

基于色谱指纹图谱的五倍子定量测定方法

郭小瑞¹, 孙哲², 王添敏¹, 杨开宇³, 李里^{4*}, 郭乃菲¹, 徐美玲¹, 马福敏¹

- (1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600;
2. 北京中医药大学, 北京 100029; 3. 大连市第四人民医院, 辽宁 大连 116031;
4. 沈阳军区总医院口腔科, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 建立以五倍子的高效液相色谱指纹图谱指纹峰为基准峰计算多指标成分的定量方法。方法: 建立五倍子的指纹图谱, 达到基线分离的峰确定为指纹峰, 以没食子酸峰为基准峰, 计算基准峰中没食子酸的含量, 其他指纹峰以没食子酸为参照, 计算每个指纹峰以没食子酸计的的含量。结果: 确定了五倍子指纹图谱中 14 个指纹峰, 计算出指纹峰以没食子酸计的的含量。结论: 建立了五倍子多指标成分的定量方法, 方法具有可操作性, 使指纹图谱在药品质量控制中更具有意义。

[关键词] 五倍子; 指纹图谱; 定量方法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0137-04

[doi] 10.11653/syjf2013210137

Multicomponent Quantitative Method of *Galla Chinensis* Based on Fingerprint

GUO Xiao-rui¹, SUN Zhe², WANG Tian-min¹, YANG Kai-yu³, LI Li^{4*},
GUO Nai-fei¹, XU Mei-ling¹, MA Fu-min¹

- (1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;
2. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

[收稿日期] 20130504(016)

[基金项目] 辽宁省科技厅博士启动基金项目(20111130)

[第一作者] 郭小瑞, 博士, 讲师, 从事中药及食品现代化研究, Tel:0411-87586495, E-mail: guoxiaoruiqq@163.com

[通讯作者] * 李里, 硕士, 主治医师, 从事口腔医学及中药现代化应用研究, Tel:024-28851333, E-mail: reddwht@163.com

和挥发油的香味不同的主要原因之一。柠檬烯具有镇咳、祛痰、抗菌等作用^[9]和精油的主要成分^[10]。本项研究为了解该药材的化学成分、质量控制和进一步开发利用, 提供了有用的资料。

[参考文献]

- [1] 马成亮. 野菊花的价值与加工[J]. 特种经济动植物, 2002(9):25.
[2] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1997:4402.
[3] 文加旭, 陈建宁, 吴丽婷, 等. 重庆缙云山野菊花挥发油化学成分研究[J]. 中药材, 2012, 35(1):70.
[4] 张永明, 黄亚非, 陶玲, 等. 不同产地野菊花挥发油化学成分比较研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(4):265.
[5] 胡浩斌, 郑旭东. 子午岭野菊花挥发油的化学成分及

- 抑菌活性[J]. 新疆大学学报, 2005, 22(3):295.
[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 63.
[7] Juergens U R, Dethlefsen U, Steinkamp G, et al. Anti-inflammatory activity of 1, 8-cineol (eucalyptol) in bronchialasthma: a double-blind placebo-controlled trial [J]. Respir Med, 2003, 97(3):250.
[8] Santos F A, Silva R M, Campos A R, et al. 1, 8-Cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis [J]. Food Chem Toxicol, 2004, 42(4):579.
[9] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986:668.
[10] 余珍, 丁靖垠. 几种芸香科柑桔类精油的化学成分与香气的研究[J]. 云南植物研究, 1996, 18(4):465.

[责任编辑 邹晓翠]

3. The Fourth People's Hospital of Dalian City, Dalian 116031, China;

4. General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110016, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the quantitative method in the form of fingerprint peaks of *Galla chinensis*. **Method:** The fingerprints of *G. chinensis* were obtained, the peaks which can be separated from the baseline were defined as fingerprint peaks, and the peak of gallic acid was appointed as the benchmark peak. All the fingerprint peaks were quantified grounded on the peak of gallic acid. **Result:** Fourteen peaks were defined and quantified rested on the peak of gallic acid. **Conclusion:** A multicomponent quantitative method for *G. chinensis* is established. The method is feasible.

[**Key words**] *Galla chinensis*; fingerprint; quantitative method

五倍子为漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis* Mill.、青麸杨 *R. potaninii* Maxim. 或红麸杨 *R. punjabensis* Stew. var. *sinica* (Diels) Rehd. et Wils. 叶上的虫瘿,主要由五倍子蚜 *Melaphis chinensis* (Bell) Baker 寄生而形成。主产于四川、湖南、贵州等省,药理作用包括收敛作用、抗病毒作用、抗菌作用等,主要成分为鞣质和没食子酸^[1-6]。目前,其质量控制方法方面,《中国药典》2010 年版采用可见分光光度法测定鞣质含量,采用高效液相色谱法将样品经长时间酸水解后测定其中没食子酸的含量。文献报道也多集中于此^[7-10],以上方法虽然准确但是操作较为繁琐。中药的色谱指纹图谱是能够反映该中药特征、标示该中药特性的共有峰的图谱,具有特征性和稳定性。曾有学者^[11]对五倍子药材色谱指纹图谱进行了测定,但色谱峰分离度不甚理想;采用以指纹峰中某单一指标成分计算每个指纹峰含量的方法,虽然不能完全代替含量测定,但可以更全面更直观的控制药品质量。因此,本文在前期工作基础上,以没食子酸色谱峰为基准峰进行多指标成分测定方法的研究,为控制药材质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent-1100 高效液相色谱仪:二元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、二级管阵列检测器(DAD)(美国安捷伦公司);Agilent ChemStation 色谱工作站(美国安捷伦科技公司);XP205 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);SY-120 型超声波清洗器(浙江象山石浦海天电子仪器厂)。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯,天津市凯信化学工业有限公司),冰乙酸(色谱纯,丹东市胜利化学厂),超纯水,没食子酸对照品(批号 0831-9501,中国药品生物制品检定所)。

1.3 药材 共对 15 批不同来源的五倍子药材进行分析。样品来源及编号见表 1,经辽宁中医药大学

中药鉴定教研室王添敏副教授鉴定为五倍子 *Galla chinensis*。

表 1 药材样品来源

| 样品批次 | 来源 | 样品批次 | 来源 | 样品批次 | 来源 |
|------|----|------|----|------|----|
| 1 | 辽宁 | 6 | 四川 | 11 | 辽宁 |
| 2 | 四川 | 7 | 湖南 | 12 | 湖南 |
| 3 | 辽宁 | 8 | 湖南 | 13 | 四川 |
| 4 | 贵州 | 9 | 辽宁 | 14 | 湖南 |
| 5 | 四川 | 10 | 四川 | 15 | 贵州 |

2 方法

2.1 色谱条件 大连中汇达 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相采用二元梯度系统溶剂 A(1% 冰醋酸水溶液)和溶剂 B(甲醇)进行梯度洗脱(0 ~ 15 min B 由 2% 升至 3%, 15 ~ 40 min B 由 12% 升至 13%, 40 ~ 60 min B 为 20%, 60 ~ 120 min B 由 22% 升至 27%),柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 5 μL,检测波长 280 nm。理论塔板数按没食子酸计算不低于 3 000。

2.2 供试品溶液的制备 取五倍子药材粉末约 0.25 g,精密称定,用 20 mL 甲醇超声处理 0.5 h,放至室温,过滤,置 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释并定容至刻度,使成每毫升含 10 mg 生药的药液,摇匀,滤过,取续滤液,备用。

2.3 对照品溶液的制备 没食子酸为五倍子水溶性成分中的主要药效成分之一,含量较大且容易辨认,将其选为参照物。取没食子酸对照品适量,精密称定,用甲醇溶解稀释,制成 0.32 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取质量浓度为 1.6, 3.2, 8, 40, 80, 160 mg·L⁻¹ 的没食子酸对照品溶液各 5 μL,注入液相色谱仪,在 2.1 项下色谱条件洗脱,

测定各峰面积,以对照品溶液质量浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标,峰面积为纵坐标,求得回归方程: $Y = 24.50X - 2.04, r = 0.9999$ 。结果表明没食子酸在 $1.6 \sim 160 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取五倍子药材粉末约 0.25 g ,精密称定,按**2.2**项下制备供试品溶液,在**2.1**项下色谱条件洗脱,连续进样5次,记录色谱图,计算RSD 1.2%。结果表明仪器精密度良好。

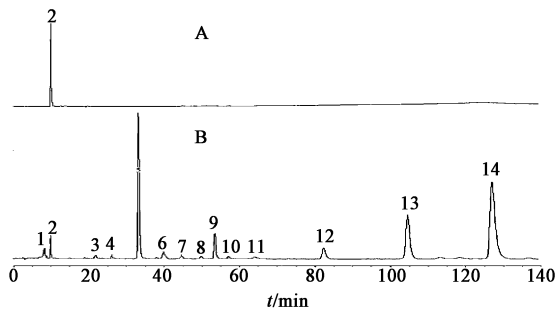
2.4.3 重复性试验 取同一来源药材6份,按**2.2**项下制备供试品溶液,在**2.1**项下色谱条件洗脱,记录色谱图,计算RSD 1.9%。结果表明方法重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一来源药材,按**2.2**项下制备供试品溶液,在**2.1**项下色谱条件分别在0,2,8,12,24,48 h进样分析,记录色谱图,计算RSD 2.7%。结果表明供试品溶液在48 h内稳定。

2.4.5 回收率试验 取同一来源药材6份,每份 0.25 g ,精密称定,分别精密加入一定量的对照品溶液($8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 2 mL),按**2.2**项下制备供试品溶液,在**2.1**项下色谱条件洗脱,测定没食子酸质量浓度,计算回收率。结果6份样品中没食子酸的平均回收率为99.9%,RSD 1.3%,表明本法回收率符合要求。

3 结果

3.1 五倍子药材指纹峰定量 根据作者前期建立的五倍子药材色谱指纹图谱测定方法,确定了其指纹图谱中14个共有峰。其中以没食子酸色谱峰为基准峰,根据其色谱峰面积由标准曲线计算出质量浓度后,折算成生药中的质量分数。对选定的其余指纹峰,以基准峰含量为依据,分别计算相对含量。以批次编号1的五倍子药材样品为例,结果见表2。药材典型色谱图见图1。



A. 对照品;B. 药材样品;2. 没食子酸

图1 没食子酸对照品(A)和五倍子药材样品(B)HPLC

3.2 样品含量测定 取15批样品,按**2.2**项下制

表2 指纹峰(以没食子酸计)相对含量

| 指纹峰号 | 指纹峰面积 | 指纹峰相对含量/% | 指纹峰以没食子酸计总含量/% |
|---------|----------|-----------|----------------|
| 1 | 1 866.6 | 0.77 | 28.84 |
| 2(没食子酸) | 1 749.3 | 0.72 | |
| 3 | 84.7 | 0.03 | |
| 4 | 61 | 0.03 | |
| 5 | 16 661 | 6.88 | |
| 6 | 1 215.9 | 0.50 | |
| 7 | 163.2 | 0.07 | |
| 8 | 92.8 | 0.04 | |
| 9 | 3 266.3 | 1.35 | |
| 10 | 45 | 0.02 | |
| 11 | 59.7 | 0.02 | |
| 12 | 2 693.5 | 1.11 | |
| 13 | 12 348.4 | 5.10 | |
| 14 | 29 544.7 | 12.20 | |

注:计算方法:以基准峰计指纹峰含量=(指纹峰峰面积/基准峰面积) \times 基准峰含量

备供试品溶液,在**2.1**项下色谱条件进样分析,按**3.1**项下方法计算样品中每个指纹峰的相对含量。结果见表3(其中2号峰为没食子酸质量分数)。

4 讨论

中药色谱指纹图谱具有特征性,广泛应用于中药的定性分析与半定量分析。若在色谱指纹图谱研究的基础上,基于其中某一已知成分的含量,计算其他未知共有峰的相对含量,充分利用指纹图谱的定性功能并提升其定量功能,可以更全面的掌握中药材中多成分的信息,为全面控制中药材的质量提供更有效的方法。

中药含有许多未知化学成分,如何测定这些成分的含量是中药成分分析与质量控制中的难点。本文在五倍子药材高效液相色谱指纹图谱基础上,以其中没食子酸含量为基准,对共有峰相对于基准峰的相对含量进行标定,方法操作简便、重复性好,具有可行性,为中药复杂成分的质量控制方法做出了有意义的探索。

对15批不同来源的五倍子药材进行指纹峰相对含量计算结果表明,不同来源的药材各指纹峰相对含量相差较大。提示各来源药材质量良莠不齐,使用时应注意选择。

表 3 15 批样品中指纹峰(以没食子酸计)相对含量及总含量

%

| 峰号 | 各批次样品含量 | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| 1 | 0.77 | 0.51 | 0.42 | 0.37 | 0.25 | 0.21 | 0.26 | 0.50 | 0.28 | 0.40 | 0.50 | 0.19 | 0.22 | 0.21 | 0.26 |
| 2* | 0.72 | 1.54 | 1.25 | 0.53 | 1.58 | 0.54 | 0.81 | 2.70 | 0.44 | 1.08 | 0.61 | 1.35 | 2.80 | 1.18 | 1.73 |
| 3 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.08 | 0.03 | 0.07 | 0.10 | 0.07 | 0.05 | 0.09 | 0.09 |
| 4 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.18 | 0.01 | 0.10 | 0.03 | 0.37 | 0.03 | 0.08 | 0.08 |
| 5 | 6.88 | 6.73 | 5.56 | 9.07 | 5.96 | 7.46 | 6.34 | 7.79 | 8.57 | 10.45 | 10.63 | 6.01 | 4.16 | 7.40 | 7.93 |
| 6 | 0.50 | 0.71 | 0.38 | 0.24 | 0.81 | 0.18 | 0.98 | 1.30 | 0.22 | 0.05 | 0.19 | 0.47 | 0.12 | 0.30 | 0.80 |
| 7 | 0.07 | 0.09 | 0.03 | 0.01 | 0.11 | 0.01 | 0.02 | 0.67 | 0.02 | 0.76 | 0.20 | 0.02 | 0.02 | 0.43 | 0.45 |
| 8 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.07 | 0.02 | 0.02 | 0.13 | 0.16 | 0.17 | 0.13 | 0.05 |
| 9 | 1.35 | 0.91 | 1.02 | 0.71 | 0.72 | 0.86 | 0.75 | 0.49 | 0.37 | 0.41 | 0.02 | 0.04 | 0.04 | 0.02 | 0.13 |
| 10 | 0.02 | 0.06 | 0.02 | 0.05 | 0.77 | 0.05 | 0.06 | 3.91 | 0.06 | 5.30 | 0.58 | 0.17 | 0.25 | 2.23 | 2.38 |
| 11 | 0.02 | 0.03 | 0.07 | 0.05 | 0.05 | 0.07 | 0.04 | 0.27 | 0.08 | 0.05 | 0.07 | 0.15 | 0.09 | 0.09 | 0.08 |
| 12 | 1.11 | 0.29 | 0.36 | 1.33 | 1.38 | 0.24 | 0.23 | 5.70 | 0.25 | 6.64 | 1.86 | 0.17 | 0.14 | 4.00 | 3.18 |
| 13 | 5.10 | 3.37 | 3.82 | 3.58 | 4.21 | 4.98 | 4.06 | 5.67 | 3.86 | 3.28 | 2.41 | 3.09 | 3.88 | 3.41 | 2.80 |
| 14 | 12.20 | 13.18 | 9.37 | 14.64 | 11.28 | 12.92 | 9.28 | 8.02 | 14.11 | 6.35 | 13.49 | 9.64 | 9.13 | 7.43 | 8.28 |
| 总量 | 28.84 | 27.50 | 22.38 | 30.62 | 27.20 | 27.57 | 22.88 | 37.33 | 28.31 | 34.96 | 30.80 | 21.90 | 21.09 | 27.01 | 28.24 |

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:62.
- [2] 宋巧,张耀春,胡秋颖,等. 不同产地五倍子有效成分的研究[J]. 畜牧市场,2007(7):56.
- [3] 蒲春霞. 五倍子药理研究与临床应用进展[J]. 现代临床学,2005,31(2):119.
- [4] 朱日丙,李继遥,周学东. 五倍子对牙根面脱矿影响的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(6):529.
- [5] 李秀萍,李眷远,渠桂荣,等. 五倍子的研究概况[J]. 中医药报,2002,30(3):72.
- [6] 刘军莲,唐德才,金芳. 五倍子研究近况[J]. 中药材,2002,25(12):911.
- [7] 侯惠婵,梁前,卢迅聪. 五倍子、没食子中没食子酸的含量测定[J]. 中国药品标准,2005,6(3):38.
- [8] 宋光志,刘静,谢道刚. 五倍子鞣酸的质量标准[J]. 华西药理学杂志,2004,19(4):279.
- [9] 刘起中,张可可. HPLC法测定五倍子中没食子酸的含量[J]. 中草药,2002,33(5):427.
- [10] 夏宇敏,姜义武. 复方五倍子洗剂质量标准探讨[J]. 湖南中医药导报,2001,7(6):336.
- [11] 陈红,龙远德,张丹. 五倍子的指纹图谱研究[J]. 华西药理学杂志,2010,25(3):373.

[责任编辑 邹晓翠]