

藏药坐珠达西中 8 种成分 HPLC 定量测定

任桂友¹, 刘海萍², 王战国³, 曾 锐¹

1. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610041

2. 四川省自然资源科学研究院, 四川 成都 610041

3. 四川大学生命科学学院, 四川 成都 610041

摘要:目的 建立藏药坐珠达西中 8 种成分的 HPLC 定量测定方法, 提高藏药坐珠达西 HPLC 检测标准。方法 采用 HPLC 法, Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 检测波长: 没食子酸、苯甲酸、山柰酚、木香炔内酯和去氢木香炔内酯检测波长为 225 nm, 绿原酸检测波长为 352 nm, 西红花苷 I 和西红花苷 II 检测波长为 455 nm。结果 该方法分离度良好, 标准曲线在线性范围内相关性良好, 平均回收率为 97.13%~101.42%。对 5 批 10 份坐珠达西测定和主成分分析 (PCA), 结果显示不同厂家的产品各聚一类, 表明不同厂家产品质量差异较大; 偏最小二乘法 (PLS) 的得分图分析表明, 8 种指标成分中没食子酸、苯甲酸、山柰酚、去氢木香炔内酯和西红花苷 II 对坐珠达西的质量贡献尤为明显。结论 该方法稳定可靠、结果准确, 具有较好的稳定性和重复性, 可用于坐珠达西的 HPLC 定量检测和质量控制。

关键词: 坐珠达西; HPLC; 聚类分析; 没食子酸; 绿原酸; 苯甲酸; 山柰酚; 木香炔内酯; 西红花苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)15-2189-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.15.013

Quantitative determination of eight active constituents in Tibetan medicine *Zuozhudaxi* by HPLC

REN Gui-you¹, LIU Hai-ping², WANG Zhan-guo³, ZENG Rui¹

1. Ethnic Medicine Institute of Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

2. Sichuan Academy of Natural Resources Sciences, Chengdu 610041, China

3. School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous determination of eight components in Tibetan medicine *Zuozhudaxi*, and improve the standard of HPLC test. **Methods** The HPLC analysis was performed on a Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The column temperature was set at 30 °C. A mixture of methyl alcohol-0.05% phosphoric acid aqueous solution was used as the mobile phase, gradient eluted with the flow rate at 1 mL/min, and detected by different UV wave lengths, i.e. 225 nm for gallic acid, benzoic acid, kaempferol, costunolide, and dehydroepiandrosterone costunolide, 352 nm for chlorogenic acid, and 445 nm for crocin I and crocin II. **Results** The eight components were well separated with ideal linear correlations. The average recoveries were in the range of 97.13%—101.42%. The contents of the eight components between two manufactures were different. PLS-DA loading plot of the samples showed that gallic acid, benzoic acid, kaempferol, dehydroepiandrosterone costunolide, and crocin II were the main components which made contributions to the quality of *Zuozhudaxi*. **Conclusion** The method is reliable, stable, accurate, and reproducible for the quantitative determination and quality control of *Zuozhudaxi*.

Key words: *Zuozhudaxi*; HPLC; clustering analysis; gallic acid; chlorogenic acid; benzoic acid; kaempferol; costunolide; crocin

藏药坐珠达西为丸剂剂型, 由佐塔、红花、木 马钱子等 35 味药物组成, 功效为疏肝、健胃、清热、
香、诃子、余甘子、石榴子、安息香、唐古特乌头、 愈溃疡、消肿, 用于“木布”病迁延不愈、胃脘嘈

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划 (2012BAI27B07)

作者简介: 任桂友, 硕士研究生, 从事药物制剂及民族药的研究。Tel: 13540108836 E-mail: rgy506189795@126.com

*通信作者 曾 锐, 副教授, 硕士研究生导师, 从事药物制剂及民族药的研究。Tel: 13981910281 E-mail: Mackzeng@gmail.com

杂、消化不良、浮肿、水肿等^[1]，为藏药治疗慢性胃炎的常用药物。原制剂标准进行了2项理化反应鉴别和船形乌头薄层鉴别及丸剂的相关检查。马肖等^[2]在此基础上又对熊胆、牛黄、木香、丁香进行了薄层鉴别，对马钱子中的马钱子碱进行了液相定性鉴别，对西红花中的西红花苷 I 进行了高效液相色谱定量测定。但是该药物组成药味较多，仅依靠少数指标的定量测定难以控制其内在质量。

该药物中诃子在藏药中被视为“药中之王”，具有很好的解毒功效，邪气聚于脏腑的内源性毒性和食物、药物中毒等外源性毒性都能驱解^[3]；余甘子系藏族常用药，能清热凉血、消食健胃，用于血热血瘀、消化不良、腹胀等症^[4]；石榴子能温中健脾，治疗厌食、胃寒、腹胀等症^[5]；此3种药物中均含有没食子酸，可用没食子酸作为三者的综合定量标准。木香中医常用以治疗胃部胀满、呕吐、腹痛和腹泻等消化不良症状，具有芳香健胃、行气止痛的功效，是常用理气药，主要成分为木香烃内酯和去氢木香烃内酯^[6]；红花藏医常用来治疗肝病、血病和进行培元健身，其主要成分有西红花苷 I、西红花苷 II^[7]；安息香具有开窍醒神、行气活血、镇惊息风等功效，其主要成分有苯甲酸^[8]。在组成坐珠达西的药味中，还含有绿原酸和山柰酚。本研究针对上述8种指标性成分建立的多波长 HPLC 定量测定方法，并测定了2个厂家，共5个批次（四川阿坝州藏医院：批号 20130926、20130823、20130703、20120618；金诃藏药：批号 20120612）的样品，为更好地控制该药生产规范提供参考依据。

1 仪器与材料

Waters 2695/2996 型高效液相色谱仪，2996PDA 检测器，Empower 化学工作站；KQ5200E 型超声波清洗器，昆山超声仪器有限公司；Mettler AE240S 型电子天平，梅特勒-托利上海有限公司。

对照品没食子酸（批号 111109，质量分数 $\geq 98.0\%$ ），苯甲酸（批号 120807，质量分数 $\geq 98.0\%$ ），木香烃内酯（批号 120322，质量分数 $\geq 98.0\%$ ），去氢木香烃内酯（批号 120321，质量分数 $\geq 98.0\%$ ），西红花苷 I（批号 120714，质量分数 $\geq 98.0\%$ ），西红花苷 II（批号 110925，质量分数 $\geq 98.0\%$ ），四川省维克奇生物科技有限公司；对照品绿原酸（批号 121125，质量分数 $\geq 98.0\%$ ），山柰酚（批号 120718，质量分数 $\geq 98.0\%$ ），成都普菲德生物技术有限公司。坐珠达西（丸剂）供试品，批号 20130926、

20130823、20130703、20120618，四川阿坝州藏医院藏医药研究所制；批号 20120612，金诃藏药股份有限公司。流动相甲醇为色谱纯（Oceanpak 公司），提取用甲醇为分析纯（质量分数 $\geq 99.5\%$ ，成都市科龙化工试剂厂），磷酸为分析纯（质量分数 $\geq 85.0\%$ ，成都市科龙化工试剂厂），水为纯净水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)；流动相甲醇(A)-0.05%磷酸溶液(B)，梯度洗脱：0~8 min, 13%~20% A；8~20 min, 20%~38% A；20~30 min, 38%~50% A；30~45 min, 50%~70% A；45~65 min, 70%~80% A；体积流量为 1 mL/min；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样量 10 μ L；没食子酸、苯甲酸、山柰酚、木香烃内酯和去氢木香烃内酯检测波长为 225 nm，绿原酸检测波长为 352 nm，西红花苷 I 和西红花苷 II 检测波长为 455 nm。按照上述色谱条件进行测定，各组间分离度良好，对照品及样品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

取没食子酸、绿原酸、苯甲酸、山柰酚、木香烃内酯、去氢木香烃内酯适量，精密称定，加甲醇分别制成含 1.012、1.102、1.016、1.080、1.004、1.098 mg/mL 的溶液；再取西红花苷 I、西红花苷 II 适量，精密称定，加稀乙醇分别制成含 1.070、1.064 mg/mL 的溶液，即得各对照品溶液。分别精密吸取上述对照品溶液各 2.7、1.3、0.9、1.7、3.5、3.0、0.5、0.2 mL 于 25 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

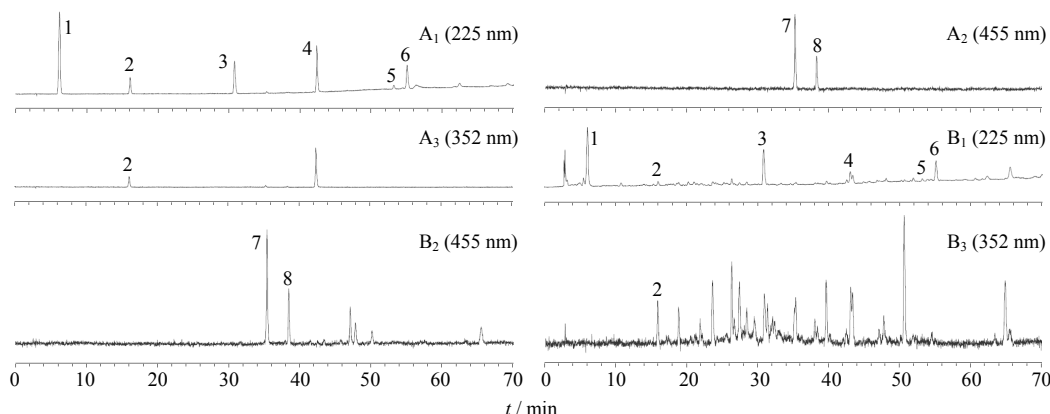
取坐珠达西粉末 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，密封，称定质量，超声提取 30 min。冷却至室温后称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液即得。

2.4 线性关系的考察

将“2.2”项下混合对照品溶液依次稀释 1、2、4、8、16 倍，分别精密吸取不同倍数和原混合对照品溶液 10 μ L 进样，以进样质量浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)，绘制标准曲线，得到线性回归方程及相关系数，见表 1。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2”项下稀释 1 倍的混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，每次



A₁~A₃-对照品 B₁~B₃-样品 1-没食子酸 2-绿原酸 3-苯甲酸 4-山柰酚 5-木香烃内酯 6-去氢木香烃内酯
7-西红花苷 I 8-西红花苷 II, 图 4 同
A₁—A₃-reference substances B₁—B₃-sample 1-gallic acid 2-chlorogenic acid 3-benzoic acid 4-kaempferol
5-costunolide 6-dehydroepiandrosterone costunolide 7-crocin I 8-crocin II, Fig. 4 is same

图 1 对照品和样品 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of reference substances and samples

表 1 对照品的线性关系和范围

Table 1 Linearities and ranges of reference substances

化合物	回归方程	r	线性范围 / μg
没食子酸	$Y=5.8 \times 10^7 X + 2 \times 10^5$	0.999 6	34.156~1 093
绿原酸	$Y=1.4 \times 10^7 X + 60 625$	0.999 8	17.906~573
苯甲酸	$Y=6.8 \times 10^7 X + 72 302$	0.999 6	11.438~366
山柰酚	$Y=4.0 \times 10^7 X + 74 794$	0.999 7	22.938~734
木香烃内酯	$Y=1.8 \times 10^6 X + 19 255$	0.999 8	50.188~1 606
去氢木香烃内酯	$Y=1.4 \times 10^7 X + 54 205$	0.999 8	41.094~1 315
西红花苷 I	$Y=7.3 \times 10^7 X + 64 046$	0.999 9	6.688~214
西红花苷 II	$Y=8.0 \times 10^7 X + 37 398$	0.999 8	2.656~85

10 μL, 记录峰面积, 计算峰面积的 RSD。结果显示没食子酸、绿原酸、苯甲酸、山柰酚、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、西红花苷 I 和西红花苷 II 峰面积的 RSD 分别为 0.89%、0.49%、0.87%、0.93%、0.42%、0.44%、0.72%、0.58%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验

取同一份坐珠达西样品 (批号 20130703) 粉末 6 份, 按“2.3”项下确定的方法平行制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行分析。结果显示没食子酸、绿原酸、苯甲酸、山柰酚、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、西红花苷 I 和西红花苷 II 质量分数的 RSD 分别为 0.73%、1.99%、2.23%、1.12%、1.68%、2.19%、2.11%、2.07%, 表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验

取一份坐珠达西样品 (批号 20130703) 粉末, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 时进样 10 μL, 按“2.1”项下色谱条件进行分析, 计算各成分峰面积的 RSD。结果显示供试品溶液中没食子酸、绿原酸、苯甲酸、山柰酚、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、西红花苷 I 和西红花苷 II 峰面积的 RSD 分别为 1.85%、2.02%、2.65%、3.32%、3.76%、1.38%、3.49%、2.25%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

称取已测定的坐珠达西样品 (批号 20130703) 粉末 6 份, 每份约 1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入各对照品溶液 (使得对照品量相当于样品中相应成分量的 50%~120%) 适量, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算各对照品的回收率和 RSD, 结果没食子酸、绿原酸、苯甲酸、山柰酚、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、西红花苷 I 和西红花苷 II 的平均加样回收率为 100.17%、97.99%、101.42%、100.54%、99.13%、99.82%、98.11%、97.13%, RSD 为 2.1%、2.9%、5.2%、4.2%、3.3%、5.3%、2.0%、3.4%。

2.9 样品测定

取各批次的坐珠达西样品粉末, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 每个样品平行 2 份, 并按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 每份测定 2 次, 计算各样品中没食子酸、绿原酸、苯甲酸、山柰酚、

木香烃内酯、去氢木香烃内酯、西红花苷 I 和西红花苷 II 的量, 结果见表 2。

2.10 不同厂家不同批次间坐珠达西 8 个成分质量分数的主成分分析 (PCA)

参考文献方法^[9], 以上述测定的 8 个成分质量分数为数据库。以 SIMPCA-12.0 软件进行 PCA 和偏最小二乘法 (PLS) 分析。坐珠达西样品 HPLC 的 PCA 打分图见图 2, 聚类分析 (HCA) 对 PCA 进行聚类分析柱状图见图 3, 荷载图见图 4。结果显

示: 图 2 和图 3 中坐珠达西样品清晰地聚为 2 大类, 阿坝州藏医院产样品聚为 1 类, 金诃藏药产样品聚为 1 类; 同时四川产样品不同批次间又分 2 组。图 4 表明本实验中用于定量测定的 8 个指标峰对坐珠达西内在质量贡献较大。

3 讨论

本研究建立了同时测定藏药坐珠达西中 8 种成分的 HPLC 方法, 并测定了 2 个厂家 5 批 10 个样品中的 8 种成分。该方法简单准确, 具有较好的重

表 2 5 批样品中 8 种成分的测定 (n=4)

Table 2 Contents of eight constituents in five batches of samples (n=4)

批号	进样序号	厂家	质量分数 / (mg·g ⁻¹)							
			没食子酸	绿原酸	苯甲酸	山柰酚	木香烃内酯	去氢木香烃内酯	西红花苷 I	西红花苷 II
20130926	1~4	阿坝州藏医院	0.672 0	0.181 7	0.157 7	0.729 0	2.156 9	1.621 5	0.045 8	0.030 2
20130823	5~8	阿坝州藏医院	0.763 4	0.227 0	0.151 3	0.689 4	2.527 2	1.533 2	0.052 4	0.023 8
20130703	9~12	阿坝州藏医院	0.742 1	0.170 9	0.146 1	0.629 5	1.717 8	1.525 2	0.045 1	0.026 0
20120618	13~16	阿坝州藏医院	1.129 5	0.165 1	0.095 0	0.399 2	0.177 0	0.801 3	0.022 4	0.010 4
20120612	17~20	金诃藏药	1.192 3	0.118 4	0.682 7	0.535 3	1.403 4	1.888 0	0.366 6	0.159 6

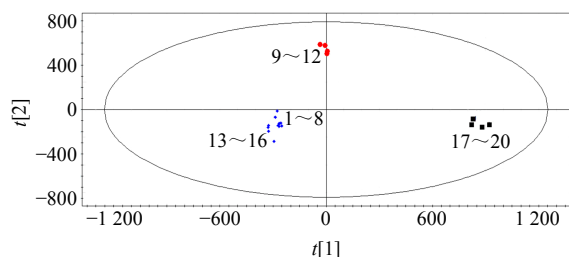


图 2 样品的 PCA 图

Fig. 2 PCA plot of samples

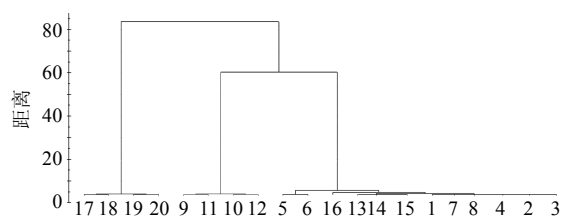


图 3 坐珠达西样品 PCA 打分图的 HCA 分析图

Fig. 3 HCA analysis by PCA scores of Zuozhudaxi samples

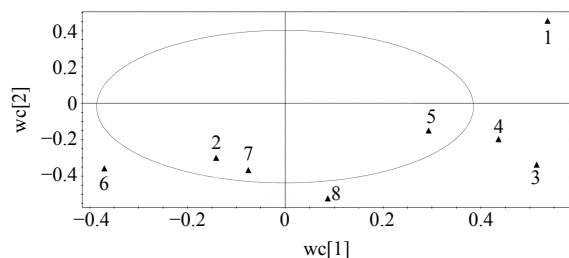


图 4 坐珠达西样品的 PCA 荷载图

Fig. 4 PCA plot of Zuozhudaxi samples

复性和稳定性。

3.1 检测波长的确定

采用 PDA 二极管阵列检测器, 分别对 8 种成分在 190~700 nm 进行全波长扫描。结果显示没食子酸、绿原酸、苯甲酸、山柰酚、木香烃内酯、去氢木香烃内酯、西红花苷 I 和西红花苷 II 分别在 210、352、230、204、225、225、455、455 nm 处有最大吸收。为了兼顾 8 种成分的最大吸收波长, 同时降低工作量, 经多次实验验证最终确定没食子酸、苯甲酸、山柰酚、木香烃内酯和去氢木香烃内酯 5 个样品的检测波长为 225 nm, 绿原酸的检测波长为 352 nm, 西红花苷 I 和西红花苷 II 的检测波长为 455 nm。

3.2 供试品提取方法的考察

本研究分别考察了甲醇超声提取, 甲醇回流, 甲醇回流后酸解 3 种提取方法对坐珠达西样品中 8 种成分提取效果的影响, 结果以甲醇超声提取的效果最好, 加热回流和加酸对样品中的 8 种成分都有一定的破坏作用, 最终确定采用甲醇 25 mL 超声提取 30 min 作为供试品溶液的制备方法。

3.3 流动相的确定

分别考察了乙腈-0.05%磷酸水溶液和甲醇-0.05%磷酸水溶液 2 种流动相, 结果显示乙腈-0.05%磷酸水溶液作为流动相时杂峰很多且多拖尾现象,

严重影响8种成分的检测, 甲醇-0.05%磷酸水溶液作为流动相上述现象较为缓和, 最终选择甲醇-0.05%磷酸水溶液进行优化作为洗脱流动相。

3.4 聚类分析

本研究以所测8个成分为数据库进行了聚类分析, 结果显示青海产样品和四川产样品各聚为一类, 同时四川产样品又分为2组, 表明四川和青海2个厂家内在质量差异较大; 同一厂家不同生产年生产的坐珠达西内在质量差异也较大。由于坐珠达西生产工艺较为一致, 因此说明不同地区的厂家和批次生产过程中, 原药材料的质量控制和生产工艺的控制存在较大的波动, 这可能是由于不同地区的藏药厂在生产过程中, 使用了同物异名、或不同采收季和生产年限的原药材所致, 需要进一步完善原药材和成品的质量标准。

同时经打分图分析可知, 本实验中用于测定的8个指标峰对坐珠达西内在质量贡献较大, 而其中以峰1(没食子酸)、峰3(苯甲酸)、峰4(山柰酚)、峰6(去氢木香烃内酯)和峰8(西红花苷II)对坐珠达西的质量贡献尤为明显。上述分析表明8个指标成分的定量测定有助控制坐珠达西的内在质量。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部标准·藏药 [S]. 1995.
- [2] 马肖, 王兰霞, 赵建邦, 等. 提高坐珠达西质量标准的研究 [J]. 药物分析与检验, 2012, 29(3): 250-253.
- [3] 罗光伟, 陈建江. 诃子的药理作用研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33(11): 78-80.
- [4] 沙磊, 张兰珍, 徐义侠, 等. RP-HPLC法测定余甘子中诃黎勒酸、没食子酸、粘酸-2-O-没食子酸酯的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 293-295.
- [5] 王秋霞, 贾美艳, 唐荣平, 等. 石榴籽化学成分及应用研究进展 [J]. 特产研究, 2006, 28(1): 53-55.
- [6] 张建春, 蔡雅明, 周德斌, 等. 木香的研究进展 [J]. 甘肃科技, 2010, 26(27): 170-173.
- [7] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [8] 王峰, 鄢琼芳, 华会明. 安息香属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 广东药学院学报, 2009, 25(5): 541-544.
- [9] 高飞, 傅超美, 胡慧玲, 等. HPLC-UV技术用于川木香煨制前后代谢物轮廓差异研究 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 547-551.