

# 固相萃取-高效液相色谱法测定藿香正气口服液中厚朴酚与和厚朴酚的含量

张海江<sup>1,2</sup>, 郭怀忠<sup>2,3</sup>, 杨晓萍<sup>2</sup>, 罗小慧<sup>2</sup>

(1. 淮阴工学院, 淮安 223003 2. 天津大学, 天津 300072 3. 河北大学, 保定 071002)

**摘要** 目的: 建立简便准确的固相萃取-高效液相色谱法测定藿香正气口服液中厚朴酚与和厚朴酚的含量。方法: 选用 C<sub>18</sub>键合硅胶固相萃取小柱对藿香正气口服液进行预处理, 分别以水和甲醇为淋洗剂和洗脱剂, 收集甲醇洗脱物用于 HPLC 分析。采用 Scierham e-Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水-甲酸 (75: 25: 0.25) 为流动相, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 294 nm。结果: 方法除杂效果明显, 重复性的 RSD 小于 1.0%, 厚朴酚与和厚朴酚的平均回收率分别为 96.7% 和 97.2%。结论: 本方法操作简便快速, 环境友好, 结果准确可靠, 适用于藿香正气口服液中厚朴酚与和厚朴酚的含量测定。

**关键词:** 固相萃取; 高效液相色谱法; 藿香正气口服液; 厚朴酚; 和厚朴酚

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0316-04

## SPE-HPLC determination of honokiol and magnonol in Huoxiangzhengqi oral solution

ZHANG Hai-jiang<sup>1,2</sup>, GUO Huai-zhong<sup>2,3</sup>, YANG Xiao-ping<sup>2</sup>, LUO Xiao-hui<sup>2</sup>

(1. Huaiyin Institute of Technology, Huaiyin 223003 China

2. Tianjin University, Tianjin 300072 China 3. Hebei University, Baoding 071002 China)

**Abstract Objective** To establish a rapid and reliable SPE-HPLC method for determination of honokiol and magnonol in Huoxiangzhengqi oral solution based on the present method in Chinese pharmacopias **Methods** Samples were pre-treated with RP-C<sub>18</sub> SPE column, water and methanol were used as the elution solvents. The methanol eluate was then subjected for HPLC analysis using a Scierham e-Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-water-formic acid (75: 25: 0.25), the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was set at 294 nm. **Results** Through the SPE pre-treatment most impurities were removed. The RSD of the repeatability of this method was less than 1.0%. The recovery rates of magnonol and honokiol were 96.7% and 97.2%, respectively. **Conclusion** The method is rapid, easily operated and reliable.

**Key words** SPE; HPLC; Huoxiangzhengqi oral solution; honokiol; magnonol

藿香正气口服液是传统中药酊剂藿香正气水的水溶性制剂, 主要用于治疗暑湿感冒、头痛身重胸闷、恶寒发热、腹部胀痛、呕吐泄泻。因其口感较好, 尤其适用于对酒精过敏和不宜服用酒精的人群, 故近年来在市场上获得了迅速发展。2005年版中国药典<sup>[1]</sup>以厚朴酚与和厚朴酚的含量作为藿香正气口服液的质量控制指标, 以氯仿为溶剂, 采用液液萃取技术对样品进行预处理, 然后以高效液相色谱法 (HPLC) 测定含量。该方法在实际应用中存在操作烦琐费时、萃取过程出现乳化、所使用的氯仿溶剂毒性较大且污染环境的缺点。

为克服这些缺点, 本文采用近年来在中药分析领域应用广泛的固相萃取技术 (Solid Phase Extraction, SPE)<sup>[2,3]</sup>对藿香正气口服液进行预处理, 建立了基于 SPE-HPLC 技术的藿香正气口服液中厚朴酚与和厚朴酚的含量测定方法。

### 1 仪器与试剂

Agilent 1200 型 HPLC 仪 (G1311A 四元泵, G1322A 脱气机, G1329A 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315B DAD 检测器, Chemstation 色谱工作站), 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司), C<sub>18</sub> 键合硅胶 (30~50 μm,

石家庄石兴氨基酸有限公司), SPE柱(250 mg: 3 mL, 自制)。

藿香正气口服液(市售:北京某厂家,批号:07051908;重庆某厂家,批号:88070015),对照品厚朴酚与和厚朴酚购自上海云上生物技术有限公司(HPLC方法分析,以面积归一化法计算纯度均大于98%)。甲醇为色谱纯(Fisher Scientific),甲酸和氯仿均为分析纯(天津市元立化工有限公司)。

## 2 色谱条件

色谱柱为Scinhome-Kromasil C<sub>18</sub>柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水-甲酸(75:25:0.25);流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温为25℃;检测波长为294 nm,进样量为10 μL。

## 3 溶液制备

**3.1 对照品储备液** 精密称取和厚朴酚对照品10.4 mg,厚朴酚对照品21.8 mg,混合后加甲醇溶解定容至10 mL,摇匀即得。

### 3.2 供试品溶液

**3.2.1** 2005年版中国药典方法<sup>[1]</sup> 精密量取藿香正气口服液5.0 mL,加盐酸两滴,用三氯甲烷振摇提取3次,每次10 mL,合并氯仿液,蒸干,残渣用甲醇溶解并精密稀释至10 mL,摇匀滤过,取续滤液进样。

**3.2.2 SPE预处理方法** 固相萃取小柱依次以5 mL甲醇和5 mL水淋洗后备用。精密量取藿香正气口服液1.0 mL进样,先用15 mL水淋洗,再以甲醇洗脱。收集洗脱液于5 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀即得。

## 4 方法与结果

**4.1 系统适用性试验** 按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2”项下的色谱条件进行分析,重复进样6次,结果见图1。和厚朴酚、厚朴酚的保留时间分别为9.92 min和14.57 min,峰形良好,理论塔板数和厚朴酚为12237,厚朴酚为13985,分离度为4.65,以峰面积计算RSD分别为0.23%和0.21%,均符合相关要求。

**4.2 线性关系考察** 逐级稀释对照品储备液5~400倍得到7个不同浓度的对照品溶液,按“2”项下的色谱条件进行分析。以对照品溶液浓度X(mg·mL<sup>-1</sup>)对其峰面积的平均值Y(n=3)作图,回归方程分别为:

$$Y = 1.527 \times 10^4 X + 2.660 \quad r = 1.000$$

$$Y = 1.263 \times 10^4 X + 12.25 \quad r = 0.9999$$

结果表明,和厚朴酚在0.00260~0.208 mg·mL<sup>-1</sup>,厚朴酚在0.00545~0.436 mg·mL<sup>-1</sup>的浓度范围内,峰面积与浓度有良好的线性关系。

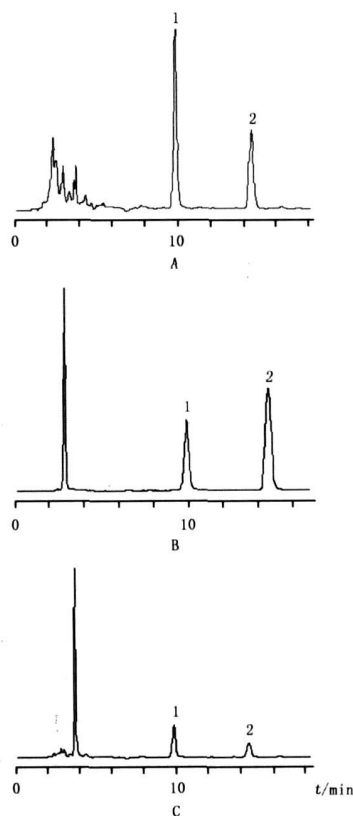


图1 供试品溶液(A)、对照品溶液(B)和按药典方法制备的样品溶液(C)的HPLC谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of Huoxiangzhengqi oral solution (A), reference substances solution (B) and sample solution prepared according to the Chinese pharmacopoeias (C)

1. 和厚朴酚(honokiol)  $t_R = 9.92$  min 2. 厚朴酚(magnonol)  $t_R = 14.57$  min

**4.3 稳定性试验** 取藿香正气口服液,连续3 d内进样测定,每天连续进样3次,测定峰面积,计算和厚朴酚的RSD为0.12%,厚朴酚的RSD为0.34%,表明样品溶液至少在48 h内稳定。

**4.4 精密度试验** 按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2”项下色谱条件连续进样6次,测定峰面积,计算含量。和厚朴酚的RSD为0.23%,厚朴酚的RSD为0.21%,精密度良好。

**4.5 重复性试验** 按“3.2.2”项下方法制备同一批供试品溶液6份,进行HPLC分析,每批样品分析3次,计算含量。和厚朴酚浓度为0.0242 mg·mL<sup>-1</sup>,RSD为0.86%;厚朴酚浓度为0.0164 mg·mL<sup>-1</sup>,RSD为0.72%。

**4.6 加样回收试验** 按“3.1”项下方法配制和厚朴酚1.37 mg·mL<sup>-1</sup>,厚朴酚1.04 mg·mL<sup>-1</sup>的对照品溶液。分别量取2.0 1.5 1.0 mL的经稀释10倍后的对照品溶液各3份于锥形瓶中,挥干,每份加

入精密量取的藿香正气口服液 1 mL, 混合均匀, 按“3.2.2”项下方法制备得供试品。按“2”项下色谱条件进行 HPLC 分析, 每个样品进样 3 次, 计算加样回收率。高浓度时, 和厚朴酚与厚朴酚的回收率 ( $n = 3$ ) 分别为 97.8% 和 97.0%, RSD 分别为 0.66% 和 0.76%; 中浓度时, 和厚朴酚与厚朴酚的回收率 ( $n = 3$ ) 分别为 97.3% 和 97.1%, RSD 分别为 0.68% 和 1.64%, 低浓度时, 和厚朴酚与厚朴酚的

回收率 ( $n = 3$ ) 分别为 96.6% 和 96.0%, RSD 分别为 1.54% 和 2.73%。

4.7 样品测定 按“3.2.2”项和“3.2.1”项下方法分别制备目前市场上的 2 种藿香正气口服液的供试品溶液各 3 批, 按“2”项色谱条件分析, 每个样品进样 3 次, 分别计算和厚朴酚与厚朴酚的含量及本文方法相对于药典方法的回收率。结果见表 1。结果表明, 本文方法与药典方法的测定结果基本一致。

表 1 藿香正气口服液的含量测定结果 ( $n = 3$ )

Tab 1 Contents of honokiol and magnonol in Huoxiangzhengqi oral solution

批号 (Lot No.)	化合物 (compound)	浓度 (concentration) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		回收率 (recovery) /%
		药典方法 (ChP method)	本文方法 (this method)	
		07051908	和厚朴酚 (honokiol)	
	厚朴酚 (magnonol)	0.166	0.164	98.8
88070015	和厚朴酚 (honokiol)	0.191	0.190	99.5
	厚朴酚 (magnonol)	0.173	0.170	98.2

## 5 讨论

5.1 流动相的确定 参考药典方法确定柱型、流速、柱温和检测波长, 首先选择甲醇-水体系为流动相, 考察了不同比例甲醇-水对北京厂家藿香正气口服液的分离效果, 结果表明甲醇-水的比例为 75:25 时, 和厚朴酚与厚朴酚的分离效果和峰形均较好 (图 2-A)。本文在流动相中添加一定浓度甲酸, 结果表明甲醇-0.1% 甲酸的比例为 75:25 时, 在甲醇-水流动相体系中的弱保留成分出现一定程度的分离, 在  $t_R = 3.8 \text{ min}$  时出现强度很大的尖峰 (图 2-B)。样品经中国药典方法处理后, 该谱峰未见明显减小 (图 1-C)。经“3.2.2”项下处理的样品中, 该谱峰则明显降低 (图 3-G), 因此, 本文以甲醇-0.1% 甲酸 (75:25) 为流动相, 以便了解 SPE 方法对杂质的洗脱影响。

### 5.2 SPE 洗脱条件的优化

固相萃取小柱依次以 5 mL 甲醇和 5 mL 水冲洗后备用。精密量取藿香正气口服液 1 mL 进样, 按以下方法进行洗脱, 收集各个洗脱流分, 按“2”项下色谱条件进行 HPLC 分析, 各洗脱物分析结果见图 3 (1) 进样后, 依次以水、10% 甲醇、20% 甲醇、30% 甲醇各约 1 mL 洗脱, 分析进样流出物以及各洗脱物; (2) 分 3 次以 15 mL 的 10% 甲醇淋洗, 每次 5 mL, 再用甲醇洗脱定容至 5 mL, 分析各淋洗液和甲醇洗脱物; (3) 分 3 次以 15 mL 水淋洗, 每次 5 mL, 再用甲醇洗脱定容至 5 mL, 分析各淋洗液和甲醇洗脱物。

(1) 实验结果显示, 10% 甲醇流分及其之前的

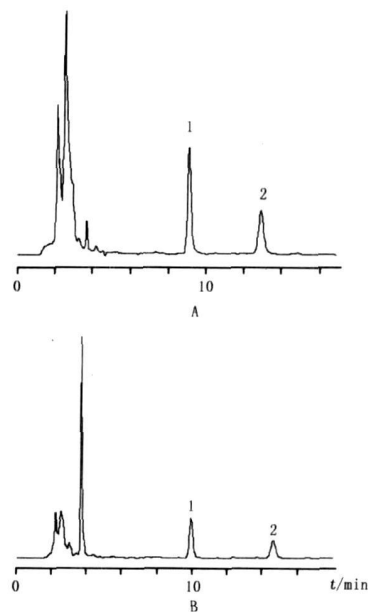


图 2 流动相中添加甲酸前 (A) 后 (B) 的藿香正气口服液 HPLC 谱图  
Fig 2 HPLC chromatograms of Huoxiangzhengqi oral solution with mobile phase (A) not containing formic acid (B) containing formic acid  
1 和厚朴酚 (honokiol) 2 厚朴酚 (magnonol)

洗脱物 (图 3-A、B、C) 中未检测出目标化合物, 20% 甲醇流分 (图 3-D) 中目标化合物的谱峰较大。因此, 确定进样量为 1 mL, 以水和 10% 甲醇为淋洗液进一步优化洗脱方法。(2)、(3) 项实验结果显示, 淋洗液对杂质峰的洗脱效果显著, 第 3 次淋洗液中的杂质峰基本消失, 因此确定淋洗液用量为 15 mL。图 3-F 和图 3-G 显示水和 10% 甲醇对杂质

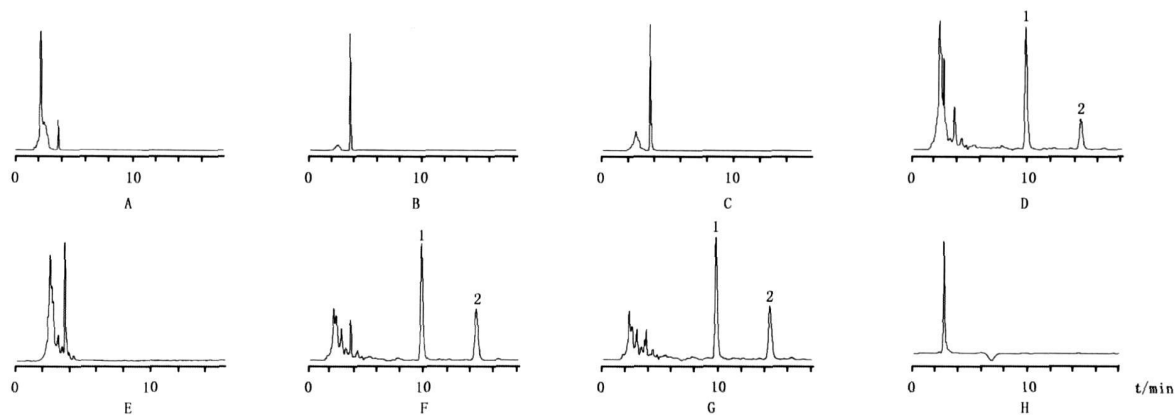


图 3 SPE各流分的色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of different eluates

A. 进样流出液 (eluate of loading sample) B 水洗洗脱液 (water eluate) C. 10% 甲醇洗脱液 (10% methanol eluate) D. 20% 甲醇流分 (20% methanol eluate) E 第 3 个 5 mL 10% 甲醇淋洗液 (the 3rd 5 mL 10% methanol eluate) F. 经 15 mL 10% 甲醇淋洗后的 5 mL 甲醇洗脱液 (methanol eluate with 15 mL 10% methanol pre-washed) G. 经 15 mL 水洗后的 5 mL 甲醇洗脱液 (methanol eluate with 15 mL water pre-washed) H. 第 6 mL 甲醇洗脱液 (the 6th milliliter methanol eluate)

1. 和厚朴酚 (honokiol 9.92 min) 2. 厚朴酚 (magnonol 14.57 min)

的去除效果无明显差别,且都显著好于中国药典方法(图 1- C)。因此,确定以 15 mL 水为淋洗液。当 5 mL 甲醇洗脱完毕后,再各以 1 mL 甲醇洗脱,收集洗脱物,分析后发现没有目标化合物(图 3- H),表明 5 mL 甲醇已将目标化合物洗脱完全。

**5.3 藿香正气口服液作为水溶性制剂,相比藿香正气水的酏剂更适用于采用固相萃取技术进行样品的前处理。**本方法与中国药典方法相比,结果准确可靠,同时具有操作简单、快速、环境友好、除杂效果显

著的特点,尤其适合于大量样品的分析。

参考文献

- 1 ChP (中国药典). 2005. Vol I (一部): 660
- 2 YANG Tie-jin (杨铁金). Analytical Samples Pre-treatment and Separation Technologies (分析样品预处理及分离技术). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2007. 289
- 3 ChP (中国药典). 2005. Vol II (二部): 420

(本文于 2007 年 12 月 3 日收到)