

藏药六味木香丸的定性定量检测方法研究

续艳丽¹, 祁景琨², 续创业³, 徐雪梅^{1*} (1. 甘肃省兰州市食品药品检验所, 兰州 730000; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 3. 平凉市农业科学院, 平凉 744000)

摘要 目的: 建立藏药六味木香丸的定性定量检测方法, 为质量标准修订提供参考。**方法:** 采用TLC法对藏药六味木香丸中木香、石榴子、余甘子和荜茇进行定性鉴别; 采用HPLC法测定藏药六味木香丸中木香炔内酯和去氢木香炔内酯的含量, 使用C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水 (65 : 35) 为流动相, 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长225 nm, 柱温25 °C。**结果:** 薄层色谱斑点清晰, 分离度良好, 阴性样品无干扰。木香炔内酯质量浓度在12~60 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好 ($r = 0.9997$), 平均回收率 ($n=6$) 为98.8%, RSD=1.6%; 去氢木香炔内酯质量浓度在17~85 μg·mL⁻¹范围内线性关系良好 ($r = 0.9996$), 平均回收率 ($n=6$) 为99.8%, RSD=1.4%。**结论:** 所建立的方法准确、可靠, 专属性强, 可用于六味木香丸的质量控制。

关键词: 藏药; 六味木香丸; 木香; 石榴子; 余甘子; 荜茇; 木香炔内酯; 去氢木香炔内酯; 定性检测; 定量分析; 质量标准

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)03-0295-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.03.011

On the Qualitative and Quantitative Detection Methods of Tibetan Medicine Liuwei Muxiang Wan

Xu Yanli¹, Qi Jingkun², Xu Chuangye³, Xu Xuemei^{1*} (1. Lanzhou Institute for Food and Drug Control, Lanzhou 730000, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 3. Pingliang Academy of Agricultural Sciences, Pingliang 744000, China)

Abstract Objective: To establish the qualitative and quantitative detection methods for Tibetan Medicine Liuwei Muxiang Wan. **Methods:** TLC was used to identify Radix Aucklandiae, Pomegranate seed, Phyllanthi Fructus, and Piperis Longi Fructus. HPLC method was used to determine costunolide and dehydrocostuslactone in Tibetan Medicine Liuwei Muxiang Wan. The procedure was performed on an Agilent 5 TC- C18 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) at 25 °C, with acetonitrile- water (65 : 35) as mobile phase and the detection wavelength was set at 225 nm. **Results:** The clear TLC spots showed good resolution without interference from negative samples. The calibration curve of costunolide was linear in the mass concentration range of 12-60 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9997$), and the average recovery rate was 98.8% with the corresponding RSD of 1.6%; the calibration curve of dehydrocostuslactone was linear in the mass concentration range of 17-85 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9996$), and the average recovery rate was 99.8% with the corresponding RSD of 1.4%. **Conclusion:** The established method of identification is accurate, simple and specific, and can be used in the quality control of Liuwei Muxiang Wan.

Keywords: Tibetan medicine; Liuwei Muxiang Wan; Radix Aucklandiae; pomegranate seed; Phyllanthi Fructus; Piperis Longi Fructus; costunolide; dehydrocostuslactone; qualitative detection; quantitative analysis; quality standard

六味木香丸是藏药治疗胃病的经典验方, 收载于藏药部颁标准^[1] (标准编号: WS3-BC-0283-95), 由木香、豆蔻、石榴子、萆薢、余甘子和巴夏嘎6味药材组成, 具有止吐、止疼等功效, 常用于治疗胃溃疡等慢性胃病。六味木香散为蒙药, 收载于《中国药典》, 其处方与藏药六味木香丸稍有不同, 但功效基本相同^[2-6]。现代研究^[7]表明, 六味木香丸具有明显的抗炎镇痛作用, 并在肿瘤化疗后的恶心呕吐治疗方面具有显著效果^[8]。原部颁标准仅有木香和石榴子的薄层鉴别, 方法专属性和重复性较差, 样品和木香药材中去氢木香内酯和木香烃内酯分离较差, 石榴子特征斑点Rf值较大, 标准亟待提高。目前, 关于六味木香胶囊质量控制研究的文献报道^[9-11]较多, 但对藏药六味木香丸的研究较少, 仅焦正花^[12]、吕露阳^[13]对藏药六味木香丸处方中的木香、萆薢进行了定性鉴别试验, 并对木香进行了含量测定。因此, 为了更好地控制其质量, 本试验采用薄层色谱法, 建立了处方中木香、石榴子、余甘子、萆薢药材的专属性薄层鉴别方法, 采用高效液相色谱, 优选了君药木香中有效成分木香烃内酯和去氢木香内酯含量测定方法, 以制定有效控制该药品质量的标准, 为该药品的进一步研究开发提供技术支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200高效液相色谱仪 (Agilent公司); 二极管阵列检测器, 自动进样器, Agilent 1200色谱工作站; AE-163电子天平 (梅特勒托利多公司); KQ-200D超声波清洗机 (东莞市科桥超声波设备有限公司); DHG-9070A电热恒温鼓风干燥箱 (上海森信实验仪器有限公司); 硅胶G、GF₂₅₄薄层板 (青岛海洋化工厂); 双槽层析缸 (上海信谊仪器厂)。

1.2 试剂

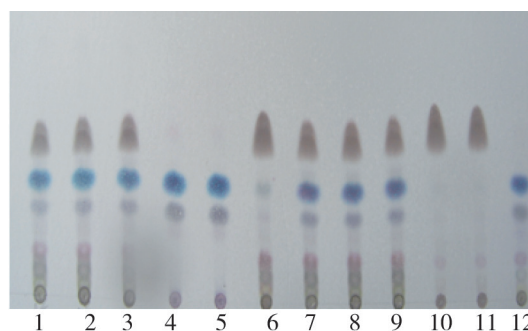
对照品木香烃内酯 (批号111524-201208)、

去氢木香烃内酯 (批号111525-201210)、胡椒碱 (批号110775-201203) 及对照药材余甘子 (批号121289-201301)、木香 (批号120921-201306)、石榴子 (批号121431-201301), 均购自中国食品药品检定研究院; 六味木香丸样品由市场购买; 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 木香、石榴子的鉴别

取本品2 g, 研细, 加乙酸乙酯20 mL, 超声提取30 min, 滤过, 滤液浓缩至约2 mL, 作为供试品溶液; 取木香、石榴子对照药材各0.5 g, 同法制成对照药材溶液; 再按处方比例, 分别配制不含木香、石榴子的阴性对照样品, 同法制成阴性对照溶液。照薄层色谱法 (《中国药典》2015年版四部0502) 试验, 吸取上述供试品溶液10 μL、对照药材溶液及阴性溶液各5 μL, 分别点于同一硅胶G板上, 以环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯 (14:6:0.5) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以5%香草醛硫酸溶液, 在105 °C加热至斑点显色清晰, 立即检视。样品色谱中, 在与木香、石榴子对照药材色谱图相应的位置上, 斑点颜色相同, 且分离度良好, 阴性样品无干扰, 结果见图1。

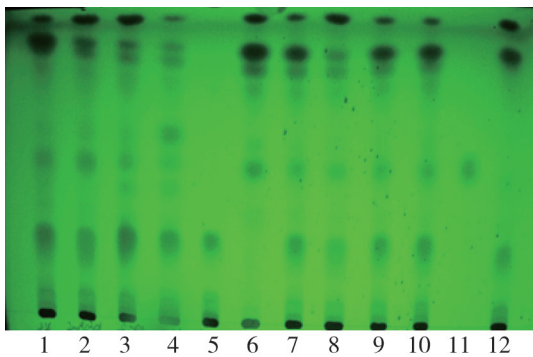


1~3. 样品; 4~5. 木香对照药材; 6. 阴性对照样品 (缺木香); 7~9. 样品; 10~11. 石榴子对照药材; 12. 阴性对照样品 (缺石榴子)。

图1 六味木香丸中木香、石榴子薄层色谱图

2.2 余甘子、葶苈的鉴别

取本品2 g, 研细, 加95%乙醇20 mL, 超声处理30 min, 滤过, 滤液浓缩至约2 mL, 制成供试品溶液; 取余甘子对照药材0.5 g, 同法制成对照药材溶液; 按处方比例, 制备不含余甘子、葶苈的阴性对照样品, 同法制成阴性对照溶液; 取胡椒碱对照品1 mg, 制成1 mg·mL⁻¹的对照品溶液。按照薄层色谱法, 吸取上述4种溶液各10 μL, 分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上, 以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯-甲酸(5.5:4.5:0.25)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 在紫外灯(254 nm)下观察。样品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 阴性样品无干扰, 见图2。



1~4. 样品; 5. 余甘子对照药材; 6. 阴性对照样品(缺余甘子); 7~10. 样品; 11. 胡椒碱; 12. 阴性对照样品(缺葶苈)。

图2 六味木香丸中余甘子、葶苈薄层色谱图

2.3 含量测定

2.3.1 溶液制备

2.3.1.1 混合对照品溶液

精密称取木香烃内酯、去氢木香内酯的对照品适量, 加甲醇溶解制成每1 mL含木香烃内酯60 μg、去氢木香内酯85 μg的混合溶液, 即得。

2.3.1.2 供试品溶液

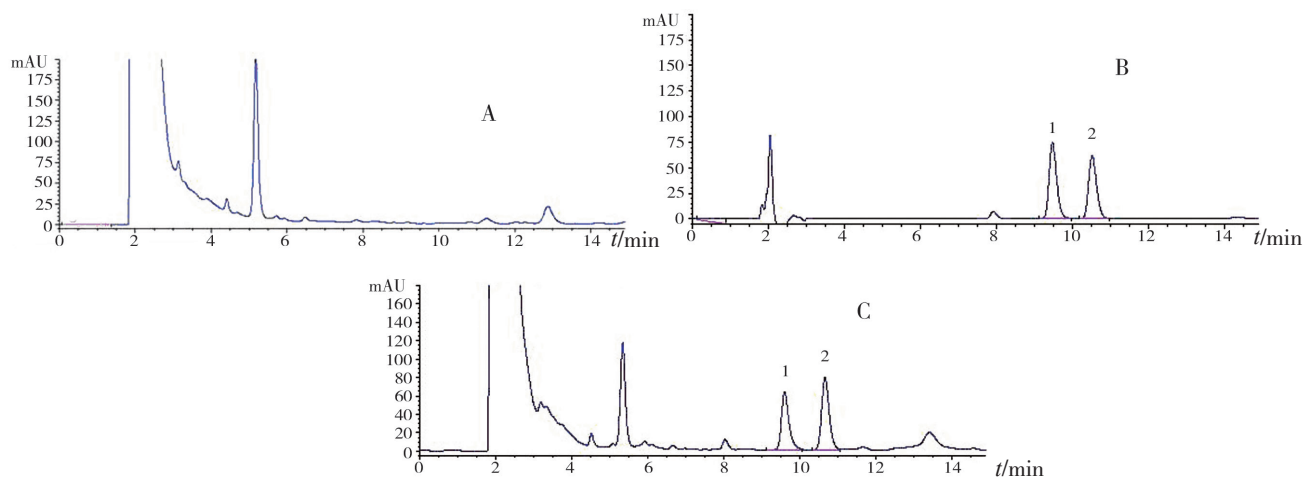
取本品适量, 研细, 取约1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇25 mL, 称量, 超声处理^[14-16](功率250 W, 频率40 kHz) 30 min, 放冷, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.1.3 阴性对照溶液

按照处方比例制备缺木香药材的阴性对照样品, 按“2.3.1.2”节下方法制成阴性对照溶液。

2.3.2 色谱条件

色谱柱: Agilent 5 TC-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(65:35); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 225 nm; 柱温: 25℃。在上述色谱条件下, 样品与木香烃内酯和去氢木香内酯对照品的色谱图中, 在对应的位置出现色谱峰, 分离效果好, 理论塔板数均不小于3000, 阴性对照样品在对照品色谱峰处无干扰, 专属性强^[17-20], 结果见图3。



A. 阴性对照样品; B. 对照品; C. 样品; 1. 木香烃内酯; 2. 去氢木香内酯。

图3 HPLC 色谱图

2.3.3 线性关系的考察

精密吸取上述混合对照品溶液2、4、5、6、7、10 mL, 分别置10 mL量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。按“2.3.2”节下色谱条件, 分别进样10 μ L。以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程:

$$Y_{\text{木香烯内酯}} = 23.793X + 10.253 \quad r = 0.9997$$

$$Y_{\text{去氢木香内酯}} = 14.982X + 0.0062 \quad r = 0.9996$$

结果表明, 木香烯内酯和去氢木香内酯质量浓度分别在12 ~ 60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、17 ~ 85 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与其峰面积线性关系良好。

2.3.4 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液10 μ L, 按“2.3.2”节下色谱条件, 连续进样5次, 测定峰面积。结果, 木香烯内酯和去氢木香内酯峰面积的RSD分别为0.61%和1.34%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液10 μ L, 分别于0、2、4、6、12 h进样, 测定峰面积, 计算木香烯内酯和去氢木香内酯峰面积的RSD分别为0.79%和

1.55%。结果表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.3.6 重复性试验

取同一批号六味木香丸样品6份, 按照“2.3.1.2”节下方法制备供试品溶液, 精密吸取10 μ L, 按“2.3.2”节下色谱条件进样测定峰面积。结果木香烯内酯和去氢木香内酯的平均含量为0.225 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和1.241 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD分别为0.44%和1.31%。表明该方法重复性良好。

2.3.7 回收率试验

取已知含量的六味木香丸粉末约0.5 g, 精密称定, 加入一定量的木香烯内酯和去氢木香内酯, 按“2.3.1.2”节下方法制备溶液, 按“2.3.2”节下色谱条件进行测定, 记录峰面积, 并计算加样回收率, 结果见表1。

2.3.8 样品的测定

取六味木香丸样品适量, 研细, 取约1.0 g, 精密称定, 按“2.3.1.2”节下方法制备供试品溶液, 按“2.3.2”节下色谱条件进行测定, 用外标法计算含量, 结果见表2。

表1 加样回收率试验结果

成分	样品称重 / g	样品含量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD / %
木香烯内酯	0.491	0.438	0.340	0.768	96.84	98.8	1.6
	0.491	0.438	0.340	0.773	98.25		
	0.503	0.449	0.450	0.898	99.75		
	0.501	0.447	0.450	0.887	97.67		
	0.502	0.448	0.540	0.982	98.87		
	0.499	0.446	0.540	0.992	101.27		
去氢木香内酯	0.493	0.876	0.720	1.578	97.51	99.8	1.4
	0.492	0.874	0.720	1.593	99.85		
	0.503	0.893	0.900	1.794	100.12		
	0.503	0.893	0.900	1.788	99.41		
	0.501	0.890	1.080	1.971	100.10		
	0.499	0.886	1.080	1.986	101.81		

表2 样品测定结果 (n=3)

批号	木香烃内酯		去氢木香内酯		总量 / (mg · g ⁻¹)
	含量 / (mg · g ⁻¹)	RSD/%	含量 / (mg · g ⁻¹)	RSD/%	
20100821	0.892	1.05	1.764	0.92	2.656
20110328	0.868	0.98	1.629	0.96	2.497
20090801	0.225	0.76	1.241	0.94	1.466
20090301	0.332	0.88	1.269	1.01	1.601
07436A	0.100	0.96	1.399	0.99	1.499
08283A	0.099	1.01	1.812	0.78	1.912
09029A	0.130	0.94	1.222	0.89	1.352

3 讨论

3.1 木香、石榴子的薄层条件选择

在木香和石榴子的薄层鉴别中, 比较了乙酸乙酯加热回流提取和超声提取, 环己烷-乙酸乙酯(6:2)和环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯(14:6:0.5)展开系统。结果表明, 加热回流和超声提取效果基本一致, 故选用简便快速的超声提取, 以环己烷-二氯甲烷-乙酸乙酯(14:6:0.5)展开剂展开, 斑点清晰。

3.2 余甘子、葶苈的薄层条件选择

在余甘子和葶苈药材薄层鉴别中, 比较了95%乙醇提取后乙酸乙酯萃取, 乙醇、甲醇直接超声提取, 乙酸乙酯加热回流提取等不同处理方法, 以及环己烷-乙酸乙酯(6:2)、石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯-甲酸(5.5:4.5:0.25)、氯仿-石油醚(4:1)等展开系统。结果表明, 95%乙醇超声提取、石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯-甲酸(5.5:4.5:0.25)为展开剂展开, 斑点清晰, R_f值较好。

3.3 木香烃内酯、去氢木香烃内酯的流动相选择

参考文献^[12-15], 比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液作为流动相时, 木香烃内酯和去氢木香烃内酯的分离效果。结果表明, 乙腈-水(65:35)作为流动相时, 木香烃内酯和去氢木香烃内酯出峰时间较早, 2种活性成分完全分离且峰形对称性较好。

3.4 豆蔻薄层条件摸索

对方中豆蔻药材做了薄层鉴别试验, 先后采用正己烷、乙酸乙酯、甲醇等提取溶剂, 加热回流、超声提取, 并以不同的展开剂展开, 由于处方中豆蔻含量很少, 样品显色后斑点不明显, 且阴性干扰无法消除, 不能作为该产品的质量控制指标, 有待进一步研究。

3.5 方法的可行性

本试验建立的木香和石榴子、余甘子和葶苈薄层鉴别方法, 均用同一处理方法、同一展开条件, 同时定性鉴别2种成分, 专属性强, 符合节约、简便、快速的原则。HPLC法定量测定君药木香中木香烃内酯和去氢木香烃内酯的含量, 专属性强, 重复性好, 可用于六味木香丸的质量控制。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准藏药: 第一册[S]. 1995.
- [2] 梁建, 王姝, 熊丽, 等. 藏药六味木香丸及其组成药物的控制和药效物质基础研究进展[J]. 世界科学技术, 2015, 17(7): 1504-1507.
- [3] 国家药典委员会. 中国药典: 四部[S]. 2015.
- [4] 刘铎, 吕露阳, 曾锐, 等. 六味木香丸治疗实验性胃溃疡大鼠的机制[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(3): 257-259.
- [5] 沈德莉, 孙兰, 陈蔚芸, 等. 六味木香散抗炎、抗

- 溃疡作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 1995, 2(6): 31-32.
- [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, 2015, 41(6): 713-716.
- [7] 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.
- [8] 李海峰. 藏药六味木香丸治疗肿瘤化疗后恶心呕吐72例观察[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(9): 13-14.
- [9] 王海宇. HPLC法测定六味木香胶囊中木香烃内酯和去氢木香烃内酯[J]. 中草药, 2014, 45(16): 2349-2351.
- [10] 丛晓东, 毛秋媚, 陈碧莲, 等. 六味木香胶囊质量标准研究[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(8): 552-555.
- [11] 王永林, 兰燕宇. 六味木香胶囊制剂质量控制[J]. 中国药理学杂志, 1995, 30(4): 229-231.
- [12] 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烃内酯含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(10): 94-96.
- [13] 吕露阳, 刘圆, 张志峰, 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, 2013, 38(6): 61-67.
- [14] 裴贵珍, 郭鑫, 张雪峰, 等. HPLC法同时测定六味能消胶囊中木香烃内酯、去氢木香烃内酯大黄素、大黄酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 241-245.
- [15] 张治军, 曾友保, 覃晓. 反相高效液相色谱法同时测定正胃胶囊中木香烃内酯和去氢木香内酯含量[J]. 中国药业, 2016, 25(14): 78-80.
- [16] 田原, 吕晓东, 樊晖. 三香颗粒质量标准研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(5): 1138-1140.
- [17] 吴永芹, 赵新静, 阎道辉. HPLC法测定复方黄连素片中木香烃内酯和去氢木香内酯的含量[J]. 齐鲁药事, 2009, 28(10): 596-598.
- [18] 杨宪, 刘筱琴, 张雪, 等. HPLC—一测多评法用于木香及3种含木香中药复方制剂的质量评价[J]. 中国药房, 2014, 25(11): 1030-1033.
- [19] 冯欣, 鲁晓光, 罗布扎西, 等. HPLC法同时测定藏药七味铁屑丸中木香烃内酯和去氢木香内酯[J]. 中成药, 2013, 33(9): 1535-1537.
- [20] 刘正清. 不同产地和采收时间木香药材中木香烃内酯和去氢木香内酯的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 116-118.

(收稿日期 2016年8月25日 编辑 郑丽娥)