

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.02.009

高效液相色谱法测定余甘子提取物中 没食子酸与鞣花酸含量

张文莉¹, 张俊仪², 张龙开¹, 黄月纯³, 林伟斌¹, 梁芷韵², 魏 刚⁴

(1. 无限极 < 中国 > 有限公司, 广东 江门 529156; 2. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510006; 3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 4. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要:目的 建立测定市售余甘子提取物中没食子酸与鞣花酸含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 采用 Zorbax SB Aq 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2% 磷酸溶液(梯度洗脱), 检测波长分别为 273 nm 和 254 nm, 柱温为 30 ℃, 流速为 1.0 mL/min。结果 没食子酸与鞣花酸进样量分别在 0.282~4.230 μg 和 0.043 6~0.654 0 μg 范围内与峰面积线性关系良好, $r = 0.999\ 9$ ($n = 5$); 平均加样回收率分别为 99.14% 和 102.86%, RSD 分别为 0.64% 和 0.78% ($n = 5$); 10 批样品中有 8 批为正品, 含量分别为 12.79~105.07 mg/g 和 3.09~33.47 mg/g; 2 批伪品中 2 种成分含量均为 0。结论 市售余甘子提取物质量差异较大, 存在伪品。该方法准确可靠, 重复性好, 为评价余甘子提取物的质量提供了依据。

关键词: 高效液相色谱法; 余甘子提取物; 没食子酸; 鞣花酸; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)02-0026-04

Content Determination of Gallic Acid and Ellagic Acid of *Phyllanthus Emblica* Extract by HPLC

ZHANG Wenli¹, ZHANG Junyi², ZHANG Longkai¹, HUANG Yuechun³, LIN Weibin¹, LIANG Zhiyun², WEI Gang⁴

(1. Infinitus <China> Company Limited, Jiangmen, Guangdong, China 529156; 2. The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510006; 3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510405; 4. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510006)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for content determination of gallic acid and ellagic acid of commercial *Phyllanthus emblica* Extract. **Methods** Zorbax SB Aq column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was methanol-0.2% phosphoric acid solution (gradient elution), the detection wavelength was 273 nm for gallic acid and 254 nm for ellagic acid. The column temperature was 30 ℃, and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** Gallic acid and ellagic acid had a good linear relationship with peak area in the range of 0.282-4.230 μg and 0.043 6-0.654 0 μg, respectively, $r = 0.999\ 9$ ($n = 5$). The average recovery rates of gallic acid and ellagic acid were 99.14% and 102.86%, RSD s were 0.64% and 0.78% ($n = 5$). Among the 10 batches of samples, 8 batches were genuine, the contents of gallic acid and ellagic acid were 12.79-105.07 mg/g and 3.09-33.47 mg/g, respectively, and the contents of the two components in the two batches of adulterants were 0. **Conclusion** The quality of commercial *Phyllanthus emblica* extract is quite different, and there are some adulterants in it. The method is accurate, reliable and reproducible, which provides a basis for evaluating the quality of *Phyllanthus emblica* extract.

Key words: HPLC; *Phyllanthus emblica* extract; gallic acid; ellagic acid; content determination

第一作者: 张文莉, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量标准及安全性, (电子信箱) ZWLeimily123@163.com。

- 速检测结核分枝杆菌耐药性的临床应用评价[J]. 中华疾病控制杂志, 2013, 17(8): 722-725.
- [12] 李 强, 赵雁林. 197 例临床结核分枝杆菌分离株的快速耐药性检测报告[J]. 中国防痨杂志, 2009, 31(12): 709-712.
- [13] 张太松, 李 明. 分子诊断技术在耐多药结核分枝杆菌检测中的应用进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(2): 129-134.
- [14] MBOOWA G, NAMAQANDA C, SSENQOBA W. Rifampicin resistance mutations in the 81bp RRDR of rpoB gene in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates using Xpert MTB/RIF in Kampala, Uganda: a retrospective study[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14: 481.
- [15] MATHYS V, VAN DE VWERE M, DE DROOQH E, et al. False-positive rifampicin resistance on Xpert MTB/RIF caused by a silent mutation in the rpoB gene[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2014, 18(10): 1255-1257.
- [16] 邓叶华, 向延根, 马小华, 等. 结核分枝杆菌耐利福平和异烟肼分子机制的研究进展[J]. 实用预防医学, 2015, 22(9): 1148-1151.
- [17] 梁佳元, 杨立军, 刘 敏, 等. Hain 和 Xpert MTB/RIF 技术对结核分枝杆菌药物敏感性的检测[J]. 中国热带医学, 2017, 17(3): 263-265.
- [18] 卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告(2007-2008 年)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 3.

(收稿日期: 2018-06-13)

余甘子为大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实,有清热凉血、消食健胃、生津止渴功效,常用于治疗血热血瘀、消化不良、腹胀、咳嗽、喉咙痛及口干^[1]。余甘子富含酚类、维生素、氨基酸、黄酮等生物活性物质^[2],主要有抗菌^[3]、抗氧化^[4]、抗病毒^[5]、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化^[6]、免疫调节等^[7]药理作用。近几年的研究主要集中在药物效应学与食品和保健品开发^[8]。目前,余甘子药材的质量控制方法主要有2015年版《中国药典(一部)》记载的高效液相色谱(HPLC)法^[11]。研究表明,余甘子药材的质量与其来源、产地的地理环境、气候、土壤等生长条件及采收加工方法关系较大^[9-10],提示药典仅通过检测没食子酸含量控制余甘子质量专属性不强。除没食子酸外,余甘子尚含较多的鞣花酸、柯里拉京等多种酚酸类成分,采用特征指纹图谱进行分析能更好地对余甘子进行质量评价^[11-13]。余甘子提取物是由余甘子提取加工而成,常用作于药品、保健品的原料。本研究中参考药典余甘子标准检测方法及文献记载方法,对余甘子提取物中没食子酸和鞣花酸含量进行测定,为评价其质量提供依据。

1 仪器与试剂

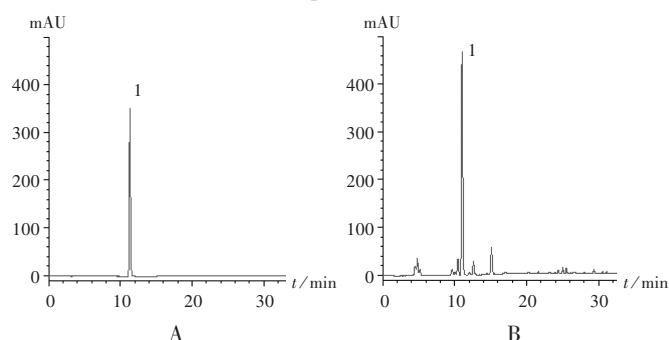
Agilent 1100 型 HPLC 仪(包括二极管阵列检测器,美国 Agilent 公司);KQ-400 KDE 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。10 批余甘子提取物(编号 S1~S10,来源见表1);余甘子药材,经广州中医药大学魏刚研究员鉴定为大戟科植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实;没食子酸对照品(批号为 110831-201605,纯度为 89.9%),鞣花酸对照品(批号为 111959-201602,纯度为 89.3%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(Merck 公司,色谱纯),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 没食子酸含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax SB Aq 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);



1. 没食子酸 2. 鞣花酸

A, A'. 对照品溶液 B, B'. 供试品溶液

图1 专属性试验高效液相色谱图

表1 余甘子提取物样品来源

编号	批号	供货单位
S1	160801	西安 A 厂
S2	ZLSC-2016121813	南京 B 厂
S3	20170612	西安 C 厂
S4	无	西安 D 厂
S5	ZLSC-2017032422	南京 F 厂
S6	CYY170528	汉中 G 厂
S7	CYY170530	汉中 G 厂
S8	20170308	西安 H 厂
S9	20170606	西安 H 厂
S10	161101	西安 A 厂

流动相:甲醇(A)-0.2%磷酸溶液(B)系统,梯度洗脱,0~10 min, A 为 2%→10%, 10~15 min, A 为 10%→20%, 15~20 min, A 为 20%→30%, 20~25 min, A 为 30%→40%, 25~35 min, A 为 40%→60%, 35~40 min, A 为 60%→90%;检测波长:273 nm;柱温:30℃;流速:1.0 mL/min;进样量为 10 μL。

2.1.2 溶液制备

取样品粉末 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,超声(功率为 320 W,频率为 40 kHz)提取 60 min,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,即得供试品溶液。取没食子酸对照品适量,精密称定,置棕色容量瓶中,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含 0.282 mg 的溶液,摇匀,即得对照品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:取 2.1.2 项下 2 种溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果色谱峰分离度良好,峰形尖锐,符合含量测定要求(见图 1 A 和图 1 B)。

线性关系考察:分别精密吸取 2.1.2 项下对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15 μL,进样分析,测定峰面积。以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 2914.6X - 15.21$, $r = 0.9999$ ($n = 5$)。

结果表明,没食子酸进样量在 0.282 ~ 4.230 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密密度试验:精密吸取同一对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,测定峰面积。结果的 RSD 为 0.03% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品(S1)溶液 10 μL ,分别在室温下放置 0,2,4,8,12,24 h 时进样,测定峰面积。结果的 RSD 为 0.11% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

重复性试验:分别精密称取同一批样品(S2)6 份,依法制备供试品溶液,进样测定。结果平均含量为 37.15 mg/g, RSD 为 0.68% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:称取 6 份已知含量的样品(S2,含水量分 3.15%,按干燥品计算含量为 38.36 mg/g),每份约 0.1 g,精密称定。然后分别精密加入一定量的对照品,依法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 2。

2.2 鞣花酸含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax SB Aq 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.2% 磷酸溶液(B)系统,梯度洗脱,0 ~ 10 min 时 A 为 40% $\rightarrow$ 60%, 10 ~ 15 min 时 A 为 60% $\rightarrow$ 90%, 15 ~ 20 min 时 A 为 90%;检测波长:254 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.0 mL/min;进样量 10 μL 。

2.2.2 溶液制备

取样品粉末 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定质量,超声提取 60 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续

滤液,即得供试品溶液。取鞣花酸对照品适量,精密称定,置棕色容量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含鞣花酸 0.043 6 μg 的溶液,摇匀,即得对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2.2 项下 2 种溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果色谱峰分离度良好,峰形尖锐,符合含量测定要求(见图 1A'和图 1B')。

线性关系考察:分别精密吸取 2.2.2 项下对照品溶液 1,2,5,10,15 μL ,进样分析,测定峰面积。以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、色谱峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=9\,054.5X-9.077$, $r=0.999\,9$ ($n=5$)。结果表明,鞣花酸进样量在 0.043 6 ~ 0.654 0 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

精密密度试验:精密吸取同一对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,测定峰面积。结果的 RSD 为 0.26% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:精密吸取同一供试品(S1)溶液 10 μL ,分别在室温下放置 0,2,4,8,12,24 h 时测定峰面积。结果的 RSD 为 0.38% ($n=6$),表明供试品溶液室温下放置 24 h 内稳定。

重复性试验:分别精密称取同一批样品(S2)6 份,依法制备供试品溶液,进样测定。结果平均含量为 13.52 mg/g, RSD 为 0.43% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:称取 6 份已知含量的样品(S2,含水量分 3.15%,按干燥品计算含量为 13.52 mg/g),每份约为 0.1 g,精密称定,然后分别精密加入一定量的对照品,依法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,计算回收率。结果见表 3。

表 2 没食子酸加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.100 7	3.741 2	3.756	7.473	99.36	99.14	0.64
0.100 9	3.748 6	3.764	7.483	99.21		
0.099 9	3.711 5	3.727	7.443	100.12		
0.100 7	3.741 2	3.756	7.469	99.25		
0.100 4	3.730 0	3.745	7.412	98.32		
0.100 2	3.722 6	3.737	7.406	98.57		

表 3 鞣花酸加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)	样品量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.101 2	1.325 1	1.310 8	2.669 0	102.53	102.86	0.78
0.101 1	1.323 8	1.310 8	2.654 7	101.53		
0.101 3	1.326 4	1.310 8	2.671 4	102.61		
0.102 1	1.336 9	1.310 8	2.692 5	103.42		
0.101 3	1.326 4	1.310 8	2.683 6	103.54		
0.102 1	1.336 9	1.310 8	2.694 4	103.56		

2.3 样品含量测定

精密吸取对照品溶液、供试品溶液各 5~10 μL , 按拟订色谱条件进样分析, 外标法测定含量。结果见表 4。

表 4 余甘子提取物含量测定结果 ($n=2$)

编号	批号	没食子酸		鞣花酸	
		含量(mg/g)	RSD(%)	含量(mg/g)	RSD(%)
S1	160801	93.43	0.37	29.27	1.06
S2	ZLSC-2016121813	37.29	0.28	13.68	0.30
S3	20170612	12.79	0.38	3.09	0.77
S4	无	46.94	0.88	14.28	0.46
S5	ZLSC-2017032422	28.12	0.27	5.85	1.27
S6	CYY170528	16.33	0.13	5.91	2.62
S7	CYY170530	15.85	0.39	5.77	0.07
S8	20170308	0	-	0	-
S9	20170606	0	-	0	-
S10	161101	105.07	0.06	33.47	0.04

3 讨论

2015 年版《中国药典(一部)》余甘子药材质量标准中, 采用 HPLC 法测定没食子酸含量时的检测波长为 273 nm, 本研究中以此测定余甘子中没食子酸含量。而测定余甘子中鞣花酸含量的检测波长 254 nm 是参考文献确定的。

由于其酚酸类成分极性差异大, 不同溶剂对没食子酸、鞣花酸提取效果差异较大。本试验中分别以不同体积分数甲醇为溶剂考察对没食子酸和鞣花酸提取效果的影响, 结果显示, 50% 甲醇对没食子酸提取效果明显优于其他体积分数甲醇。而鞣花酸以甲醇为溶剂时提取率较高。本研究中参考 2015 年版《中国药典(一部)》^[1] 及文献[3], 拟订分别以 50% 甲醇和甲醇为溶剂制备供试品溶液测定 2 种成分的含量。同时对 2 种成分的超声时间(45, 60, 75 min)及取样量(0.1, 0.2, 0.3 g)进行了优化筛选。结果显示, 提取时间和取样量的改变对没食子酸、鞣花酸的提取率均无明显影响, 故确定采用将提取物粉末 0.2 g 加入相应溶剂 50 mL 超声提取 60 min 的方法制备供试品溶液。

没食子酸和鞣花酸极性差异较大, 采用梯度洗脱可同时测定其含量^[3], 因所用溶剂不同, 故对鞣花酸测定的流动相梯度进行了优化调整, 缩短了保留

时间。加样回收试验等方法学验证表明, 所建立的方法简便可行。

根据含量测定结果判定, 10 批样品中有 2 批为未知伪品, 其没食子酸与鞣花酸含量均为 0。8 批正品含量差异较大, 没食子酸含量为 12.79~105.07 mg/g, 鞣花酸含量为 3.09~33.47 mg/g, 最高与最低含量的差分别达 8 倍和 10 倍, 提示市场上余甘子提取物质量差异较大。由于没食子酸的专属性相对较差, 而药典余甘子标准仅以没食子酸含量作为定量指标, 提示药典余甘子质量控制指标专属性不强。本试验中所采用的没食子酸结合鞣花酸含量测定方法, 能更好地控制余甘子提取物的质量。

文献对余甘子提取物的伪品报道较少, 检出的 2 批伪品暂未能确定其来源。但即使是正品, 不同厂家产品含量差异也比较大, 主要可能与药材来源、制备工艺等相关。因此, 应加强原料质量控制, 规范稳定的制备工艺, 才能更好地保障提取物质量的稳定性。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:179.
- [2] 朱华伟, 李伟, 陈运娇, 等. 余甘子化学成分及其抗炎作用的研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(3):670-674.
- [3] 席晓蓉. 余甘子抗菌作用的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(3):46-47.
- [4] 林素英, 黄旭心, 蔡财木, 等. 余甘子抗氧化成分的提取与抗氧化活性研究[J]. 莆田学院学报, 2011, 18(2):71-73.
- [5] 席晓蓉, 邢海晶. 余甘子抗病毒、抗真菌作用的研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2010, 33(3):69-70.
- [6] 范源, 刘竹煊. 余甘子活性成分抗动脉硬化作用的研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2011, 34(2):67-70.
- [7] 罗春丽. 余甘子对肿瘤细胞抑制作用及免疫调节的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):155-158.
- [8] 刘延泽, 李海霞, 许利嘉, 等. 药食兼用余甘子的现代研究概述及应用前景分析[J]. 中草药, 2013, 44(12):1700-1706.
- [9] 赖志勇, 戴宏芬, 肖维强, 等. 4 种余甘子功能成分的分析[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(1):97-101.
- [10] 张兰珍, 赵文华, 郭亚健, 等. 藏药余甘子化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(10):46-49.
- [11] 孙雪飞, 张鸿雁, 夏青, 等. 藏药余甘子药材及其鞣质部位的指纹图谱评价研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7):1173-1179.
- [12] 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):94-99.
- [13] 王飞, 包永睿, 孟宪生, 等. 不同产地余甘子酚酸类成分指纹图谱研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(4):1-33.

(收稿日期:2018-06-10)

本栏目由
国药控股云南有限公司
协办