

- 卷)[M].北京:科学出版社,1988:313-314.
- [4] 崔乃然.新疆草地植物名录[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,1990:34.
- [5] 陈孝娟,顾政一,徐芳,等.不同产地的石榴皮总多酚的含量测定[J].时珍国医国药,2011,22(3):541-543.
- [6] 田树革,魏玉龙,刘宏炳,等.Folin-Ciocalteu 比色法测定石榴不同部位总多酚的含量[J].光谱实验室,2009,26(2):341-343.
- [7] 刘硕谦,刘仲华,黄建安.紫外分光光度法检测水皂角总多酚的含量[J].食品工业科技,2003,(6):76-77.
- [8] Qinghong You, Xiulian Yin, Shengnan Zhang, et al. Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 99(2):1-10.
- [9] Guanghua Mao, Ye Zou, Weiwei Feng, et al. Extraction, preliminary characterization and antioxidant activity of Se-enriched Maitake polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101(3):213-219.
- [10] 欧贤红,叶勇,黄秋洁,等.藤茶抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(2):245-248.
- [11] 张清安,范学辉,张志琪,等.沙苑子酚类提取物的抗氧化能力研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(7):955-958.
- [12] 阿孜古丽·依明,艾尼瓦尔·艾克木,宋凤凤.药蜀葵种子挥发油的提取与分离鉴定[J].新疆医科大学学报,2013,36(9):1275-1277.
- [13] 孙国栋,李新霞,李琳琳,等.胡芦巴提取物化学成分含量测定及体外抗氧化研究[J].新疆医科大学学报,2013,36(6):772-776.
- [14] 米娜瓦尔·哈帕尔,艾尼瓦尔·吾买尔,阿孜古丽·吐尔逊,等.维药罗勒提取物中总黄酮含量及其抗氧化活性研究[J].新疆医科大学学报,2012,35(6):736-739.
- (收稿日期:2013-11-20)
(本文编辑:董历华)

HPLC 法测定藏药巴桑母酥油颗粒中没食子酸的含量

赖先荣 何新友

【摘要】 目的 建立藏药巴桑母酥油颗粒中没食子酸的含量测定方法。**方法** 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定巴桑母酥油颗粒中没食子酸的含量,色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶柱 Welch Materials,流动相为乙腈—0.1%磷酸水溶液(3:97),流速为1.0 ml/min;柱温为30℃,检测波长为215 nm,外标一点法定量。**结果** 没食子酸在0.2~1.6 μg范围内,与峰面积积分值线性关系良好($n=6$)。该方法的平均回收率为98.34%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.62%($n=9$)。四批样品的含量分别是0.3224 mg/g、0.3354 mg/g、0.3288 mg/g、0.3269 mg/g。**结论** 高效液相色谱法准确、简便、快速,适合于该制剂的质量控制。

【关键词】 藏药; 巴桑母酥油颗粒; 没食子酸; 高效液相色谱法; 含量测定

【中图分类号】 R29 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.02.008

Content determination of gallic acid in Tibetan medicine Basangmu butter granules by HPLC

LAI Xian-rong, HE Xin-you. Ethnomedicine College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Corresponding author: LAI Xian-rong, E-mail: laixianrong@163.net

【Abstract】 Objective To establish a content determination method of gallic acid in Tibetan medicine Basangmu butter granules. **Methods** The content of gallic acid in Basangmu butter granules was de-

基金项目:四川省高校科研创新团队建设计划(11TD004);成都中医药大学藏药学特色专业建设项目(2012-特色-5);成都中医药大学藏药学专业综合改革项目(2012-专业-13);西藏藏医学院藏药有限公司资助项目

作者单位:611137 成都中医药大学民族医药学院

作者简介:赖先荣(1971-),本科,副研究员。研究方向:中药及民族药创新药物的研究与开发。E-mail: laixianrong@163.net

terminated by high performance liquid chromatography (HPLC), the chromatographic column was Welch Materials C18, the mobile phase was acetonitrile and 0.1% phosphoric acid water solution at rate 3:97, the flow rate was set as 1.0 ml/min, column temperature was set as 30 °C, detection wavelength was set as 215 nm, used external standard method. **Results** The gallic acid concentration had a good linear relation with peak area integral quantity in the range of 0.2 ~ 1.6 μg ($n=6$), the average recovery rate was 98.34%, and relative standard deviation(RSD) was 1.62% ($n=9$). Four batches content were 0.3224 mg/g, 0.3354 mg/g, 0.3288 mg/g and 0.3269 mg/g respectively. **Conclusion** The method had showed high accuracy, reliability and reproducibility, so it can be used in the quality control of the preparation.

【Key words】 Tibetan medicine; Basangmu butter granules; Gallic acid; High performance liquid chromatography; Content determination

巴桑母酥油丸是藏医常用的滋补经验方,具有壮阳益肾,养心安神,强筋骨的功能,用于心悸失眠、脾胃不和、老年虚弱、经络不利、肢体僵直、肾虚、阳痿不举、虚损不足症,由诃子、毛诃子、余甘子、黄精、天冬、西藏梭子芹、蒺藜、喜马拉雅紫茉莉八种藏药及酥油、牛奶、白糖、炼蜜等藏医特色辅料制成,其质量标准项下仅有处方、制法、性状、检查、功能与主治、用法与用量、规格等质量控制项目^[1],缺乏含量测定项目。巴桑母酥油颗粒是其改变剂型品种,提高了成品对温度的耐候性,其处方剂量与原剂型巴桑母酥油丸一致。

巴桑母酥油颗粒处方中诃子、毛诃子、余甘子用量占总处方量的三分之一以上,其主要指标成分为没食子酸^[2]。没食子酸具有较强的抗肿瘤和抗氧化等作用^[3],其含量测定方法主要采用高效液相色谱法^[2]。本文采用高效液相色谱法,具有快速、灵敏、重现性好等特点,同时采用自动进样器可以减少人为因素影响,其重复性、精密度良好,测定结果可信。

1 仪器与试药

1.1 仪器

岛津 LC-2010A HT 高效液相色谱仪(四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、智能化柱温箱、紫外检测器);岛津 LC Solution 色谱工作站;BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司);Q-250 型超声波清洗器(上海必能信仪器制造有限公司);Lambda 35 UV/Vis Spectrometer(美国 Perkin Elmer 公司)。

1.2 试药

甲醇(分析纯,成都科龙化学试剂公司)、石油醚(60~90℃)(分析纯,成都科龙化学试剂公司)、乙腈(色谱纯, Fisher Scientific)、磷酸(85%,分析纯,成都科龙化学试剂公司)、水为去离子水,其它

试剂均为分析纯。

没食子酸(含量测定用,由中国药品生物制品检定所提供,批号:110831-200302)。

1.3 样品来源

巴桑母酥油颗粒(批号 20110201、20110301、20110302、20110303,由成都中医药大学民族医药学院提供,规格为每袋装 25 g)。

诃子、毛诃子、余甘子用量占总处方量的三分之一以上,其主要指标成分为没食子酸^[2]。按巴桑母酥油颗粒的处方比例及制备工艺,制成缺诃子、毛诃子、余甘子的阴性样品制剂。

2 试验方法与结果

2.1 色谱条件

采用十八烷基硅烷键合硅胶柱 Welch Materials (钻石)(4.6 mm × 250 mm, 5 μm , 柱号 Wel518425)。流动相为乙腈—0.1% 磷酸水溶液(3:97);流速 1.0 ml/min;柱温:30℃;检测波长 215 nm。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸对照品适量,置 10 ml 量瓶中,加甲醇使溶解,并稀释至刻度,摇匀,作为没食子酸对照品溶液贮备液(2 mg/ml)。精密吸取上述没食子酸对照品贮备液 2.5 ml,置 25 ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为没食子酸对照品溶液(0.2 mg/ml)。

2.3 供试品溶液的制备

取装量差异项下的样品适量,研细,取 10 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入石油醚(60~90℃) 100 ml,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)30 分钟,放冷,滤过,弃去石油醚液,残渣水浴挥干溶剂,连同滤纸移入锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 ml,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 33 kHz)1 小时,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足

减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 系统适用性

按 2.1 项色谱条件测定,对照品溶液与供试品溶液在相同的保留时间处有相同的色谱峰,供试品溶液有效峰与杂峰能很好分离,分离度大于 1.5,拖尾因子不超过 1.05,阴性对照液与对照品溶液及供试品溶液在相同的保留时间处无相应的色谱峰,见图 1-4。

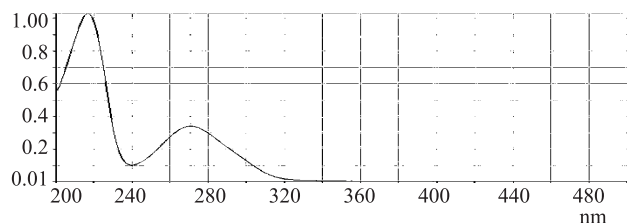


图 1 没食子酸对照品紫外光谱扫描图

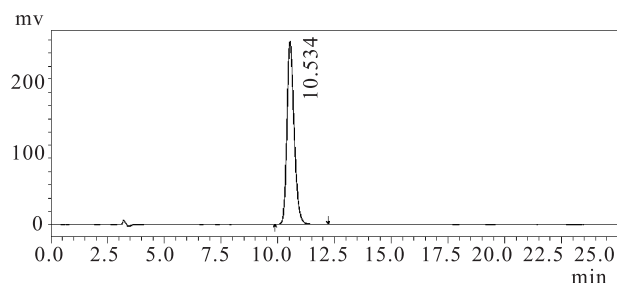


图 2 没食子酸对照品 HPLC 色谱图

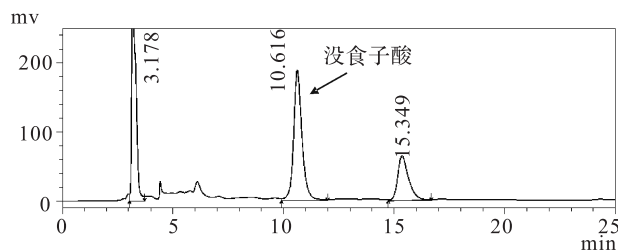


图 3 巴桑母酥油颗粒 HPLC 色谱图

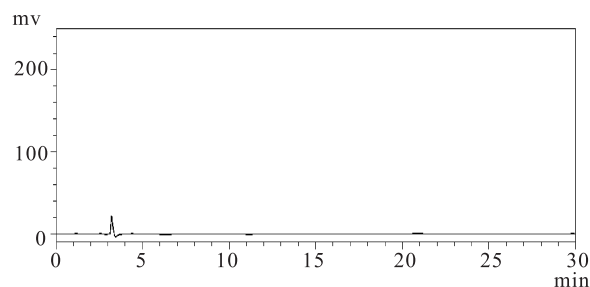


图 4 巴桑母酥油颗粒阴性样品 HPLC 色谱图

2.5 线性关系考察

分别精密吸取上述对照品溶液 1.0 μ l、2.0 μ l、4.0 μ l、5.0 μ l、6.0 μ l、8.0 μ l 注入色谱仪,测定峰面积积分值,以峰面积 (Y) 为纵坐标,对照品的量

(μ g) (X) 为横坐标进行线性回归,得没食子酸回归方程 $Y = 7664116 X (r = 0.9999)$ 。结果表明没食子酸对照品的量在 0.2 ~ 1.6 μ g 在范围内的线性关系良好。

2.6 精密度试验

精密吸取对照品溶液 (0.2 mg/ml) 5 μ l, 重复进样 6 次, 测定峰面积积分值。结果表明相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 0.61% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

因没食子酸见光易发生变化, 要求避光保存^[3], 故考察对照品溶液、供试品溶液在阴暗处室温密闭放置的稳定性。

取对照品溶液 (0.2 mg/ml), 置阴暗处室温密闭放置, 在 12 小时内的不同时间间隔取出测定其峰面积积分值。结果 RSD 为 0.98% ($n = 6$), 表明在 12 小时内对照品溶液稳定性良好。

取供试品溶液 (批号 20110201), 置阴暗处室温密闭放置, 在 12 小时内的不同时间间隔取出测定其峰面积积分值。结果 RSD 为 1.10% ($n = 6$), 表明在 12 小时内供试品溶液稳定性良好。

2.8 重复性试验

取本品 (批号 20110201), 按 2.3 项相同方法分别制备 6 份供试品溶液, 测定没食子酸含量, 结果平均含量为 0.3224 mg/g, RSD 为 1.56%。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品 (批号 20110201) 约 5.0 g, 各精密加入没食子酸 (0.2 mg/ml) 对照品溶液 8.0 ml, 挥干溶剂, 按 3.3 项相同方法分别制备 9 份供试品溶液, 测定没食子酸含量, 计算回收率, 平均回收率为 98.34%, RSD 为 1.62% ($n = 9$)。结果见表 1。

2.10 阴性样品测定

取巴桑母酥油颗粒的阴性样品 (不含诃子、毛诃子、余甘子), 按 2.3 项相同方法制备阴性样品供试品溶液, 依法测定, 在没食子酸对照品相应的位置上, 未见到相应的色谱峰。结果表明: 巴桑母酥油颗粒中其他药味及辅料不影响没食子酸的测定结果。

2.11 样品测定

取本品 4 批, 按 2.3 项相同方法分别制备供试品溶液, 测定没食子酸含量, 含量分别是 0.3224 mg/g、0.3354 mg/g、0.3288 mg/g、0.3269 mg/g ($n = 2$)。

表 1 回收率试验结果($n=9$)

序号	样品量 (g)	含没食子酸量 (mg)	加入没食子酸量 (mg)	测得没食子酸量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	5.0058	1.6139	1.6	3.2087	99.68	98.34	1.62
2	5.0065	1.6141	1.6	3.1654	96.96		
3	5.0087	1.6148	1.6	3.1886	98.36		
4	5.0063	1.6140	1.6	3.1612	96.70		
5	5.0039	1.6133	1.6	3.1651	96.99		
6	5.0078	1.6145	1.6	3.2360	101.34		
7	5.0058	1.6139	1.6	3.2087	99.68		
8	5.0065	1.6141	1.6	3.1654	96.96		
9	5.0087	1.6148	1.6	3.1886	98.36		

3 讨论

由于巴桑母酥油颗粒以酥油作为藏医特色辅料(约 30%),酥油熔点为 34℃且降低色谱柱的理论塔板数,根据没食子酸极性较大的性质并参考文献^[4-5],首先采用石油醚对样品进行脱脂处理,再用 70% 甲醇超声提取,没食子酸出峰时间适宜、峰形对称性良好、加样回收率符合要求,结果达到很好的效果。

文献报道没食子酸的含量测定采用甲醇—磷酸溶液^[6]和甲醇—十六烷基三甲基溴化胺-N,N 二甲基甲酰胺—磷酸溶液^[7]作为流动相,但实验中采用甲醇—磷酸溶液作为流动相时,理论塔板数偏低,没食子酸峰形差,且保留时间过长;而采用乙腈—磷酸溶液作为流动相时,理论塔板数达 5000 以上,没食子酸出峰时间适宜、峰形对称、尖锐,分离度较好。

没食子酸对照品甲醇溶液在 200~500 nm 波长范围内,测得其在 215 nm、272 nm 处均有吸收峰、在 215 nm 有最大吸收峰,比较相同色谱条件下样品于 215 nm 和 272 nm 波长下的色谱图:检测波长为 215 nm 的色谱图没食子酸峰可以与其它峰达到良好的基线分离,且重现性好,阴性无干扰,峰形良好;在 272 nm 的检测波长下,供试品溶液的没食子酸色谱峰分离度不能达到要求(色谱峰前沿有干扰小峰出现,说明有干扰物质在 275 nm 处吸收值较

高、在 215 nm 处吸收值较低),峰形较差,因此选择 215 nm 作为检测波长。

本试验建立的 HPLC 法测定巴桑母酥油颗粒中没食子酸的含量,色谱峰之间能有效分离,精密度、重复性及线性关系好,回收率数值符合规定,故认为该方法简便易行、稳定可靠,可提高巴桑母酥油颗粒的质量控制水平。

参 考 文 献

- [1] 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药典委员会,1995:297.
- [2] 郑海杰,耿志鹏,冯冠榕,等.高效液相色谱法测定藏药多血康中没食子酸的含量[J].中国科技论文在线,2009,2(11):1163-1166.
- [3] 柯发敏,张开莲.没食子酸的研究进展[J].泸州医学院学报,2011,34(4):440-442.
- [4] 孙文基,谢世昌.天然药物成分定量分析[M].北京:中国医药科技出版社,2002:175.
- [5] 刘东辉,古星妙,袁冬生,等. HPLC 法测定宫炎平分散片中没食子酸的含量[J].中药新药与临床药理,2006,17(14):277-279.
- [6] 刘舜慧,吴春敏.反相高效液相色谱法测定青果颗粒中没食子酸的含量[J].海峡药学,2008,20(1):30-32.
- [7] 邓科君,张艺,王平,等.反相高效液相色谱法同时测定藏药广枣中没食子酸和原儿茶酸的含量[J].色谱,2006,24(6):652-653.

(收稿日期:2013-11-20)

(本文编辑:董历华)