

HPLC法同时测定西河蜜膏中没食子酸和鞣花酸的含量^Δ

李建梅^{1*},买买提·霍吉²,希尔艾力·吐尔逊^{1#}(1.新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所维吾尔医方剂学重点实验室,乌鲁木齐 830049;2.新疆维吾尔自治区哈密地区维吾尔医医院,新疆哈密 839000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2546-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.33

摘要 目的:建立同时测定西河蜜膏中没食子酸和鞣花酸含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为X-Bridge C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:没食子酸和鞣花酸的检测进样量线性范围分别为0.132~0.792、0.108 0~0.648 2 μg(*r*均为0.999 9);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为95.15%~99.69%(RSD=1.64%,*n*=9)、97.24%~100.43%(RSD=1.24%,*n*=9)。结论:该方法操作简单、结果准确、灵敏度高,可用于西河蜜膏中没食子酸和鞣花酸的含量测定。

关键词 西河蜜膏;没食子酸;鞣花酸;高效液相色谱法

Simultaneous Determination of Gallic Acid and Ellagic Acid in Xihe Majun Ointment by HPLC

LI Jianmei¹, Mamat HOJA², Xirali TURSUN¹ (1. Xinjiang Uyghur Autonomous Region Key Laboratory of Traditional Uyghur Medicine Prescription of Institute of Xinjiang Traditional Uyghur Medicine, Urumqi 830049, China; 2. Xinjiang Uyghur Autonomous Region Kumul Prefecture, Uygur Medicine Hospital, Xinjiang Hami 839000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of gallic acid and ellagic acid in Xihe majun ointment. METHODS: HPLC method was performed on the column of X-Bridge C₁₈ with mobile phase of methanol-acetonitrile-0.2% Phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 254 nm, detection temperature was 30 ℃, and injection volume was 10 μl. RESULTS: The linear range was 0.132-0.792 μg for gallic acid (*r*=0.999 9) and 0.108 0-0.648 2 μg for ellagic acid (*r*=0.999 9); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recoveries were 95.15%-99.69% (RSD=1.64%, *n*=9) and 97.24%-100.43% (RSD=1.24%, *n*=9). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and sensitive, and can be used for the content determination of gallic acid and ellagic acid in Xihe majun ointment.

KEYWORDS Xihe majun ointment; Gallic acid; Ellagic acid; HPLC

维吾尔药西河蜜膏是维吾尔医药独有的一种剂型,其在预防与保健,疾病的治疗中应用范围较广,具有制备工艺简便、口感好、对慢性疾病的疗效好等特点。西河蜜膏是由毛诃子、诃子肉、西青果等3味诃子类药材组成的复方制剂,其3味药材的主要活性成分均为没食子酸和鞣花酸。该制剂由《中华人民共和国卫生部药品标准-维吾尔药分册》(1998年版)所载的清凉埃提勒非力开西尼孜颗粒改动而来,原制剂具有清理血热、止痛安神之功效,常用于治疗各种异常胆液质性头痛、热性心悸、恶心、目花、耳鸣等证^[1]。本研究根据原制剂处方与课题设计初衷^[2-3],对其剂型进行修饰后,采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定西河蜜膏中没食子酸和鞣花酸的含量,为西河蜜膏的质量控制提供定量依据,亦为后续开发维吾尔药蜜膏复方新药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695型HPLC仪,包括2489型紫外检测器、Empower 3色谱工作站(美国Waters公司);RS-232型十万分之一电子天平

Δ基金项目:新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(No.KY2012112)

* 助理研究员,硕士。研究方向:药物制剂与分析。电话:0991-2565093。E-mail:hello0125@sohu.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:维药传统制剂。E-mail:xirlion@126.com

(上海恒平科学仪器有限公司);SGT7200HBT型超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司,功率:200 W,频率:50 kHz);RUPT-10-W型超纯水机(滕州新瑞分析仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

西河蜜膏(由新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所药剂研究室提供,编号:S1);蜂蜜(购自新疆奇台县,编号:S2)为当年向日葵蜜;没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110831-200302,纯度>99.9%);鞣花酸对照品(北京世纪奥科生物技术有限公司,批号:476-66-4,纯度>99.9%);甲醇、乙腈为色谱纯,磷酸、乙酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[4-6]

色谱柱: X-Bridge C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇(A)-乙腈(B)-0.2%磷酸水溶液(C),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %	C, %
0	4	0	96
15	5	0	95
18	31	8	61
35	32	10	58

2.2 溶液的准备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取没食子酸对照品和鞣花酸对照品各适量,分别置于25 ml棕色量瓶中,加甲醇制成每1 ml溶液中含没食子酸0.132 mg、鞣花酸0.108 mg的单一对照品贮备液。分别精密吸取上述单一没食子酸和鞣花酸对照品贮备液各2.5 ml,分别置于10 ml棕色量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成每1 ml溶液中含没食子酸33 μg、鞣花酸27 μg的单一对照品溶液。分别精密量取上述单一对照品溶液各1.0 ml,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成每1 ml溶液中含没食子酸13.2 μg、鞣花酸10.8 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液^[7-8] 取样品约3.0 g,精密称定,置于研钵中,加入3.0 g硅藻土研磨均匀,置于50 ml棕色量瓶中,加50%甲醇20 ml,超声处理30 min,加50%甲醇定容,摇匀,滤过;精密量取续滤液2 ml,置于10 ml棕色量瓶中,加50%甲醇定容,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取蜂蜜1.5 g,精密称定,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,各成分均能达到基线分离,分离度>1.6,理论板数以没食子酸和鞣花酸峰计均>4 000,保留时间分别为12.159、29.932 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

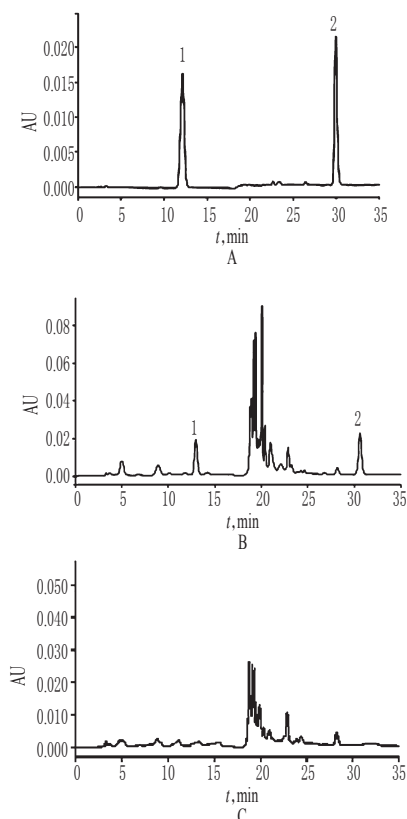


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.没食子酸;2.鞣花酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test samples; C.negative reference substance; 1.gallic acid; 2.ellagic acid

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下单一没食子酸和鞣花酸对照品溶液各4.0、8.0、12.0、16.0、20.0、24.0 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表2。

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	线性范围, μg	r
没食子酸	$y=2\ 805\ 472.94x-2\ 591.67$	0.132~0.792	0.999 9
鞣花酸	$y=3\ 223\ 676.19x-30\ 869.27$	0.108 0~0.648 2	0.999 9

2.5 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,等倍逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为3:1时,得检测限(LOD);当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ),结果见表3。

表3 检测限与定量限考察结果

Tab 3 Results of detection limits and quantification limits

待测成分	LOD, ng	LOQ, ng
没食子酸	8.16	25.81
鞣花酸	9.92	28.25

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液15 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,没食子酸和鞣花酸峰面积的RSD分别为0.21%、1.82%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(编号:S1)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸和鞣花酸峰面积的RSD分别为0.87%、2.51%(n=6),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(编号:S1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸和鞣花酸峰面积的RSD分别为0.71%、2.37%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取样品(编号:S1)共9份,每份约0.06 g,精密称定,加入0.06 g硅藻土于研钵中研磨均匀,置于同一10 ml量瓶中,分成3组,每组3份。每组分别加入“2.2.1”项下单一没食子酸的对照品溶液1.0、1.6、2.2 ml,单一鞣花酸对照品溶液1.0、1.5、2.0 ml,再加50%甲醇5 ml,超声处理30 min,加50%甲醇定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,按“2.2.2”项下方法制备低、中、高不同浓度的供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

2.10 样品含量测定

取样品(编号:S1)约3.0 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件对室温(25 ℃)和40 ℃方式放置的样品进样测定,记录峰面积并计算各成分的

含量,结果见表5。

表4 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 4 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	称样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
没食子酸	0.061	222.65	152.00	372.50	98.58	97.22	1.64			
	0.063	229.95	152.00	378.04	97.43					
	0.064	233.60	152.00	378.69	95.46					
	0.062	226.30	243.20	463.86	97.68					
	0.064	233.60	243.20	471.79	97.94					
	0.065	237.25	243.20	468.66	95.15					
	0.066	240.90	334.40	559.32	95.22					
	0.063	229.95	334.40	563.31	99.69					
	0.062	226.30	334.40	553.41	97.82					
	鞣花酸	0.061	123.22	116.00	236.02			97.24	99.04	1.24
		0.063	127.26	116.00	243.28			100.02		
		0.064	129.28	116.00	244.16			99.03		
0.062		125.24	174.00	297.07	98.75					
0.064		129.28	174.00	303.88	100.34					
0.065		131.30	174.00	306.04	100.43					
0.066		133.32	230.00	357.08	97.29					
0.063		127.26	230.00	356.90	99.85					
0.062		125.24	230.00	351.52	98.38					

表5 样品含量测定结果(n=3, mg/g)

Tab 5 Results of contents determination of samples(n=3, mg/g)

放置时间, 天	室温(25℃)含量, mg/g				40℃含量, mg/g			
	没食子酸	$\bar{x} \pm s$	鞣花酸	$\bar{x} \pm s$	没食子酸	$\bar{x} \pm s$	鞣花酸	$\bar{x} \pm s$
0	2.61		2.32		7.61		1.26	
10	4.18		2.59		6.65		2.92	
20	4.65	5.01 ± 1.51	2.04	2.65 ± 0.67	7.56	8.23 ± 1.11	2.38	2.19 ± 0.54
30	5.77		2.02		8.95		2.13	
45	6.02		3.24		9.20		2.11	
60	6.81		3.67		9.41		2.33	

3 讨论

3.1 检测波长的选择

笔者曾取“2.2.1”项下单一没食子酸和鞣花酸对照品溶液各适量,分别进行全波长扫描,发现没食子酸和鞣花酸分别在254、270 nm波长处有最大吸收,但在270 nm处没食子酸吸收相对较小。为了在相同条件下同时对两个成分进行检测,缩小样品中两个成分峰面积的差别,提高检测灵敏度,因此最终选择254 nm作为本试验的检测波长。

3.2 流动相的选择

色谱条件优化时,参考相关文献^[4-6],对甲醇-0.2%乙酸、甲醇-0.2%磷酸、乙腈-0.2%磷酸、甲醇-乙腈-0.2%磷酸溶液等流动相以不同种类、不同比例进行比较。结果,甲醇-乙腈-0.2%磷酸溶液在梯度洗脱时,没食子酸和鞣花酸峰的峰形均最好、分离度最高,故选择甲醇-乙腈-0.2%磷酸溶液为本试验的流动相。

3.3 提取方法的选择

由于蜜膏黏性太大,不易研细,加入硅藻土可使其松散,便于取样和提取且不影响样品含量,故本试验在样品取样后与硅藻土混合。根据文献结果选择甲醇作为提取溶剂^[7-12],分

别考察了以不同体积分数甲醇(20%、50%、100%)以及不同提取方式(超声和回流提取),在不同提取时间内进行考察。结果表明,以50%甲醇超声提取30 min即可提取完全,供试品中两个成分均可达到较好的分离效果和提取率。

3.4 含量测定结果分析

由于维吾尔医师在临床中常将西河蜜膏放置40 d或者更长时间后使用,故根据本课题研究设计初衷,对放置不同条件和时间的样品含量进行考察。结果发现,西河蜜膏放置60 d内,与室温条件放置样品比较,40℃条件下样品中没食子酸含量增加了近50%,鞣花酸含量则变化不大。没食子酸含量变化的原因可能与西河蜜膏中含有蜂蜜有关,蜂蜜中的水分和其他成分与制剂中的其他药材在放置时间内相互作用,使没食子酸含量发生变化。

综上所述,本方法操作简单、结果准确、灵敏度高,可用于西河蜜膏中没食子酸和鞣花酸的含量测定。

参考文献

- [1] 卫生部.中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册[S].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:190.
- [2] 吴秀芝,袁芳.表没食子儿茶素没食子酸酯联合多柔比星对肺癌A549细胞增殖与荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用[J].中国药房,2015,26(10):1353.
- [3] 王舒.药用植物毛诃子研究进展[J].安徽农业科学,2015,43(5):65.
- [4] 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.
- [5] 严劲松.反相高效液相色谱法测定不同产地西青果中没食子酸的含量[J].国际中医中药杂志,2013,35(2):140.
- [6] 杨艳,周健,陈晓,等.圆果化香树中没食子酸的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(13):107.
- [7] 希尔艾力·吐尔逊,曼尔丹·尼牙孜,库尔班尼沙·买提卡思木,等.阿米乐努西达日蜜膏中没食子酸的含量测定[J].医药导报,2012,31(3):350.
- [8] 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.
- [9] 常安,王巍,张婷婷,等.HPLC测定诃子全果、果肉及果核中没食子酸的含量[J].广州化工,2014,42(7):93.
- [10] 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.
- [11] 郭建民,王建科,李玮,等.不同产地余甘子中没食子酸与槲皮素含量的测定[J].贵州农业科学,2013,41(5):61.
- [12] 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.

(收稿日期:2015-07-30 修回日期:2016-03-31)

(编辑:刘柳)