

· 研究报告 ·

## HPLC 法同时测定陈香露白露片中 7 个成分的含量

张 璐, 戴群芳, 陈思思 (江西省南昌市检验检测中心, 江西 南昌 330000)

**[摘要]** **目的** 构建同步测定陈香露白露片中甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素、木香烯内酯和去氢木香内酯含量的 HPLC 法。**方法** 采用 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱, 流速 1.0 ml/min, 柱温 35 ℃, 检测波长 237 nm(检测甘草苷、甘草酸铵、木香烯内酯、去氢木香内酯)、283 nm(检测橙皮苷)、330 nm(检测川陈皮素、橘皮素), 进样量 10 μl, 对采集的 16 批次样品进行 7 种成分的含量检测。**结果** 甘草苷、橙皮苷、甘草酸铵、川陈皮素、橘皮素、木香烯内酯、去氢木香内酯的线性范围分别为 1.110 ~ 55.72( $r=0.9992$ )、22.15 ~ 1108( $r=0.9995$ )、6.140 ~ 307.2( $r=0.9995$ )、1.130 ~ 56.25( $r=0.9997$ )、0.3700 ~ 18.75( $r=0.9982$ )、0.5200 ~ 26.01( $r=0.9991$ )、1.180 ~ 58.95( $r=0.9999$ ) μg/ml。回收率( $n=9$ )分别为 98.71%、98.12%、98.44%、98.22%、99.17%、99.18%、97.93%, RSD 分别为 0.16%、0.67%、0.57%、0.62%、0.48%、0.56%、0.58%。16 批样品中甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素、木香烯内酯、去氢木香内酯的含量分别为 0.1250 ~ 1.174、2.354 ~ 7.426、1.822 ~ 27.21、0.0370 ~ 1.399、0.0723 ~ 0.4433、0.0140 ~ 0.1990、0.2207 ~ 1.407 mg/g。**结论** 该方法准确性高、重复性好、耐用性强, 可用于陈香露白露片的质量控制和评价。

**[关键词]** 高效液相色谱法; 陈香露白露片; 甘草苷; 甘草酸铵; 橙皮苷; 川陈皮素; 橘皮素; 木香烯内酯; 去氢木香内酯

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-2024(2022)06-0553-04

**[DOI]** 10.12206/j.issn.2097-2024.202202038

## Simultaneous determination of seven constituents in Chenxiang Lubailu tablet by HPLC

ZHANG Lu, DAI Qunfang, CHEN Sisi (Nanchang Inspection and Testing Center, Nanchang 330000, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish the method for the simultaneous determination of liquiritin, ammonium glycyrrhizinate, hesperidin, nobiletin, tangeretin, costunolide, dehydrocostuslactone in Chenxiang Lubailu tablet by HPLC. **Methods** ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> chromatographic column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution. Gradient elution with flow rate of 1.0 ml/min was used. Column temperature was 35 ℃. Detection wavelength for liquiritin, ammonium, tangeretin, and costunolide was at 237 nm. Detection wavelength for glycyrrhizinate was at 283 nm. Detection wavelength for hesperidin and nobiletin was at 330 nm. Injection volume was 10 μl. 16 batches of samples were tested. **Results** The linear ranges for the detection of liquiritin, ammonium, glycyrrhizinate, hesperidin, nobiletin, tangeretin, and costunolide were 1.110 - 55.72 ( $r=0.9992$ ), 22.15 - 1108 ( $r=0.9999$ ), 6.140 - 307.2 ( $r=0.9995$ ), 1.130 - 56.25 ( $r=0.9997$ ), 0.3700 - 18.75 ( $r=0.9982$ ), 0.5200 - 26.01 ( $r=0.9991$ ), and 1.180 - 58.95 ( $r=0.9999$ ) μg/ml respectively. The average recoveries were 98.71%, 98.12%, 98.44%, 98.22%, 99.17%, 99.18%, and 97.93%, and the RSDs were 0.16%, 0.67%, 0.57%, 0.62%, 0.48%, 0.56%, and 0.58% respectively. The contents of the seven components in 16 batches of samples were 0.1250 - 1.174, 2.354 - 7.426, 1.822 - 27.21, 0.0370 - 1.399, 0.0723 - 0.4433, 0.0140 - 0.1990, and 0.2207 - 1.407 mg/g respectively. **Conclusion** The method is accurate, reproducible and durable, which could be used to the quality control and evaluation of Chenxiang Lubailu tablet.

**[Key words]** HPLC; Chenxiang Lubailu tablet; liquiritin; ammonium glycyrrhizinate; hesperidin; nobiletin; tangeretin; costunolide; dehydrocostuslactone

陈香露白露片的处方由陈皮、甘草、川木香、大黄、石菖蒲五味中药和碳酸镁、氧化镁、次硝酸铋、碳酸氢钠 4 种化学药组成<sup>[1]</sup>。方中陈皮行脾胃之气<sup>[2,3]</sup>, 为君药, 主要活性成分为橙皮苷、川陈皮

素、橘皮素, 与甘草配伍, 健脾祛湿<sup>[4]</sup>; 甘草苷、甘草酸铵为甘草的主要活性成分; 川木香具行气止痛之效<sup>[5]</sup>, 广泛用于腹痛, 食欲不振等, 木香烯内酯、去氢木香内酯为其主要活性成分。加之碳酸氢钠等碱性药物中和胃酸<sup>[6]</sup>, 共成健胃和中、理气止痛功效。

陈香露白露片目前执行的质量标准为《卫生部

**[作者简介]** 张 璐, 主管药师, 研究方向: 药品、食品安全风险监测, Email: 30964706@qq.com

药品标准 WS3-B-1553-93》,该标准仅设置了化学成分的质量控制参数,难以全面反映产品质量,存在较大的安全风险。为实现陈香露白露片内在质量的有效控制,本实验构建了同步测定陈香露白露片中甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷、橘皮素、川陈皮素、木香烃内酯、去氢木香内酯等 7 种特征活性成分含量的 HPLC 方法。该研究不仅为提高该制剂质量提供了有效、可靠的分析方法,同时对药品安全风险评估的有效实施也具有重要的研究意义。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪(安捷伦公司),配置 DAD 检测器;XS105DU 电子天平、ME 204E 电子天平(梅特勒-托利多公司);KQ-300DE 数控超声仪(昆山超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药

对照品甘草苷(批号:111610-201908,含量 95.0%)、甘草酸铵(批号:110731-202021,含量 96.2%)、橙皮苷(批号:110721-202019,含量 95.3%)、川陈皮素(批号:112055-202001,含量 99.6%)、橘皮素(批号:112054-202001,含量 99.8%)、木香烃内酯(批号:111524-201911,含量 99.9%)、去氢木香内酯(批号:111525-201912,含量 99.5%)均购于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(色谱纯,赛默飞公司);其余试剂均为分析纯(购于国药集团化学试剂有限公司);实验用水为娃哈哈纯净水。16 批陈香露白露片样品来自 3 个生产厂家:广西圣特药业有限公司(企业 1),批号 201207(S1)、190202(S2)、200506(S3)、210106(S4)、210107(S5)、210110(S6)、201102(S7);贵州百灵企业集团制药有限责任公司(企业 2),批号 20191211(S8)、20210105(S9)、20210111(S10)、20201212(S11)、20201001(S12);四川康福来药业集团(企业 3),批号 200902(S13)、200901(S14)、201202(S15)、200601(S16),以上样品规格均为每片重 0.3 g。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.1% 磷酸水溶液,梯度洗脱(0~8 min, 15% A; 8~35 min, 15% A→50% A; 35~50 min, 50% A; 50~65 min, 50% A→80% A; 65~66 min, 80% A→15% A; 66~75 min, 15% A),流速 1.0 ml/min,柱

温 35 ℃,进样量 10 μl,检测波长 237 nm(0~15 min, 检测甘草苷)、283 nm(15~25 min, 检测橙皮苷)、237 nm(25~34 min, 检测甘草酸铵)、330 nm(34~45 min, 检测川陈皮素、橘皮素)、237 nm(45~75 min, 检测去氢木香内酯、木香烃内酯)。

### 2.2 溶液制备

#### 2.2.1 对照品溶液

取甘草苷、橙皮苷、甘草酸铵、川陈皮素、橘皮素、木香烃内酯、去氢木香内酯对照品适量,精密称定,用 50% 甲醇配制成浓度分别为 55.72、1108、307.2、56.25、18.75、26.01、58.95 μg/ml 的混合对照溶液。

#### 2.2.2 供试品溶液

取陈香露白露片样品,研细,精密称取约 1 g,置于锥形瓶中,精密加入 25 ml 50% 甲醇,超声 30 min(功率 250 W,频率 33 kHz),放冷,精密称定,用 50% 甲醇补充损失的重量,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

#### 2.2.3 阴性供试品溶液

分别按陈香露白露片处方中各药比例制备缺陈皮、甘草、川木香的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成缺陈皮、甘草、川木香的阴性供试品溶液。

### 2.3 系统适应性试验

对照品溶液、供试品溶液及缺陈皮、甘草、川木香的阴性供试品溶液按“2.1”项下色谱条件进行测定分析。结果如图 1 所示,甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素、木香烃内酯、去氢木香内酯等 7 种成分与相邻峰分离良好,分离度均大于 1.5;阴性样品中其他成分色谱峰均未对 7 种成分产生干扰,表明该分析方法专属性良好。

### 2.4 线性范围考察

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 0.10、0.50、1.00、2.00、3.00、5.00 ml 置于 5 ml 容量瓶中,用 50% 甲醇稀释,制备 6 个浓度的对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进行测定,并绘制标准曲线,其中横坐标为对照品的浓度( $X$ , μg/ml),纵坐标为峰面积( $Y$ )。7 种成分线性范围、线性回归方程与相关系数见表 1。结果显示,7 种成分分别在各自浓度范围内线性关系良好。

### 2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件重复测定 6 次。结果显示甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素、木香烃内酯、去氢木香内酯峰面积 6 次测定结果的 RSD 分别为 0.37%、0.38%、0.39%、0.42%、0.48%、0.75%、0.67%,表明

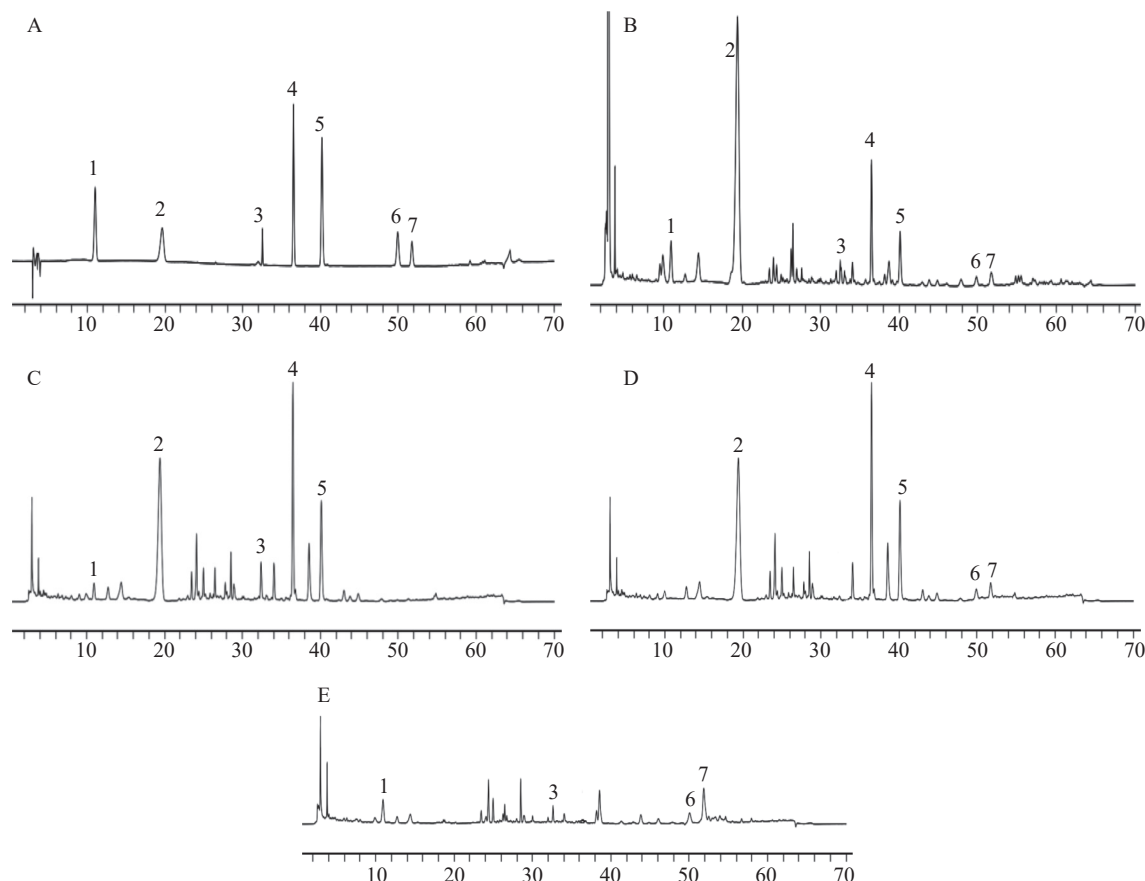


图 1 陈香露白露片 HPLC 色谱图

1.甘草苷; 2.橙皮苷; 3.甘草酸铵; 4.川陈皮素; 5.橘皮素; 6.木香桉内酯; 7.去氢木香内酯;  
A.混合对照品; B.供试品; C.缺川木香阴性样品; D.缺甘草阴性样品; E.缺陈皮阴性样品

表 1 7 种成分的线性范围、线性回归方程与相关系数

| 成分     | 线性范围( $\mu\text{g/ml}$ ) | 回归方程               | $r$    |
|--------|--------------------------|--------------------|--------|
| 甘草苷    | 1.110 ~ 55.72            | $Y=17125X+155.53$  | 0.9992 |
| 橙皮苷    | 22.15 ~ 1108             | $Y=5784.3X+7.1165$ | 0.9995 |
| 甘草酸铵   | 6.140 ~ 307.2            | $Y=15716X+375.13$  | 0.9999 |
| 川陈皮素   | 1.130 ~ 56.25            | $Y=21135X+32.117$  | 0.9997 |
| 橘皮素    | 0.3700 ~ 18.75           | $Y=20148X+72.316$  | 0.9982 |
| 木香桉内酯  | 0.5200 ~ 26.01           | $Y=21432X+4.1189$  | 0.9991 |
| 去氢木香内酯 | 1.180 ~ 58.95            | $Y=15235X-135.15$  | 0.9999 |

该仪器精密度良好。

## 2.6 重复性试验

按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份陈香露白露片(批号: 20210105)供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果显示甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素、木香桉内酯、去氢木香内酯的含量依次分别为 1.158、4.002、10.68、0.0633、0.1477、0.1323、0.2927 mg/g,其 RSD 分别为 0.62%、0.65%、0.64%、1.05%、1.62%、0.87%、1.28%,表明该方法重复性良好。

## 2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号: 20210105),放置 0、4、8、12、16、20、24 h 后,按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果显示甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素、木香桉内酯、去氢木香内酯峰面积的 RSD 依次分别为 0.54%、0.68%、0.72%、1.02%、0.85%、1.60%、1.32%,表明该供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。

## 2.8 加样回收率试验

取已知含量的陈香露白露片(批号: 20210111)9 份,每份约 0.5 g,精密称定,基于样品中 7 种成分的含量分别按低、中、高 3 种浓度水平加入对照品溶液(每个浓度各 3 份),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.1”项下色谱条件进行测定,结果显示 7 种成分的回收率分别为 98.71%、98.12%、98.44%、98.22%、99.17%、99.18%、97.93%,RSD 分别为 0.16%、0.67%、0.57%、0.62%、0.48%、0.56%、0.58%,表明该方法准确性高。

## 2.9 样品含量测定

取 16 批陈香露白露片样品,按“2.2.2”项下方

法制备供试品溶液,并在“2.1”项下色谱条件测定样品。外标法计算 16 批次样品中 7 种成分的含量,结果见表 2。结果显示 16 批样品中甘草苷、甘草酸铵、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素、木香烯内酯、去氢木香内酯的含量分别为 0.1250~1.174、2.354~7.426、1.822~27.21、0.0370~1.399、0.0723~0.4433、0.0140~0.1990、0.2207~1.407 mg/g。

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件的选择

本实验色谱条件参考《中华人民共和国药典》(2020 年版)一部,237 nm 为甘草苷、甘草酸铵的检测波长<sup>[7]</sup>,225 nm 为木香烯内酯、去氢木香内酯

的检测波长<sup>[7]</sup>,对两个检测波长均进行了待测成分响应值及专属性的考察,结果显示各成分在 237 nm 波长处响应值均较高且与杂质峰分离良好,故最终选择 237 nm 作为甘草苷、甘草酸铵、木香烯内酯、去氢木香内酯等 4 种成分的检测波长。而橙皮苷、川陈皮素、橘皮素均参考药典上的检测波长<sup>[7]</sup>。陈香露白露片中所含成分复杂,等度洗脱很难将 7 个化学成分同时分离,故采用梯度洗脱。

#### 3.2 聚类分析

利用 SPSS 软件以 16 批陈香露白露片中 7 种有效成分含量作为变量进行聚类分析。结果如图 2 所示,16 批样品以度量值 11 为阈值,聚分为 2 大

表 2 16 批样品中 7 种成分含量测定结果 (mg/g, n=2)

| 批号       | 甘草苷    | 橙皮苷    | 甘草酸铵  | 川陈皮素   | 橘皮素    | 木香烯内酯  | 去氢木香内酯 |
|----------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 201207   | 0.5967 | 1.822  | 2.354 | 0.0847 | 0.1840 | 0.1990 | 0.9440 |
| 190202   | 0.6090 | 3.513  | 3.413 | 1.399  | 0.2773 | 0.0487 | 1.407  |
| 200506   | 1.053  | 9.611  | 3.643 | 0.351  | 0.0723 | 0.0140 | 0.4123 |
| 210106   | 0.6203 | 3.634  | 2.682 | 0.0433 | 0.0930 | 0.0673 | 0.2647 |
| 210107   | 0.6433 | 3.855  | 2.761 | 0.0480 | 0.2883 | 0.0460 | 0.2207 |
| 210110   | 0.2047 | 3.034  | 2.689 | 0.3313 | 0.1237 | 0.0993 | 0.2907 |
| 201102   | 0.6677 | 5.209  | 2.613 | 0.1530 | 0.2897 | 0.0417 | 0.4200 |
| 20191211 | 1.107  | 6.832  | 3.724 | 0.4360 | 0.0843 | 0.0180 | 0.2243 |
| 20210105 | 1.158  | 10.68  | 4.002 | 0.0633 | 0.1477 | 0.1323 | 0.2927 |
| 20210111 | 1.174  | 9.624  | 3.971 | 0.0370 | 0.0830 | 0.1857 | 0.8773 |
| 20201212 | 1.085  | 9.204  | 3.860 | 0.0993 | 0.2333 | 0.1890 | 0.4257 |
| 20201001 | 1.055  | 10.333 | 3.682 | 0.8917 | 0.1937 | 0.1023 | 1.293  |
| 200902   | 0.747  | 8.085  | 2.947 | 0.9430 | 0.2137 | 0.0870 | 1.326  |
| 200901   | 0.8807 | 27.21  | 3.080 | 1.044  | 0.2270 | 0.1263 | 0.5503 |
| 201202   | 0.5473 | 5.573  | 2.584 | 1.144  | 0.2437 | 0.1280 | 0.3333 |
| 200601   | 0.1250 | 5.374  | 7.426 | 0.0883 | 0.4433 | 0.0650 | 0.3890 |

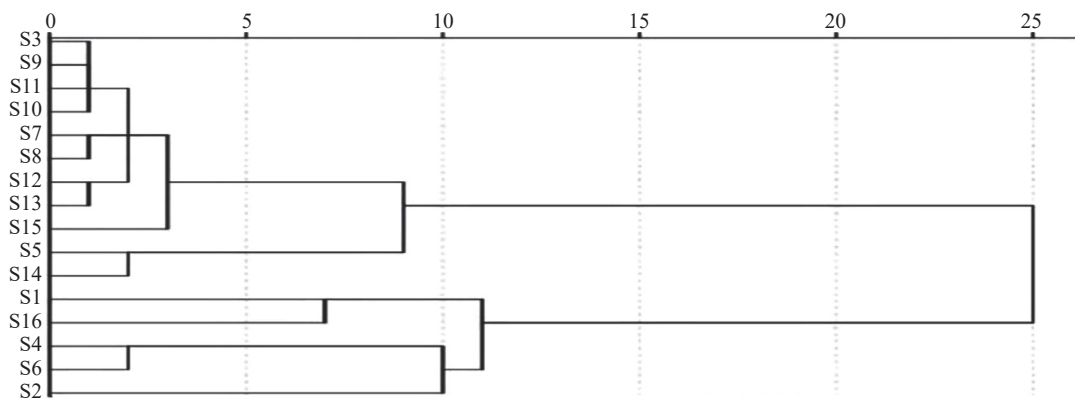


图 2 16 批样品测定结果聚类分析图



- ic characterization of HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Cell*, 2019, 179(5): 1240.
- [13] LONG J Y, WANG A Q, BAI Y, et al. Development and validation of a TP53-associated immune prognostic model for hepatocellular carcinoma[J]. *EBioMedicine*, 2019, 42: 363-374.
- [14] TOK Y T, ŞENER A G, GÖKMEN A A, et al. Investigation of regulatory T cells and secreted immunomodulatory cytokine IL-10 levels in patients with hepatitis B[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2020, 54(2): 266-278.
- [15] HE G B, KARIN M. NF- $\kappa$ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer[J]. *Cell Res*, 2011, 21(1): 159-168.
- [16] MIZUTANI T, SHINODA M, TANAKA Y, et al. Autoantibodies against CYP2D6 and other drug-metabolizing enzymes in autoimmune hepatitis type 2[J]. *Drug Metab Rev*, 2005, 37(1): 235-252.
- [17] CHEN X P, WANG H J, XIE W M, et al. Association of CYP1A2 genetic polymorphisms with hepatocellular carcinoma susceptibility: a case-control study in a high-risk region of China[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2006, 16(3): 219-227.
- [18] SALUM G M, BADER EL DIN N G, IBRAHIM M K, et al. Vascular endothelial growth factor expression in hepatitis C virus-induced liver fibrosis: a potential biomarker[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2017, 37(7): 310-316.
- [19] DU T, GUO X H, ZHU X L, et al. Association of TNF- $\alpha$  promoter polymorphisms with the outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population[J]. *J Viral Hepat*, 2006, 13(9): 618-624.
- [20] EL-KASHEF D H, ABDELRAHMAN R S. Montelukast ameliorates Concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice via inhibiting TNF- $\alpha$ /JNK signaling pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 393: 114931.
- [21] ZHANG H Y, BERNUZZI F, LLEO A, et al. Therapeutic potential of IL-17-mediated signaling pathway in autoimmune liver diseases[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 436450.
- [22] CHANG M L, YEH C T, CHIEN R N, et al. Overt acute hepatitis B deteriorates in females: destructive immunity with an exaggerated interleukin-17 pathway[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 631976.
- [23] HENNIG B J, FIELDING K, BROXHOLME J, et al. Host genetic factors and vaccine-induced immunity to hepatitis B virus infection[J]. *PLoS One*, 2008, 3(3): e1898.
- [24] OFFICE F E. Retraction: microRNA-155 modulates hepatic stellate cell proliferation, apoptosis, and cell cycle progression in rats with alcoholic hepatitis via the MAPK signaling pathway through targeting SOCS1[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12: 840009.
- [收稿日期] 2022-04-11 [修回日期] 2022-07-10  
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 556 页)

类,其中一大类主要为企业 2 和 3 的样品,另一大类主要为企业 1 的样品。结果表明由于企业缺少对该品种中重要指标成分的含量控制,导致产品在不同企业,以及相同企业不同批次之间质量差异较大。

### 3.3 含量分析

由表 2 得知,16 批陈香露白露片 7 种主要成分含量差异较大。其中,橙皮苷含量差异主要表现在不同生产企业之间,主要原因可能是各生产企业使用了不同产地、不同采收期、不同生长年限的原药材导致的差异。而去氢木香内酯含量差异主要表现在同一生产企业的不同批次之间,其原因可能是药材养护措施不当、生产工艺控制参数不合理导致挥发性成分去氢木香内酯损失产生的差异。基于上述研究,建议生产企业加强对陈皮、甘草、川木香等原药材中关键活性成分的质量控制,建立高于《中华人民共和国药典》的内控标准,严格按批准

的处方和生产工艺进行投料与生产,进一步提高陈香露白露片的质量一致性,从而实现其疗效的稳定性和有效性。

### 【参考文献】

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第八册)[S]. 1993: 87.
- [2] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 432.
- [3] 吴惠君, 欧金龙, 池晓玲, 等. 陈皮药理作用研究概述[J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(9s): 91-92.
- [4] 杨豆, 张卫波. 甘草化学成分及药理作用研究[J]. 湖南饲料, 2017(3): 21-23.
- [5] 毛景欣, 王国伟, 易曼, 等. 川木香化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(22): 4797-4803.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)2020年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)2020年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [收稿日期] 2022-02-16 [修回日期] 2022-05-30  
[本文编辑] 崔俐俊