

藏药石榴莲花散中鞣花酸和胡椒碱含量测定方法研究

才让草¹, 潘遐^{2*}, 李魁¹, 才让三知³, 高晓昱², 张骞⁴ (1. 甘南藏族自治州药品检验检测中心, 甘南 747000; 2. 定西市药品检验检测中心, 定西 743000; 3. 甘南藏族自治州藏医医院, 甘南 747000; 4. 甘南藏族自治州食品检验检测中心, 甘南 747000)

摘要 目的: 建立藏药石榴莲花散中鞣花酸和胡椒碱含量测定方法, 以完善其质量标准。方法: 采用高效液相色谱法测定制剂中石榴子和诃子的鞣花酸含量, 采用ODS-2 HYPERSIL C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸(15:85)为流动相, 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长254 nm, 柱温30 ℃; 采用高效液相色谱法测定制剂中华菱的胡椒碱含量, 采用ODS-2 HYPERSIL C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(40:60)为流动相, 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长343 nm, 柱温30 ℃。结果: 鞣花酸进样量在5.065~25.325 μg范围内呈良好线性关系($r=0.9999$), 平均回收率为97.5%, RSD=1.5% ($n=6$); 胡椒碱进样量在10.414~52.071 μg范围内呈良好线性关系($r=1.0000$), 平均回收率为99.6%, RSD=0.6% ($n=6$)。结论: 该方法可准确测定石榴莲花散中鞣花酸和胡椒碱的含量, 有助于提高石榴莲花散的质量标准。

关键词: 藏药; 石榴莲花散; 鞣花酸; 胡椒碱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)02-0215-07
doi:10.16153/j.1002-7777.2020.02.010

On Content Determination of Ellagic Acid and Piperine in Tibetan Medicine Pomegranate Lotus Powder

Cairang Cao¹, Pan Xia^{2*}, Li Kui¹, Cairang Sanzhi³, Gao Xiaoyu², Zhang Qian⁴ (1. Gannan Drug Inspection and Testing Center of Tibetan Autonomous Prefecture, Gannan 747000, China; 2. Dingxi Drug Inspection and Testing Center, Dingxi 743000, China; 3. Gannan Hospital of Tibetan Medicine, Tibetan Autonomous Prefecture, Gannan 747000, China; 4. Gannan Food Inspection and Testing Center of Tibetan Autonomous Prefecture, Gannan 747000, China)

Abstract Objective: To establish a method for the content determination of ellagic acid and piperine in pomegranate lotus powder, a Tibetan medicine, in order to improve its quality standard. **Methods:** The content of ellagic acid in pomegranates and chebula was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The column was ODS-2 HYPERSIL C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid (15:85), the detection wavelength was 254 nm, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was 30 ℃. HPLC was used to determine piperine of long pepper in the preparation. The column was ODS-2 HYPERSIL C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (40:60), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 343 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Results:** There was a good linear relationship ($r=0.9999$) between 5.065 and 25.325 μg for

基金项目: 甘肃省食品药品监督管理局科研项目(编号2018GSFDA029)

作者简介: 才让草, 本科, 副主任藏药师, 主要从事中藏药检验及质量标准研究; E-mail: 709784715@qq.com

通信作者: 潘遐, 本科, 主管药师, 主要从事中成药、中药材检测分析; E-mail: 107271403@qq.com

ellagic acid, and the average recovery was 97.5% with RSD of 1.5% ($n=6$). There was a good linear relationship ($r=1.0000$) between 10.414 and 52.071 μg for piperine, with an average recovery of 99.6% and RSD of 0.6% ($n=6$).

Conclusion: This method could accurately determine the content of ellagic acid and piperine in pomegranate lotus powder, which was helpful to improve the quality standard of pomegranate lotus powder.

Keywords: Tibetan medicine; pomegranate lotus powder; ellagic acid; piperine

民族医药学是我国传统医药的重要组成部分,藏医药是我国医药宝库中的瑰宝之一,在藏族人民的防病治病中发挥了重要作用,以其独特的疗效越来越被大家关注。石榴莲花散由石榴子、肉桂、豆蔻、荜茇、波棱瓜子、黑冰片(炭)、诃子、蔷薇花8味中藏药材组成;功能主治为温中健胃、消食,用于“培根甲布”病、积食不化、“赤巴”病、“木布”病、胃肠传染病等^[1]。石榴子为石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥成熟种子,藏医药临床常用石榴子入药。《晶珠本草》^[2]记载“石榴子塞珠味酸,甘,性润,治胃病,提升胃温,治培根寒症”;肉桂,温经通脉;荜茇,温中散寒,下气止痛;诃子,涩肠止泻,敛肺止咳,降火利咽。藏成药石榴莲花散现行质量标准收载于《卫生部药品标准(藏药第一册)》(1995年版)^[3],但该标准只有【性状】和【检查】项,缺乏【鉴别】【含量测定】项目,不能有效地控制各组成成分的质量,从而不能有效地控制藏药制剂石榴莲花散的质量。本研究采用高效液相色谱法对制剂中石榴子和诃子中鞣花酸进行含量测定^[4-5],并对制剂中荜茇的胡椒碱进行含量测定^[6-7],从而更加有效地控制藏成药石榴莲花散的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(岛津公司)包括 LC-20AT 四元泵,SPD-20A 检测器,LC-20A HPLC 系统化学工作站;十万分之一电子天平(CP-225D 型,上海沪粤明科学仪器有限公司);万分之一电子天平(EL204-IC 型,上海沪粤明科学仪器有限公司);H-250DB 型超声波清洗器(45 kHz, 500 W, 昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

石榴子对照药材(批号 121431-201002)、诃子对照药材(批号 121015-201605)、鞣花酸对照品(批号 11959-201602,纯度 98%)、胡椒碱对照品(批号 110775-201706,纯度 98.9%)均购自

中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇为色谱纯(默克公司);水为屈臣氏蒸馏水;其他所用试剂为分析纯。

石榴莲花散样品(来源:甘南藏族自治州藏医药研究院4批 S1, S2, S3, S4;甘肃省夏河县藏医院3批 S5, S6, S7;甘肃省碌曲县西仓寺院藏医院3批 S8, S9, S10)。

2 方法与结果

2.1 鞣花酸的含量测定

2.1.1 色谱条件

采用 ODS-2 HYPERSIL-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.2%磷酸(15:85)为流动相,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长:254 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 10 μL 。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取鞣花酸对照品适量,加甲醇制成 253.2548 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,作为对照品储备液。精密吸取对照品储备液 2 mL,置 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备

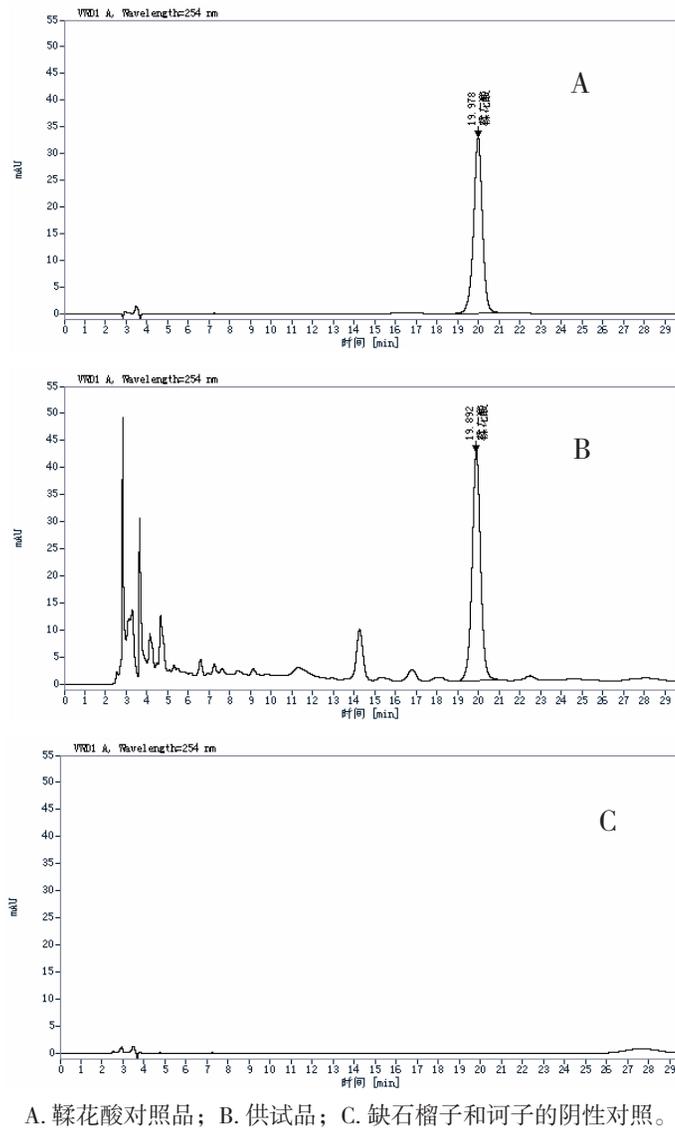
称取供试品 1.0 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称量,超声处理 40 min,放冷,用甲醇补足减失的量,滤过,取续滤液 2 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,取续滤液,即得。

2.1.4 阴性对照溶液的制备

按本品处方及制备工艺制得缺石榴子和诃子的阴性样品,照“2.1.3”节下方法制得缺石榴子和诃子的阴性对照溶液。

2.1.5 阴性干扰试验

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各 10 μL ,注入液相色谱仪。结果表明,供试品色谱中在与对照品色谱相应位置有色谱峰,而阴性对照色谱中在与对照品色谱相应位置上则未检测到峰,表明其他成分对测定结果无干扰,见图 1。



A. 鞣花酸对照品; B. 供试品; C. 缺石榴子和诃子的阴性对照。

图1 石榴莲花散及鞣花酸对照品HPLC图

2.1.6 线性关系考察

精密吸取“2.1.2”节下对照品储备液1、2、3、5 mL，分别置于50 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，精密吸取10 μL注入色谱仪，在“2.1.1”节色谱条件下测定。以峰面积为纵坐标 (Y)，质量浓度为横坐标 (X)，得到回归方程： $Y=108.45X-118.17$ ($r=0.9999$)，结果表明鞣花酸进样量在5.065 ~ 25.325 μg范围内呈良好线性关系^[8]。

2.1.7 精密度试验

精密吸取对照品溶液10 μL注入色谱仪，按“2.1.1”节色谱条件下连续进样6次，测定鞣花酸峰面积，计算其RSD=0.38% ($n=6$)，表明该测定

方法精密度良好。

2.1.8 稳定性试验

取供试品溶液 (样品S2)，分别在0、2、4、6、8、12、24 h测定其鞣花酸含量。结果7次测定鞣花酸平均质量分数为0.3130%，RSD=1.29% ($n=7$)。结果表明，样品溶液在24 h内稳定^[8]。

2.1.9 重复性试验

取同一批样品 (样品S2) 6份，分别按“2.1.3”节下方法制备供试品溶液，按含量测定方法测定鞣花酸含量。结果6份样品中鞣花酸平均质量分数为0.290%，RSD=1.28% ($n=6$)。结果表明，该测定方法重复性良好。

2.1.10 回收率试验

取已知鞣花酸含量的同一批样品适量(样品S2),精密称定,平行6份,分别精密加入鞣花酸对照品储备溶液($253.2548 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 5 mL,按“2.1.3”节下方法制备供试溶液,精密吸取 $10 \mu\text{L}$

注入色谱仪,在“2.1.1”节色谱条件下测定,计算加样回收率,结果见表1。试验结果表明该含量测定方法的加样回收率符合要求。

表1 石榴莲花散中鞣花酸回收试验结果

取样量 /mg	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
401.0	1.297	1.266	2.435	95.01		
407.2	1.317	1.266	2.459	95.20		
404.7	1.309	1.266	2.482	96.39	95.7	1.5
406.7	1.316	1.266	2.519	97.56		
404.5	1.309	1.266	2.479	96.27		
401.5	1.299	1.266	2.407	93.84		

2.1.11 样品含量测定

取10批石榴莲花散样品,分别按“2.1.3”节下方法制备供试品溶液。精密吸取上述供试品溶

液及鞣花酸对照品溶液各 $10 \mu\text{L}$ 注入色谱仪,在“2.1.1”节色谱条件下测定鞣花酸的质量分数,结果见表2。

表2 10批石榴莲花散样品中鞣花酸、胡椒碱含量测定结果

样品编号	鞣花酸 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	胡椒碱 / ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
S1	2.968	1.192
S2	3.022	1.200
S3	2.970	1.195
S4	2.981	1.197
S5	1.429	0.621
S6	1.416	0.619
S7	1.439	0.610
S8	2.680	1.572
S9	2.668	1.560
S10	2.673	1.573

2.2 胡椒碱的含量测定

2.2.1 色谱条件

采用ODS-2 HYPERSIL-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-水(40:60)为流动相, 流速1.0 mL · min⁻¹, 检测波长343 nm, 进样量10 μL, 柱温30 °C。

2.2.2 对照品溶液的制备

精密称取胡椒碱对照品适量置棕色量瓶中, 加甲醇制成 104.1417 μg · mL⁻¹的溶液, 作为对照品储备液。再精密吸取对照品储备液2 mL, 置10 mL棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备

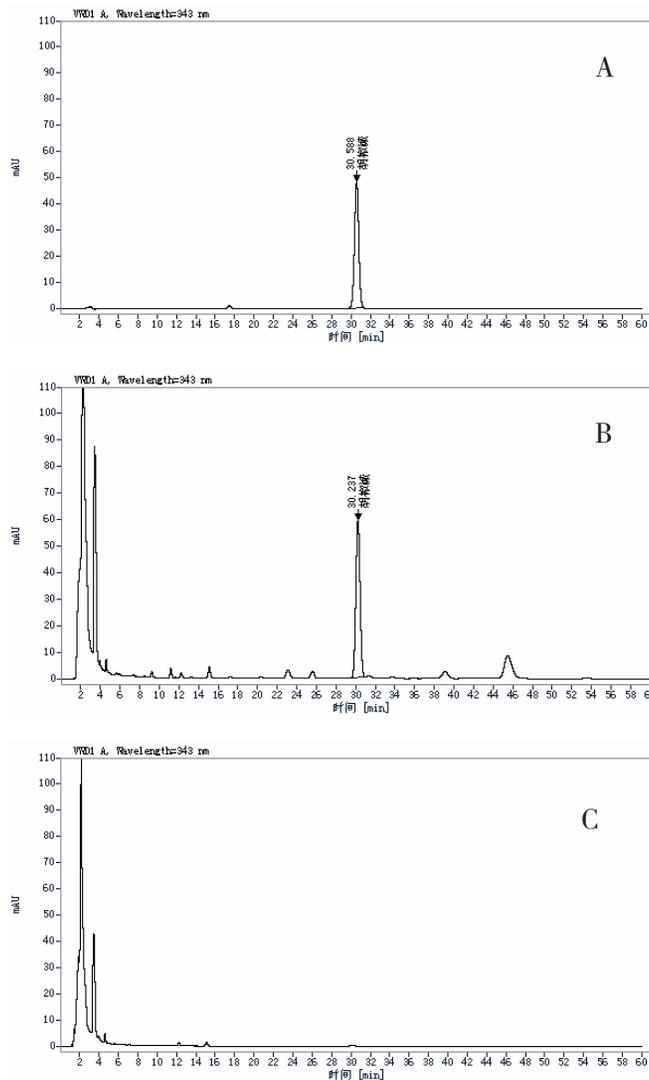
取“2.1.3”节下续滤液即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备

按本品处方及制备工艺制得缺荜茇的阴性样品, 照“2.1.3”节下供试品制备方法处理, 即得缺荜茇的阴性对照溶液。

2.2.5 阴性干扰试验

分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各10 μL, 注入液相色谱仪。结果表明, 供试品色谱中在与对照品色谱相应位置上有色谱峰, 而阴性对照色谱中在与对照品色谱相应位置上则未检测到峰, 表明其他成分对测定结果无干扰, 见图2。



A. 胡椒碱对照品; B. 供试品; C. 缺荜茇的阴性对照。

图2 石榴莲花散及胡椒碱对照品HPLC图

2.2.6 线性关系考察

分别精密吸取上述“2.2.2”节下对照品储备溶液1、2、3、5 mL于50 mL棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取10 μ L注入色谱仪,在“2.2.1”节色谱条件下测定。以峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),得到回归方程: $Y=72.128X-0.5195$ ($r=1.0000$),结果表明胡椒碱进样量在10.414 ~ 52.071 μ g范围内呈良好线性关系。

2.2.7 精密度试验

精密吸取对照品溶液10 μ L注入色谱仪,按“2.2.1”节色谱条件连续进样6次,测定胡椒碱峰面积,计算其RSD=0.42% ($n=6$),表明该测定方法精密度良好。

2.2.8 稳定性试验

取供试品溶液(样品S3),分别在0、2、4、6、8、12 h测定其胡椒碱含量。结果6次测定胡椒

碱平均质量分数为0.121%, RSD=0.22% ($n=6$)。结果表明,样品溶液在12 h内稳定。

2.2.9 重复性试验

取同一批样品(样品S3)6份,分别按“2.1.3”节下方法制备供试品溶液,按含量测定方法测定其胡椒碱含量。结果6份供试品中胡椒碱平均质量分数为0.119%, RSD=0.58% ($n=6$)。结果表明,该测定方法重复性良好。

2.2.10 回收率试验

取已知胡椒碱含量的同一批样品适量(样品S3),精密称定,平行6份,分别精密加入胡椒碱对照品储备溶液(104.1417 μ g \cdot mL⁻¹)5 mL,按“2.1.3”节下方法制备供试品溶液,精密吸取10 μ L注入色谱仪,在“2.2.1”节色谱条件下测定,计算加样回收率,结果见表3。试验结果表明该含量测定方法的加样回收率符合要求。

表3 石榴莲花散中胡椒碱回收试验结果

取样量 /mg	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测定量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
402.4	0.4768	0.5265	0.9970	99.37		
406.6	0.4818	0.5265	0.9933	98.51		
405.1	0.4800	0.5265	1.0040	99.75	99.6	0.60
402.3	0.4767	0.5265	1.0023	99.91		
406.0	0.4811	0.5265	1.0064	100.12		
405.6	0.4806	0.5265	1.0073	100.02		

2.2.11 样品含量测定

取10批石榴莲花散样品,分别按“2.1.3”节下方法制备供试品溶液。精密吸取上述供试品溶液及胡椒碱对照品溶液各10 μ L注入色谱仪,在“2.2.1”节色谱条件下测定,结果见表2。

3 讨论

色谱柱的选择:试验过程中考察了ODS-2 HYPERSIL-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)和Agilent 5 HC-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)色谱柱,结果表明两根色谱柱出峰效果差别不大,因此选择价位低的ODS-2 HYPERSIL-C₁₈色谱柱。

流动相的选择:测定鞣花酸过程中,考察了乙腈-0.2%磷酸(15:85)^[9]和乙腈-0.1%磷酸(15:85)^[10],结果表明用乙腈-0.2%磷酸(15:85)作流动相时色谱分离效果更好;测定胡椒碱过程中,考察了乙腈-水(40:60)^[11]和甲醇-水(40:60)^[12],结果表明用乙腈-水(40:60)作流动相时色谱分离效果更好;因此,选择了乙腈-0.2%磷酸(15:85)和乙腈-水(40:60)为流动相。

在供试品溶液的制备过程中,超声提取时间的选择试验了30、40、50 min,超声时间30 min

的待测成分含量较低, 超声时间40、50 min的待测成分含量较高, 且相差不大, 表明超声40 min待测成分已基本提取完全, 因此选择超声提取时间为40 min。

因胡椒碱对光十分敏感, 易发生光化学歧化作用产生异构体; 故在测定荜茇中胡椒碱含量时, 取样后加入溶剂超声提取、过滤、稀释等操作过程中, 要特别注意避光, 以确保实验结果的准确性。

本方法灵敏、简便, 过程容易控制, 重复性好, 稳定性强, 阴性对照无干扰, 可作为进一步提高石榴莲花散质量的方法。

参考文献:

- [1] 宋丽娜, 包照日格图, 万春平, 等. 浅析中药学与民族药理学对石榴的临床应用异同[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 7(7): 52.
- [2] 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015: 137, 235, 187.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准藏药第一册[S]. 1995: 301.
- [4] 尤佳莉, 蔡霞, 李聪颖, 等. 中国药典(2015版)藏药质量控制研究[J]. 全国民族医药发展学术研讨会论文集[C]. 2014: 183-184.
- [5] 苏楞高娃. 蒙药石榴的现代研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2017, (2): 54-56.
- [6] 高丽梅, 郑健. HPLC法测定那木吉格-14中胡椒碱的含量[J]. 中国药事, 2011, 25(8): 804-805.
- [7] 李方, 曹阳, 张清波. 高效液相色谱法测定荜茇中胡椒碱的含量[J]. 中医药信息, 2010, 27(2): 21-22.
- [8] 杨金草, 禄晓艳. 藏药六味能消散质量标准研究[J]. 西部中医药, 2014, 27(9): 43-45.
- [9] 何元. HPLC-PDA同时测定石榴健胃片中4种活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, (12): 2209-2214.
- [10] 蔡霞, 李聪颖, 张雨欣, 等. 石榴皮、石榴子质量标准提高研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(5): 1007-1011.
- [11] 倪琳, 杨锡. HPLC测定石榴健胃丸中桂皮醛和胡椒碱的含量[J]. 中国现代应用药学, 2012, (1): 67-69.
- [12] 胡玉, 吕顺忠, 高鸿亮, 等. HPLC法测定荜茇根中胡椒碱的含量[J]. 中国药房, 2014, (7): 633-635.

(收稿日期 2019年5月22日 编辑 郑丽娥)