



# HPLC 分析不同来源藏药当佐中 4 种 指标成分的含量

李岑<sup>1,2,3</sup>, 肖远灿<sup>1,2</sup>, 杨红霞<sup>1,2,3</sup>, 杜玉枝<sup>1,2</sup>, 魏立新<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008

2. 青海省藏药药理学和安全性评价研究重点实验室, 青海 西宁 810008

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定藏药当佐中没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛、胡椒碱含量的方法, 对不同来源样品进行测定, 以建立当佐的质量控制标准。方法: 采用 Waters XTerra RP-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-水 (含 0.1% 冰乙酸) 为流动相, 梯度洗脱 (0~22.5 min 流动相比例 5:95~50:50, 22.5~40 min 流动相比例 50:50~80:20), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 270 nm。结果: 在此色谱条件下, 没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛、胡椒碱达到基线分离, 且线性良好, 线性范围分别为 0.040~0.640 μg (r = 0.999 8), 0.090~1.440 μg (r = 0.999 9), 0.031~0.500 μg (r = 0.999 9), 0.092~1.477 μg (r = 0.998 9), 平均回收率 (n = 6) 分别为 97.42% (RSD 1.9%), 97.55% (RSD 2.9%), 98.69% (RSD 0.9%), 96.72% (RSD 4.0%); 不同来源当佐中该 4 种成分的含量变化分别为 0.113~1.69, 0.889~1.51, 0.000~0.606, 1.96~2.75 mg·g<sup>-1</sup>。结论: 本研究建立的方法, 能够准确快速地测定当佐中指标成分的含量, 可为该药的全面质量评价提供参考。

[关键词] HPLC; 当佐; 没食子酸; 羟基红花黄色素-A; 桂皮醛; 胡椒碱

藏药当佐由石榴子、红花、肉桂、白豆蔻、荜茇及珍宝药佐太 6 味药组成, 为藏医临床常用传统制剂之一, 具有温胃益火、化滞除湿、温通经脉、保肝健胃等功效, 用于消化不良、食欲不振、寒性腹泻、慢性肠胃炎、乙型肝炎、糖尿病等病症。本制剂临床应用广泛, 疗效确切, 但关于其质量控制尚未见文献报道。现代研究表明, 没食子酸 (gallic acid)、羟基红花黄色素-A (hydroxysafflor yellow A, HSYA)、桂皮醛 (cinnamic aldehyde)、胡椒碱 (piperine) 分别为当佐配伍药石榴子、红花、肉桂、荜茇中的主要药理活性成分<sup>[1-6]</sup>。因此, 本研究建立了高效液相色谱 (HPLC-DAD) 同时检测藏药当佐中没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛及胡椒碱含量的方法, 并对不同来源当佐中该 4 种指标成分的含量进行了测定, 为当佐的质量控制提供参考依据。

## 1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, DAD 检测器, ChemStation 色谱工作站 (美国, Agilent 公司); AG135 精密天平 (瑞士, Mettler-Toledo 公司); KQ-2500DE 数控超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司); Millipore 超纯水器 (美国, Millipore 公司)。

当佐样品 4 批, 分别购自西藏藏医学院藏药厂 (批号: 080401)、西藏雄巴拉曲神水藏药厂 (批号: 20090701)、青海玉树州藏医院、四川省甘孜州石渠县藏医院。

没食子酸 (gallic acid 批号 110831-200302)、羟基红花黄色素-A (hydroxysafflor yellow A, HSYA, 批号: 111637-200905)、桂皮醛 (cinnamic aldehyde 批号 710-200011)、胡椒碱 (piperine 批号 0775-200203) 对照品均购自中国药品生物鉴定所。甲醇为色谱纯 (山东禹王实业有限公司禹城化工厂), 冰乙酸为分析纯 (天津市百世化工有限公司), 实验用水为 Millipore 纯水器制超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Waters XTerra RP-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5

[稿件编号] 20100909010

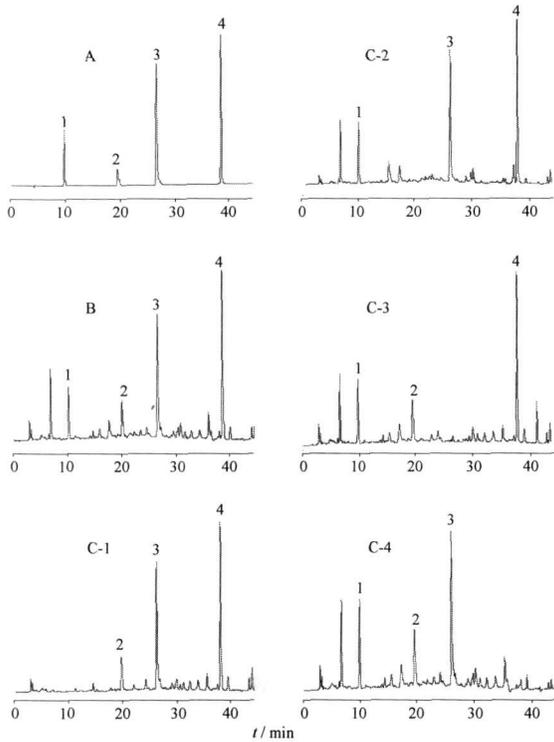
[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2007BA148B02)

[通信作者] \* 魏立新, 博士, 主要从事藏药药学研究, Tel (0971) 6143668, Email kwel@nwjpb.ac.cn

[作者简介] 李岑, 硕士研究生, 主要从事药用植物化学研究, Email licen\_60@126.com



$\mu\text{m}$ ) 色谱柱, 以甲醇-水 (含 0.1% 冰乙酸) 为流动相, 梯度洗脱 (0~22.5 min, 5:95~50:50; 22.5~40 min, 50:50~80:20), 流速  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , DAD 检测器, 检测波长 270 nm, 参比波长 500 nm, 柱温  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 进样量  $10\text{ }\mu\text{L}$ 。相应色谱图见图 1。



C-1 C-2 C-3 C-4 分别为缺石榴子、红花、肉桂及葶苈  
阴性对照; 1. 没食子酸; 2. HSYA; 3. 桂皮醛; 4. 胡椒碱。

图 1 4 种对照品 (A)、当佐 (B) 及阴性对照 (C) 色谱图

## 2.2 溶液制备

**2.2.1 对照品混合溶液制备** 称取没食子酸对照品 2.56 mg 羟基红花黄色素-A 5.76 mg 桂皮醛 2.00 mg 胡椒碱 5.89 mg 分别置于 4 个 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 即得对照品储备液。精密吸取各对照品储备液 2.5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 混匀, 制得质量浓度分别为 0.064 0.144 0.050 0.147  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛及胡椒碱对照品混合溶液。

**2.2.2 供试品溶液制备** 称取当佐样品约 1 g 精密称定置于具塞三角烧瓶中, 精密加甲醇 25 mL, 密封, 称定, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min 放冷, 再称定, 用甲醇补足失重, 摇匀, 滤过, 即为供试品溶液, 进样  $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

**2.2.3 阴性对照溶液的制备** 根据当佐中各配伍药的比例, 分别制备各缺石榴子、红花、肉桂及葶苈的 4 份阴性对照品, 按 2.2.2 项下方法制得阴性对照溶液。

## 2.3 线性关系的考察

精密吸取 2.2.1 项中配制的对照品混合溶液 0.1 mL, 用甲醇依次作等倍稀释, 配成系列浓度, 按 2.2.1 项下色谱条件测定,  $10\text{ }\mu\text{L}$  进样, 每个浓度进样 3 次, 取平均值。以进样量对峰面积积分值进行回归处理, 得没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛、胡椒碱标准曲线, 见表 1。

表 1 当佐中 4 种活性成分的标准曲线

化合物	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}$
没食子酸	$Y = 2.137 \times 10^3 X + 3.142$	0.999 8	0.040~0.640
羟基红花黄色素-A	$Y = 0.401 \times 10^3 X + 1.979$	0.999 9	0.090~1.440
桂皮醛	$Y = 4.852 \times 10^3 X + 2.535$	0.999 9	0.031~0.500
胡椒碱	$Y = 1.538 \times 10^3 X + 32.957$	0.998 9	0.092~1.477

## 2.4 精密度试验

精密吸取对照品混合溶液  $10\text{ }\mu\text{L}$ , 连续进样 6 次, 记录峰面积, 测得没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛、胡椒碱的日内精密度 RSD 分别为 1.3%, 1.0%, 1.8%, 2.1%; 精密吸取同一对照品混合溶液  $10\text{ }\mu\text{L}$ , 连续 2 d 进样, 每天进样 3 次, 记录峰面积, 以上 4 种指标成分的日间精密度 RSD 分别为 1.5%, 1.8%, 2.1%, 2.7%。

## 2.5 稳定性试验

取同一供试样品溶液  $10\text{ }\mu\text{L}$ , 分别于 0 2 6 8 24 48 72 h 进样。测得没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛、胡椒碱的峰面积 RSD 分别为 1.7%, 1.1%, 1.4%, 1.5%, 表明供试样品中 4 种指标成分在 3 d 内稳定性良好。

## 2.6 重复性试验

将同一厂家的当佐样品, 按 2.2.2 项方法配制成 6 份供试品溶液, 进样  $10\text{ }\mu\text{L}$ , 测得没食子酸 ( $0.191\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )、羟基红花黄色素-A ( $1.507\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )、桂皮醛 ( $0.606\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )、胡椒碱 ( $1.962\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) 的平均含量 RSD 分别为 1.9%, 1.0%, 1.4%, 2.6%, 表明该方法的重复性较好。

## 2.7 加样回收率试验

称取已知含量的样品 (西藏藏医学院藏药厂, 批号 080401) 约 0.5 g 共 6 份, 精密称定。配制没



食子酸 ( $0.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、羟基红花黄色素-A ( $0.75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、桂皮醛 ( $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )及胡椒碱 ( $1.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )混合对照品溶液,精密吸取 1 mL 分别加入上述 6 份样中,并按供试品溶液制备方法处理,测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 4 种成分加样回收率试验结果 ( $n = 6$ )

化合物	样品中 量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 %	平均值 %	RSD %
没食子酸	0.096	0.11	0.2020	98.06	97.42	1.9
	0.097	0.11	0.2017	97.44		
	0.096	0.11	0.2075	100.73		
	0.095	0.11	0.1979	96.54		
	0.096	0.11	0.1963	95.29		
	0.096	0.11	0.1987	96.46		
羟基红花 黄色素-A	0.754	0.75	1.5005	99.77	97.55	2.9
	0.762	0.75	1.4148	93.57		
	0.763	0.75	1.4481	95.71		
	0.751	0.75	1.4909	99.33		
	0.754	0.75	1.4478	96.26		
	0.754	0.75	1.5240	100.66		
桂皮醛	0.305	0.32	0.6133	98.13	98.69	1.0
	0.307	0.32	0.6167	98.36		
	0.303	0.32	0.6203	99.57		
	0.306	0.32	0.6229	99.50		
	0.302	0.32	0.6047	97.22		
	0.307	0.32	0.6230	99.36		
胡椒碱	0.997	1.02	1.9980	99.06	96.72	4.0
	0.968	1.02	1.9389	97.53		
	0.996	1.02	1.9920	98.81		
	0.997	1.02	1.9363	96.00		
	0.975	1.02	1.7817	89.31		
	0.979	1.02	1.9910	99.60		

## 2.8 样品的测定

按 2.2.2 项下方法处理不同来源的当佐样品,制备供试样品溶液,进样量 10  $\mu\text{L}$ ,记录没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛及胡椒碱的峰面积,由线性回归方程计算 4 种指标成分的含量,表 3。

表 3 当佐中 4 种指标性成分的含量 ( $n = 3$ )

样品来源	没食子酸	HSYA	桂皮醛	胡椒碱
西藏藏医学院藏药厂	0.191	1.51	0.606	1.96
西藏雄巴拉曲神水藏药厂	0.113	1.21	0.114	1.98
青海玉树州藏医院	0.242	0.970	-	2.56
四川石渠县藏医院	1.69	0.889	0.104	2.73

## 3 讨论

检测波长的确定,文献[7-10]报道没食子酸最大吸收波长为 272 nm,羟基红花黄色素-A 为 403 nm,桂皮醛为 276 nm,胡椒碱为 343 nm,各波长存在较大差异,据此很难确定合适的共同检测波长。本研究在紫外-可见光 (190~800 nm) 范围内对 4 种化合物进行全波段扫描,通过综合比较各化合物吸收强度变化趋势,选择 270 nm 为检测波长、500 nm 为参比波长,在此条件下,4 种化合物均有较强吸收峰。

洗脱条件的确定,藏药复方当佐中所含成分复杂,用甲醇-水二元系统进行等度洗脱,分离度较差。通过反复地摸索尝试,最终确定以甲醇-水(含 0.1% 冰乙酸)为流动相,梯度洗脱 (0~22.5 min, 5:95~50:50, 22.5~40 min, 50:50~80:20)。在此条件下,4 种指标成分达到了良好分离。

研究结果表明,不同来源当佐中没食子酸和桂皮醛含量差异较大,羟基红花黄色素-A 和胡椒碱的含量差异较小,其中玉树州藏医院样品未检测出桂皮醛色谱峰。本研究检测的 4 批样品中没食子酸、羟基红花黄色素-A 及桂皮醛胡椒碱含量变化分别为: 0.113~1.69, 0.889~1.51, 0.000~0.606, 1.96~2.73  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,推测造成当佐中指标成分含量差异的原因可能与原药材的来源、加工炮制及制剂生产工艺有关。

本研究所建立的方法快速灵敏,能同时测定藏药当佐中没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛及胡椒碱的含量,为评价藏药当佐的药品质量提供了科学的依据。

### [参考文献]

- [1] 赵建国,李桂峰,董周永,等.石榴籽多酚的提取及抗氧化作用研究[J].西北植物学报,2008,26(12):2532
- [2] 康丽,颜晓燕,辛志伟.红花的药理作用进展[J].西南军医,2008,10(6):136
- [3] Xinbing Wei, Huiqing Liu, Xia Sun, et al. Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemic reperfusion injury by antioxidant action[J]. Neurosci Lett, 2005, 386(1): 58
- [4] Kim H O, Park S W, Park H D. Inactivation of escherichia coli O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot[J]. Food Microbiology, 2004, 21(1): 105.
- [5] 张荣发.桂皮醛的药理作用研究进展[J].中国药业,2008,17(10):75.
- [6] 聂超,张蕾,柯世怀.萆薢化学成分与提取方法及主要作用研究[J].实用中医杂志,2008,24(12):809



- [ 7 ] 陈业光, 李德潮. HPLC 测定正胃片中没食子酸的含量 [ J ]. 中成药, 2008, 30(9): 附 13.
- [ 8 ] 杨静, 杨志福, 田云, 等. HPLC-UV 法测定人血浆中羟基红花黄色素 A 的含量 [ J ]. 解放军药学报, 2009, 25(1): 68.
- [ 9 ] 王连芝, 姜维琴. HPLC 法测定桂枝中桂皮醛和肉桂酸的含量 [ J ]. 中医药信息, 2009, 26(4): 19.
- [ 10 ] 胡家敏, 彭绍忠, 曾惠芳, 等. HPLC 法测定胡椒根中胡椒碱的含量 [ J ]. 中国新药与临床药理学, 2009, 20(3): 260.

## HPLC determination of four components in Tibetan medicine Dangzuo of different tibetan regions

LI Cen<sup>1,2,3</sup>, XIAO Yuancan<sup>1,2</sup>, YANG Hongxia<sup>1,2,3</sup>, DU Yuzhi<sup>1,2</sup>, WEI Lixin<sup>1,2\*</sup>

(1. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences Xining 810008, China;

2. Qinghai Province Key Laboratory of Tibetan Medicine Pharmacology and Safety Asses, Xining 810008, China;

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**[ Abstract ] Objective** To develop an HPLC method for determination of gallic acid, hydroxysafflor yellow A, cinnamic aldehyde and piperine in Tibetan medicine Dangzuo, and to compare the content of four active components in Dangzuo of different Tibetan regions. **Method** The separation was carried out on a Waters XTerra RP-C<sub>18</sub> column ( 4.6 mm × 250 mm, 5 μm ). The mobile phases were methanol and water, all contained 0.1% glacial acetic acid for gradient elution. The gradient program was as follows: 0-22.5 min, methanol was changed from 5% to 50%; 22.5-40 min, changed to 80%; 80-20 min, The flow rate was 1.0 mL • min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was 270 nm. The reference wavelength was 500 nm. **Result** The linear ranges of gallic acid, hydroxysafflor yellow A, cinnamic aldehyde and piperine were 0.040-0.640 μg ( *r* = 0.9998 ), 0.090-1.440 μg ( *r* = 0.9999 ), 0.031-0.500 μg ( *r* = 0.9999 ) and 0.092-41.477 μg ( *r* = 0.9989 ), respectively. The average recoveries ( *n* = 6 ) were 97.42% ( RSD 1.9% ), 97.53% ( RSD 2.9% ), 98.69% ( RSD 0.96% ) and 96.72% ( RSD 4.0% ), respectively. The content ranges of gallic acid, hydroxysafflor yellow A, cinnamic aldehyde and piperine in Dangzuo samples of different Tibetan regions were 0.113-41.69 mg • g<sup>-1</sup>, 0.889-1.51 mg • g<sup>-1</sup>, 0.000-40.606 mg • g<sup>-1</sup> and 1.96-2.73 mg • g<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion** The method is a simple and effective for quality control of Tibetan medicine Dangzuo.

**[ Keywords ]** HPLC; Dangzuo; gallic acid; hydroxysafflor yellow A; cinnamic aldehyde; piperine

doi 10.4268/cjmm20110823

[责任编辑 丁广治]