。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪,2996 型二极管阵列检测器,Empower 工作软件;Agilent ZORBAX SB-AQ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶);Sartorius CP225D 型电子天平。

1.2 试药

对照品芥子碱硫氰酸盐(批号 111702-201303,供含量测定用)、细辛脂素(批号 111889-201203,供含量测定用)、五味子甲素(批号 110764-200408,供

含量测定用)、五味子乙素(批号 110765-200205,供含量测定用)均购于中国食品药品检定研究院。

处方饮片来源:河南中医药大学第一附属医院中药饮片库房;咳喘平散样品由河南中医药大学第一附属医院中药制剂实验室提供,批号为 150617、150115、150303;HPLC 用乙腈色谱纯,水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX SB-AQ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.08 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠水溶液(B),梯度洗脱(0~19 min, 12%A; 19~20 min, 12%A → 52%A; 20~48 min, 52%A → 56%A),流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 286 nm(芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素)、220 nm(五味子甲素、五味子乙素),进样量 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素的对照品适量,用甲醇溶解并配制成质量浓度分别为 0.508、0.646、0.434 mg · mL⁻¹ 的各对照品储备溶液;精密称取芥子碱硫氰酸盐对照品 13.55 mg,用 70% 甲醇水溶解配制成质量浓度为 0.542 mg · mL⁻¹ 的芥子碱硫氰酸盐对照品储备液。精密量取芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素的对照品储备液分别为 2.2、0.60、0.55、0.80 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量研细,取粉末约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇水 16 mL,密塞,称量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)处理 25 min,放冷至室温,精密称定,用 70% 甲醇水补足减失的量,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

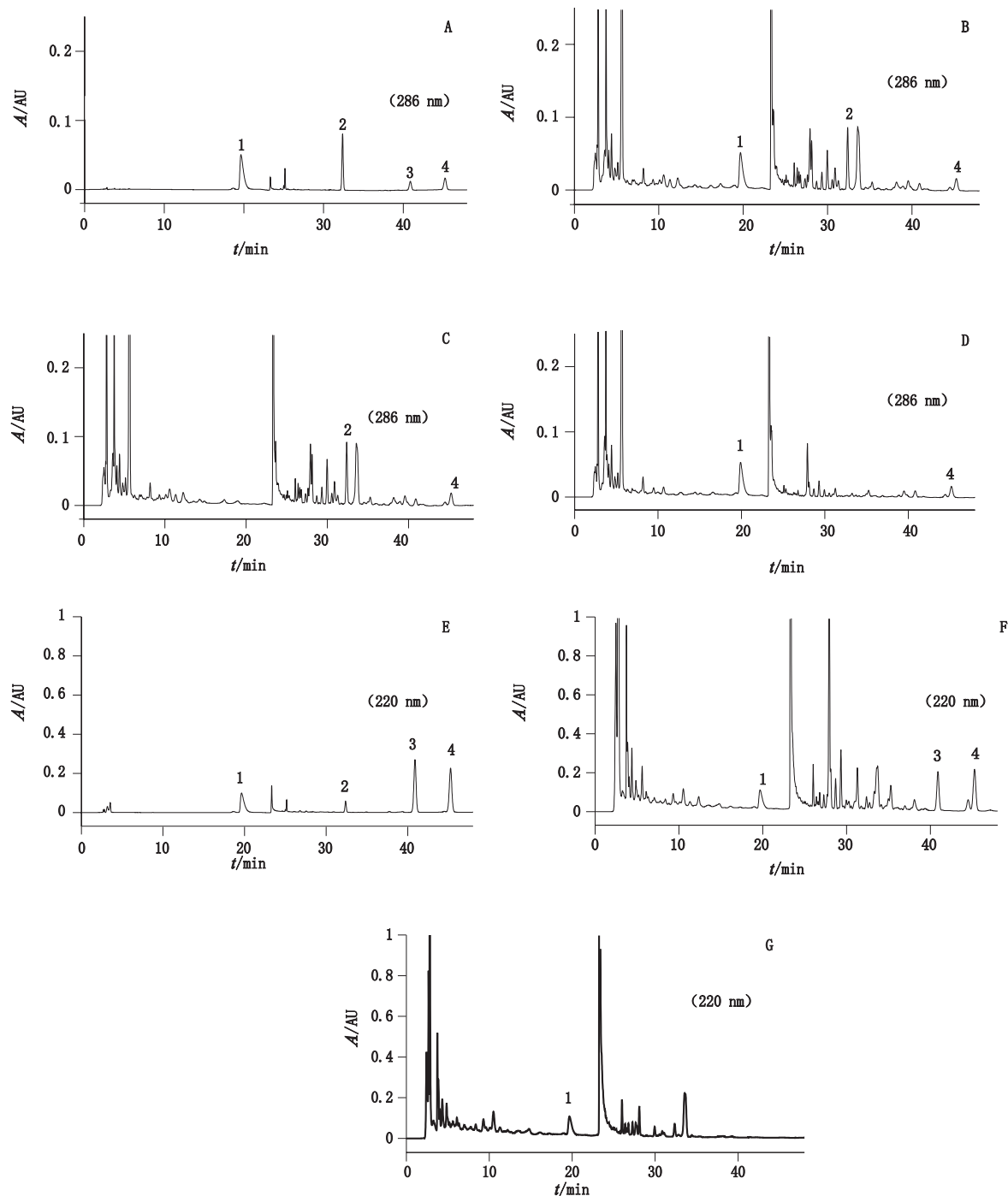
2.2.3 阴性样品溶液 按照咳喘平散的处方比例和制备工艺,分别制备缺白芥子、细辛、五味子的阴性样

品,按“2.2.2”项下方法制备各阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和

各阴性样品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果表明芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素与其他峰分离度良好,阴性无干扰,见图1。



A、E. 混合对照品 (mixed reference substances) B、F. 样品 (sample) C. 缺白芥子阴性样品 (negative sample without Semen Sinapis Albae) D. 缺细辛阴性样品 (negative sample without Asari Radix et Rhizoma) G. 缺五味子阴性样品 (negative sample without Schisandrae Chinensis Fructus)

1. 芥子碱硫氰酸盐 (sinapine thiocyanate) 2. 细辛脂素 (asarinin) 3. 五味子甲素 (deoxyschizandrin) 4. 五味子乙素 (schizandrin B)

图1 咳喘平散 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of Kechuanping powder

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样 2、4、6、10、15 μL ,测定峰面积;以对照品进样量(μg)为横坐标,以峰面积为纵坐标进行线性回归,数据见表 1。

表 1 4 种成分回归方程、相关系数及线性范围

Tab. 1 Regression equations, correlation coefficients and linear ranges of 4 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/ μg
芥子碱硫氰酸盐 (sinapine thiocyanate)	$Y=1.299 \times 10^6 X + 3.414 \times 10^4$	0.999 9	0.238~1.789
细辛脂素 (asarinin)	$Y=3.082 \times 10^6 X - 4.454 \times 10^3$	0.999 9	0.061~0.457
五味子甲素 (deoxyschizandrin)	$Y=1.443 \times 10^7 X + 6.169 \times 10^3$	1.000 0	0.071~0.533
五味子乙素 (schizandrin B)	$Y=1.405 \times 10^7 X + 6.358 \times 10^3$	1.000 0	0.069~0.521

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照

品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,结果芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 RSD 分别为 1.1%、0.9%、0.6%、0.7%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取同一批(批号 150617)咳喘平散样品 6 份。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,结果芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素平均含量分别为 1.517、0.497、0.425、0.514 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 分别为 1.5%、1.1%、1.1%、1.3%,表明方法的重复性较好。

2.5.3 稳定性试验 精密吸取同一咳喘平散供试品溶液 10 μL ,分别在 0、2、6、12、16、20 h 进样,结果芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素峰面积的 RSD 分别为 1.6%、1.6%、1.2%、1.4%,表明供试品溶液在 20 h 内较稳定。

2.5.4 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的同一批(批号 150617)咳喘平散样品粉末 1.0 g,置具塞锥形瓶中,分别精密加入各对照品储备溶液适量,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果见表 2。

表 2 咳喘平散样品中 4 种成分的加样回收率试验

Tab. 2 Results of recovery tests of 4 compounds in Kechuanping powder

成分 (component)	称样量 (sample weight)/g	样品中量 (sample content)/mg	加入量 (added amount)/mg	测得总量 (measured amount)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
芥子碱硫氰酸盐 (sinapine thiocyanate)	1.000 3	0.758 9	0.758 8	1.511 0	99.1	98.7	1.8
	1.000 6	0.759 1	0.758 8	1.532 0	101.9		
	1.000 3	0.758 9	0.758 8	1.493 1	96.8		
	1.000 7	0.759 2	0.758 8	1.497 4	97.3		
	1.000 2	0.758 8	0.758 8	1.502 8	98.0		
细辛脂素 (asarinin)	1.000 7	0.759 2	0.758 8	1.511 6	99.2	99.5	1.6
	1.000 3	0.248 7	0.254	0.498 9	98.5		
	1.000 6	0.248 8	0.254	0.506 4	101.4		
	1.000 3	0.248 7	0.254	0.497 6	98.0		
	1.000 7	0.248 8	0.254	0.505 7	101.2		
五味子甲素 (deoxyschizandrin)	1.000 2	0.248 7	0.254	0.502 3	99.9	101.8	1.6
	1.000 7	0.248 8	0.254	0.497 6	97.9		
	1.000 3	0.212 8	0.206 7	0.420 3	100.4		
	1.000 6	0.212 8	0.206 7	0.426 6	103.4		
	1.000 3	0.212 8	0.206 7	0.418 0	99.3		
五味子乙素 (schizandrin B)	1.000 7	0.212 9	0.206 7	0.424 9	102.6	99.7	1.7
	1.000 2	0.212 8	0.206 7	0.423 5	101.9		
	1.000 7	0.212 9	0.206 7	0.426 4	103.3		
	1.000 3	0.257 0	0.260 4	0.520 1	101.0		
	1.000 6	0.257 1	0.260 4	0.511 7	97.8		
	1.000 3	0.257 0	0.260 4	0.521 0	101.4	99.7	1.7
	1.000 7	0.257 1	0.260 4	0.511 1	97.5		
	1.000 2	0.257 0	0.260 4	0.516 1	99.5		
	1.000 7	0.257 1	0.260 4	0.519 5	100.8		

2.6 样品测定

取3个批号的咳喘平散样品, 每批3份, 按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别进样, 记录峰面积, 以标准曲线法分别计算各成分的含量, 结果见表3。

表3 样品的含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab. 3 Determination results of samples				
批号 (lot No.)	芥子碱硫 氰酸盐 (sinapine thiocyanate)	细辛脂素 (asarinin)	五味子甲素 (deoxyschizandrin)	五味子乙素 (schizandrin B)
150617	1.517	0.497	0.425	0.514
150115	1.566	0.470	0.442	0.553
150303	1.508	0.479	0.398	0.470

3 讨论

咳喘平散中化学成分复杂, 本试验采用梯度洗脱, 能对方中多种待测成分进行较好的分离, 确保分离度好、峰形对称、检测灵敏度高, 结果准确。

参考相关文献, 试验中曾选用不同溶剂系统(乙腈-0.2% 甲酸水溶液、甲醇-0.08 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠水溶液)作为流动相进行考察, 结果表明, 本实验所用流动相具有分离度高, 峰形好, 干扰少的特点。

芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素、五味子甲素、五味子乙素紫外吸收相差较大, 为保障阴性无干扰且分离度较好, 最终确定各成分检测波长如下: 286 nm (芥子碱硫氰酸盐、细辛脂素), 220 nm (五味子甲素, 五味子乙素)。

3批样品测定结果表明, 各批次样品之间化合物的含量有一定差别, 表明中药制剂应加强原料药质量控制, 从各方面保证原料药质量, 进而使制成品质量获得保证。

本试验操作方法简便、准确、专属性强, 重复性好, 能进一步完善咳喘平散的质量控制, 为咳喘平散及类似组方制剂的质量评价提供参考。

参考文献

[1] 中国药典 2015 年版一部. [S]. 2015: 230

ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 230

[2] 中国药典 2015 年版一部. [S]. 2015: 66

ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 66

[3] 吴建兵, 褚襄萍, 张永煜, 等. 五味子-细辛药对抗哮喘活性部位筛选[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1): 121

WU JB, CHU XP, ZHANG YY, et al. Screening of the anti-asthma active sites for the drug partnership containing Fructus Schisandrae and Asarun[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2013, 31(1): 121

[4] 张学梅, 刘凡亮, 梁文波, 等. 白芥子提取物的镇咳、祛痰及平喘作用研究[J]. 中草药, 2003, 34(7): 635

ZHENG XM, LIU FL, LIANG WB, et al. Antitussive, expectorant and antiasthmatic effects of Brassica alba extracts[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2003, 34(7): 635

[5] 王辉, 苑艳霞, 邱琳, 等. 芥子碱平喘作用及其机制研究[J]. 中草药, 2011, 42(1): 134

WANG H, YUAN YX, QIU L, et al. Effect of sinapine on relieving asthma and its mechanism[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2011, 42(1): 134

[6] 苏建, 刘永利, 郭毅, 等. 多波长 HPLC 法同时测定四神丸中 7 个有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1531

SU J, LIU YL, GUO Y, et al. Simultaneous determination of seven active components in Sishen pills by HPLC under multiple UV wavelengths[J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(9): 1351

[7] 吴国清, 张家建, 孙萍萍, 等. RP-HPLC 法测定止痛化痰搽剂中欧前胡素和细辛脂素的含量[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(2): 402

WU GQ, ZHANG JJ, SUN PP, et al. Determination of imperatorin and asarinin in eliminating pain and stasis liniment by RP-HPLC[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(2): 402

[8] 宋双红, 色林格, 陈蓓, 等. HPLC 法测定 4 种细辛中马兜铃酸 I 和细辛脂素[J]. 中成药, 2014, 36(8): 1711

SONG SH, SE LG, CHEN B, et al. Determination of aristolochic acid I and asarinin in four species of Asari Radix et Rhizoma by HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(8): 1711

[9] 王国清, 赵云丽, 王晶晶, 等. HPLC 法测定十味益脾颗粒中绿原酸和芥子碱硫氰酸盐的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2012, 29(4): 280

WANG GQ, ZHAO YL, WANG JJ, et al. Determination of chlorogenic acid and sinapine thiocyanate in Shiweiyipikeli granula by HPLC[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2012, 29(4): 280

[10] 单进军, 杜丽娜, 徐建亚, 等. UPLC 法同时测定金欣口服液 8 种指标成分[J]. 中草药, 2013, 44(2): 183

SHAN JJ, DU LN, XU JY, et al. Simultaneous determination of eight components in Jinxin oral liquid by UPLC[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(2): 183

[11] 郑敏霞, 沈洁, 马小琼, 等. LC-MS/MS 同时测定消喘膏中 3 种化学成分[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(10): 2385

ZHENG MX, SHEN J, MA XQ, et al. Simultaneous determination of three components in Xiaochuan ointment by LC-MS/MS[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(10): 2385

[12] 刘玉红, 易进海, 黄蛟, 等. RP-HPLC 法同时测定细辛中甲基丁香酚、黄樟醚和细辛脂素的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 822

LIU YH, YI JH, HUANG J, et al. RP-HPLC simultaneous

- determination of methyleugenol, safrole and asarinin in Asari Radix et Rhizoma [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(5): 822
- [13] 许慧君, 陈钟, 卢树杰, 等. HPLC 测定安神补心胶囊 7 个有效成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(11): 2078
- XU HJ, CHEN Z, LU SJ, *et al.* HPLC simultaneous determination of seven active components in Anshenbuxin capsules [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(11): 2078
- [14] 刘宏胜, 王树森, 张雅敏, 等. RP-HPLC 同时测定护肝剂中 9 种活性成分 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 933
- LIU HS, WANG SS, ZHANG YM, *et al.* Simultaneous determination of nine kinds of active components in Hupan agent by RP-HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(6): 933
- [15] 高森, 李正翔, 王志涛, 等. 九龙化风丸中升麻素苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、羌活醇、异欧前胡素和细辛脂素的 HPLC 梯度洗脱法测定 [J]. 中成药, 2014, 36(3): 541
- GAO S, LI ZX, WANG ZT, *et al.* Determination of prim-o-glucosylcimifugin, 4'-o- β -D-glucosyl-5-O-methylvisamminol, notopteron, isoimperatorin and asarinin in Jiulong Huafeng pills by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(3): 541
- [16] 陈瑛, 付正丰, 方应权, 等. HPLC 法同时测定当归四逆汤中 3 种有效成分 [J]. 中成药, 2016, 38(2): 325
- CHEN Y, FU ZF, FANG YQ, *et al.* Simultaneous determination of three effective components in Danggui Sini decoction [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(2): 325

(本文于 2016 年 8 月 24 日收到)