

# HPLC-DAD 法同时测定七珍汤散（努布炖屯汤）中 4 个成分

王福成<sup>1</sup>, 李冬华<sup>1,2\*</sup>, 冯祥瑞<sup>1</sup>, 马潇<sup>1,2</sup>, 杨平荣<sup>1,2</sup> (1. 甘肃省药品检验研究院, 兰州 730070; 2. 甘肃省中藏药检验检测技术工程实验室, 兰州 730070)

**摘要** 目的: 建立 HPLC-DAD 法同时测定七珍汤散中没食子酸、6-姜辣素、异土木香内酯、土木香内酯的含量, 为七珍汤散的质量控制研究、考察其处方各味藏药材的成分和质量标准的提高提供参考。方法: 采用 Luna C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2%醋酸溶液, 梯度洗脱 (0~10 min, 2%→12% A; 10~20 min, 12%→50% A; 20~30 min, 50%→85% A; 30~50 min, 85%→2% A), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长 230、280 nm。结果: 4种成分实现完全分离; 没食子酸、6-姜辣素、异土木香内酯、土木香内酯的线性范围依次分别在 7.42~148.4、0.92~18.4、1.83~91.25、1.71~85.30 μg ( $r \geq 0.9990$ ); 平均加样回收率依次分别为 99.06%、99.27%、99.86%、99.36%, RSD 依次分别为 1.33%、0.67%、0.35%、0.18%。结论: 该方法对 4 个成分同时测定, 简便准确, 重复性好, 灵敏度高, 阴性试验无干扰, 可用于七珍汤散的质量控制。

**关键词:** 七珍汤散; 没食子酸; 6-姜辣素; 异土木香内酯; 土木香内酯

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)02-0222-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.02.011

## Simultaneous Determination of 4 Constituents in Qizhentang San by HPLC-DAD

Wang Fucheng<sup>1</sup>, Li Donghua<sup>1,2\*</sup>, Feng Xiangrui<sup>1</sup>, Ma Xiao<sup>1,2</sup>, Yang Pingrong<sup>1,2</sup> (1. Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730070, China; 2. Gansu Inspection and Testing Technical Engineering Laboratory for Chinese Herbal and Tibetan Medicine, Lanzhou 730070, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC-DAD method for the simultaneous determination of gallic acid, 6-gingerol, isosalantolactone, alantolactone in Qizhentang San in order to provide references for its quality control. **Methods:** HPLC separation was performed on a Luna C<sub>18</sub> column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with a gradient mobile phase of acetonitrile-0.2% acetic acid delivered at 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was at 35 °C and the detection wavelengths were detected as 230 and 280 nm. **Results:** Gallic acid, 6-gingerol, isosalantolactone, alantolactone were completely separated from the other constituents. The linear ranges of gallic acid, 6-gingerol, isosalantolactone, lantolactone were 7.42-148.4 μg, 0.92-18.4 μg, 1.83-91.25 μg, and 1.71-85.30 μg ( $r \geq 0.9990$ ), respectively. The average recoveries were 99.06%, 99.27%, 99.86% and 99.36% with RSD values

基金项目: 甘肃省科技重大专项 (编号 17ZD2FA009)

作者简介: 王福成, 硕士; 研究方向: 中药药剂; Tel: (0931) 7822922; E-mail: 724320006@qq.com

通信作者: 李冬华, 硕士, 副主任药师; 研究方向: 中药材检验、质量评价及资源开发利用; Tel: (0931) 7822987; E-mail: donghuamuzi@163.com

at 1.33%, 0.67%, 0.35% and 0.18%, respectively. **Conclusion:** This method could be used for the simultaneous determination of multi-ingredients in Qizhentang San and the established method was simple and accurate, with good reproducibility and high sensitivity. It could be used for the quality control of Qizhentang San.

**Keywords:** Qizhentang San; Gallic acid; 6-Gingerol; Isoalantolactone; Alantolactone

七珍汤散收载于《中华人民共和国卫生部-药品标准-藏药》第一册,是由藏木香、悬钩木、宽筋藤、干姜、诃子、毛诃子、余甘子7味藏药制成的藏药复方制剂。本品具有解表散寒的功效,用于血、龙等三邪紊乱,风寒感冒,热病初起,恶性发热,关节疼痛<sup>[1]</sup>。本文采用反相高效液相色谱法,建立高效液相色谱(HPLC)法测定七珍汤散中的没食子酸、6-姜辣素、异土木香内酯、土木香内酯4个成分的含量测定,为全面评价七珍汤散的质量、制定更为合理的质量标准提供参考依据。

## 1 仪器与试剂

Waters2695型高效液相色谱仪(2695溶剂管理系统,2996二极管阵列检测器,Empower III色谱工作站,Waters公司);KQ-250型超声波提取器(昆山市超声仪器有限公司);XR205SM-DR型1/10万分析天平(Pricisa公司)。

土木香内酯(批号110760-201811,100%)、异土木香内酯(批号110761-201505,99.5%)、没食子酸(批号110813-201605,90.8%)、6-姜辣素(批号111833-201806,99.9%)均来自于中国食品药品检定研究院。七珍汤散(批号171003、171102、171103,甘南藏族自治州藏医药研究院)。甲醇、乙腈为色谱纯(Merck公司);其余试剂均为分析纯;纯水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Luna C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%醋酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min, 2%→12% A; 10~20 min, 12%→50% A; 20~30 min, 50%→85% A; 30~50 min, 85%→2% A);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温:35℃;检测波长:没食子酸、6-姜辣素280 nm,异土木香内酯、土木香内酯230 nm;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液的制备

#### 2.2.1 对照品储备液

①精密称取没食子酸对照品18.55 mg,置于25 mL

棕色量瓶中,加50%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为742.00 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液A。②精密称取土木香内酯对照品17.06 mg,置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为1706.00 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液B。精密吸取对照品储备液B 5 mL,置于50 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为170.60 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液C。③精密称取异土木香内酯对照品18.25 mg,置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为1825.00 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液D。精密吸取对照品储备液D 5 mL,置于50 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为182.50 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液E。④精密称取6-姜辣素对照品9.18 mg,置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为918.00 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液F。精密吸取对照品储备液F 5 mL,置于50 mL棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为91.8 μg·mL<sup>-1</sup>的对照品储备液G。

#### 2.2.2 混合对照品溶液

分别吸取对照品储备液A、C、E、G各5 mL,置于同一50 mL棕色量瓶中,甲醇定容,制成每1 mL分别含没食子酸74.2 μg、6-姜辣素9.18 μg、土木香内酯17.1 μg、异土木香内酯18.3 μg的混合溶液,即得。

#### 2.2.3 供试品溶液

取供试品适量,研细,取约0.1 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率300 W,频率50 kHz)20 min,放冷,再称量,用甲醇补足减失的量,摇匀,滤过,精密量取续滤液10 mL,置25 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

#### 2.2.4 阴性样品溶液

按七珍汤散的处方工艺,分别配制处方中不含藏木香,不含干姜,不含余甘子、诃子和毛诃子

药材的3份样品,按“2.2.3”节下方法制成阴性样品溶液。

### 2.3 专属性试验

分别吸取“2.2”节下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液各10  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”节下色谱条件进样测定,结果见图1-1、图1-2。由图可知,各待测成分可与相邻成分达到基线分离,在被测色谱峰相对应的保留时间无干扰。

### 2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”节下的对照品储备液A 0.5、1、2、4、10 mL,对照品储备液C 0.5、1、2、4、10 mL,对照品储备液E 0.5、1、2、4、10 mL,对照品储备液G 0.5、1、2、4、10 mL,分别置于50 mL棕色量瓶中,加甲醇定容,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各20  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”节下色谱条件分别进行测定。以进样量 $X$  ( $\mu\text{g}$ )为横坐标,峰面积 $Y$ 为纵坐标,得线性回归方程:

没食子酸 $Y=608240X+221373$ ,  $r=0.9998$  ( $n=6$ ),线性范围 $7.42 \sim 148.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;

6-姜辣素 $Y=265509X+30908$ ,  $r=0.9995$  ( $n=6$ ),线性范围 $0.92 \sim 18.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;

异土木香内酯 $Y=334920X+80460$ ,  $r=0.9999$  ( $n=6$ ),线性范围 $1.83 \sim 91.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;

土木香内酯 $Y=405388X+94877$ ,  $r=0.9998$  ( $n=6$ ),线性范围 $1.71 \sim 85.30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.5 精密度试验

吸取“2.2.1”节下对照品溶液,按“2.1”节下色谱条件下连续重复进样6次,测得没食子酸、6-姜辣素、土木香内酯、异土木香内酯峰面积平均值分别为6339929、2718253、4170803、3440836, RSD分别为1.0%, 0.4%, 1.2%, 0.6%,表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液,室温下于0、2、4、6、8、10 h按“2.1”节下色谱条件进样测定,测得没食子酸、6-姜辣素、异土木香内酯、土木香内酯峰面积平均值分别为6376432、2722037、4155855、3435737, RSD分别为0.5%、0.7%、1.1%、0.9%,表明供试品溶液在10 h内稳定性良好。

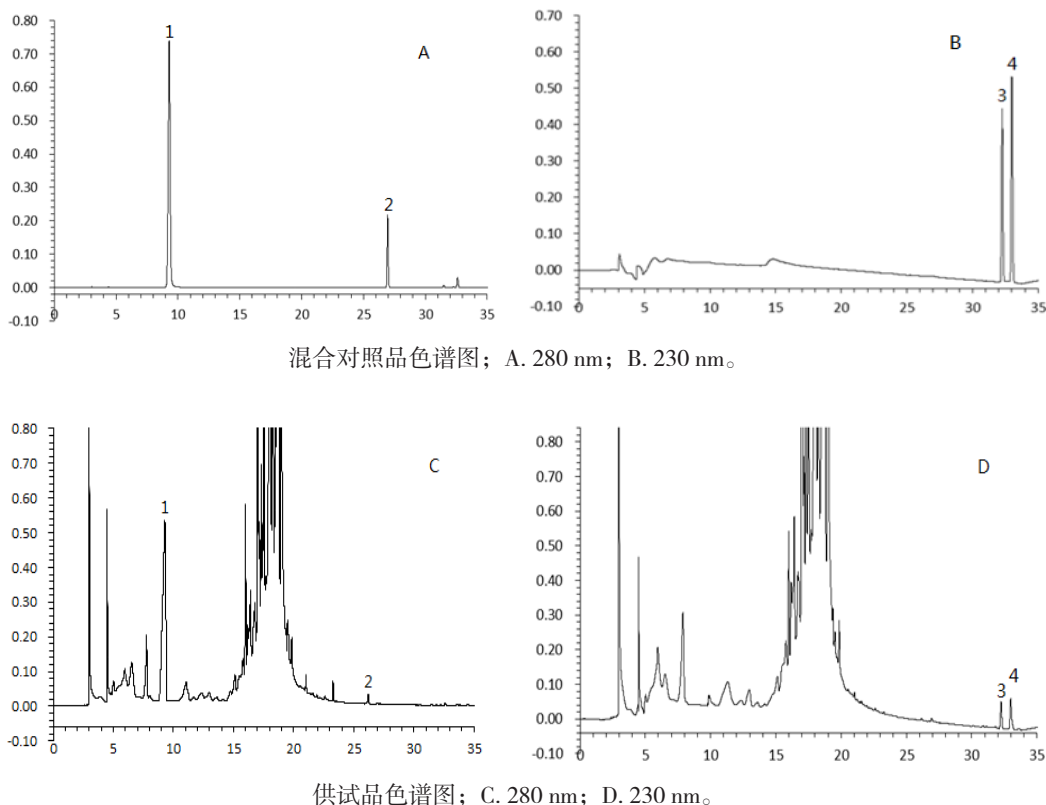
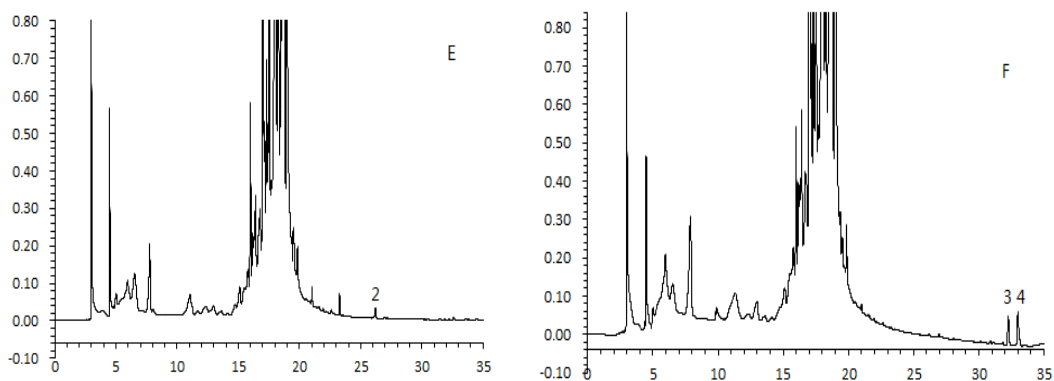
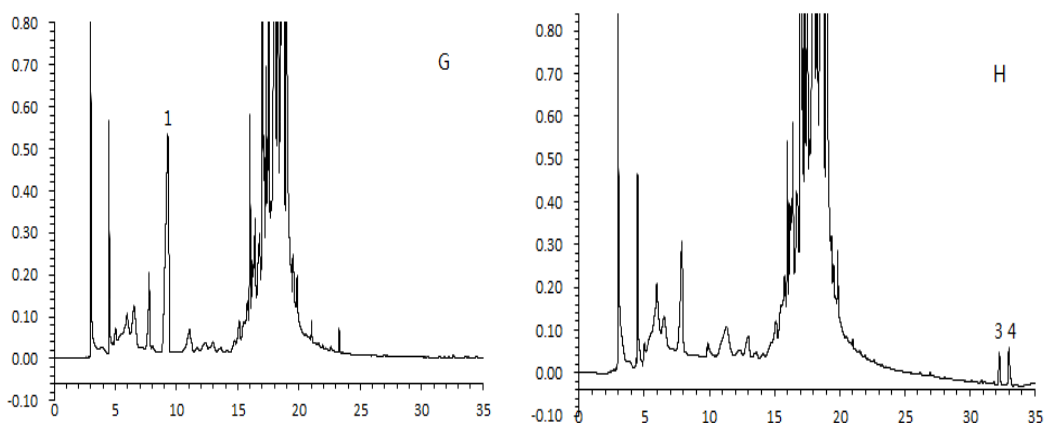


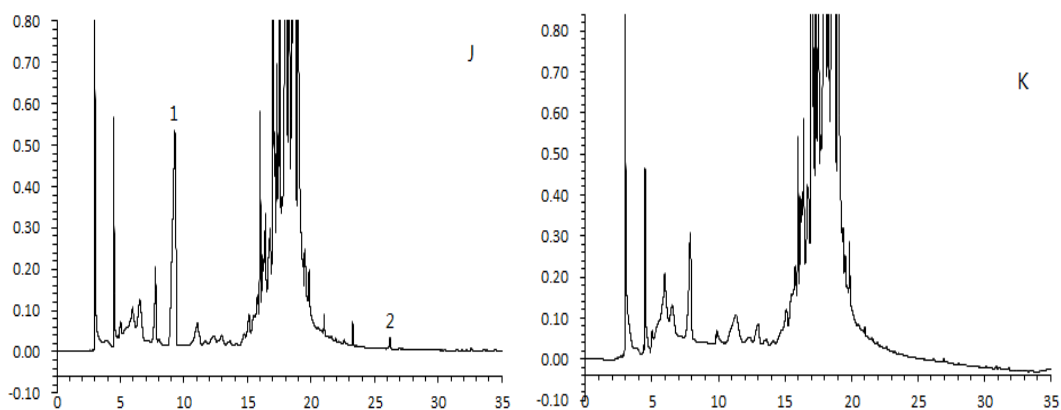
图1-1 七珍汤散 HPLC 色谱图



不含余甘子、诃子和毛诃子药材阴性样品色谱图；E. 280 nm；F. 230 nm。



不含干姜药材阴性样品色谱图；E. 280 nm；F. 230 nm。



不含藏木香阴性样品色谱图；E. 280 nm；F. 230 nm。

1. 没食子酸；2. 6-姜辣素；3. 异土木香内酯；4. 土木香内酯。

图1-2 七珍汤散 HPLC 色谱图

## 2.7 重复性试验

取同一批七珍汤散(批号 171003),按“2.2.2”节下方法制备供试品溶液6份,按“2.1”节下色谱条件进样测定,测得没食子酸、6-姜辣素、异土木香内酯、土木香内酯含量平均值分别为7.50、1.00、1.71、1.88 mg·g<sup>-1</sup>,RSD分别为2.0%、1.3%、1.6%、1.8%,表明该方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

精密量取已知含量的七珍汤散(批号 171003)

0.05 g,置100 mL量瓶中,精密加入一定量用甲醇溶液配制的混合对照品储备液(没食子酸74.2 μg、6-姜辣素9.18 μg、土木香内酯17.1 μg、异土木香内酯18.3 μg·mL<sup>-1</sup>),以下按“2.2.2”节下方法制备加样供试溶液。按“2.1”节下色谱条件进样。结果没食子酸、6-姜辣素、异土木香内酯、土木香内酯的平均加样回收率分别为99.06%、99.27%、99.86%、99.36%,RSD分别为1.33%、0.67%、0.35%、0.18%,见表1。

表1 4个成分的加样回收率试验(n=6)

成分	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
没食子酸	0.374	0.371	0.745	99.44	99.06	1.33
	0.368	0.371	0.739	100.77		
	0.383	0.371	0.754	97.04		
	0.354	0.371	0.725	99.91		
	0.361	0.371	0.732	99.14		
	0.376	0.371	0.747	98.06		
6-姜辣素	0.046	0.046	0.092	99.36	99.27	0.67
	0.046	0.046	0.092	99.45		
	0.047	0.046	0.093	100.27		
	0.044	0.046	0.090	98.20		
	0.045	0.046	0.091	99.20		
	0.046	0.046	0.092	99.12		
异土木香内酯	0.086	0.091	0.184	99.50	99.86	0.35
	0.085	0.091	0.183	99.47		
	0.088	0.091	0.187	99.32		
	0.081	0.091	0.179	99.35		
	0.083	0.091	0.181	99.49		
	0.086	0.091	0.185	99.02		
土木香内酯	0.093	0.085	0.171	99.78	99.36	0.18
	0.092	0.085	0.170	100.23		
	0.096	0.085	0.173	100.36		
	0.088	0.085	0.166	99.54		
	0.090	0.085	0.168	99.71		
	0.094	0.085	0.171	99.53		

### 2.9 样品含量测定

七珍汤散为甘南藏族自治州藏医药研究院产品，因条件所限，仅收集到3批样品，按上述方法

进行4个成分的测定，外标法计算各成分的含量，结果见表2。

表2 3批七珍汤散含量测定 (n=3)

批号	没食子酸		6-姜辣素		土木香内酯		异土木香内酯	
	含量/ (mg·g <sup>-1</sup> )	RSD/ %	含量/ (mg·g <sup>-1</sup> )	RSD/ %	含量/ (mg·g <sup>-1</sup> )	RSD/ %	含量/ (mg·g <sup>-1</sup> )	RSD/ %
171003	7.50	1.15	1.00	1.73	1.71	1.01	1.86	0.54
171102	7.23	0.48	0.82	1.40	1.68	0.60	1.83	0.63
171103	7.35	0.27	0.89	0.65	1.67	0.35	1.84	0.54

## 3 讨论

### 3.1 测定指标的确定

在现行七珍汤散的质量标准中无定量指标，不能全面反映藏药多组分共同药效作用的特点。根据文献<sup>[2-21]</sup>报道，方中藏木香中含土木香内酯、异土木香内酯；干姜中含6-姜辣素；诃子、毛诃子、余甘子均含有没食子酸。本研究通过方法学研究，建立了七珍汤散中土木香内酯、异土木香内酯、没食子酸、6-姜辣素的含量测定方法，以上述4个成分为指标共同对七珍汤散中藏木香、干姜、诃子、毛诃子、余甘子等5味藏中药材进行定量测定。

### 3.2 流动相和测定波长的选择

七珍汤散中化学成分较为复杂。经反复试验，建立了七珍汤散中没食子酸、6-姜辣素、异土木香内酯、土木香内酯测定的流动相梯度洗脱程序。按照所选方法，可在40 min内完成4种成分的同时测定，以6-姜辣素计理论板数≥4000，各成分的色谱峰峰形基本对称，拖尾因子1.01，分离度大于1.5。对各成分的HPLC色谱峰在200~400 nm进行紫外吸收光谱扫描，结果没食子酸、6-姜辣素在波长280 nm，异土木香内酯、土木香内酯在波长230 nm有强吸收，故分别选择280 nm作为没食子酸、6-姜辣素的测定波长，230 nm作为异土木香内酯、土木香内酯的测定波长，利用Empower III的定时波长转换功能实现不同波长下4个成分的同时测定。

### 3.3 色谱柱的选择

本试验考察了Agilent ZORBAX SB C<sub>18</sub>色谱柱

(4.6 mm×150 mm, 5 μm)、Shim-pack VP-ODS C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)、Luna C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)，结果显示Luna C<sub>18</sub>色谱柱的分离效果良好。

本文采用高效液相色谱法建立了同时测定七珍汤散中没食子酸、6-姜辣素、异土木香内酯、土木香内酯的定量测定方法，该法操作简便，重复性、精密度、稳定性、回收率结果较好，可为七珍汤散的全面质量评价提供参考。

### 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: 230.
- [2] 中华人民共和国药典：一部[S]. 2015: 179.
- [3] 都格尔, 麻春杰, 蔡秋杰, 等. 诃子, 西青果和毛诃子红外指纹图谱鉴别研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(3): 661-664.
- [4] 卢平华, 颜玉贞. 诃子质量标准研究[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(6): 385-388.
- [5] 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.
- [6] 黄耀广, 陈小雪, 陈秀英. 诃子、西青果和毛诃子的含量比较研究[J]. 西北药学杂志, 2017, 32(2): 154-157.
- [7] 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.
- [8] 袁涛, 王森, 管咏梅, 等. HPLC同时测定奇正止痛贴膏中3种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014,

- 20 (19) : 72-74.
- [9] Wang Mingjuan, Dai Zhong, Ma Shuangcheng, et al. Rational Column Selection Approach for Purity Determination of Chemical Reference Standards of Natural Products Based on a Column Characterization Database[J]. Chin J Chromatogr, 2017, 35 (2) : 196-202.
- [10] 骆桂法, 杨凤梅, 刘海青, 等. 青海省藏药质量标准调研报告[J]. 中国药事, 2015, 29 (12) : 1272-1277.
- [11] 阿萍, 尼玛潘多, 次旦多吉. 西藏自治区藏药质量标准调研报告[J]. 中国药事, 2015, 29 (12) : 1267-1271.
- [12] 陈静, 支张, 索朗次仁. 现代分析技术对藏药质量标准化的重要性[J]. 中国民族医药杂志, 2015, 21 (6) : 36-37.
- [13] 张幸福, 才毛, 骆桂法. 藏药十味诃子丸的质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (9) : 51-55.
- [14] 张秀娟, 何丽娟, 芦清, 等. 民族药诃子药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (4) : 619-623.
- [15] 陈岳蓉, 李普衍, 刘海青. 藏药七味诃子散中有效成分丁香酚的含量测定[J]. 中国药事, 2017, 31 (2) : 165-169.
- [16] 郑晓萍, 杨晓娟, 杨自荣, 等. HPLC波长切换法同时测定白益镇惊丸中的京尼平龙胆二糖苷、栀子苷、西红花苷-I、去氢茯苓酸和茯苓酸[J]. 中国药事, 2017, 31 (3) : 275-280.
- [17] 王爱娜, 冯贞. 同时测定小儿咳喘灵颗粒中4种成分的方法研究[J]. 中国药事, 2017, 31 (8) : 933-939.
- [18] 徐阳, 单柏宇, 徐伟男, 等. HPLC-DAD法同时测定宁泌泰胶囊中5个有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39 (6) : 1042-1047.
- [19] 郝乘仪, 于蕾, 昌盛, 等. HPLC-DAD法同时测定栀芩清热合剂中多指标成分含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (9) : 1601-1608.
- [20] 王常顺, 刘永利, 段吉平, 等. 双波长-UPLC法同时测定知柏地黄丸中6个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38 (2) : 256-262.
- [21] 张幸福, 刘媛慧, 骆桂法, 等. 十味消食散的TLC法定性及肉桂酸、没食子酸的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45 (6) : 573-576.

(收稿日期 2019年7月30日 编辑 郑丽娥)