

## 藏药七味诃子散中有效成分丁香酚的含量测定

陈岳蓉<sup>1</sup>, 李普衍<sup>1</sup>, 刘海青<sup>2</sup> (1. 青海省药品检验检测院, 西宁 810000; 2. 青海省食品药品监督管理局食品药品审评中心, 西宁 810007)

**摘要** 目的: 建立七味诃子散中丁香酚含量的 HPLC 测定方法。方法: 采用 Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为甲醇-水 (55 : 45), 流速为 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, 检测波长为 280 nm, 柱温为 25  $^{\circ}$ C。结果: 丁香酚的进样量在 0.564~2.820  $\mu$ g 范围内线性关系良好 ( $r=0.9999$ ), 平均回收率为 99.03% (RSD =1.01%); 样品中丁香酚的含量测定结果为 14.7~15.6 mg $\cdot$ g<sup>-1</sup>。结论: 本方法可用于测定七味诃子散中丁香酚的含量, 可为该药质量标准修定提供参考。

**关键词:** 七味诃子散; 丁香酚; 丁香化学成分; 藏族验方; 民族药质量标准

中图分类号: R927.2; R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)02-0165-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.02.009

### Determination of Eugenol in Qiwei Hezi Powders

Chen Yuerong<sup>1</sup>, Li Puyan<sup>1</sup>, Liu Haiqing<sup>2</sup> (1. Qinghai Provincial Drug Inspection and Testing Institute, Xining 810000, China; 2. Qinghai Food and Drug Evaluation and Inspection Center, Xining 810007, China)

**Abstract Objective:** To develop an HPLC method for determination of eugenol in Qiwei Hezi powders.

**Methods:** The optimal HPLC conditions were as follows: Phenomenex Luna 5  $\mu$  C18 column (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m) was adopted, methanol-water (55 : 45) was used as mobile phase, flow rate was 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, detection wavelength was 280 nm, and column temperature was 25  $^{\circ}$ C. **Results:** There was a good linearity between peak areas and injection quantity of eugenol within the range of 0.564~2.820  $\mu$ g ( $r=0.9999$ ). The average recovery was 99.03% (RSD =1.01%). The contents of eugenol in Qiwei Hezi powders were 14.7~15.6 mg $\cdot$ g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** The method can detect eugenol in Qiwei Hezi powders, and can provide references for the quality standard revision of this drug.

**Keywords:** Qiwei Hezi powders; eugenol; chemical composition of Caryophylli Flos; Tibetan prescriptions; ethnodrug quality standard

传统藏医药是极具民族特色的生命科学, 藏药产业是民族地区独具特色和少数具有国际优势的产业之一<sup>[1]</sup>。藏药现代化战略的实施强有力地推动了藏药产业的发展。由于历史原因, 藏药科技基础相对薄弱, 成方制剂工艺粗放、质控技术落后等, 严重制约了藏药品种做大做强<sup>[2]</sup>。七味诃子散系藏族验方, 由诃子(去核)、波棱瓜子、木棉花、草果、丁香、甘松、芫荽 7 味药材组成,

具有清热、镇痛的作用, 用于劳伤引起的脾脏肿大、疼痛、脾热等症。该品种收载于《卫生部药品标准》(藏药)1995 年版第一册<sup>[3]</sup>, 标准编号 WS3-BC-0220-95; 另外《青海省藏药标准》1992 年版也有收载, 其质量标准中仅规定了性状和检查项, 均无含量测定项, 亦未见文献报道。该处方的君药为诃子<sup>[4-5]</sup>, 原计划对诃子中没食子酸进行含量测定<sup>[6-9]</sup>, 通过试验发现丁香<sup>[4, 10]</sup>中也含有

少量的没食子酸<sup>[11-12]</sup>,对阴性有干扰,故用RP-HPLC测定了丁香中有效成分丁香酚的含量作为定量检测指标<sup>[13]</sup>。文献<sup>[14-16]</sup>报道丁香酚具有抗菌、降血压等多种活性。笔者参照相关文献标准<sup>[17]</sup>,采用高效液相色谱法(HPLC法)测定了七味诃子散的有效成分丁香酚的含量,该方法简便、灵敏、准确,且重现性好,可作为衡量七味诃子散质量的一项重要指标。

## 1 仪器与试剂

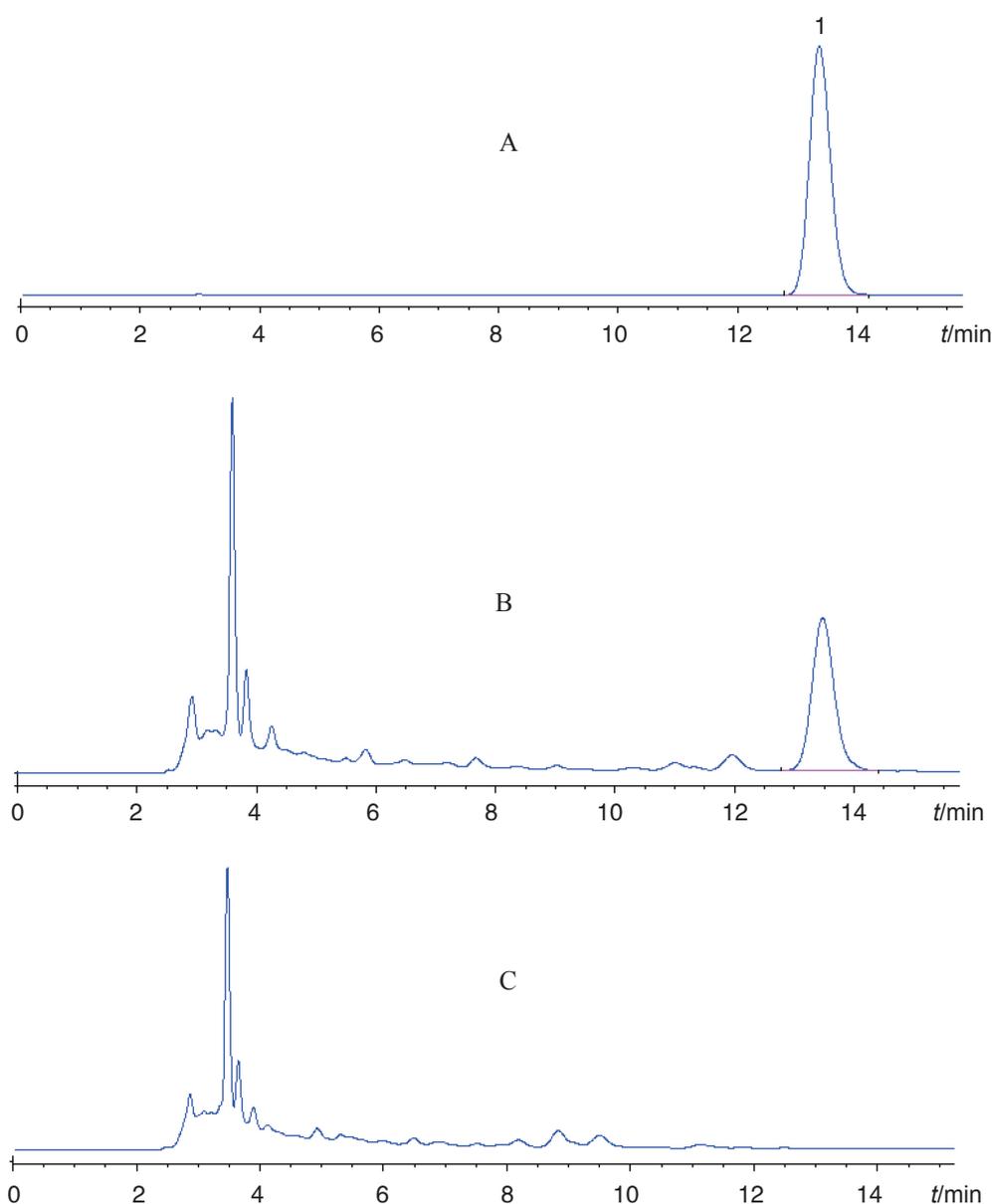
LC-20ATVP 高效液相色谱仪及工作站(日本岛津公司);XS105DU 电子天平(梅特勒-托利多)。

丁香酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110725-200610);甲醇为色谱纯;水为三重蒸馏水,七味诃子散(西藏雄巴拉曲神水藏药厂,批号 20100701、20100702、20100703、20100704、20100705、20100706)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna 5 $\mu$  C18(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m);流动相:甲醇-水(55:45);流速:1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>;检测波长:280 nm;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:10 $\mu$ L;丁香酚的保留时间为13.4 min(见图1)。



A: 对照品; B: 丁香酚样品; C: 阴性样品; 1. 丁香酚。

图1 HPLC 色谱图

## 2.2 对照品溶液的制备

精密称取丁香酚对照品 0.44062 g, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 得  $8.8124 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  丁香酚溶液作为对照品储备液。精密吸取对照品储备液 2.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 10.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 即得对照品溶液 (质量浓度为  $0.1410 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

## 2.3 供试品溶液的制备

将本品研细, 取 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称量, 超声处理 (功率 200 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称量, 用甲醇补足减失的量,  $0.45 \mu\text{m}$  的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

## 2.4 空白试验

按七味诃子散制备方法制成缺丁香的阴性对照品, 再按“2.3”节供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液, 并按上述色谱条件进行检测。结果在丁香酚对照品相同保留时间处无干扰峰出现 (图 1-C), 表明处方中其余 6 味药材对丁香酚的测定无干扰。

## 2.5 线性关系考察

精密吸取丁香酚对照品溶液 4、8、12、18、20  $\mu\text{L}$ , 参照“2.1”节下色谱条件进样。以峰面积 ( $Y$ ) 对进样量 ( $X$ ) 进行线性回归, 得回归方程:

$$Y=981654X+8370.5 \quad r=0.9999$$

结果表明, 丁香酚进样量在  $0.564\sim 2.820 \mu\text{g}$  范围内与峰面积响应值呈良好线性关系。

## 2.6 稳定性试验

取样品按“2.3”节下方法制成供试品溶液, 按“2.1”节下色谱条件分别在 0、2、4、6、8 h 测定, 结果丁香酚峰面积的 RSD 为 0.20%, 表明在 8 h 内供试品溶液稳定性良好。

## 2.7 重复性试验

取同一批号的样品 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 按“2.3”节下方法制备溶液并进行测定。结果丁香酚的含量平均值为  $14.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 为 1.39%。

## 2.8 精密度试验

取对照品溶液, 按“2.1”节下色谱条件连续进样测定 6 次, 计算丁香酚峰面积的 RSD 为 0.13%。

## 2.9 加样回收率试验

采用加样回收法, 精密称取已知含量的样品 (批号为 20100703, 测得含量为  $14.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 适量共 9 份, 按低、中、高浓度 (每个浓度 3 份), 分别准确加入丁香酚对照品溶液适量, 按“2.3”节下方法制成供试溶液, 按“2.1”节下方法进行测定, 用外标法计算丁香酚的量及加样回收率, 结果见表 1。

表 1 丁香酚回收率试验

| 编号 | 取样量 / g | 样品含量 / g | 加入量 / mg | 测得量 / mg | 回收率 / % | 平均回收率 / % | RSD / % |
|----|---------|----------|----------|----------|---------|-----------|---------|
| 1  | 0.2485  | 3.703    | 1.410    | 5.087    | 98.16   |           |         |
| 2  | 0.2439  | 3.634    | 1.410    | 5.051    | 100.49  |           |         |
| 3  | 0.2479  | 3.694    | 1.410    | 5.076    | 98.01   |           |         |
| 4  | 0.2588  | 3.856    | 2.820    | 6.635    | 98.55   |           |         |
| 5  | 0.2599  | 3.873    | 2.820    | 6.627    | 97.66   | 99.03     | 1.01    |
| 6  | 0.2484  | 3.701    | 2.820    | 6.498    | 99.18   |           |         |
| 7  | 0.2419  | 3.604    | 4.230    | 7.801    | 99.22   |           |         |
| 8  | 0.2427  | 3.616    | 4.230    | 7.852    | 100.14  |           |         |
| 9  | 0.2542  | 3.788    | 4.230    | 8.011    | 99.83   |           |         |

### 2.10 样品测定

取6个批号七味诃子散,分别按“2.3”节下方法制成供试品溶液并按上述色谱条件测定峰面积,按外标法计算样品的含量,结果见表2。

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

HPLC法测定丁香酚的含量,需选择适当的检测波长。利用高效液相色谱-二极管阵列(DAD),根据丁香酚的光谱图进行选择,丁香酚在 $(280 \pm 2)$  nm、 $(203 \pm 2)$  nm处有最大吸收。因在280 nm处基线较为稳定,本试验选取280 nm作为检测波长(见图2)。

表2 样品测定结果 ( $n=3$ )

| 批号       | 平均含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | RSD/% | 批号       | 平均含量 / ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) | RSD/% |
|----------|--------------------------------------------|-------|----------|--------------------------------------------|-------|
| 20100701 | 15.3                                       | 0.39  | 20100704 | 14.9                                       | 0.34  |
| 20100702 | 14.7                                       | 0.30  | 20100705 | 14.8                                       | 0.33  |
| 20100703 | 14.9                                       | 1.22  | 20100706 | 15.6                                       | 0.39  |

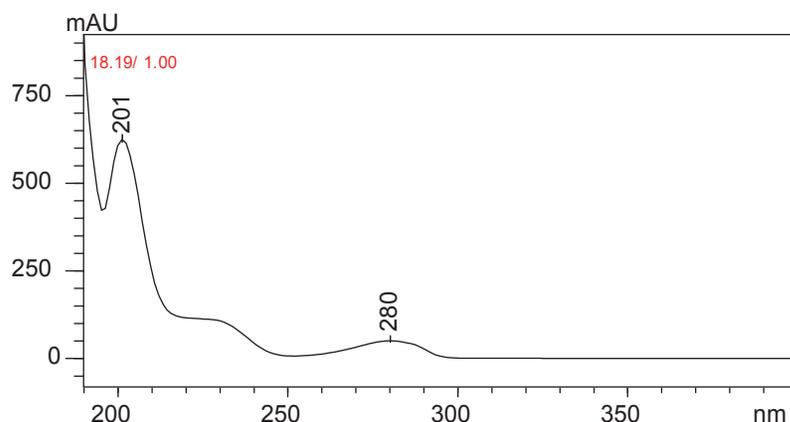


图2 丁香酚紫外吸收图

### 3.2 流动相的选择

在选用流动相时,试用了多种比例的乙腈-水、甲醇-水、水-甲醇-乙腈等流动相的分离效果,最终确定以甲醇-水(55:45)为优,分离效果较好,且无干扰。

### 3.3 样品的处理

本试验对七味诃子散样品的提取方法进行筛选时,考察了甲醇、乙醇、醋酸乙酯3种溶剂提取的效果,结果表明甲醇提取效果最好;分别采用加热回流提取、超声处理、索氏提取3种方法进行提取,结果采用超声提取效果好,且超声提取方法操作简便、省时。另考察了不同提取时间(20、30、50 min),发现只需超声提取30 min即可将本品中丁香酚提取完全,含量并未随着提取时间延长而有

所增加,超过30 min时含量甚至有下降的趋势。故最终选择以甲醇为提取溶剂,超声30 min为最佳提取方法。

### 3.4 标准提高的迫切性

青海藏药多源于藏医传统验方和藏医名著,受历史和工艺影响,标准现代化升级进程缓慢,特别是一些临床过硬的品种如“七味诃子散”因为缺乏基础性研究,药物化学成分、安全性、稳定性研究不透彻,严重影响了藏药的有效推广。针对七味诃子散中丁香的有效成分丁香酚的含量测定项增加到质量标准中可显著提高药品质控水平,保证临床疗效。七味诃子散现行标准中无含量测定项,会导致生产企业质量控制水平低下,生产工艺不规范,通过增加丁香酚的含量测定项能精准控制工艺参数,

显著提高藏药七味诃子散的品质<sup>[18-20]</sup>。

### 3.5 小结

用 HPLC 法测定七味诃子散中丁香酚的含量,经方法学研究表明,此方法具有样品预处理提取完全,回收率、重复性、稳定性好及专属性强等优点,可作为七味诃子散质量标准检测方法。

### 参考文献:

- [1] 尚远宏,刘超,彭镰心,等.藏药的研究现状及展望[J].西南民族大学学报(自然科学版),2006,(1) 140-144.
- [2] 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.
- [3] 中华人民共和国卫生部.中华人民共和国卫生部药品标准藏药:第一册[S].1995:12,64.
- [4] 中国药典:一部[S].2010:173.
- [5] 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,1996:589.
- [6] 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):36-40.
- [7] 蔡小华,谢兵,杜海军.诃子化学成分及药理作用的研究进展[J].药学进展,2008,35(5):212-215.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 青海省药品检验所,青海省藏医药研究所.中国藏药(第二卷)[M].上海:上海科学技术出版社,1996:265.
- [11] 杨凤梅,张幸福,张炜,等.UPLC法同时测定十八味诃子利尿丸中4种药效成分含量的方法研究[J].青海医学院学报,2011,32(1):53-59.
- [12] 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.
- [13] 黎迎,陆洋,杜守颖,等.对《中国药典》2010年版丁香药材中丁香酚含量测定方法的探讨[J].中药新药与临床药理,2012,23(5):579-582.
- [14] 邱电,张魁华,方炳虎.丁香酚的药理作用[J].动物医学进展,2007,28(8):101-103.
- [15] 朱金段,袁德俊,林新颖.丁香的药理研究现状及临床应用[J].中国药物经济学,2013,40(1):32-35.
- [16] 周丽光,冯雪松,黄开毅,等.关东丁香化学成分研究[J].中药材,2008,31(5):679-681.
- [17] 张锐,卢金清,江汉美,等.高效液相色谱法测定不同产地丁香中丁香酚含量研究[J].亚太传统医药,2015,11(12):36-38.
- [18] 毛萌,任小巧,杨秀岩,等.藏药质量标准现状及其研究对策[J].中医杂志,2015,56(8):640-644.
- [19] 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.
- [20] 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.

(收稿日期2016年8月31日 编辑 郑丽娥)