

HPLC-DAD 法同时测定八味沉香散中的 6 种成分

吴剑涓¹, 李文明², 李腾飞²

1. 天津市环湖医院 药剂科, 天津 300060

2. 天津医科大学药学院, 天津 300070

摘要: **目的** 建立同时测定八味沉香散中没食子酸、原儿茶酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚、11-羰基- β -乙酰乳香酸 6 种成分的 HPLC-DAD 方法。**方法** 采用 RP-HPLC 法, Waters XBridge-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μ m), 甲醇-乙腈 (50:50, A) 和甲醇-0.1% 乙酸水溶液 (10:90, B) 为流动相, 体积流量 0.8 mL/min, 梯度洗脱; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。分别对线性关系、精密度、重复性、稳定性及加样回收率进行考察。**结果** 被测定的 6 种指标成分没食子酸在 1.5~30.0 mg/L ($r=0.999\ 0$)、原儿茶酸在 1.0~20.0 mg/L ($r=0.999\ 2$)、木香烃内酯在 2.0~40.0 mg/L ($r=0.999\ 1$)、去氢木香内酯在 2.0~40.0 mg/L ($r=0.999\ 3$)、去氢二异丁香酚在 0.2~4.0 mg/L ($r=0.999\ 4$)、11-羰基- β -乙酰乳香酸在 3.5~70.0 mg/L ($r=0.999\ 1$) 线性关系良好; 精密度、重复性良好, RSD 均小于 2.0%; 在室温条件下 24 h 内稳定; 平均加样回收率在 98.49%~101.55% (RSD \leq 2.0%)。**结论** 该方法简便、准确, 重复性好, 为八味沉香散的质量控制提供实验依据。

关键词: 八味沉香散; HPLC; 没食子酸; 原儿茶酸; 木香烃内酯; 去氢木香内酯; 去氢二异丁香酚; 11-羰基- β -乙酰乳香酸
中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)24-3569-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.013

Simultaneous determination of six components in Bawei Chenxiang Powder by HPLC-DAD

WU Jian-juan¹, LI Wen-ming², LI Teng-fei²

1. Department of Pharmacy, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

2. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To develop an HPLC method for simultaneous determination of gallic acid, protocatechuic acid, costunolide, dehydrocostuslactone, ehydrodiisoeugenol, and acetyl-11-keto- β -boswellic acid in Bawei Chenxiang Powder (BCP). **Methods** The chromatographic separation was achieved on a Waters XBridge-C₁₈ column (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μ m) with methanol-acetonitrile (50:50, A) and methanol-0.1% acetic acid (10:90, B) as mobile phases at the flow rate of 0.8 mL/min for gradient elution, and the column temperature was 35 $^{\circ}$ C. Its linear relationship, precision, repeatability, stability, and recoveries were investigated. **Results** The seven components were well separated and showed good linearity, such as gallic acid 1.5—30.0 mg/L ($r=0.999\ 0$), protocatechuic acid 1.0—20.0 mg/L ($r=0.999\ 2$), costunolide 2.0—40.0 mg/L ($r=0.999\ 1$), dehydrocostuslactone 2.0—40.0 mg/L ($r=0.999\ 3$), ehydrodiisoeugenol 0.2—4.0 mg/L ($r=0.999\ 4$), and acetyl-11-keto- β -boswellic acid 3.5—70.0 mg/L ($r=0.999\ 1$). The precision was good, and RSD value was less than 2.0%. The repeatability was good, and RSD was less than 2.0%. The stability was good in 24 h. The average recoveries were between 98.49% and 101.55% (RSD \leq 2.0%). **Conclusion** The method is accurate, sensitive, credible, and repeatable. It can be applied to the quality control of BCP.

Key words: Bawei Chenxiang Powder; HPLC; gallic acid; protocatechuic acid; costunolide; dehydrocostuslactone; ehydrodiisoeugenol; acetyl-11-keto- β -boswellic acid

八味沉香散收载于《中国药典》2010 年版一部, 本品系藏族验方, 该药由沉香、肉豆蔻、广枣、石灰华、乳香、木香、诃子 (煨)、木棉花 8 味中药组成, 具有清心热、养心、安神、开窍之功效, 临床

用于热病攻心、神昏谵语、冠心病、心绞痛。

八味沉香散《中国药典》2010 年版中定量测定采用 HPLC 法测定木香烃内酯的方法^[1], 文献中也有 HPLC 法测定没食子酸与原儿茶酸量的报道^[2-3]。

收稿日期: 2014-09-04

作者简介: 吴剑涓, 女, 主任药师, 研究方向为医院药学及药物分析。Tel: (022)60367500 E-mail: tjhyywj@163.com

只用 1~2 种成分来衡量八味沉香散的质量是不够的,多指标成分定量测定方法能更加客观地体现制剂的质量^[4]。乳香的主要活性成分之一为 11-羰基- β -乙酰乳香酸^[5];广枣的主要指标成分为没食子酸和原儿茶酸^[6];肉豆蔻的主要指标成分为去氢二异丁香酚^[7];木香的主要活性成分为木香烯内酯和去氢木香内酯^[8]。本实验采用梯度洗脱法与分段变波长检测法,首次建立了没食子酸、原儿茶酸、木香烯内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚、11-羰基- β -乙酰乳香酸 6 种指标成分同时测定的 RP-HPLC 方法;结果表明,该方法简便、快速、灵敏度高,为该药的质量控制提供了依据。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪,美国安捷伦公司,包括四元泵,自动进样器,DAD 二极管阵列检测器;梅特勒托利多 XS3DU 电子天平,十万分之一;KQ5200 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

没食子酸(批号 110831-201304)、原儿茶酸(批号 110809-201208)、木香烯内酯(批号 111524-201310)、去氢木香内酯(批号 111525-200706)、去氢二异丁香酚(批号 18388-201305)、11-羰基- β -乙酰乳香酸(批号 111760-201301)购于中国食品药品检定研究院;八味沉香散,规格:2 g,西藏神猴药业有限责任公司,批号 20131106、20131107、20131108、20131212、20131213、20131214;乙腈、甲醇、乙醇、乙酸,色谱纯,天津康科德试剂有限公司;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters XBridge-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μ m);流动相为甲醇-乙腈(50:50, A)和甲醇-0.1%乙酸水溶液(10:90, B),梯度洗脱:0~6.0 min, 100% B; 6.0~9.0 min, 100%~

80% B; 9.0~17.0 min, 80%~60% B; 17.0~35.0 min, 60%~45% B; 35.0~40.0 min, 100% B; 分段变波长测定:0~8.0 min 为 274 nm(检测没食子酸和去氢二异丁香酚),8.0~17.0 min 为 254 nm(检测原儿茶酸和 11-羰基- β -乙酰乳香酸),17.0~40.0 min 为 225 nm(检测木香烯内酯和去氢木香内酯);体积流量 0.8 mL/min,柱温 35 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L。

2.2 对照品溶液制备

取对照品没食子酸、原儿茶酸、木香烯内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚、11-羰基- β -乙酰乳香酸适量,精密称定,用 50%乙醇配制成含没食子酸 75 μ g/mL、原儿茶酸 50.0 μ g/mL、木香烯内酯 100 μ g/mL、去氢木香内酯 100 μ g/mL、去氢二异丁香酚 10 μ g/mL、11-羰基- β -乙酰乳香酸 175 μ g/mL 的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备

取待测制剂约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中。精密加入 50%乙醇水溶液 20 mL,摇匀,称定质量,超声(功率 250 W,频率 45 kHz)处理 30 min,放冷,称定质量,用 50%乙醇水溶液补足减失的质量,摇匀,用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.4 空白对照溶液制备

根据八味沉香散的生产标准,取沉香、石灰华、诃子(煨)、木棉花药材以及相关辅料制得八味沉香散阴性样品,按照“2.3”项方法制得阴性空白对照溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 按照“2.1”~“2.3”项方法进行试验,结果供试品中各待测成分色谱峰的分离度均大于 1.5,对照品、样品及阴性空白对照品的色谱图见图 1。

2.5.2 线性关系考察 精密吸取按“2.2”项下方法制备的混合对照品储备液 1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、17.5、20.0 mL,分别置 50 mL 量瓶中,以 50%

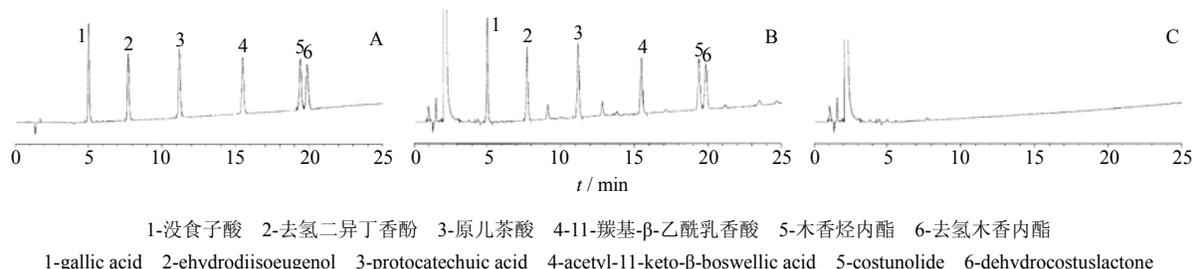


图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B) 和阴性空白对照品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), sample (B), and negative blank reference substances (C)

乙醇定容, 摇匀, 即得系列质量浓度的混合对照品溶液。分别吸取上述系列混合对照品溶液各 10 μ L, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积积分值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程: 没食子酸 $Y=7\ 823.1 X-459.3$, $r=0.999\ 0$, 线性范围 1.5~30.0 mg/L; 原儿茶酸 $Y=389\ 234 X-3\ 993$, $r=0.999\ 2$, 线性范围 1.0~20.0 mg/L; 木香烃内酯 $Y=5\ 234 X-239.1$, $r=0.999\ 1$, 线性范围 2.0~40.0 mg/L; 去氢木香内酯 $Y=2\ 738 X-661.2$, $r=0.999\ 3$, 线性范围 2.0~40.0 mg/L; 去氢二异丁香酚 $Y=45\ 274 X-3\ 371$, $r=0.999\ 4$, 线性范围 0.2~4.0 mg/L; 11-羰基- β -乙酰乳香酸 $Y=3\ 489 X-336.7$, $r=0.999\ 1$, 线性范围 3.5~70.0 mg/L。

2.5.3 精密度试验 精密吸取“2.5.2”项下中间质量浓度梯度点的混合对照品溶液 (没食子酸 15.0 mg/L、原儿茶酸 10.0 mg/L、木香烃内酯 20.0 mg/L、去氢木香内酯 20.0 mg/L、去氢二异丁香酚 2.0 mg/L、11-羰基- β -乙酰乳香酸 35.0 mg/L) 10 μ L, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定峰面积值。结果表明没食子酸、原儿茶酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚、11-羰基- β -乙酰乳香酸峰面积的 RSD 分别为 0.76%、0.34%、0.96%、0.72%、1.12%、0.95%, 表明精密度良好。

2.5.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (批号 20131106), 分别于 0、2、4、6、8、12、24 h, 按上述色谱条件测定峰面积。结果供试品溶液在 24 h 内色谱峰面积无明显变化, 没食子酸、原儿茶酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚、11-

羰基- β -乙酰乳香酸的 RSD 分别为 0.63%、1.33%、1.12%、1.11%、1.49%、1.14%, 表明供试品溶液在制备后 24 h 内保持稳定。

2.5.5 重复性试验 取同一批样品 (批号 20131106) 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定各物质的量。结果没食子酸、原儿茶酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚、11-羰基- β -乙酰乳香酸的平均质量分数分别为 1.545、0.116、1.822、1.767、0.150、3.533 mg/g, RSD 分别为 0.78%、0.93%、0.98%、0.34%、1.03%、1.05%。

2.5.6 加样回收率试验 取同一批号已测定的样品 6 份 (批号 20131106), 每份约 2.0 g, 精密称定, 分别精密加入对照品溶液适量, 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, 记录色谱峰峰面积, 计算回收率。结果没食子酸、原儿茶酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚、11-羰基- β -乙酰乳香酸的平均回收率分别为 101.19%、100.12%、101.55%、100.31%、99.25%、98.49%, RSD 分别为 1.56%、1.22%、1.08%、1.73%、1.49%、1.52%。

2.6 样品测定

取 6 批八味沉香散, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 采用外标法计算, 结果见表 1。6 批样品中原儿茶酸与去氢二异丁香酚的量较低, 11-羰基- β -乙酰乳香酸的量最高, 但是批与批之间差异较小, 可以有效地控制该药品的质量。

表 1 八味沉香散中指标性成分的质量分数 ($n=2$)
Table 1 Contents of target components in BCP ($n=2$)

批号	质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	没食子酸	原儿茶酸	木香烃内酯	去氢木香内酯	去氢二异丁香酚	11-羰基- β -乙酰乳香酸
20131106	1.545	0.116	1.822	1.767	0.150	3.533
20131107	1.489	0.101	1.988	1.897	0.178	3.672
20131108	1.601	0.098	2.009	1.956	0.135	3.712
20131212	1.409	0.089	1.884	1.799	0.149	3.668
20131213	1.563	0.095	1.952	1.953	0.156	3.654
20131214	1.522	0.099	1.942	1.864	0.163	3.511

3 讨论

在样品处理过程中, 参照了《中国药典》2010 年版中定量测定项下的样品处理方法, 比较了甲醇、50%甲醇、乙醇、50%乙醇、醋酸乙酯 5 种提取溶

媒, 结果表明以 50%乙醇为最佳提取溶媒; 同时比较了冷浸法、回流提取法、超声提取法 3 种不同的提取方法, 超声提取法的提取效率最高; 此外, 还考察了提取溶剂的体积与提取时间。

分别对没食子酸、原儿茶酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚、11-羧基- β -乙酰乳香酸对照品溶液,进行紫外扫描,根据紫外扫描可知,没食子酸与去氢二异丁香酚在 274 nm 处有最大吸收,原儿茶酸的最大吸收峰在 260 nm 处,木香烃内酯与去氢木香内酯在 225 nm 处有最大吸收,11-羧基- β -乙酰乳香酸的最大吸收峰在 250 nm 处,同时参考文献报道^[2-7],确定本实验中没食子酸与去氢二异丁香酚的检测波长为 274 nm,木香烃内酯与去氢木香内酯的检测波长为 225 nm,其余 2 个成分的检测波长为 254 nm。

色谱分离的关键是流动相的筛选,实验中比较了以甲醇-乙腈-水、甲醇-乙腈-甲酸-水、甲醇-乙腈-乙酸-水、甲醇-乙腈-磷酸-水构成的洗脱系统,分别进行等度与梯度的洗脱方式。最后确定了甲醇-乙腈和甲醇-乙酸-水系统。

经方法学研究结果表明,本方法具有良好的精密密度、准确度和重复性,能够同时测定没食子酸、原儿茶酸、木香烃内酯、去氢木香内酯、去氢二异丁香酚、11-羧基- β -乙酰乳香酸的量,有效地控制八味沉香散质量。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 潘国庆, 冯学梅, 马玉花. HPLC 测定藏成药仲泽八味沉香散中没食子酸的含量 [J]. 华西药学杂志, 2006, 21(4): 388-389.
- [3] 刘翔. HPLC 法测定八味沉香丸中原儿茶酸的含量 [J]. 安徽医药, 2010, 14(5): 541-542.
- [4] 田成旺, 张铁军, 蒋伶俐. HPLC 法同时测定藏茵陈胶囊中 7 种有效成分 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 705-708.
- [5] 孔静, 于海云, 耿桂霞, 等. HPLC 法测定乳香药材中 11-羧基- β -乙酰乳香酸的含量 [J]. 齐鲁药事, 2007, 26(7): 403-404.
- [6] 邓科君, 张艺, 王平, 等. 反相高效液相色谱法同时测定藏药广枣中没食子酸和原儿茶酸的含量 [J]. 色谱, 2006, 24(6): 652-653.
- [7] 胡娜, 刘欢, 袁子民, 等. 肉豆蔻制霜新工艺优选及质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 10-12.
- [8] 李慧, 陈宝田, 翁立冬, 等. 木香炮制品中木香烃内酯和去氢木香内酯的 HPLC 测定 [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1659-1661.