

1-香荆芥酚 2-麝香草酚
1-carvacrol 2-thymol

图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 色谱图
Fig. 1 HPLC Chromatogram of reference substances (A) and sample (B)

确、可靠的检测方法。

3.2 我国不同产地牛至中有效成分香荆芥酚与麝香草酚的量差异明显。从香荆芥酚来看,湖北、湖南岳阳、江西九江和安徽、云南部分产地的量较高;从麝香草酚来看,浙江丽水、江西九江和湖北部分地区的量高。综合分析湖北、湖南岳阳、江西九江、浙江丽水等地牛至中香荆芥酚与麝香草酚总量较高,品质较好。

3.3 牛至中有效成分与样品采集地的海拔高度有一定关系,产于海拔较低的牛至中香荆芥酚与麝香草酚的量相对较高。

References:

- [1] Beijing Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. *Iconographia Cormophytorum Sinicorum* (中国高等植物图鉴) [M]. Beijing: Science Press, 1974.
- [2] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.
- [3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 1977.

RP-HPLC 法测定石榴皮中安石榴苷

李海霞¹, 张红岭¹, 刘延泽^{2*}, 杜 鹄¹

(1. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450052; 2. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450008)

石榴皮为石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮, 在我国传统医药中主要用于久泻、出血、蛔虫等证。《中国药典》2005 年版规定石榴皮中鞣质不得低于 10%, 可见鞣质类成分是其主要成分, 此类成分的变化是影响石榴皮质量的主要因素; 并且石榴皮作为富含鞣质类成分的中药, 在近年来的研究中发现其总鞣质具有抗菌、抗病毒、抗癌、防治性病传播等特殊的药理活性^[1], 因此很有必要对石榴皮中鞣质类成分进行定性、定量。目前, 《中国药典》虽从 2000 年版的皮粉测定法发展到 2005 年版的没食子酸法测定总鞣质, 但尚缺乏特异性和特征性成分的测定。本试验以 RP-HPLC 法测定石榴皮中鞣质类成分安石榴苷 (punicalagin), 为科学评价石榴皮药材质量, 制定科学、规范、合理、可行的石榴皮质量控制标准提供依据。

1 仪器、试剂与样品

Agilent 1100 型高效液相色谱仪; 四元泵、在线脱气机、柱温箱、自动进样器、G1315B 型 DAD 检测器 (Agilent 公司)。08892-26 型超声波仪器 (COLO-Parmer 仪器公司)。柱色谱用吸附剂: Toyopearl HW-40C (Tosoh 公司), Diaion HP-20 (Mitsubishi 公司)。安石榴苷对照品为自制, 用高效液相色谱测定质量分数大于 95%。甲醇、冰醋酸为色谱纯, 水为高纯水, 硼氢化钠与其余试剂均为分析纯。石榴皮药材由河南中医学院刘若塘教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-2% 冰醋酸 (5: 95); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 232 nm; 柱温: 26 °C。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取安石榴苷对照品 2.1 mg, 置 1 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

收稿日期: 2005-08-20

作者简介: 李海霞 (1973—), 女, 河南平顶山人, 讲师, 硕士, 主要从事中草药活性成分及其制剂的研究。

Tel: (0371) 66658082 E-mail: lihx1024@zzu.edu.cn

* 通讯作者 刘延泽 E-mail: yanze_liu@hms.harvard.edu

2.3 对照品溶液的还原:已知对照品为 α,β -异构体(图 1-A),反相 HPLC 在判断此类异构体方面有独到之处,正相 HPLC 区别不开 α,β -异构体,而用反相 HPLC 展开呈现双峰时,在被测样品中加入硼氢化钠将其还原,在同样条件下行反相 HPLC,如原来双峰消失,出现新的比原来双峰的 t_R 小的单峰,则说明该样品为 α,β -异构体;如原来双峰无变化,则说明该样品为两成分的混合物,需进一步分离^[2]。在以乙醇-醋酸乙酯-0.01 mol/L 磷酸-0.01 mol/L 磷酸二氢钾(简称为 EEHK)作流动相时,对照品(图 1-C)用硼氢化钠还原后,得到一个分离度较好的单峰(图 1-D),这进一步说明所提取的对照品安石榴苷为同分异构体。

2.4 供试品溶液的制备:精密称取过 40 目筛的石榴皮粉末约 0.5 g,用 70%丙酮超声提取 3 次(50 mL×3),每次 20 min;提取液滤过,残渣用少量 70%丙酮冲洗 3 次,滤液合并,置 250 mL 量瓶中,以 70%丙酮定容;精密取 50 mL 提取液,减压浓缩至 5 mL,加入 Toyopearl HW-40C 柱(内径 1 cm,吸附剂高 10 cm)常压柱色谱分离,以水 50 mL、10%甲醇 50 mL、20%甲醇 60 mL 洗脱除去杂质,再用甲醇-丙酮-水(6:2:2)约 100 mL 洗脱至洗脱液三氯化铁薄层显色为阴性,甲醇-丙酮-水洗脱部位减压浓缩至干,用甲醇溶解并定容至 10 mL,摇匀,经 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。其色谱图见图 1。

2.5 线性关系的考察:精密吸取上述安石榴苷对照品溶液 2、4、6、8、10 μL ,在上述色谱条件下测定峰面积。以安石榴苷进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),得回归方程: $Y=695.46 X+231.52, r=0.9995$ 。安石榴苷在 4.3~21.5 μg 与峰面积的线性关系良好。

2.6 精密度试验:精密吸取对照品溶液,按上述色谱连续进样 5 次,得其峰面积的 RSD 为 1.03%。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液(冰箱保存,测定取出放置至约 25 $^{\circ}\text{C}$ 的室温)日内、日间各测 3 次(分别在 0、3、6、12、24、36、40、48、56、64、72 h 进行测定),结果安石榴苷峰面积的日内 RSD 为 1.45%,日间 RSD 为 2.12%,表明供试品溶液在 3 d 内基本稳定。

2.8 重现性试验:取同一产地的石榴皮粉末 5 份,依法制备供试品溶液测定,安石榴苷峰面积的 RSD 为 3.00%。

2.9 加样回收率试验:精密称取石榴皮粉末 0.25 g(含安石榴苷为 101.4 mg/g),共 5 份,每份精密加入安石榴苷对照品 26 mg,按上述供试品溶液的制备方法制备,进样测定,并计算回收率,结果安石榴苷平均回收率为 96.65%,RSD 为 1.96%($n=5$)。

2.10 样品测定:按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,进样 10 μL ,测定了 3 个地区样品中安石榴苷的质量分数,结果见表 1。

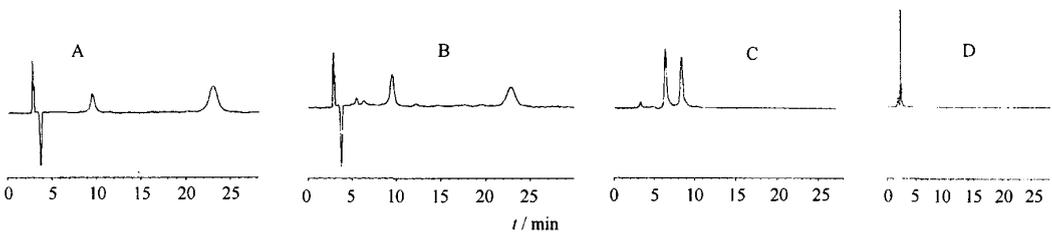


图 1 安石榴苷对照品(A)、样品(B)、以 EEHK 为流动相的对照品(C)及还原对照品(D)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of punicalagin (A), sample (B), punicalagin with reference substance with EEHK as mobile phase (C), and punicalagin reference substance by deoxidation (D)

表 1 样品测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of samples ($n=3$)

购入及采集地	安石榴苷/%	RSD/%
河南郑州	10.14	1.18
北京	10.07	1.31
湖北襄樊	10.45	1.09

3 讨论

3.1 药理研究显示安石榴苷可防止博来霉素诱导的中国仓鼠卵巢细胞 hgp_rt 基因突变和 DNA 链断裂,从而有抗癌作用^[3],是活性成分;并且经系统查

阅文献安石榴苷仅在石榴皮、使君子科榄仁树的叶、诃子等少数植物中分离得到,为石榴皮中较为特异性的成分。

3.2 提取方法选择:70%丙酮提取后,曾试用了溶剂萃取法、明胶沉淀法, Diaion HP-20 柱色谱和 Toyopearl HW-40C 柱色谱法来提取安石榴苷。在溶剂萃取法中,用醋酸乙酯萃取多次仍有鞣质类成分,并且正丁醇萃取部位和醋酸乙酯萃取部位成分重叠较多,起不到分离的效果;明胶沉淀法经多次沉

淀后三氯化铁薄层显色反应仍为阳性;Diaion HP-20 柱色谱法制备的样品液经过 HPLC 测定结果显示样品量过少;只有 Toyopearl HW-40C 柱色谱法中的甲醇-丙酮-水洗脱部分测得样品量高,且其余洗脱部位几乎不含对照品成分,说明此法洗脱完全,效果好。

3.3 对照品用硼氢化钠还原后,虽在以乙醇-醋酸乙酯-0.01 mol/L 磷酸-0.01 mol/L 磷酸二氢钾为流动相时为分离度很好的单峰,但用流动相甲醇-2%冰醋酸水溶液(5:95)时没能得到好的还原峰,这可能与甲醇和硼氢化钠反应的程度以及对硼氢化钠还原的具体量未知等因素有关,有待以后进一步优化反应条件。

3.4 色谱条件的选择:由于对照品在 232 nm 有最大紫外吸收,因此选择 232 nm 为检测波长。流动相曾试用了甲醇-2%冰醋酸(5:95、20:80、27:73)^[4],甲醇-2%冰醋酸梯度洗脱,乙醇-醋酸乙酯-0.01 mol/L 磷酸-0.01 mol/L 磷酸二氢钾(7:3:45:45)及梯度洗脱等,但多出现样品峰中的杂质峰

干扰,溶剂峰干扰及不能达到基线分离和基线漂移等问题;其中虽以乙醇-醋酸乙酯-0.01 mol/L 磷酸-0.01 mol/L 磷酸二氢钾为流动相时,获得了良好的还原峰,但样品中的安石榴苷与杂质峰不能很好分离。最终以甲醇-2%冰醋酸水溶液(5:95)的分离度最好,因此选择其为流动相。

3.5 本实验测定安石榴苷的量较高,可达 10%,这与《中国药典》2005 年版规定的鞣质质量分数不得低于 10%的标准有一致之处。

References:

- [1] Li H X, Wang Z, Liu Y Z. Progress in studies on chemical constituents and pharmacological effects of Punicaceae [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(8): 765.
- [2] Lu Y R. *Chemistry of Chinese Materia Medica* (中药化学) [M]. Beijing: Xueyuan Press, 1995.
- [3] Chen P S, Li J H, Liu T Y, et al. Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cell [J]. *Cancer Lett*, 2000, 152: 115.
- [4] Liu Y Z, Ding G, Yu B W, et al. Determination of three hydrolysable tannins in the fruits of *Terminalia chebula* Retz. by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2000, 20(3): 189.

“全国医院药房建设与管理学术研讨会”

征 文 通 知

中国药学会医院药学专业委员会拟于 2006 年 9 月下旬在北京召开“全国医院药房建设与管理学术研讨会”,会议由《中国药学杂志》编辑部 and 北京大学第三医院承办。欢迎大家踊跃投稿!

一、征文范围

1. 如何完善和落实医院药学专业委员会编写的《优良药房工作规范(2005 版)》;2. 门诊药房、急诊药房和住院药房建设模式和布局的探索和研究;3. 门诊及住院药房患者的用药服务和用药管理;4. 门诊及住院药房服务的流程创新和服务创新;5. 门诊及住院药房调剂自动化的实践和管理经验;6. 怎样利用现代管理的观念和手段加强医院药房的人力资源管理;7. 药房药品管理的新技术、新措施和新经验;8. 医院药学人员的继续教育和知识结构更新。

二、征文要求

1. 论文未在公开发期刊或全国性学术会议上发表或交流过,文责自负;2. 论著不超过 3 500 字,综述不超过 5 000 字,并附 300 字以内的结构摘要;3. 稿件要求宋体,4 号字,1.5 倍行距。稿件格式按《中国药学杂志》2006 年第 1 期稿约;4. 请用 E-mail 传递或邮寄文稿。邮寄稿件应一式两份并附软盘;5. 要求字迹清楚,数据准确;投稿截止日期 2006 年 8 月 10 日(以邮戳为准)。

三、会议地点和时间

具体地点和时间见第二轮通知。也可登陆中国药学会网站(www.cpa.org.cn)或中国药学会医院药学专业委员会(www.cpahp.org.cn)查询本次会议通知。

四、继续教育学分

将授予参会代表中国药学会 I 类继续教育教育学分 6 分。

五、联系人与联系电话

联系人:周颖玉 张传林 宋彦平

E-mail: zhengwen@wx9999.com

电话:(010)68361318 68361320

传真:(010) 68361390

地址:北京市西城区北礼士路甲 38 号 《中国药学杂志》市场部(邮编 100810)