[质 量]

HPLC 法同时测定六味木香丸中 4 种成分

徐 僮，杜 欢，李 琪，王 张，张 静*，范 刚*
(成都中医药大学民族医药学院，四川 成都 611137)

摘要：目的 建立 HPLC 法同时测定六味木香丸（木香、余甘子、豆蔻等）中 4 种成分的含有量。**方法** 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 WondaSil C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈-0.2% 磷酸，梯度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 210 nm。**结果** 鞣花酸、胡椒碱、木香烃内酯、去氢木香内酯分别在 16.06～321.20、20.66～413.20、7.00～140.00、15.76～315.20 μg/mL 范围内线性关系良好（r=0.999 5），平均加样回收率分别为 96.69%、97.26%、98.27%、97.75%，RSD 分别为 2.85%、2.66%、2.47%、2.83%。**结论** 该方法简便准确，重复性好，可用于六味木香丸的质量控制。

关键词：六味木香丸；鞣花酸；胡椒碱；木香烃内酯；去氢木香内酯；HPLC
中图分类号：R927.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2019)10-2315-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.10.006

Simultaneous determination of four constituents in Liuwei Muxiang Pills by HPLC

XU Tong, DU Huan, LI Qi, WANG Zhang, ZHANG Jing*, FAN Gang*
(*College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China*)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Liuwei Muxiang Pills (*Aucklandiae Radix*, *Phyllanthi Fructus*, *Amomi Fructus Rotundus*, *etc.*). **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic WondaSil C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.2% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 210 nm. **RESULTS** Ellagic acid, piperine, costunolide, dehydrocostuslactone showed good linear relationships within the ranges of 16.06-321.20, 20.66-413.20, 7.00-140.00, 15.76-315.20 μg/mL (r = 0.999 5), whose average recoveries were 96.69%, 97.26%, 98.27%, 97.75% with the RSDs of 2.85%, 2.66%, 2.47%, 2.83%, respectively. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Liuwei Muxiang Pills.

KEY WORDS: Liuwei Muxiang Pills; ellagic acid; piperine; costunolide; dehydrocostuslactone; HPLC

六味木香丸为常用藏药成方制剂，又名“如达柱巴”，收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》（藏药分册），具有止吐、止疼的功效，可用于治疗“培根木布”引起的疼痛、嗳气、腹胀、呕吐等[1]，主要由木香、巴夏嘎、余甘子、豆蔻、荜茇、石榴子 6 味药材组成。其中，木香为君药，气浓香，性凉，味苦，能清烦热，调和气血，消积去食，可用于“培根”聚滞、烦热[2]；余甘子、石榴子为臣药，前者性凉、锐，能清血热、健胃消食、生津止咳，主治培根病、消化不良症[3]，而

收稿日期：2019-02-28
基金项目：四川省教育厅科技成果转化重大培育项目（18CZ0011）；成都中医药大学科技发展基金（CGZH1704）
作者简介：徐 僮（1996—），男，硕士生，从事藏药质量评价及药效物质基础研究。Tel：（028）87714869，E-mail：905771949@qq.com
*通信作者：张 静（1982—），女，博士，教授，从事中药及民族药药效物质基础研究。Tel：（028）87714869，E-mail：zhangjingtcm@cdutcm.edu.cn
范 刚（1983—），男，博士，副研究员，从事民族药质量控制研究，Tel：（028）87714869，E-mail：fangang1111@163.com

后者性温，能开胃，助消化，可治疗胃病、培根病、一切培龙病[4]。现代研究表明，六味木香丸具有明显的抗炎、镇痛、抗胃溃疡损伤作用[5-6]，在质量控制方面，已有采用 HPLC 法测定木香烃内酯、去氢木香内酯含有量的报道[7-9]，但尚未涉及其他成分。因此，本实验建立 HPLC 法同时测定六味木香丸中鞣花酸、胡椒碱、木香烃内酯、去氢木香内酯的含有量，以期为提高该制剂质量控制水平提供参考依据。

1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪，配置二极管阵列（DAD）检测器、自动进样器、柱温箱（美国 Agilent 公司）；SB5200D 型超声波清洗机（宁波新艺超声设备有限公司）；UPLC-1-10T 型超纯水机（成都优普超纯水科技有限公司）；DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅（北京市永光明医疗仪器厂）；BSA124S 型电子天平［赛多利斯科学仪器（北京）有限公司］。

六味木香丸 9 批（批号 20170708、20180620、20180620、20180620、20180815、20180905、20180912、20180912、20180915），主要购于西藏、青海、四川等地藏医院和藏药厂。木香烃内酯（批号 111524-201710）、去氢木香内酯（批号 111525-201711）对照品购于中国食品药品检定研究院；胡椒碱（批号 PS010640）、鞣花酸（批号 PS010827）对照品购于成都普思生物科技股份有限公司，含有量均大于 98%。

2 方法与结果

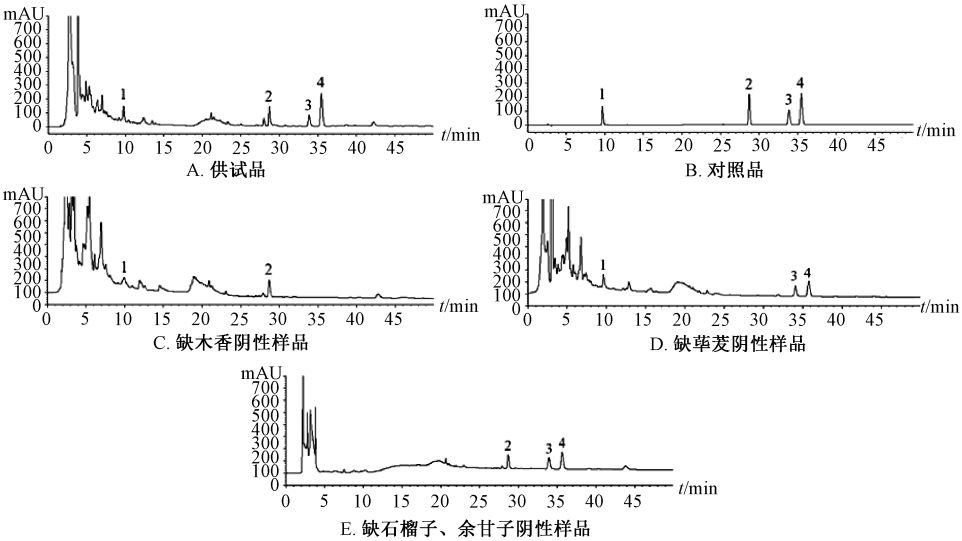
2.1 色谱条件 WondaSil C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-0.2% 磷酸（B），梯度洗脱（0～12 min，20%～28% A；12～15 min，28% A；15～20 min，28%～55% A；20～35 min，55%～60% A；35～45 min，60%～65% A）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 210 nm；进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取去氢木香内酯、木香烃内酯、鞣花酸、胡椒碱对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，甲醇分别制成 3.152、1.400、3.212、4.132 mg/mL 贮备液，各精密量取 5 mL，置于同一 50 mL 量瓶中，甲醇制成每 1 mL 分别含四者 0.315 2、0.140 0、0.321 2、0.413 2 mg 的溶液，摇匀，即得。

2.3 供试品溶液制备 精密称取丸剂粉末约 2.0 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 50 mL 70% 甲醇，密塞，称定质量，水浴回流提取 40 min，放冷，70% 甲醇补足减失的质量，摇匀，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.4 阴性样品溶液制备 取缺荜茇、木香及石榴子、余甘子的阴性样品，按“2.3”项下方法制备，即得。

2.5 专属性考察 取对照品、供试品、阴性样品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由图可知，阴性无干扰，方法专属性良好。



1. 鞣花酸 2. 胡椒碱 3. 木香烃内酯 4. 去氢木香内酯

1. ellagic acid 2. piperine 3. costunolide 4. dehydroligustilide

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.6 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1、2、4、6、8、10 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，配制成 6 个质量浓度，在“2.1”项色谱条件下各进样 10 μL 测定。以溶液质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/（μg·mL^{-1}）	r
鞣花酸	Y=16 012X−51.735	16.06～321.20	0.999 5
胡椒碱	Y=21 351X+114.67	20.66～413.20	0.999 5
木香烃内酯	Y=38 679X+50.14	7.00～140.00	0.999 5
去氢木香内酯	Y=32 095X+112.11	15.76～315.20	0.999 5

2.7 精密度试验 对照品溶液在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得鞣花酸、胡椒碱、木香烃内酯、去氢木香内酯峰面积 RSD 分别为 1.16%、1.22%、1.21%、1.24%，表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一批供试品溶液（批号 20170708），于 0、1、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得鞣花酸、胡椒碱、木香烃内酯、去氢木香内酯峰面积 RSD 分别为 0.98%、0.24%、0.19%、0.21%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 精密称取同一批丸剂（批号 20170708）粉末 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得鞣花酸、胡椒碱、木香烃内酯、去氢木香烃内酯含有量 RSD 分别为 1.83%、1.98%、1.96%、1.10%，表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取同一批丸剂（批号 20170708）粉末 6 份，每份约 1.0 g，按 100%水平加入鞣花酸（4.794 mg/mL）、胡椒碱（3.776 6 mg/mL）、木香烃内酯（2.349 mg/mL）、去氢木香内酯（5.810 6 mg/mL）对照品溶液，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率，结果见表 2。

表 2 各成分加样回收率试验结果（n=6）

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents（n=6）

成分	取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%（RSD/%）
鞣花酸	1.003 7	2.408 9	2.397 0	4.779 3	98.89	96.69
	1.001 2	2.402 9	2.397 0	4.691 0	95.46	（2.85）
	1.001 2	2.402 9	2.397 0	4.671 3	94.63	
	1.004 7	2.411 3	2.397 0	4.820 6	100.51	
	1.002 1	2.405 0	2.397 0	4.639 1	93.20	
	1.002 4	2.405 8	2.397 0	4.741 9	97.46	
胡椒碱	1.003 7	1.907 0	1.888 3	3.796 6	100.07	97.26
	1.001 2	1.902 3	1.888 3	3.736 7	97.15	（2.66）
	1.001 2	1.902 3	1.888 3	3.684 4	94.38	
	1.004 7	1.908 9	1.888 3	3.711 1	95.44	
	1.002 1	1.904 0	1.888 3	3.713 7	95.84	
	1.002 4	1.904 6	1.888 3	3.806 0	100.69	
木香烃内酯	1.003 7	0.501 9	0.469 8	0.955 7	96.59	98.27
	1.001 2	0.500 6	0.469 8	0.976 1	101.21	（2.47）
	1.001 2	0.500 6	0.469 8	0.954 4	96.59	
	1.004 7	0.502 4	0.469 8	0.955 0	96.34	
	1.002 1	0.501 1	0.469 8	0.978 1	101.53	
	1.002 4	0.501 2	0.469 8	0.958 5	97.34	
去氢木香内酯	1.003 7	2.910 7	2.905 3	5.791 5	99.16	97.75
	1.001 2	2.903 5	2.905 3	5.718 3	96.89	（2.83）
	1.001 2	2.903 5	2.905 3	5.664 9	95.05	
	1.004 7	2.913 6	2.905 3	5.879 7	102.09	
	1.002 1	2.906 1	2.905 3	5.768 5	98.52	
	1.002 4	2.907 0	2.905 3	5.660 5	94.78	

2.11 样品含有量测定 取各批丸剂粉末，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，平行 3 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 3。

表 3 各成分含量测定结果（$n=3$）

Tab. 3 Results of content determination of various constituents ($n=3$)

批号	来源	胡椒碱/%	木香烃内酯/%	去氢木香内酯/%	鞣花酸/%
20170708	四川省甘孜藏族自治州藏医院	0. 19	0. 05	0. 29	0. 24
20180620	青海省藏医院	0. 43	0. 31	0. 45	0. 00
20180620	青海省海南藏族自治州藏医院	0. 22	0. 13	0. 21	0. 03
20180620	青海省海北藏族自治州藏医院	0. 12	0. 14	0. 21	0. 02
20180815	西藏藏医药大学附属医院	0. 13	0. 06	0. 28	0. 05
20180905	四川省阿坝藏族羌族自治州红原县藏医院	0. 24	0. 15	0. 56	0. 00
20180912	西藏自治区山南地区藏医院制剂室	0. 09	0. 10	0. 11	0. 32
20180912	西藏自治区藏医院门孜康制剂中心	0. 10	0. 02	0. 17	0. 01
20180915	西藏藏医学院藏药厂	0. 16	0. 02	0. 16	0. 08
	平均值	0. 19	0. 11	0. 27	0. 08

3 讨论

3.1 指标成分筛选 木香为六味木香丸君药，木香烃内酯、去氢木香内酯是其主要有效成分，具有明显的抗炎、抗肿瘤、抗胃溃疡等作用[10]；余甘子、石榴子用量较大，为臣药，均含有没食子酸、鞣花酸等鞣质，具有明显的抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤等多种生物活性[11-12]；胡椒碱是荜拨中主要有效成分，具有抗炎、抗氧化等作用[13]，这些药理活性与该制剂治疗慢性胃炎、胃溃疡等疾病基本吻合。本实验曾尝试测定六味木香丸中没食子酸含有量，但发现该成分极性较大，出峰时间很快，不能与其他极性较大的杂质峰分离，而且其专属性不强，故最终选择木香烃内酯、去氢木香内酯、鞣花酸、胡椒碱作为指标成分。

3.2 HPLC 色谱条件优化 本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0. 2% 磷酸、甲醇-0. 2% 磷酸流动相，发现以乙腈-0. 2% 磷酸为流动相梯度洗脱时，分离效果最佳。此外，还对色谱柱、检测波长、柱温等条件进行了研究，发现在 WondaSil C_{18} 色谱柱、柱温 30 ℃、检测波长 210 nm 条件下各成分分离度、峰型、对称因子最佳。

3.3 提取条件优化 本实验考察了提取方法（回流、超声、冷浸）、提取溶剂（70% 甲醇、50% 甲醇、甲醇、无水乙醇、纯水）、提取时间（20、30、40、50 min）、溶剂用量（25、50、70 mL），发现 50 mL 70% 甲醇回流提取 40 min 时，提取效果最佳。

3.4 含有量测定分析 9 批六味木香丸中均检测出胡椒碱、木香烃内酯、去氢木香内酯，平均含有量分别为 0. 19%、0. 11%、0. 27%；鞣花酸平均含有量为 0. 08%，但有 2 批未检测出，而且差异较大，可能是原药材来源不同造成的。余甘子、石榴子中均含有鞣花酸，文献［14-15］报道，不同产地 2 种药材中其含有量明显不同。因此，为了控制六味木香丸质量，在收集原药材时要注意保证余甘子、石榴子来源的稳定性。

4 结论

本实验首次建立 HPLC 法同时测定六味木香丸中鞣花酸、胡椒碱、木香烃内酯、去氢木香内酯的含有量，该方法简便可行，准确性、重复性较好，可为该制剂质量控制及标准建立提供参考。

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（藏药第一册）［S］. 1995.
［2］ 罗尚达. 中华藏本草［M］. 北京：民族出版社，1997.
［3］ 青海省药品检验所，青海省藏医药研究所. 中国藏药（第一卷）［M］. 上海：上海科学技术出版社，1996.
［4］ 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志［M］. 西宁：青海人民出版社，1991.
［5］ 鲁建美，张志峰，曾 锐，等. 六味木香丸抗炎镇痛作用的研究［J］. 华西药学杂志，2016，31(2)：146-148.
［6］ 鲁建美，吕露阳，张吉仲，等. 藏药六味木香丸对大鼠实验性胃溃疡损伤的保护作用［J］. 西南民族大学学报（自然科学版），2015，41(6)：713-716.
［7］ 焦正花，刘效栓，杨金草. RP-HPLC 测定藏药六味木香丸中木香烃内酯和去氢木香内酯含量［J］. 中国中医药信息杂志，2015，22(10)：94-96.
［8］ 续艳丽，祁景琨，续创业，等. 藏药六味木香丸的定性定量检测方法研究［J］. 中国药事，2017，31(3)：295-300.
［9］ 吕露阳，刘 圆，张志锋，等. 藏族验方制剂六味木香丸的质量控制研究［J］. 西南师范大学学报（自然科学版），2013，38(6)：63-67.
［10］ 魏 华，彭 勇，马国需，等. 木香有效成分及药理作用研究进展［J］. 中草药，2012，43(3)：613-620.
［11］ 郑雪花，杨 君，杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展［J］. 中国医院药学杂志，2017，37(1)：94-98；102.
［12］ 范高福，胥振国，刘修树，等. 植物提取物鞣花酸的药理作用及制剂研究进展［J］. 基因组学与应用生物学，2016，35(12)：3562-3568.

[13] 乔佛晓，禹玉洪，李 燕. 荜茇的药理作用与毒性作用研究概述[J]. 环球中医药，2015，8(4)：507-512.
[14] 蔡 霞，李聪颖，张雨欣，等. 石榴皮、石榴子质量标准提高研究[J]. 世界科学技术（中医药现代化），2015，17(5)：1007-1011.
[15] 郑玉忠，张振霞，董婷霞，等. 余甘子药材 HPLC 指纹图谱及其没食子酸和鞣花酸含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(23)：94-99.

丹参总酚酸滴丸的制备及质量评价

何银舟[1]， 胡正明[1]， 潘 旻[2]， 嵇 晶[2]， 程建明[2*]
(1. 淮安市淮安医院，江苏 淮安 223001；2. 南京中医药大学，江苏 南京 210023)

摘要：目的 制备丹参总酚酸滴丸，并对其进行质量评价。**方法** 以外观、成型性为评价指标，单因素试验考察冷却剂种类、基质配比、药物与基质配比、滴距、滴速、料温对制备工艺的影响。然后，HPLC 法测定丹酚酸 B、迷迭香酸含有量，TLC 法定性鉴别，药典法检测重量差异限度、溶散时限。**结果** 最佳条件为冷却剂二甲基硅油，基质配比 3∶1，药物与基质配比 1∶5，滴距 6 cm，滴速 60 滴/min，料温 65 ℃，所得滴丸圆整均一，无拖尾和粘连。丹酚酸 B、迷迭香酸分别在 19.01～190.12 μg/mL（R^2=0.999 6）、1.49～14.90 μg/mL（R^2=0.999 8）范围内线性关系良好，平均加样回收率分别为 97.92%、96.58%，RSD 分别为 2.45%、1.64%；TLC 斑点清晰，重复性好；重量差异限度、溶散时限符合药典要求。**结论** 该方法合理、可行、稳定，可用于制备丹参总酚酸滴丸。

关键词：丹参总酚酸；滴丸；制备；丹酚酸 B；迷迭香酸；单因素试验；HPLC；TLC
中图分类号：R944 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2019)10-2319-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.10.007

Preparation and quality evaluation for dropping pills of total salvianolic acids

HE Yin-zhou[1], HU Zheng-ming[1], PAN Min[2], JI Jing[2], CHENG Jian-ming[2*]
(*1. Huai'an Hospital of Huai' an City, Huai' an 223001, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

ABSTRACT: AIM To prepare the dropping pills of total salvianolic acids and to make quality evaluation. **METHODS** With appearance and formability as evaluation indices, the effects of coolant type, matrix ratio, drug-matrix ratio, dropping distance, dropping speed and material temperature on preparation process were investigated by single factor test. Subsequently, HPLC was adopted in the content determination of salvianolic acid B and rosmarinic acid, TLC was used for qualitative identification, and pharmacopeia method was applied to detecting weight difference degree and dissolving time. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be dimethicone as coolant, 3∶1 for matrix ratio, 1∶5 for drug-matrix ratio, 6 cm for dropping distance, 60 drops/min for dropping speed, 65 ℃ for material temperature, the obtained round and uniform dropping pills displayed no tailing and adhesion. Salvianolic acid B and rosmarinic acid showed good linear relationships within the ranges of 19.01-190.12 μg/mL (R^2=0.999 6) and 1.49-14.90 μg/mL (R^2=0.999 8), whose average recoveries were 97.92% and 96.58% with the RSDs of 2.45% and 1.64%. The clear TLC spots were reproducible. Both weight difference degree and dissolving time accorded with the pharmacopoeia requirements. **CONCLUSION** This reasonable, feasible and stable method can be used for the preparation of total salvianolic acids dropping pills.

KEY WORDS: total salvianolic acids; dropping pills; preparation; salvianolic acid B; rosmarinic acid; single factor test; HPLC; TLC

收稿日期：2019-01-07
基金项目：江苏省高校自然科学基金项目（13KJD360004）
作者简介：何银舟（1964—），男，副主任药师，研究方向为药剂学。Tel：13915117666，E-mail：czyyybk@163.com
*通信作者：程建明（1965—），男，博士，研究员，研究方向为药物新剂型与新技术开发。Tel：13585206999，E-mail：cjm7895@163.com