

HPLC 测定不同批次藏药三果汤中 没食子酸和鞣花酸的含量

张海伟, 张艺*, 杨继家, 范刚

(成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 建立同时测定藏药三果汤中抗氧化活性成分没食子酸和鞣花酸含量的方法, 并对不同批次中的含量进行比较。方法: 采用 HPLC, Welchrom C₁₈ 色谱柱 (4.60 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.25% 甲酸溶液, 梯度洗脱, 流速 0.85 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 260 nm。结果: 没食子酸和鞣花酸分别在 0.050 ~ 0.700, 0.050 ~ 0.714 μg 呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 100.57%, 98.71%, RSD 分别为 0.84%, 1.16%。结论: 所建方法操作简便、准确、重复性好, 适用于同时测定藏药三果汤中没食子酸和鞣花酸的含量, 含量测定结果为藏药三果汤的药用研究、产品的开发提供了依据。

[关键词] 藏药; 三果汤; 没食子酸; 鞣花酸; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)10-0095-04

[doi] 10.11653/syjf2013100095

Determination of Gallic Acid and Ellagic Acid from the Oxidation Resistance of Traditional Tibetan Drug Sanguotang of Different Batches by HPLC

ZHANG Hai-wei, ZHANG Yi*, YANG Ji-jia, FAN Gang

(College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the gallic acid and ellagic acid in the traditional Tibetan drug Sanguotang by RP-HPLC and compare the content of different batches. **Method:** The separation was performed on a welchrom C₁₈ (4.60 mm × 250 mm, 5 μm) column with gradient elution. The mobile phase was acetonitrile-0.25% methanoic acid solution, and the flow rate was 0.85 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 260 nm. The column temperature was kept at 25 °C. **Result:** The linear ranges of gallic acid and ellagic acid were within 0.050 0-0.700 0, 0.050 2-0.714 0 mg respectively. The average recoveries for gallic and ellagic acid were 103.22%, 97.49% (n = 6). **Conclusion:** This method is suitable for the determination of gallic acid and ellagic acid in the traditional Tibetan drug Sanguotang. The results provide a basis for medicinal value research and product development of the traditional Tibetan drug Sanguotang.

[Key words] traditional Tibetan drug; Sanguotang; gallic acid; ellagic acid; determination

藏药三果汤由诃子、毛诃子和余甘子 3 味药组成, 最早见于《四部医典》, 主治瘟疫、紊乱热症、促

使热症成型^[1], 收载于 1995 年版藏药《部颁标准》具有清热、调和气血^[2]、化解坏血^[3]的功效。高原地区地理、气候独特, 大体处于清气不足状态, 则宗气虚弱, 肺主气功能降低, 人体固有的血和赤巴等物质因内、外因引起紊乱, 失去平衡, 发生病变。这些病变进而影响精微运化功能, 导致血液不能正常生化而化为坏血, 造成瘀血及溃烂^[4-5]。藏药三果汤作为藏区治疗高原红细胞增多症的经典方剂, 为施行放血疗法之前必服的汤剂, 应用范围广泛并且具有明显的疗效^[6]。

[收稿日期] 20120211(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973957, 30960507); 高校博士点专项科研基金项目(20095132110008)

[第一作者] 张海伟, 硕士研究生, 从事藏药药效物质基础研究, Tel: 15208361203, E-mail: 690001517@qq.com

[通讯作者] * 张艺, 博士, 研究员, 从事中药及民族药效物质基础及质量控制研究, Tel: 028-61800274, E-mail: 9006zmy@sina.com

现代研究表明,藏药三果汤含有没食子酸、鞣花酸等酚酸类,以及鞣质类、三萜酸类和黄酮类等成分,其中没食子酸和鞣花酸为余甘子、毛诃子、诃子 3 味药材共有成分^[7-10]。三果汤质量控制方面多采用 HPLC 对单一成分没食子酸进行含量测定^[11],专属性较差,本文对藏药三果汤中主要酚酸类成分没食子酸和鞣花酸进行了含量测定,为提高藏药三果汤质量控制提供了参考依据。

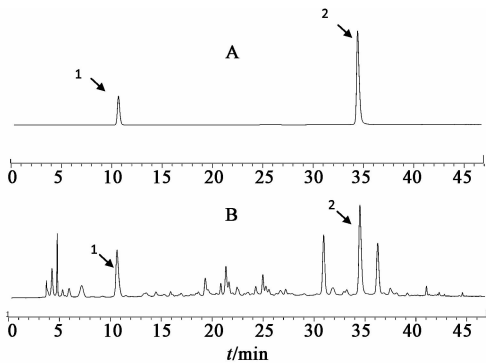
1 仪器与材料

日本岛津 LC-2010AHT 型高效液相色谱仪(G1315D-DAD 检测器),LC 色谱工作站;KQ3200E 型超声波清洗仪,BSA-124D 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),ULUP-I-10T 型优普超纯水机(成都超纯科技有限公司)。

没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110831-200302,供含量测定用),鞣花酸对照品(实验室自制,HPLC 面积归一化法计算纯度 $\geq 98\%$),藏药三果汤样品经粉碎、过三号筛混匀,置干燥器中备用,乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Welchrom C₁₈ 色谱柱(4.60 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为乙腈(B)和 0.25% 甲酸水溶液(A)。梯度洗脱,流速 0.85 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 260 nm。对照品溶液和藏药三果汤供试品溶液的 HPLC 色谱分别见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 没食子酸;2. 鞣花酸

图 1 三果汤溶液 HPLC

梯度洗脱程序为 0 ~ 6 min, 3% ~ 5% B; 6 ~ 15 min, 5% ~ 8% B; 15 ~ 17 min, 8% ~ 15% B, 17 ~ 25 min, 15% ~ 18% B; 25 ~ 33 min, 18% ~ 22% B; 33 ~ 35 min, 22% ~ 25% B, 35 ~ 40 min, 25% ~ 50% B; 40 ~ 45 min, 50% ~ 100% B。

2.2 对照品与供试品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备^[12] 精密称取没食子酸

对照品 10.003 1 mg、鞣花酸对照品 10.201 5 mg,置于 100 mL 的量瓶中,50% 甲醇溶解定容,制成浓度分别为 0.100, 0.102 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取三果汤供试品粉末(过三号筛)约 0.1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 150 W,频率 40 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,即得。

2.2.3 线性关系考察 分别精密吸取食子酸和鞣花酸对照品溶液 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 mL,分别置于 10 mL 的量瓶中,用 50% 的甲醇定容至刻度,摇匀,过滤。精密吸取 10 μL 注入液相色谱仪,测定。以对照品峰面积为纵坐标,进样量(μg)为横坐标进行线性回归,得到的线性回归方程为: $Y_{\text{没食子酸}} = 2838105.77X + 6483.80 (r = 0.9999)$, $Y_{\text{鞣花酸}} = 10880921.43X - 78339.05 (r = 0.9999)$ 。结果表明没食子酸和鞣花酸分别在 0.050 ~ 0.700, 0.050 ~ 0.714 μg 呈良好线性。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取上述配制好的混合对照品溶液重复进样 5 次,以没食子酸、鞣花酸峰面积计算,测定值的 RSD 分别为 0.20%, 0.35%,表明系统的精密度较好。

2.3.2 稳定性试验 取上述配制好的混合对照品溶液,于 0, 2, 8, 12, 24 h 分别进样分析,没食子酸和鞣花酸峰面积计算,测定值的 RSD 分别为 0.60%, 2.01%,表明对照品稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取藏药三果汤复方(批号 2011010504)制成供试品溶液 6 份,每份约 0.1 g,按 1.2.2 项下方法制备供试品溶液并分析,没食子酸和鞣花酸的平均含量分别为 2.09%, 1.07%。RSD 分别为 3.30%, 2.54%,表明方法的重复性好。

2.3.4 加样回收率试验 取已知没食子酸含量的样品(批号 2011010504)6 份,每份约 50 mg,精密加入上述配制好的没食子酸对照品 1.00 mg,鞣花酸对照品 1.02 mg,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液并分析,没食子酸和鞣花酸的平均加样回收率分别为 100.57%, 98.71%, RSD 分别为 0.84%, 1.16%。以上结果表明该方法符合含量测定的要求,见表 1。

2.4 含量测定 称取 15 批次藏药三果汤样品,按 2.2.2 项下制备下列批次的待测样品溶液,进样量为 10 μL,分别注入高效液相色谱仪,测定色谱峰面积,结果见表 3。

表1 没食子酸的加样回收率(n=6)

No.	样品质量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	50.05	1.05	1.00	2.06	100.49	100.57	0.84
2	49.84	1.04	1.00	2.05	100.49		
3	50.11	1.05	1.00	2.04	99.51		
4	50.08	1.05	1.00	2.07	100.97		
5	50.09	1.05	1.00	2.09	101.95		
6	50.11	1.05	1.00	2.05	100.00		

表2 鞣花酸的加样回收率(n=6)

No.	样品质量 /mg	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	50.05	0.54	1.02	1.55	99.35	98.71	1.16
2	49.84	0.53	1.02	1.56	100.64		
3	50.11	0.54	1.02	1.54	98.71		
4	50.08	0.54	1.02	1.53	98.07		
5	50.09	0.54	1.02	1.53	98.07		
6	50.11	0.54	1.02	1.52	97.43		

表3 三果汤样品中没食子酸及鞣花酸含量测定(n=2) %

No.	药材来源	没食子酸	鞣花酸含量
2011010501	西藏藏医学院标本馆	1.64	0.94
2011010502	西藏藏医学院	1.92	1.52
2011010503	西藏藏医学院藏药厂	1.19	1.24
2011010504	西藏自治区藏药厂	2.09	1.07
2011010505	西藏山南地区藏医院	1.62	1.34
2011010506	西藏拉萨药材公司	1.42	1.23
2012100607	西藏金珠雅砻藏药有限责任公司	2.10	0.99
2012111308	青海省藏医院	1.74	1.02
2012111709	青海省玉树藏医院	1.53	1.44
2012112010	四川省甘孜州藏医院	1.32	1.41
2012112011	四川省德格藏医院	1.45	0.89
2012112012	四川省若尔盖藏医院	1.89	1.33
2012112013	三勒浆药业	1.65	1.14
2012112014	云南省迪庆州香格里拉藏医院	1.23	1.06
2012122015	云南省迪庆州藏药厂	1.66	1.38

3 讨论

本文与相关文献[13]条件进行了比较,结果表明乙腈-0.25%甲酸水溶液梯度洗脱的方法能更好的将对照峰与杂质峰分开,分离度和拖尾因子均符合2010年版《中国药典》要求,且峰形更好;对超声提取和回流提取进行了比较,发现不同提取方法下没食子酸与鞣花酸的含量差异不大,故采用更为简便的超声处理法。

含量测定结果表明,不同批次藏药三果汤中没食子酸、鞣花酸含量存在一定差异。其中没食子酸含量较高的是西藏收集的药材,鞣花酸较高的是青

海收集的药材。这可能与不同来源的藏药三果汤配制比例、贮存方式等有关。此外鞣花酸为没食子酸的二聚体^[14],在一定的条件下,也会发生聚合以及分解,从而影响两者的含量,所以同时测定该2种成分,可以进一步控制藏药三果汤的质量。

[参考文献]

- [1] 罗达尚. 新修晶珠本草[M]. 成都:四川科学技术出版社,2004.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药(第一册)[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,1995:264.
- [3] 四川省阿坝食品药品监督管理局. 四川省阿坝藏族羌族自治州藏药制剂标准[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2008:290.
- [4] 董伟,聂素然,刘红宁,等. 人参、藏红花配伍预防急性高原反应的分析探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(17):239.
- [5] 董伟,聂素然,刘红宁,等. 人参藏红花组合物预防急性高原反应的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17):144.
- [6] 宇妥·云丹贡布. 四部医典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [7] 刘玉梅,宋宝安,杨松,等. 诃子化学成分与生物活性的研究进展[J]. 贵州大学学报:自然科学版, 2007, 24(2):208.
- [8] 李先端,顾雪竹,肖碧英. 绒毛诃子与诃子质量评价与比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17):48.
- [9] 吴雪辉,谢治芳,黄永芳. 余甘子的化学成分和保健功能作用[J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(6):69.
- [10] Liu X L, Cui C, Zhao M, et al. Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities [J]. Food Chemistry, 2008, 109(4):909.
- [11] 徐小平,王曙,黄英. HPLC测定四种藏药中没食子酸的含量[J]. 华西药学杂志, 2003, 18(6):448.
- [12] Patel Madhavi G, Patel cishal R, Patel Reakesh. Development and validation of HPLC method for quantification of phytoconstituents in haritaki churna [J]. Inter J Chem Tech Res, 2011, 1(3):329.
- [13] 德洛,姚喆,冀静,等. 藏药三果汤散抗氧化有效成分的薄层色谱-生物自显影及 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12):98.
- [14] 张华,裴桂珍,李桂华,等. 鞣花酸片剂的制备及其含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13):39.

[责任编辑 顾雪竹]

三重四级杆串联质谱(LC-MS/MS)法 同时测定复方广痛消水提物中 5 种有效成分的含量

朱莉¹, 王锐¹, 李鹏跃², 邓志灏¹, 赵宝明^{1*}

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100300; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立同时测定广痛消水提物中延胡索乙素、芍药苷、小檗碱、厚朴酚、和厚朴酚含量的方法。方法:采用 LC-MS/MS 联用方法。结果:芍药苷、延胡索乙素、小檗碱、厚朴酚、和厚朴酚线性范围分别为 0.882 8 ~ 113 ($r = 0.999 8$), 1.543 8 ~ 49.4 ($r = 0.999 5$), 0.904 7 ~ 115.8 ($r = 0.999 7$), 0.881 3 ~ 112.8 ($r = 0.999 4$), 0.165 6 ~ 21.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999 9$)。加样回收率分别为 1.998%, 1.14%, 3.117%, 1.828%, 1.596%。结论:该法专属性强、快速灵敏,可用于广痛消水提物中延胡索乙素、芍药苷、小檗碱、厚朴酚、和厚朴酚的含量测定。

[关键词] 广痛消水提物; 延胡索乙素; 芍药苷; 小檗碱; 厚朴酚; 和厚朴酚; 三重四级杆串联质谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0098-05

[doi] 10.11653/syjf2013100098

Determination of Five Kinds of Effective Components in Guang Tong Xiao Water Extract by LC-MS/MS

ZHU Li¹, WUANG Rui¹, LI Peng-yue², DENG Zhi-hao¹, ZHAO Bao-ming^{1*}

(1. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100300, China;

2. China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a LC-MS/MS method for the determination of tetrahydropalmatine, paeoniflorin, berberine, magnolol and honokiol in Guang Tong Xiao water extract. **Method:** To measure the content of the target samples by LC-MS/MS method. **Result:** tetrahydropalmatine, paeoniflorin, berberine, magnolol and honokiol were all analyzed exactly, The linear ranges were 0.882 812 5-113 ($r = 0.999 8$), 1.543 75-49.4 ($r = 0.999 5$), 0.904 687 5-115.8 ($r = 0.999 7$), 0.881 25-112.8 ($r = 0.999 4$), 0.165 625-21.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($r = 0.999 9$) respectively. The spike recovery were 1.998%, 1.14%, 3.117%, 1.828% and 1.596%. **Conclusion:** A sensitive, accuracy and suitable LC-MS/MS method has been developed, and the method can be applied for the determination of tetrahydropalmatine, paeoniflorin, berberine, magnolol and honokiol in Guang Tong Xiao aqueous extract.

[Key words] Guang Tong Xiao water extract; tetrahydropalmatine; paeoniflorin; berberine; magnolol; honokiol; LC-MS/MS; content determination

广痛消泡沫气雾剂是北京中医药大学东直门医

院赵宝明教授根据多年的临床经验,结合肛肠疾病的发病特点及术后常见并发症研制的一种经直肠给药的中药复方制剂,主要由延胡索、白芍、厚朴、当归等 8 味中药组成,经动物实验及临床观察表明该方具有抗炎、止血、解痉止痛、消肿、促进创面愈合等作用。该复方制剂经历了提取工艺优化、动物药理实验、剂型优势和药物安全性及大样本的临床药效研究,作为院内制剂在肛肠科应用。本实验旨在建立

[收稿日期] 20121223(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072812)

[第一作者] 朱莉,博士在读,从事肛肠疾病的防治与研究, Tel:010-84013137, E-mail:xjzl_2004@sohu.com

[通讯作者] * 赵宝明,教授,博士生导师,从事肛肠疾病的防治与研究, Tel: 010-84013137, E-mail: zhaobaoming1951@126.com