

HPLC 法测定不同 pH 条件下余甘子中 4 种成分的含量变化 *

黄 宽¹, 向润清¹, 林艾和¹, 张艳娇¹, 范 源^{1, 2△}

(1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500; 2. 云南中医药大学第二附属医院, 云南 昆明 650216)

摘要: 目的 建立同时测定余甘子中 4 种成分含量的 HPLC 法, 并研究在不同 pH 条件下 4 种成分含量变化。
方法 采用高效液相色谱法测定余甘子中焦性没食子酸 (Pyrogalllic acid, PA)、没食子酸 (Gallic acid, GA)、1, 3, 6-O-三没食子酰基葡萄糖 (1, 3, 6-tri-O-galloyl-β-D-glucose, TGG) 和 1, 2, 3, 4, 6-O-五没食子酰基葡萄糖 (1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-β-D-glucose, β-PGG) 的含量。色谱柱为 Agilent Zorbax C18 键合硅胶柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 25 ℃, 进样量为 10 μL, 测定不同 pH 条件下 4 种成分的含量。
结果 PA、GA、TGG 和 β-PGG 分别在 0.0229~0.2290 mg/mL ($r=0.9996, n=6$), 0.0148~0.1480 mg/mL ($r=0.9991, n=6$), 0.0018~0.0180 mg/mL ($r=0.9998, n=6$), 0.0031~0.0310 mg/mL ($r=0.9993, n=6$) 范围内呈良好的线性关系, 加样回收率均符合含量测定要求。余甘子中的 PA 在 pH 为 2 时含量最高; GA 在 pH 为 5 时含量最高; TGG 在 pH 为 4 时含量最多; β-PGG 在 pH 为 3 时含量最高。
结论 该方法简便、准确, 可以用于余甘子中 PA、GA、TGG 和 β-PGG 4 个成分的含量测定。通过研究不同 pH 条件下余甘子中的 PA、GA、TGG 和 β-PGG 的含量变化, 可为余甘子中相关成分的质控提供一定理论参考。

关键词: HPLC; 余甘子; 焦性没食子酸; 没食子酸; 1, 3, 6-O-三没食子酰基葡萄糖; 1, 2, 3, 4, 6-O-五没食子酰基葡萄糖

中图分类号: R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)06-0014-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.06.003

HPLC Method to Determine the Content of 4 Components of *Phyllanthus Emblica* under Different pH Conditions

HUANG Kuan¹, XIANG Runqing¹, LIN Aihe¹, ZHANG Yanjiao¹, FAN Yuan^{1, 2}

(1. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650216, China)

ABSTRACT: Objective An HPLC method was established for simultaneous determination of the contents of four components in *Phyllanthus Emblica*, and the changes of the contents of the four components under different pH conditions were studied. **Methods** The contents of PA, GA, TGG and β-PGG in *Phyllanthus Emblica* were determined by HPLC. The column was an Agilent Zorbax C18 bonded silica column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol -0.1% phosphoric acid gradient and the flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 280 nm at 25℃, the injection volume was 10 μL. Then the contents of four components under different pH conditions were determined. **Results** PA, GA, TGG, and β-PGG range from are 0.0229~0.2290 mg/mL ($r=0.9996, n=6$), 0.0148~0.1480 mg/mL ($r=0.9991, n=6$), 0.0018~0.0180 mg/mL ($r=0.9998, n=6$), 0.0031~0.0310 mg/mL ($r=0.9993, n=6$) respectively, showed a good linear relationship, and the recovery rates of the samples all met the requirements for content determination. The content of PA in *Phyllanthus emblica* was highest at pH 2, GA was highest at pH 5, TGG was highest at pH 4, β-PGG was highest at pH 3. **Conclusion**

收稿日期: 2019-11-02

* 基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(81360652); 云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项(2017FF117(-008)); 云南省高校中西医结合防治甲状腺病重点实验室项目

第一作者简介: 黄宽(1994-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理研究与应用。

△通信作者: 范源, E-mail: 1647909799@qq.com

This method is simple and accurate, and can be used to determine the content of PA, GA, TGG and β -PGG in *Phyllanthus Emblica*. By studying the content changes of PA, GA, TGG and β -PGG in *Phyllanthus Emblica* under different pH conditions, it can provide a certain theoretical reference for the quality control of related ingredients in *Phyllanthus Emblica*.

KEY WORDS: *Phyllanthus Emblica*; Gallic acid; Pyrogallol acid; 1,3,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose; 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose

余甘子为大戟科叶下珠属植物余甘子 *Phyllanthus emblica* L. 的干燥成熟果实,是藏族习用药材。其性味甘、酸、涩、凉;归肺、胃经;具有清热凉血,消食健胃,生津止渴的功效;常用于治疗血热血瘀、咳嗽、喉痛、口干、消化不良、腹胀等^[1]。余甘子中富含多酚鞣质类、黄酮类、有机酸、维生素、氨基酸等活性成分^[2],以多酚类鞣质含量最多^[3],具有抗菌^[4-5]、抗炎^[6]、抗病毒^[7]、抗肿瘤^[8-10]、抗氧化^[11-15]、降血糖^[16]等药理作用,研究发现没食子酸和其酯类衍生物可作为一种有价值的抗癌药物^[17-18]。没食子酸(Gallic acid, GA)、焦性没食子酸(Pyrogallol acid, PA)、1,3,6-O-三没食子酰基葡萄糖(1,3,6-tri-O-galloyl- β -D-glucose, TGG)、1,2,3,4,6-五-O-没食子酰基葡萄糖(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-

glucose, β -PGG)属天然水解类鞣质,没食子鞣质极不稳定,容易在酸、碱、酶的催化作用下水解,生成没食子酸和多元醇。GA 为弱酸性物质,在高温或催化条件下还原脱羧后可生成焦性没食子酸。 β -PGG 在酸、碱条件下发生水解,逐步生成四没食子酰葡萄糖、TGG、二没食子酰葡萄糖、葡萄糖和没食子酸^[19]。余甘子作为药食两用的传统习用民族药物,营养丰富,药效明确,目前其加工利用主要有果汁、果肉制成的饮料、果脯、果酒、果酱,其种子和提取物也常作为食品或添加剂使用^[20]。但余甘子在我国开发利用度还相对较低,为使其有效物质活性高,且不出现褐变反应,溶剂 pH 值尤为关键。本研究以提高余甘子质量标准为目的,以期获得有效控制余甘子质量的方法。

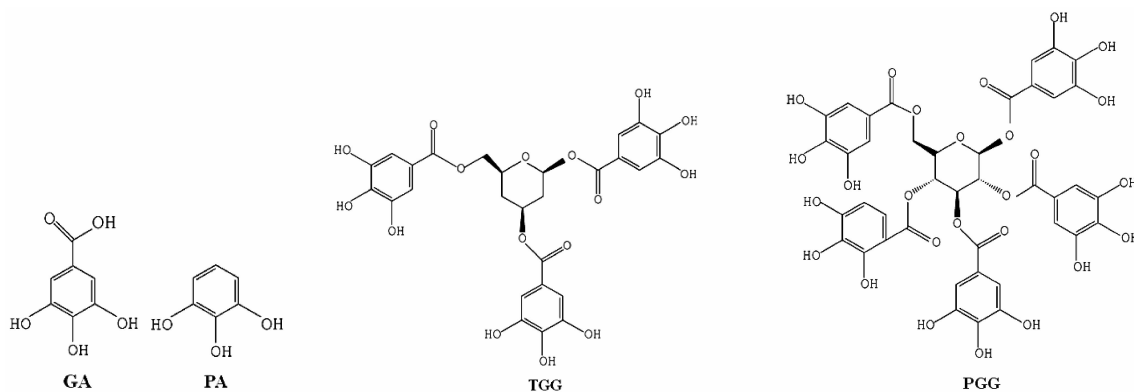


图1 化学结构

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),色谱柱为 Agilent Zorbax C18 键合硅胶柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m);语路超声波清洗机(深圳市即洁超声科技有限公司);DFY-600 摇摆式高速万能粉碎机(永康式速锋工贸有限公司);T-1000 型电子天平(上海浦春计量仪器有限公司);AB265-SMETTLER TOLEDO 十万分之一分析天平(Mettler-tolindo international trade(Shanghai)co.LTD)。

对照品:焦性没食子酸(PA 批号:TS0905CA14,

上海源叶生物科技有限公司)、没食子酸(GA 批号:wkq16081904, 四川省维克奇生物科技有限公司)、1,3,6-O-三没食子酰基葡萄糖(TGG 批号:CFN95043, 武汉天植生物技术有限公司)、1,2,3,4,6-O-五没食子酰基葡萄糖(β -PGG 批号:PRF10011001, 成都普瑞法科技开发有限公司);余甘子(批号:P20180612, 安国市旭芳中药材经营有限公司)。甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax C18 (4.6 mm×250

mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇(A)-0.1%磷酸(B), 梯度洗脱(0~2 min, 2%~5% A; 3~10 min, 5%~10% A; 10~26 min, 10%~15% A; 26~45 min, 15%~26% A; 45~75 min, 26%~35% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 25℃; 进样量: 10 μ L。理论塔板数按焦性没食子酸计算应不低于 3 000。色谱图见图 2。

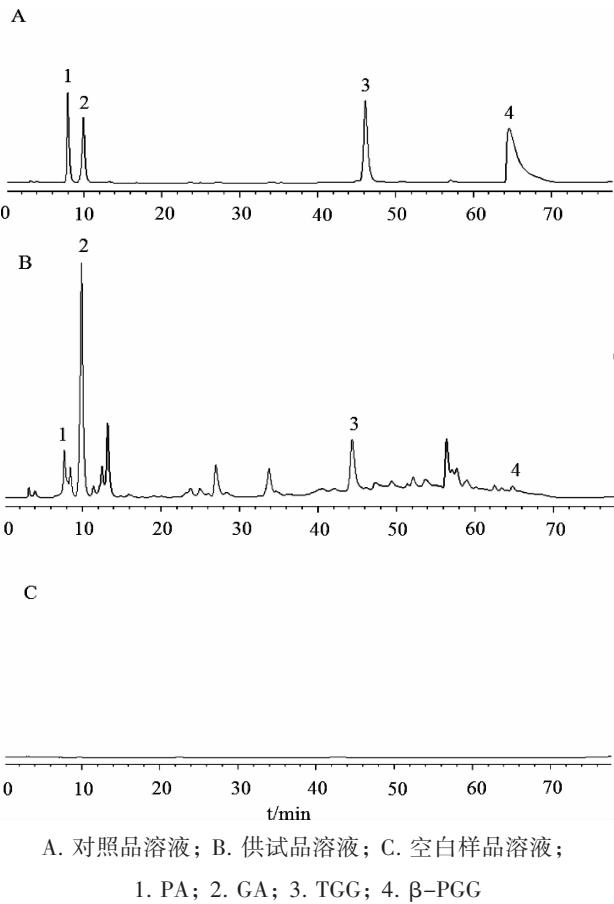


图 2 高效液相色谱图

2.2 溶液的制备

2.2.1 磷酸缓冲液 A 液: 10 mL 磷酸溶液, 加水定容至 100 mL; B 液: 7.2 g 磷酸氢二钠加水定容至 100 mL。分别取上述不同体积的 A 液和 B 液混合配制不同 pH(2、3、4、5、6、7、8)的磷酸盐缓冲溶液, 即得。

2.2.2 混合对照品溶液 分别精密称取各对照品适量, 加甲醇定容。配制各对照品质量浓度分别为焦性没食子酸 0.229 mg/mL、没食子酸 0.148 mg/mL、1,3,6-O-三没食子酰基葡萄糖 0.018 mg/mL、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖 0.031 mg/mL。

2.2.3 供试品溶液 精密称取干燥的余甘子粉末 2 g, 精密加 30 mL 的 70% 甲醇, 超声 60 min, 冷却后用甲醇补足减失质量, 过滤, 滤液浓缩后用甲醇定容

至 25 mL, 备用。用移液枪分别移取 1 mL 置于 6 个样品瓶中, 再分别加入 1 mL pH 为 2、3、4、5、6、7、8 的磷酸缓冲液, 摇匀静置, 即得不同 pH 条件下的供试品溶液。

2.2.4 空白样品溶液 因最终定容时所用的溶剂为甲醇, 故本研究中以甲醇作为空白溶液。

2.3 线性关系考察 配制不同质量浓度的对照品溶液, 在“2.1”项条件下依次连续进样, 以质量浓度(mg/mL)为横坐标(X), 峰面积(mAU*s)为纵坐标(Y)进行线性回归, 绘制标准曲线, 结果见表 1, 表明各成分均具有良好的线性关系。

表 1 线性关系考察结果

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
PA	$Y=3357.2X+84.156$	0.9996	0.0229~0.2290
GA	$Y=19235X+68.557$	0.9991	0.0148~0.1480
TGG	$Y=71454X-25.157$	0.9998	0.0018~0.0180
β -PGG	$Y=15222X+29.159$	0.9993	0.0031~0.0310

2.4 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液, 在“2.1”项条件下连续进样 6 次, 结果显示 PA、GA、TGG、 β -PGG 峰面积 RSD 分别为 0.72%、0.92%、1.15%、1.30%, 表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 在“2.1”项条件下, 分别于 2、4、6、8、10、12 h 进样, 结果显示 PA、GA、TGG、 β -PGG 10 h 内峰面积的 RSD 值分别为 1.21%、1.24%、1.11%、1.65%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验 取同一批余甘子粉末 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下进样, 结果显示 PA、GA、TGG、 β -PGG 含量 RSD 分别为 1.71%、1.15%、1.77%、1.56%, 表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批余甘子样品粉末 9 份, 每份精密称取 2 g, 分别按照药材含有量的 80%、100%、120% 加入混合对照品, 按“2.2.3”项下方法制备供试溶液, 在“2.1”项条件下进样, 结果见表 2。

2.8 含量测定 取 3 份不同批次余甘子样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下进样, 计算 4 种成分含量, 结果见表 3。

表 2 加样回收率试验(n=9)

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%	成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
PA	1.3861	1.1100	2.4842	98.93	100.27	1.70	TGG	0.1664	0.1330	0.3031	102.78	100.67	1.71
	1.3861	1.1100	2.5238	102.50				0.1664	0.1330	0.2978	98.85		
	1.3861	1.1100	2.5027	100.60				0.1664	0.1330	0.3	101.35		
	1.3861	1.3900	2.7456	97.81				0.1664	0.1660	0.3364	102.41		
	1.3861	1.3900	2.7558	98.54				0.1664	0.1660	0.3314	99.42		
	1.3861	1.3900	2.7942	101.30				0.1664	0.1660	0.3339	100.90		
	1.3861	1.6600	2.9897	99.66				0.1664	0.1980	0.3701	102.88		
	1.3861	1.6600	3.0438	99.86				0.1664	0.1980	0.3635	99.55		
	1.3861	1.6600	3.0992	103.20				0.1664	0.1980	0.3602	97.89		
GA	2.695	2.1500	4.842	99.86	99.89	1.40	β-PGG	0.1884	0.1520	0.3408	100.26	100.25	1.74
	2.695	2.1500	4.815	98.60				0.1884	0.1520	0.3396	99.45		
	2.695	2.1500	4.907	102.88				0.1884	0.1520	0.3373	97.97		
	2.695	2.6900	5.396	100.41				0.1884	0.1880	0.3834	103.72		
	2.695	2.6900	5.365	99.26				0.1884	0.1880	0.3769	100.27		
	2.695	2.6900	5.409	100.89				0.1884	0.1880	0.3756	99.56		
	2.695	3.2300	5.848	97.62				0.1884	0.2260	0.4138	99.73		
	2.695	3.2300	5.907	99.44				0.1884	0.2260	0.4205	102.70		
	2.695	3.2300	5.928	100.09				0.1884	0.2260	0.4112	98.57		

表 3 含量测定结果(mg/g)

批次	PA	GA	TGG	β-PGG
P20180612	0.6513	1.3590	0.0864	0.0892
P20180120	0.6904	1.3514	0.0840	0.0934
P20181119	0.6718	1.3482	0.0852	0.0924

2.9 不同 pH 条件下含量变化 在缓冲液 pH 值为 2~5 的区间,随着 pH 的增大,PA 含量呈逐渐减少的趋势;pH 值为 5~6 的区间,随着 pH 的增大,PA 含量呈逐渐增加的趋势;pH 值为 6~8 的区间,随着 pH 的增大,PA 含量逐渐减少,且当 pH 值为 2 时,在所测 pH 值范围中含量达到最高。在缓冲液 pH 值为 2~5 的区间,随着 pH 的增大,GA 含量逐渐增加;pH 值为 5~6 的区间,随着 pH 的增大,GA 含量急剧减少;pH 值为 6~8 的区间,随着 pH 的增大,GA 含量逐渐下降,且当 pH 值为 5 时,在所测 pH 值范围中含量达到最高。在缓冲液 pH 值为 2~4 的区间,随着 pH 的增大,TGG 含量逐渐增加;pH 值为 4~8 的区间,随着 pH 的增大,

TGG 含量逐渐减少;且当 pH 值为 4 时,在所测 pH 值范围中含量达到最高。在缓冲液 pH 值为 2~3 的区间,随着 pH 的增大,β-PGG 含量逐渐增加;pH 值为 3~5 的区间,随着 pH 的增大,PGG 含量逐渐减少;pH 值为 5~8 的区间,随着 pH 的增大,PGG 含量缓慢增加随后逐渐减少,且当 pH 值为 3 时,在所测 pH 值范围中含量达到最高。结果见表 4 和图 2。

表 4 不同 pH 条件下余甘子中 GA、PA、TGG、β-PGG 的含量变化(mg/g)

pH 值	PA	GA	TGG	β-PGG
2	0.5330	0.3898	0.0496	0.0364
3	0.2649	0.5499	0.0603	0.0417
4	0.1398	0.6750	0.0841	0.0276
5	0.0862	0.9401	0.0561	0.0226
6	0.1681	0.3901	0.0468	0.0253
7	0.0817	0.3391	0.0201	0.0148
8	0.0609	0.1486	0.0094	0.0052

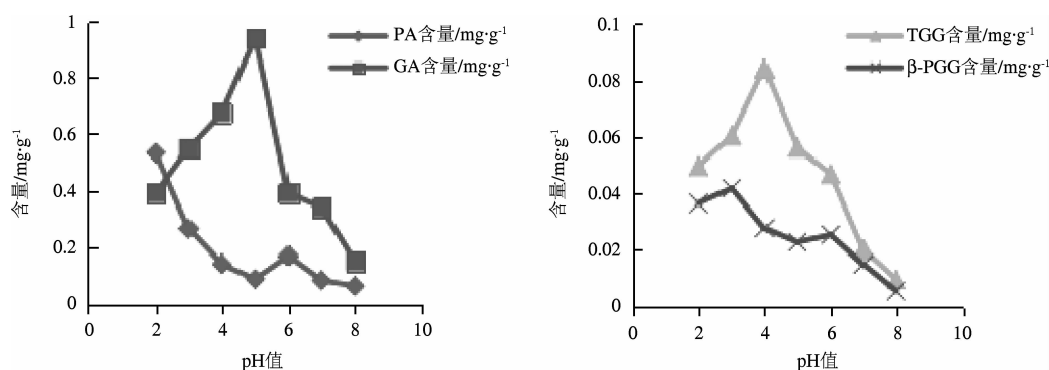


图 3 不同 pH 条件下余甘子中 4 种成分含量变化

3 讨论

云南省是主要的余甘子野生资源分布区^[21],余甘子作为一种多民族习用药材,具有广泛的药学应用价值。根据多酚鞣质类化合物易分解的化学性质,本研究测定不同 pH 条件下余甘子中 PA、GA、TGG 和 β-PGG 的含量变化,4 种成分的测定可以为丰富和完善余甘子的质控体系提供参考。结果表明在 pH 2~8 之间,PA 含量随 pH 的增大而减小,原因可能是 PA 在碱性条件下分解,随着 pH 升高,其分解增加,在 pH 为 6 时,可能是因为 GA 分解产生的 PA,PA 含量稍有增加;GA 含量随 pH 的增大而减少,在 pH 为 5 时含量最高,可能是由于 β-PGG 在酸性条件下水解,随着 pH 升高,GA 含量减少;TGG 含量随着 pH 增大含量增加,原因可能是 β-PGG 分解导致的含量增加,在 pH 为 4 时含量达到最高;β-PGG 含量随着 pH 的增大而减小,可能是 β-PGG 自身水解的原因。

余甘子作为主产于云南的常用藏方三果汤其中的一味,具有潜在而大的价值。本实验对不同 pH 条件下余甘子中 PA、GA、TGG 及 β-PGG 含量变化进行了研究,可为余甘子相关成分的质控、提取加工以及养护提供一定的理论参考。

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] VARIYA B C,BAKRANIA A K,PATEL S S. Emblica officinalis (Amla):A review for its phytochemistry,ethnomedicinal uses and medicinal potentials with respect to molecular mechanisms [J]. Pharmacological Research,

2016,111:180-200.

- [4] DINESH M,ROOPAN S M,SELVARAJ C I,et al. Phyllanthus emblica seed extract mediated synthesis of PdNPs against antibacterial,heamolytic and cytotoxic studies[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B-biology, 2017,167:64-71.
- [5] 曹莉莉,王芳,杨贺忠,等. 余甘子果实水溶性多糖抑菌及群体感应抑制活性初探 [J]. 亚热带植物科学,2015,44(4):289-292.
- [6] 李伟,朱华伟,陈运娇,等. 余甘子不同溶剂提取物抗炎活性的研究 [J]. 天然产物研究与开发,2018,30(3):418-424.
- [7] YADAV S S,SINGH M K,SINGH P K,et al. Traditional knowledge to clinical trials:A review on therapeutic actions of Emblica officinalis [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2017,93:1292-1302.
- [8] WANG C C,YUAN J R,WANG C F,et al. Anti-inflammatory effects of phyllanthus emblica L on benzopyrene-induced precancerous lung lesion by regulating the IL-1β/miR-101/Lin28B signaling pathway [J]. Integrative Cancer Therapies,2017,16(4):505-515.
- [9] ZHAO T,SUN Q,MARQUES M,et al. Anticancer properties of phyllanthus emblica(indian gooseberry)[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity,2015,2015:950890.
- [10] 陈静,冯光远,李登科,等. 藏药余甘子鞣质部位对人肿瘤细胞凋亡与周期的影响 [J]. 中国药物警戒,2016,13(4):193-196.
- [11] POLTANOV E A,SHIKOV A N,DORMAN H J,et al. Chemical and antioxidant evaluation of Indian gooseberry (emblica officinalis gaertn,syn. phyllanthus emblica L.) Supplements [J]. Phytotherapy Research,2009,23(9):1309-1315.
- [12] PIENAWEEERATCH S, PANAPISAL V, TANSIRI -

- KONGKOL A. Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *phyllanthus emblica*, *manilkara zapota* and *silymarin*; an in vitro comparative study for anti-aging applications [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54(9):1865-1872.
- [13] LI Y, SUN H Y, YU X Y, et al. Evaluation of cellular antioxidant and antiproliferative activities of five main *phyllanthus emblica* L. cultivars in China [J]. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 77 (3):274-282.
- [14] 杨冰鑫, 刘晓丽. 余甘子总多酚的提取及其抗氧化活性研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(16):151-155.
- [15] LI Y, CHEN J, CAO L, et al. Characterization of a novel polysaccharide isolated from *Phyllanthus emblica* L. and analysis of its antioxidant activities [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55(7):2758-2764.
- [16] 王锐. 余甘子多糖体外降血糖及抗氧化活性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(17):189-192, 224.
- [17] LOCATELLI C, FILIPPIN-MONTEIRO F B, CRECZYNSKI-PASA T B. Alkyl esters of gallic acid as anticancer agents: A review [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 60:233-239.
- [18] CHOUBEY S, VARUGHESE L R, KUMAR V, et al. Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: A patent review [J]. *Pharm Pat Anal*, 2015, 4(4):305-315.
- [19] KROOK M A, HAGERMAN A E. Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system [J]. *Food Research International*, 2012, 49(1):112-116.
- [20] 陈晓丹, 张俊仪, 林伟斌, 等. 余甘子提取物 HPLC 特征图谱研究[J]. *广东药科大学学报*, 2018, 34(3):282-287.
- [21] 雷虢, 瞿文林, 金杰, 等. 国内余甘子种质资源研究现状 [J]. *热带农业科学*, 2018, 38(9):40-44.