

HPLC 法测定复方大红袍止血胶囊中没食子酸的含量

覃媛媛, 沈嘉华

(楚雄州食品药品检验所, 云南 楚雄 675000)

摘要: 目的 建立 HPLC 方法测定复方大红袍止血胶囊中没食子酸的含量。方法 采用 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 流动相为甲醇-0.05%磷酸溶液 (5:95); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 272 nm; 进样量 10 μl ; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。结果 本方法进样量在 1.832~27.485 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r^2=1.0000$); 平均加样回收率 ($n=6$) 为 96.58% (RSD=1.42%); 采用外标法计算 10 批样品中的没食子酸含量测定结果为 0.28~0.35 mg/粒。结论 HPLC 法简便可行, 结果准确可靠, 重复性好, 可用于复方大红袍止血胶囊的质量控制。

关键词: 复方大红袍止血胶囊; 质量标准; 没食子酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2021.16.026

文章编号: 1006-1959(2021)16-0098-04

Determination of Gallic Acid in Compound Dahongpao Zhixue Capsules by HPLC

QIN Yuan-yuan, SHEN Jia-hua

(Chuxiong Prefecture Food and Drug Inspection Institute, Chuxiong 675000, Yunnan, China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for the determination of gallic acid in compound dahongpao zhixue capsules. **Methods** Agilent ZORBAX SB-C18 column (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm) was used; The mobile phase is methanol-0.05% phosphoric acid solution (5:95); the flow rate was 1.0 ml/min; the detection wavelength was 272 nm; the injection volume was 10 μl ; the column temperature was 30 $^{\circ}\text{C}$. **Results** The sample injection volume of this method showed a good linear relationship with the peak area in the range of 1.832~27.485 $\mu\text{g/ml}$ ($r^2=1.0000$); the average sample recovery ($n=6$) was 96.58% (RSD=1.42%); The external standard method was used to calculate the gallic acid content in 10 batches of samples and the results were 0.28~0.35 mg/grain. **Conclusion** HPLC method is simple, feasible, accurate, reliable, and reproducible. It can be used for the quality control of compound dahongpao zhixue capsules.

Key words: Compound dahongpao zhixue capsules; Quality standard; Gallic acid; High performance liquid chromatography

复方大红袍止血胶囊 (compound dahongpao zhixue capsules) 为云南龙发制药股份有限公司独家品种, 是由大红袍、柿蒂两味中药材经提取制成的彝药制剂, 功效为收敛止血, 用于功能性子宫出血、人工流产后出血、放取环术后出血、鼻衄、胃出血及内痔出血等 (彝医功能主治称为差嫫且凯斯多, 斯开色土, 卑开塞哪)。复方大红袍止血胶囊现行标准为局颁标准 (国家食品药品监督管理局标准 WS-10364<ZD-0364>-2002-2011Z), 制定有大红袍的薄层鉴别和鞣质的容量法含量测定。本研究中通过高效液相色谱法 (HPLC) 对大红袍和柿蒂中均含有的没食子酸进行含量测定, 以期为该制剂的质量控制提供重现性好、专属性强的检验方法, 现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 检测器: DAD; 赛多利斯 BT125D (0.01 mg) 电子分析天平 (德国赛多利斯公司); 梅特勒 MS304 TS/02 (0.1 mg) 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); ELGA 超纯水机 (法国威立雅公司)。

1.2 试剂 没食子酸对照品 (批号 111703-201504, 含量 90.8%) 购自中国食品药品检定研究院; 复方大红袍止血胶囊 (云南龙发制药股份有限公司生产, 批号分别为 171104、180105、180509、180908、181001、190102、190103、190104、190105、190106); 阴性对照

样品由云南龙发制药股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent ZORBAX SB-C18 (5 μm , 4.6 mm \times 250 mm); 流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液 (5:95); 检测波长 272 nm; 流速 1.0 ml/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μl ; 理论板数以没食子酸峰计算应不低于 7000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取没食子酸对照品 10.09 mg 置 100 ml 量瓶中, 加 5% 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 精密量取 5 ml 置 50 ml 量瓶中, 加 5% 盐酸溶液稀释至刻度, 即得没食子酸质量浓度为 9.1617 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取本品内容物 1.0 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 5% 盐酸溶液 50.00 ml, 称定重量, 置水浴中回流水解 4 h, 放冷, 用 5% 盐酸溶液补足减失的体积, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.3 阴性对照溶液 取不含大红袍药材、不含柿蒂药材、不含大红袍和柿蒂药材的阴性样品, 按照“2.2.2”项下方法制成阴性样品溶液。

2.3 专属性试验 分别精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10 μl , 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 结果发现供试品在与没食子酸对照品主峰保留时间相应的位置上有相同色谱峰出现, 且主峰与相邻色谱峰能完全分离, 峰形良好, 理论板数能达到 7000, 阴性样品无干扰, 见图 1。

作者简介: 覃媛媛 (1983.12-), 女, 云南楚雄人, 本科, 主管药师, 主要从事食品药品检验检测工作

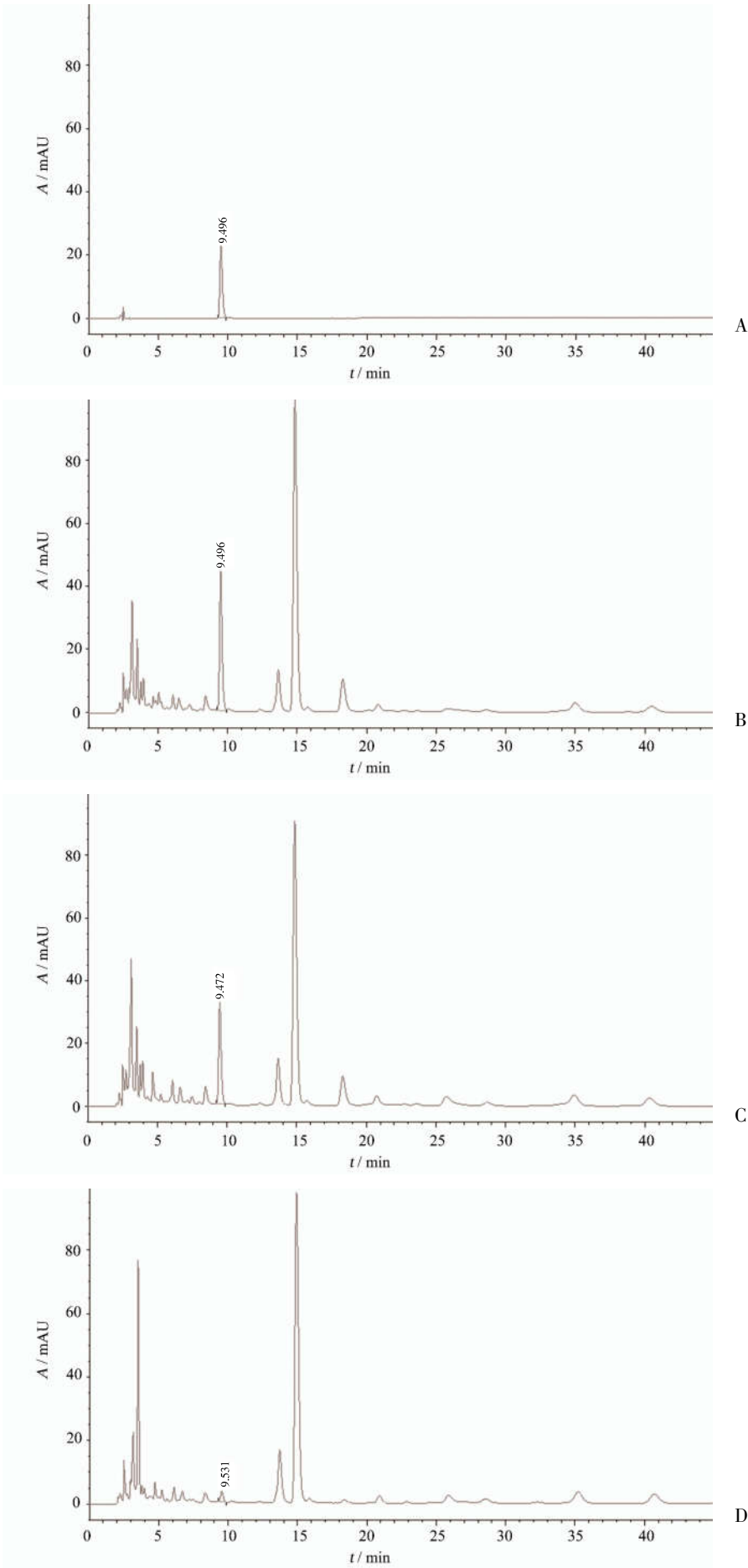
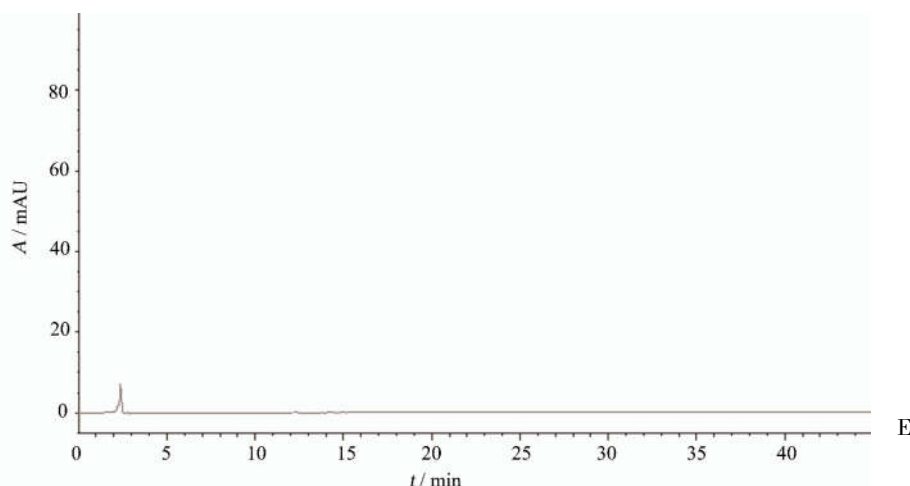


图 1 高效液相色谱图



注:A:对照品;B:样品;C:缺大红袍阴性对照;D:缺柿蒂阴性对照;E:缺大红袍和柿蒂阴性对照

图 1 (续)

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 2、4、8、10、20、30 μl , 注入液相色谱仪进行测定。以峰面积为纵坐标, 以进样量为横坐标进行线性回归, 得没食子酸的回归方程 ($n=6$) 为: $Y=3150X-1.789$, $r^2=1.0000$, 结果发现没食子酸在 1.832~27.485 $\mu\text{g/ml}$ 范围内呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μl , 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 平均峰面积为 285.55496, RSD 为 0.06%, 结果表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批样品 (批号: 190101) 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 以“2.1”项下色谱条件测定, 平均含量为 0.5963 mg/g, RSD 为 1.86%, 结果表明本方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取对照品溶液和同一批样品 (批

号: 190101) 供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、8、16、12、32、48 h 进行测定, 记录色谱图, 对照品溶液和供试品溶液没食子酸峰面积 RSD 分别为 0.38% 和 1.21%, 结果表明对照品溶液和供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.8 加样回收率实验 称取已知含量的复方大红袍止血胶囊 (批号: 190101) 内容物 6 份, 0.5 g/份, 精密加入相当于样品中所含没食子酸量 100% 的对照品储备液, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算加样回收率, 结果见表 1。

2.9 样品含量测定 取样品 10 批, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算 10 批样品中没食子酸含量, 结果见表 2。

表 1 加样回收率实验结果 ($n=6$)

序号	取样量 (g)	样品中没食子酸含量 (mg)	加入没食子酸量 (mg)	测得没食子酸总量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.4831	0.2881	0.3054	0.5821	96.27	96.58	1.42
2	0.5041	0.3006	0.3054	0.5904	94.89		
3	0.5043	0.3007	0.3054	0.5942	96.10		
4	0.5071	0.3024	0.3054	0.6022	98.17		
5	0.5040	0.3005	0.3054	0.5988	97.66		
6	0.5054	0.3014	0.3054	0.5957	96.38		

表 2 样品含量测定结果 (mg/粒)

样品批号	没食子酸			样品批号	没食子酸		
	1	2	平均值		1	2	平均值
180105	0.3347	0.3229	0.3288	190102	0.3384	0.3362	0.3373
180509	0.2911	0.3153	0.3032	190103	0.3453	0.3336	0.3394
180908	0.2794	0.2858	0.2826	190104	0.3348	0.3518	0.3433
181001	0.3469	0.3279	0.3374	190105	0.3546	0.3519	0.3533
181104	0.2843	0.2879	0.2861	190106	0.3388	0.3281	0.3335

3 讨论

3.1 HPLC 成分确定 《中国药典》2015 年版一部^[1]

“柿蒂”薄层鉴别项下以没食子酸为对照品, 国内外亦有文献报道柿蒂中含有没食子酸^[2,3], 虽未查询到

文献表明大红袍含有没食子酸,但通过对原药材的检测表明其含有该成分。没食子酸具有较强的抗炎抗氧化作用,能抑制肿瘤形成,同时能通过抑制内皮NO的生成降低血管松弛,从而起到止血作用^[4-5],故本研究将没食子酸选定为含量测定目标成分。

3.2 检测波长的选择 本文研究对没食子酸进行全波段扫描,结果发现在215 nm和272 nm波长处均有吸收,结合紫外响应值大小、色谱峰峰形对称尖锐、阴性无干扰等条件,选择272 nm作为检测波长。

3.3 流动相的选择 本研究观察了乙腈-水、乙腈-不同浓度磷酸溶液、甲醇-水、甲醇-不同浓度磷酸溶液等多种不同配比流动相对组分分离、保留时间的影响,结果表明甲醇-水(5:95)为最佳流动相,能使被测成分与其它成分较好的分离,峰形好,阴性对照无干扰。

3.4 提取方法的选择 参考《中国药典》2015年版一部^[1]中“五倍子”“地榆”“余甘子”“肠炎宁片”“宫炎平片”含量测定项下供试品溶液制备方法,考察了不同溶剂(4 mol/L盐酸溶液、5%盐酸溶液、50%甲醇、甲醇),不同提取方法(超声、加热回流),不同提取时间(3、4、5 h)的提取效果,最终确定5%盐酸溶液加热回流4 h为最佳提取方法。

3.5 耐用性考察 本研究对不同厂家、型号色谱柱(色谱柱A:Agilent SB-C18,5 μm,4.6 mm×250 mm;色谱柱B:Agilent 5 HC-C18,5 μm,4.6 mm×250 mm;色谱柱C:Thermo AcclaimTM 120-C18,5 μm,4.6 mm×

250 mm和色谱柱D:Shiseido CAPCELL PAK MG II-C18,5 μm,4.6 mm×250 mm),不同柱温(25℃、30℃、35℃、40℃),不同流速(0.8 ml/min、1.0 ml/min、1.2 ml/min)进行了耐用性考察,结果表明文中确定的色谱条件对色谱峰峰形、分离度、理论塔板数影响性不大,耐用性较好。

综上所述,复方大红袍止血胶囊是一个疗效确切、使用广泛的彝药制剂,其检验标准最早收载于《国家药品中药标准》(外科、妇科分册),与现行标准中的检验方法一致,其含量测定均用络合滴定法测定总鞣质含量,本次研究制定的HPLC法快速、简便、准确、可靠,可用于复方大红袍止血胶囊的质量控制。

参考文献:

- [1]国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2]黄文平,黄陆强,宋永贵,等.不同产地柿蒂药材中没食子酸含量的比较[J].江西中医药大学学报,2014,26(3):58-59,62.
- [3]Smrke T, Persic M, Veberic R, et al. Influence of reflective foil on persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit peel colour and selected bioactive compounds[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):19069.
- [4]吴茱萸.没食子酸对肺癌细胞增殖凋亡影响及可能机制研究[D].郑州:郑州大学,2017.
- [5]田衍,舒若,罗华友.没食子酸对PI3K/AKT基因表达的影响及其对胃癌细胞的抗转移作用[J].基因组学与应用生物学, 2020, 39(2):884-889.

收稿日期:2021-02-23;修回日期:2021-03-02

编辑/刘欢