

HPLC-DAD同时测定藏药洁白丸中4种成分的含量^Δ

张 炜^{1*}, 宋文静², 马青青¹, 范莹莹¹, 杨凤梅¹, 骆桂法^{1#}(1.青海省药品检验检测院藏药室/青海省中藏药现代化研究重点实验室, 西宁 810003; 2.青海省心脑血管病专科医院药剂科, 西宁 810012)

中图分类号 R917;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)17-2381-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.17.18

摘要 目的:建立同时测定藏药洁白丸中没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为CAPCELL PAK MG II C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,检测波长为220 nm(土木香内酯、异土木香内酯)和280 nm(没食子酸、丁香酚),柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯检测质量浓度线性范围分别为46.50~2 325.00、21.28~1 064.00、4.38~219.20、4.17~208.40 μg/mL(r 均 \geq 0.999 1),检测限分别为0.26、0.09、0.28、0.35 μg/mL,定量限分别为0.74、0.25、0.95、1.06 μg/mL;精密度、稳定性(48 h)、重复性试验的RSD均 \leq 2.0%($n=6$ 或 $n=7$),加样回收率分别为98.5%、97.6%、97.1%、101.6%,RSD分别为1.4%、1.9%、1.6%、1.7%($n=6$);6批洁白丸样品中没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯含量范围分别为4.28~7.02、1.09~4.90、0.25~0.60、0.30~0.72 mg/g。结论:建立的方法可用于藏药洁白丸中没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯含量的同时测定。

关键词 洁白丸;藏药;含量;没食子酸;丁香酚;土木香内酯;异土木香内酯;高效液相色谱法

Content Determination of 4 Components in Tibetan Medicine Jiebai Pills by HPLC-DAD Simultaneously

ZHANG Wei¹, SONG Wenjing², MA Qingqing¹, FAN Yingying¹, YANG Fengmei¹, LUO Guifa¹(1.Lab of Tibetan Medicine, Qinghai Institute for Drug Control/Qinghai Key Lab of Traditional Chinese and Tibetan Medicine Modernization Research, Xining 810003, China; 2.Dept. of Pharmacy, Qinghai Cardiovascular Disease Special Hospital, Xining 810012, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of gallic acid, eugenol, alantolactone and isosalantolactone in Tibetan medicine Jiebai pills simultaneously. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on CAPCELL PAK MG II C₁₈ column with of mobile phase composed of methanol-acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.8 mL/min. The detection wavelengths were 220 nm for alantolactone and isosalantolactone, 280 nm for gallic acid and eugenol. The column temperature was at 30 ℃, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of gallic acid, eugenol, alantolactone and isosalantolactone were 46.50-2 325.00, 21.28-1 064.00, 4.38-219.20 and 4.17-208.40 μg/mL, respectively (all $r \geq 0.999 1$). The limits of detection were 0.26, 0.09, 0.28, 0.35 μg/mL, and the limits of quantitation were 0.74, 0.25, 0.95, 1.06 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability (48 h) and reproducibility tests were all lower than 2.0% ($n=6$ or $n=7$). The recoveries were 98.5%, 97.6%, 97.1% and 101.6%, and RSDs were 1.4%, 1.9%, 1.6%, 1.7% ($n=6$), respectively. The content of gallic acid, eugenol, alantolactone and isosalantolactone in 6 batches of Baijie pills were 4.28-7.02, 1.09-4.90, 0.25-0.60, 0.30-0.72 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: The established method can be used for content determination of gallic acid, eugenol, alantolactone and isosalantolactone in Tibetan medicine Jiebai pills simultaneously.

KEYWORDS Jiebai pills; Tibetan medicine; Content; Gallic acid; Eugenol; Alantolactone; Isoalantolactone; HPLC

洁白丸成方于公元14世纪,出自藏族历史上著名的大成就者唐东杰布(1385—1464),公元17世纪达莫门让巴·洛桑曲扎将本方收载于其编著的《达莫·秘籍》中,公元19世纪贡珠·云丹嘉措编著《宝藏》称本品为唐东杰布发明的“白丸”^[1]。洁白丸应用于藏医临床有近千年的历史,是治疗消化道疾病的经典验方,其以确切的疗效被

流传至今。20世纪初,经过一系列的工艺改进和完善,演变为现用的“洁白丸”及其他剂型^[2]。

洁白丸是健脾和胃、止痛止吐的常用胃药,主要用于胃寒疼痛、胸腹胀满。方中以诃子为主药,强身壮体,健脾止泻,调节“三因”;辅以温中和胃、开胃消食、驱风散寒的石榴、木瓜、肉豆蔻、草豆蔻、丁香、草果仁,以治疗胃火衰退、胃痛;为了加强止痛止泻、消除腹胀的作用,又配用了可清热消炎、止痛止泻、调理气血的寒水石、沉香、红花、石灰华、五灵脂膏、土木香、翼首草^[3-4]。此方既可治疗呕吐泄泻,又可用于胸腹胀满,是藏族先民留下来的难得的治疗消化道疾病的良方^[5-7]。

^Δ 基金项目:青海省科技计划项目(No.2017-ZJ-772、2017-ZJ-Y40)

* 主管药师。研究方向:中藏药检验及质量标准。电话:0971-8215400。E-mail:zrj0706@gmail.com

通信作者:主任药师,硕士。研究方向:中藏药质量标准。电话:0971-8232419。E-mail:luoguifa-zys@163.com

经查询国家食品药品监督管理局药品数据库,全国生产洁白丸及其他剂型的藏药生产厂家有10余家,除丸剂外,还包括胶囊剂、片剂等。现有文献报道多集中于洁白丸的物质基础及临床功效研究上^[4-7],尚未见对洁白丸多组分含量测定的报道。本试验采用高效液相色谱(HPLC)法对洁白丸中没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯的含量进行同时测定,以期为更科学、更全面地控制洁白丸的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Waters e2695 HPLC仪,包括2998光电二极管阵列检测器(DAD)、Empower 3色谱工作站(美国Waters公司);AUW220D电子天平(日本Shimadzu公司);CPA225D电子天平(德国Sartorius公司);Milli-Q超纯水系统(德国Merck公司);Q250DE超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司);DK-S16恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

洁白丸(金诃藏药股份有限公司,批号:20150402、20160102、20160201、20160202、20160519、20161105,规格:每丸质量0.8g);丁香酚对照品(批号:110725-201414,纯度:≥98%)、土木香内酯对照品(批号:110760-201510,纯度:≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;没食子酸对照品(批号:15061207,纯度:≥98%)、异土木香内酯对照品(批号:13041108,纯度:≥98%)均购自北京恒元启天化工技术研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:CAPCELL PAK MG II C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-0.2%磷酸溶液,梯度洗脱;流速:0.8 mL/min;检测波长:220 nm(土木香内酯、异土木香内酯)、280 nm(没食子酸、丁香酚);柱温:30℃;进样量:10 μL。流动相梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program of mobile phase

| 时间, min | 甲醇, % | 乙腈, % | 0.2%磷酸溶液, % |
|---------|-------|-------|-------------|
| 0~10 | 5 | 2 | 93 |
| 10~20 | 5→10 | 2→48 | 93→42 |
| 20~40 | 10→15 | 48→55 | 42→30 |

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取没食子酸、丁香酚、土木香内酯和异土木香内酯对照品适量,置于棕色量瓶中,加入甲醇溶解并定容,制成没食子酸、丁香酚、土木香内酯和异土木香内酯质量浓度分别为2.325、1.064、0.219、0.208 mg/mL的混合溶液,作为混合对照品贮备溶液。精密吸取上述溶液加甲醇稀释10倍,制成质量浓度分别为232.5、106.4、21.9、20.8 μg/mL的混合溶液,作

为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取洁白丸样品,研成细粉;精密称取1.0 g,置于100 mL锥形瓶中;精密加入甲醇25 mL,称定质量,85℃加热回流60 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按洁白丸的处方配比,除去诃子、丁香、土木香制成阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制备成洁白丸阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果,在该色谱条件下,没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯在各自检测波长下均与其他成分完全分离,各成分色谱峰之间及与相邻色谱峰之间分离度均>1.5,其他成分对待测成分的测定无干扰。理论板数以没食子酸峰计不低于3 000,详见图1。

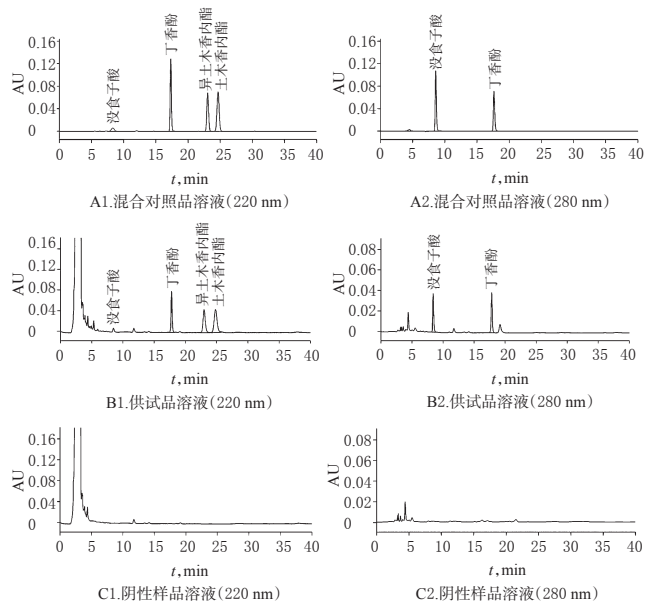


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品贮备溶液0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释成一系列质量浓度的标准溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得到4种成分的线性范围及回归方程,结果表明,4种成分在各进样范围内均呈良好的线性关系,结果详见表2。

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为3:1时,得检测限;当信噪比为10:1时,得定量限,结果详见表2。

表2 4种成分的回归方程、线性范围、检测限及定量限

Tab 2 Regression equations, linear ranges, LODs and LOQs of 4 components

| 待测成分 | 回归方程 | 线性范围, $\mu\text{g/mL}$ | r | 检测限, $\mu\text{g/mL}$ | 定量限, $\mu\text{g/mL}$ |
|--------|---------------------|------------------------|---------|-----------------------|-----------------------|
| 没食子酸 | $y=2.956x-57.076$ | 46.50~2 325.00 | 0.999 8 | 0.26 | 0.74 |
| 丁香酚 | $y=12.483x-140.768$ | 21.28~1 064.00 | 0.999 1 | 0.09 | 0.25 |
| 土木香内酯 | $y=21.054x+27.395$ | 4.38~219.20 | 0.999 2 | 0.28 | 0.95 |
| 异土木香内酯 | $y=57.731x+93.534$ | 4.17~208.40 | 0.999 4 | 0.35 | 1.06 |

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,每次10 μL ,记录峰面积。结果,没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯峰面积的RSD分别为0.9%、1.2%、0.7%、1.6% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取洁白丸样品(批号:20160519),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、16、24、48 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯的峰面积RSD分别为1.3%、1.8%、2.0%、1.5% ($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置48 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取洁白丸样品(批号:20160519)粉末1.0 g,平行6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果,没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯平均质量分数的RSD分别为1.7%、1.2%、1.8%、1.9% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取洁白丸样品(批号:20160519)0.5 g,平行6份,分别加入约与样品中没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯4种成分含量相同的4种对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯的平均加样回收率分别为98.5%、97.6%、97.1%、101.6%,RSD分别为1.4%、1.9%、1.6%、1.7% ($n=6$),结果详见表3。

2.10 样品含量测定

取6批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果详见表4。

3 讨论

3.1 提取条件的选择

以没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯4种成分的提取率为指标,分别对超声波提取和加热回流提取方法、甲醇和乙腈两种提取溶剂、50%~100%的提取溶剂(甲醇和乙腈)质量分数、30~60 min的提取时间及提取溶剂的量(25和50 mL)进行综合交叉考察。结

果显示,以25 mL的纯甲醇加热回流提取60 min所得供试品中4种待测成分的提取率最高。

表3 加样回收率试验结果($n=6$)Tab 3 Results of recovery tests($n=6$)

| 待测成分 | 取样量, g | 样品含量, mg | 加入量, mg | 测得量, mg | 加样回收率, % | 平均加样回收率, % | RSD, % |
|--------|---------|----------|---------|---------|----------|------------|--------|
| 没食子酸 | 0.502 4 | 2.979 | 3.023 | 5.991 | 99.63 | 98.5 | 1.4 |
| | 0.506 5 | 3.004 | 3.023 | 6.033 | 100.21 | | |
| | 0.501 2 | 2.972 | 3.023 | 5.962 | 98.90 | | |
| | 0.500 3 | 2.967 | 3.023 | 5.920 | 97.69 | | |
| | 0.503 7 | 2.987 | 3.023 | 5.902 | 96.43 | | |
| | 0.502 1 | 2.977 | 3.023 | 5.946 | 98.20 | | |
| 丁香酚 | 0.502 4 | 1.613 | 1.596 | 3.164 | 97.20 | 97.6 | 1.9 |
| | 0.506 5 | 1.626 | 1.596 | 3.242 | 101.26 | | |
| | 0.501 2 | 1.609 | 1.596 | 3.155 | 96.88 | | |
| | 0.500 3 | 1.606 | 1.596 | 3.157 | 97.18 | | |
| | 0.503 7 | 1.617 | 1.596 | 3.149 | 96.00 | | |
| | 0.502 1 | 1.612 | 1.596 | 3.157 | 96.82 | | |
| 土木香内酯 | 0.502 4 | 0.211 | 0.219 | 0.424 | 97.26 | 97.1 | 1.6 |
| | 0.506 5 | 0.213 | 0.219 | 0.429 | 98.75 | | |
| | 0.501 2 | 0.211 | 0.219 | 0.425 | 97.94 | | |
| | 0.500 3 | 0.210 | 0.219 | 0.425 | 98.12 | | |
| | 0.503 7 | 0.212 | 0.219 | 0.419 | 94.72 | | |
| | 0.502 1 | 0.211 | 0.219 | 0.421 | 95.94 | | |
| 异土木香内酯 | 0.502 4 | 0.286 | 0.291 | 0.575 | 99.19 | 101.6 | 1.7 |
| | 0.506 5 | 0.289 | 0.291 | 0.588 | 102.85 | | |
| | 0.501 2 | 0.286 | 0.291 | 0.582 | 101.83 | | |
| | 0.500 3 | 0.285 | 0.291 | 0.585 | 103.03 | | |
| | 0.503 7 | 0.287 | 0.291 | 0.587 | 103.06 | | |
| | 0.502 1 | 0.286 | 0.291 | 0.576 | 99.59 | | |

表4 6批洁白丸样品中4种成分的含量测定结果($n=3$, mg/g)Tab 4 Content determination of 4 components in 6 batches of Jiebai pills ($n=3$, mg/g)

| 批号 | 没食子酸 | 丁香酚 | 土木香内酯 | 异土木香内酯 |
|----------|------|------|-------|--------|
| 20150402 | 5.92 | 4.30 | 0.25 | 0.30 |
| 20160102 | 7.02 | 2.15 | 0.48 | 0.56 |
| 20160201 | 4.28 | 1.09 | 0.60 | 0.72 |
| 20160202 | 6.74 | 4.90 | 0.37 | 0.42 |
| 20160519 | 5.93 | 3.21 | 0.42 | 0.57 |
| 20161105 | 6.09 | 1.82 | 0.29 | 0.33 |

3.2 流动相和流速的选择

由于待测成分极性差异较大,且部分成分呈酸性,故首选酸性流动相系统进行梯度洗脱。本试验考察了甲醇-0.2%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液和甲醇-乙腈-0.2%磷酸溶液,结果显示,甲醇-乙腈-0.2%磷酸溶液分离效果最佳,仅使用乙腈-0.2%磷酸溶液的情况下,没食子酸出峰时间较早,分离度不佳;而仅使用甲醇-0.2%磷酸溶液的情况下,土木香内酯和异土木香内酯无法完全分离。在试验过程中笔者还发现,当采用0.8 mL/min的流速时,土木香内酯和异土木香内酯这2种成分分离效果比1.0 mL/min的流速时进一步提高。因此,最终以甲醇-乙腈-0.2%磷酸为流动相进行梯度洗脱,流速为0.8 mL/min^[8]。

3.3 检测波长的选择

笔者查阅了相关文献,没食子酸的吸收波长 λ_{\max} 为270 nm^[9],丁香酚 λ_{\max} 为280 nm^[10],土木香内酯和异土木香内酯 λ_{\max} 为220 nm^[11-12]。本试验使用的HPLC仪配备了全波长DAD,在220 nm波长下已能检测出4种待测成分的色谱峰,但没食子酸在220 nm检测波长下相比280 nm响应值低4~5倍,同时存在部分低波长杂质峰干扰;综合考虑4种成分色谱峰对称因子、分离度、响应值、基线噪音,以及检测方法对各含量范围样品的适用性、灵敏度等因素后,为了测定结果更加准确,最终确定建立220、280 nm双通道分别检测。

3.4 小结

洁白丸质量标准收载于2015年版《中国药典》(一部)^[13],含量测定指标仅为没食子酸。笔者查阅文献,针对洁白丸的研究多为临床疗效方面,未见采用其他指标成分对制剂质量进行控制。本文所选择的指标成分没食子酸、丁香酚、土木香内酯和异土木香内酯,是洁白丸处方中诃子、丁香、土木香多个药味的有效成分^[14-16],并非来源于某单一药味,故选取这4种成分进行检测更能完全反映药物的内在质量。本试验首次建立了一种快速、准确的HPLC-DAD双通道分析方法,用于同时测定藏成药洁白丸中4种活性成分(没食子酸、丁香酚、土木香内酯、异土木香内酯)的含量,与各成分单独测定含量^[17-19]比较,该方法分析时间更短、效率更高;同时,使用的有机溶剂消耗更少,在降低成本的同时还减少了环境污染^[20]。该方法成功检测了6批市售样品,结果发现除现行标准已控制的指标成分没食子酸结果较为稳定外,其他3种成分测定结果最高值约为最低值的2~4倍(丁香酚:1.09~4.90 mg/g;土木香内酯:0.25~0.60 mg/g;异土木香内酯:0.30~0.72 mg/g),提示洁白丸现行质量标准及生产工艺还需进一步完善,以便提高对丁香、土木香等挥发性药味在制剂中的质量均一性。本方法具有较好的精密度和准确度,方法学考察结果良好,可以为藏成药洁白丸的质量评价及标准制订提供依据。

参考文献

[1] 才让措,郭登海.藏药“智托洁白丸”功能主治及方解浅述[J].中国民族民间医药,2012,21(18):9.
[2] 陈来.藏药洁白丸简介[J].河南中医,2012,32(10):1371.
[3] 卓玛草.浅析关于“拉卜楞洁白丸”独具特色的方剂组成及临床应用[J].西藏科技,2015(10):47-48.

[4] 包桂芬.藏药“洁白丸”主要药物分析[J].甘肃中医学院学报,1996,13(4):50-51.
[5] 李玉宝,华尔老.藏药洁白丸治疗胃溃疡[J].中国民族医药杂志,1999,5(1):36.
[6] 苏雅拉图.蒙药洁白丸治疗慢性胰腺炎疗效分析[J].临床医药文献杂志,2018,5(17):161-162.
[7] 尕藏久美.藏药洁白丸(日格尔)治疗胆汁返流性胃炎56例[J].中国民族医药杂志,2004,10(1):7.
[8] 黄平,毛坤军,叶颖俊.HPLC法同时测定胃肠宁片中5个活性成分含量[J].药物分析杂志,2017,37(8):1530-1534.
[9] 仇朝红,魏玉海,李文渊.藏药智托洁白丸中没食子酸的定性与定量检测[J].郑州大学学报(医学版),2012,47(1):88-91.
[10] 余小平.RP-HPLC法测定中药丁香中丁香酚的含量[J].中华中医药学刊,2009,27(4):880-881.
[11] 纪松岗,金柔男,赵亮,等.用HPLC法同时测定六味安消胶囊中土木香内酯、异土木香内酯、大黄素和大黄酚的含量[J].药学服务与研究,2008,8(6):446-449.
[12] 倪琳,杨锡.HPLC法同时测定达玛保丸中木香炔内酯、异土木香内酯和土木香内酯[J].中成药,2012,34(4):664-666.
[13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1290-1291.
[14] 陈静,索朗次仁,石云,等.藏药土木香化学成分、药理活性及其藏药方的研究进展[J].西部中医药,2017,30(10):137-138.
[15] 杨雁.诃子化学成分、生物活性及分析方法研究进展[J].西藏科技,2016(9):34-39.
[16] 臧亚茹.丁香及其有效成分药理作用的实验研究[J].承德医学院学报,2007,24(1):71-73.
[17] 朱小牧,马静,王曙.HPLC测定藏木香中的内酯类成分[J].华西药学杂志,2014,29(1):100-101.
[18] 陈瑞生.RP-HPLC法测定藏成药智托洁白丸中没食子酸的含量[J].陕西中医,2007,28(12):1679-1681.
[19] 曹伟宇,贺文娟,雷丸,等.HPLC法同时测定干髓糊剂中丁香酚和麝香草酚的含量[J].中国药房,2017,28(30):4268-4271.
[20] 康慧,刘亚蓉.HPLC法同时测定六味能消丸中8种成分的含量[J].中国药房,2017,28(24):3433-3436.

(收稿日期:2018-05-21 修回日期:2018-07-17)

(编辑:余庆华)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅