

HPLC-DAD 法同时测定四磨汤口服液中 5 种多酚

杨雅蛟，孔维军，孙 兰，孙桂波，周立东*
(中国医学科学院药用植物研究所，中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室，北京 100193)

摘要：目的 建立 HPLC-DAD 法同时测定四磨汤口服液（槟榔、枳壳、乌药等）中 5 种多酚的含有量。方法 该药物提取液的分析采用 XSelect HSS T3 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈-2% 乙酸，梯度洗脱；体积流量 1.0 mL/min；柱温 25 ℃；检测波长 280 nm。**结果** 焦性没食子酸、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯分别在 7.94~158.72、11.96~239.28、19.96~399.20、15.90~318.08、11.98~239.52 μg/mL 范围内线性关系良好（ $R^2 \geq 0.999\ 0$ ），平均加样回收率分别为 101.58%、101.74%、100.12%、101.53%、101.12%，RSD 分别为 1.3%、1.2%、1.7%、0.8%、0.5%。四磨汤口服液中未检测出儿茶素，其他 4 种成分含有量低于槟榔液中。**结论** 该方法准确、灵敏、简便，可用于四磨汤口服液的质量控制。
关键词：四磨汤口服液；焦性没食子酸；表没食子儿茶素；儿茶素；表儿茶素；表没食子儿茶素没食子酸酯；HPLC-DAD
中图分类号：R927.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2020)05-1139-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.05.007

Simultaneous determination of five polyphenols in Simotang Oral Liquid by HPLC-DAD

YANG Ya-jiao，KONG Wei-jun，SUN Lan，SUN Gui-bo，ZHOU Li-dong*
(Ministry of Education Key Laboratory for Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine; Institute for Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC-DAD method for the simultaneous content determination of five polyphenols in Simotang Oral Liquid (*Arecae Semen*, *Aurantii Fructus*, *Linderae Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of extract of this drug was performed on a 25 ℃ thermostatic XSelect HSS T3 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-2% acetic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 280 nm. **RESULTS** Pyrogalllic acid, epigallocatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin gallate showed good linear relationships within the ranges of 7.94–158.72, 11.96–239.28, 19.96–399.20, 15.90–318.08, 11.98–239.52 μg/mL ($R^2 \geq 0.999\ 0$), whose average recoveries were 101.58%, 101.74%, 100.12%, 101.53%, 101.12% with the RSDs of 1.3%, 1.2%, 1.7%, 0.8%, 0.5%, respectively. Catechin was not detected in Simotang Oral Liquid, and the other four constituents' contents were lower than those in *Arecae Semen* solution. **CONCLUSION** This accurate, sensitive and simple method can be used for the quality control of Simotang Oral Liquid.
KEY WORDS: Simotang Oral Liquid; pyrogalllic acid; epigallocatechin; catechin; epicatechin; epigallocatechin gallate; HPLC-DAD

四磨汤最早记载于《重订严氏济生方》，由槟榔、枳壳、乌药、木香组成，具有顺气降逆、消积止痛的功效，用于婴幼儿乳食内滞证，中老年气滞、食积证，以及腹部术后促进肠胃功能恢复^[1-2]。

收稿日期：2019-09-12
基金项目：中医药行业科研专项项目（201507004）
作者简介：杨雅蛟（1995—），女，从事天然药物化学研究。Tel: (010) 57833289, E-mail: 451383063@qq.com
* 通信作者：周立东（1966—），男，硕士，研究员，从事天然药物化学研究。Tel: (010) 57833289, E-mail: ldzhou@implad.ac.cn

方中槟榔是棕榈科植物槟榔 *Areca catechu* L. 的干燥成熟种子，为我国四大南药之一^[3]，李晨等^[4]发现其有效成分可促进大鼠胃平滑肌收缩，它作为主要组成药味在传统使用过程中无毒性记载，但长期咀嚼时易引发口腔癌，对消化系统造成损伤，具有引发食道癌的风险^[5]，2003 年被世界卫生组织的国际癌症研究中心（IARC）认定为一级致癌物^[6]。槟榔主要有效成分是生物碱和多酚^[7]，杨博等^[8]发现高浓度槟榔碱有致口腔黏膜纤维化的作用，但少量入药并不会引起该症状，另外其中还含有大量鞣质，主要包括儿茶素、焦性没食子酸、表没食子儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯等多酚类化合物^[9-10]。Ranadive 等^[11]采用涂抹等方法使仓鼠颊囊长期暴露在槟榔多酚中，发现大块不典型损害、癌前损害、癌瘤多种黏膜损害；还有学者认为，槟榔中含有大量多酚，在碱性条件下会产生一些致癌的含氧自由基，从而引发口腔癌^[12]。

由于四磨汤中槟榔所含的多酚是其潜在毒性风险物质，故采用准确可靠的分析方法检测该类成分含有量对探析其致癌原因和机理具有重要意义。本实验建立了 HPLC-DAD 法同时测定四磨汤口服液中 5 种多酚的含有量，具有操作简便、时间短、效率高等优势，可为其质量控制提供技术支撑和数据支持。

1 材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪，配置 PDA 996 检测器（美国 Waters 公司）；JM-30001 型电子天平（余姚纪铭称重校验设备有限公司）；N-1100 型旋转蒸发器（上海爱朗仪器有限公司）；DLSB-5/20 型低温冷却循环仪（郑州长城科工贸有限公司）；GP110-230 型无油隔膜泵（美国 New Ipswich 公司）。

槟榔液（批号 161203）、四磨汤口服液（批号 1801101666）均由湖南汉森制药股份有限公司提供。焦性没食子酸（批号 200401，纯度 99.2%）、表没食子儿茶素（批号 161122，纯度 99.7%）、儿茶素（批号 201604，纯度 99.8%）、表儿茶素（批号 200102，纯度 99.4%）、表没食子儿茶素没食子酸酯（批号 161201，纯度 99.8%）对照品均由北京中科质检生物技术有限公司提供。

乙腈为色谱纯（美国 Fisher 公司，批号 106246）；乙酸为色谱纯（天津市光复科技发展有限公司，批号 12NK4021-2013）；石油醚为分析纯

（北京市通广精细化工公司，批号 20180717，60~90℃）；乙酸乙酯为分析纯（北京市通广精细化工公司，批号 20190613）；水为娃哈哈纯净水（批号 201807011117GQ）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 XSelect HSS T3 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-2% 乙酸（B），梯度洗脱（0~15 min，5%~10% A；15~23 min，10%~5% A；23~25 min，5% A）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 25℃；进样量 5 μL。

2.2 供试品溶液制备 精密量取 10 mL 口服液至分液漏斗中，10 mL 石油醚（沸程 60~90℃）萃取 3 次，弃去石油醚萃取层，再用 10 mL 乙酸乙酯萃取 3 次，合并乙酸乙酯萃取层，浓缩至干，乙腈-2% 乙酸（50：50）定容于 5 mL 量瓶中，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得，待用。

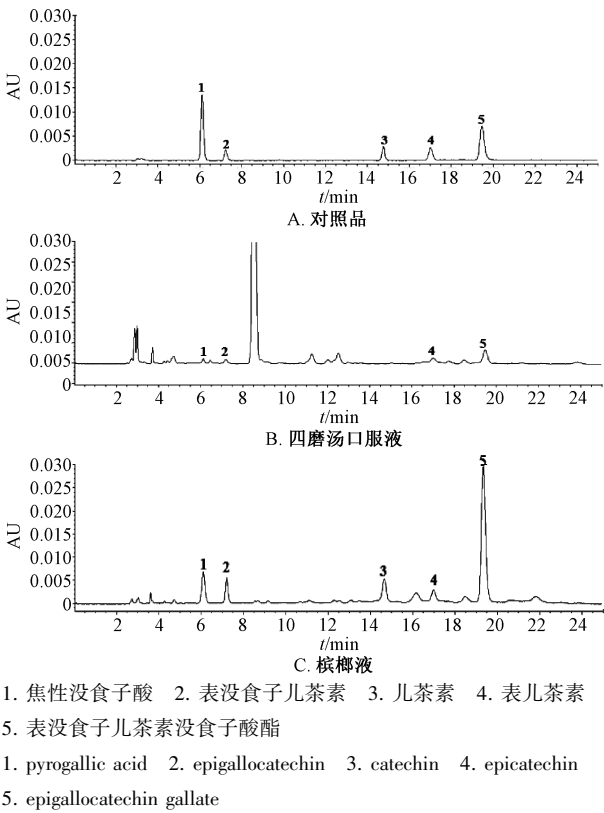
2.3 对照品溶液制备 精密称取对照品焦性没食子酸 10.0 mg、表没食子儿茶素 15.0 mg、儿茶素 25.0 mg、表儿茶素 20.0 mg、表没食子儿茶素没食子酸酯 15.0 mg，置于 25 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，精密量取 2 mL 于 5 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，摇匀，即得（含 158.72 μg/mL 焦性没食子酸、239.28 μg/mL 表没食子儿茶素、399.20 μg/mL 儿茶素、318.08 μg/mL 表儿茶素、239.52 μg/mL 表没食子儿茶素没食子酸酯）。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 取对照品、供试品（口服液、槟榔汤）溶液适量，在“2.1”项下色谱条件进样测定，结果见图 1。由此可知，各多酚分离效果良好，峰形理想，满足检测需求。

2.4.2 线性关系考察 精密量取 0.1、0.5、0.8、1.2、1.5、2.0 mL 对照品溶液至 2 mL 量瓶中，甲醇稀释至刻度，制成 6 个质量浓度的溶液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以峰面积为纵坐标（Y），溶液质量浓度为横坐标（X）进行回归，结果见表 1，可知各多酚在各自范围内线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 取“2.3”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得焦性没食子酸、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯含有量 RSD 分别为 0.5%、0.3%、0.6%、0.4%、0.5%，保留时间 RSD 分别为 1.0%、0.5%、1.0%、0.6%、0.9%，



1. 焦性没食子酸 2. 表没食子儿茶素 3. 儿茶素 4. 表儿茶素
5. 表没食子儿茶素没食子酸酯
1. pyrogallallic acid 2. epigallocatechin 3. catechin 4. epicatechin
5. epigallocatechin gallate

图 1 各多酚 HPLC-DAD 色谱图

Fig. 1 HPLC-DAD chromatograms of various polyphenols

表 1 各多酚线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various polyphenols

成分	回归方程	R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检测限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
焦性没食子酸	$Y=9.85\times10^3X+1.29\times10^3$	0.999 7	7.94~158.72	0.06	0.22
表没食子儿茶素	$Y=1.49\times10^5X-4.57\times10^3$	0.999 6	11.96~239.28	0.11	0.37
儿茶素	$Y=1.39\times10^4X+5.18\times10^3$	0.999 9	19.96~399.20	0.12	0.39
表儿茶素	$Y=1.14\times10^6X-2.12\times10^4$	0.999 0	15.90~318.08	0.21	0.71
表没食子儿茶素没食子酸酯	$Y=1.01\times10^6X-1.41\times10^5$	0.999 1	11.98~239.52	0.01	0.03

2.4.7 样品含有量测定 取四磨汤口服液、槟榔液各 6 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 3。

3 讨论

3.1 色谱条件筛选

3.1.1 色谱柱 本实验考察了 Tnatue C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、XSelect HSS T3 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱对 5 种多酚的分离效果和峰形，发现后者更理想，故选择其作为色谱柱。

3.1.2 流动相 本实验考察了不同流动相（甲醇-水、乙腈-水、甲醇-2% 乙酸、乙腈-2% 乙酸），发现以甲醇-水洗脱时，色谱峰分离时间长，拖尾严重；以乙腈-水洗脱时，色谱峰分离时间比甲醇-水

表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得焦性没食子酸、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯含有量 RSD 分别为 1.2%、0.8%、0.9%、1.0%、0.8%，保留时间 RSD 分别为 1.0%、0.9%、1.0%、0.8%、0.8%，表明该方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一供试品溶液，室温下于 0、4、8、12、16、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得焦性没食子酸、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素没食子酸酯含有量 RSD 分别为 0.8%、1.0%、0.9%、0.9%、1.0%，保留时间 RSD 分别为 0.5%、0.8%、0.5%、1.0%、1.2%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密吸取 9 份各多酚含有量已知的口服液，每份 10 mL，置于分液漏斗中，每 3 份为 1 组，按 80%、100%、120% 水平加入对照品溶液，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见表 2。

短，但拖尾依然严重；以甲醇-2% 乙酸洗脱时，色谱峰没有出现拖尾现象，但分离时间长；以乙腈-2% 乙酸洗脱时，色谱峰没有出现拖尾现象，分离时间也短，故选择其作为流动相。然后，考察了等度洗脱（20：80，流动相 1）、梯度洗脱（0~18 min，5%~20% 乙腈；18~23 min，20%~5% 乙腈；23~25 min，5% 乙腈，流动相 2）、梯度洗脱（0~15 min，5%~10% 乙腈；15~23 min，10%~5% 乙腈；23~25 min，5% 乙腈，流动相 3）的分离效果，发现以流动相 1 洗脱时，分离时间长，色谱峰不能较好分离；以流动相 2 洗脱时，5 种多酚完全分离，表儿茶素与其前 1 个色谱峰未得到完全分离，需降低乙腈比例；以流动相 3 洗脱时，表儿茶素与其前 1 个色谱峰完全分离，故选择其作为流动相。

表 2 各多酚加样回收率试验结果 (n=9)						
Tab. 2 Results of recovery tests for various polyphenols (n=9)						
成分	原有量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
焦性没食子酸	0. 141	0. 110	0. 252	100. 91	101. 58	1. 3
	0. 141	0. 110	0. 255	103. 64		
	0. 141	0. 110	0. 254	102. 73		
	0. 141	0. 140	0. 280	99. 29		
	0. 141	0. 140	0. 283	101. 43		
	0. 141	0. 140	0. 284	102. 14		
	0. 141	0. 170	0. 313	101. 18		
	0. 141	0. 170	0. 315	102. 35		
	0. 141	0. 170	0. 312	100. 59		
表没食子儿茶素	0. 157	0. 125	0. 285	102. 40	101. 74	1. 2
	0. 157	0. 125	0. 287	104. 00		
	0. 157	0. 125	0. 285	102. 40		
	0. 157	0. 160	0. 318	100. 63		
	0. 157	0. 160	0. 319	101. 25		
	0. 157	0. 160	0. 317	100. 00		
	0. 157	0. 180	0. 339	101. 11		
	0. 157	0. 180	0. 340	101. 67		
	0. 157	0. 180	0. 341	102. 22		
儿茶素	—	0. 080	0. 079	98. 75	100. 12	1. 7
	—	0. 080	0. 080	100. 00		
	—	0. 080	0. 082	102. 50		
	—	0. 100	0. 099	99. 00		
	—	0. 100	0. 098	98. 00		
	—	0. 100	0. 102	102. 00		
	—	0. 120	0. 118	98. 33		
	—	0. 120	0. 121	100. 83		
	—	0. 120	0. 122	101. 67		
表儿茶素	0. 183	0. 145	0. 330	101. 38	101. 53	0. 8
	0. 183	0. 145	0. 331	102. 07		
	0. 183	0. 145	0. 333	103. 45		
	0. 183	0. 180	0. 364	100. 56		
	0. 183	0. 180	0. 366	101. 67		
	0. 183	0. 180	0. 365	101. 11		
	0. 183	0. 220	0. 406	101. 36		
	0. 183	0. 220	0. 408	101. 27		
	0. 183	0. 220	0. 405	100. 91		
表没食子儿茶素没食子酸酯	0. 258	0. 205	0. 466	101. 46	101. 12	0. 5
	0. 258	0. 205	0. 465	100. 98		
	0. 258	0. 205	0. 467	101. 95		
	0. 258	0. 260	0. 519	100. 38		
	0. 258	0. 260	0. 521	101. 15		
	0. 258	0. 260	0. 522	101. 54		
	0. 258	0. 310	0. 569	100. 33		
	0. 258	0. 310	0. 572	101. 29		
	0. 258	0. 310	0. 571	100. 97		

注:—表示未检出。

表 3 各多酚含有量测定结果 (mg/mL, n=6)

Tab. 3 Results of content determination of various polyphenols (mg/mL, n=6)

样品	焦性没食子酸	表没食子儿茶素	儿茶素	表儿茶素	表没食子儿茶素没食子酸酯
四磨汤口服液	0.029 2	0.031 7	—	0.036 4	0.051 8
	0.028 9	0.031 9	—	0.036 2	0.052 1
	0.028 7	0.031 5	—	0.036 7	0.052 4
	0.029 5	0.031 7	—	0.035 9	0.052 5
	0.029 7	0.032 1	—	0.036 4	0.051 9
	0.030 2	0.031 2	—	0.036 3	0.052 3
	0.029 4	0.031 7	—	0.036 3	0.052 2
平均值	0.114 3	0.094 1	0.125 3	0.073 6	0.361 7
	0.114 0	0.093 7	0.124 9	0.073 1	0.363 3
	0.113 7	0.093 8	0.124 6	0.073 9	0.360 9
	0.114 9	0.093 4	0.125 1	0.073 7	0.362 7
	0.113 9	0.094 3	0.124 7	0.072 5	0.362 9
	0.114 6	0.093 9	0.124 9	0.074 7	0.362 3
	0.114 2	0.093 9	0.124 9	0.073 6	0.362 3
平均值	0.114 2	0.093 9	0.124 9	0.073 6	0.362 3

注:—表示未检出。

3.2 样品前处理方法筛选 本实验考察了“直接进样”(方法1)、“石油醚萃取, 蒸干石油醚萃取层, 流动相溶解进样”(方法2)、“乙酸乙酯萃取, 蒸干乙酸乙酯萃取层, 流动相溶解进样”(方法3)、“先石油醚萃取, 弃去石油醚萃取层, 再用乙酸乙酯萃取, 蒸干乙酸乙酯萃取层, 流动相溶解进样”(方法4), 发现方法4能较好地排除样品杂质干扰, 从而实现灵敏检测。

3.3 含有量分析 在槟榔安全性评价中, 研究最多的是生物碱, 而多酚未有明确的安全性评价报道。本实验发现, 四磨汤口服液中主要多酚含有量低于槟榔液中, 并且不含儿茶素, 有望降低其致癌性, 其原因可能为在制备过程中槟榔与其他药材配伍后发生反应, 从而降低部分多酚含有量。

4 结论

目前, 关于槟榔多酚的报道较少, 对四磨汤口服液的研究也主要集中于槟榔碱、新弗林、去甲异尔定、柚皮苷、橙皮苷等成分, 鲜有涉及其他成分定量测定, 为了保证该制剂用药安全性, 需全面考虑其中多种成分的性质、含有量变化等。本实验采用HPLC-DAD法, 能实现四磨汤口服液中5种多酚含有量的同时测定, 而且线性范围宽, 分析速度快, 精密度、稳定性好, 可为槟榔及其复方的相关研究提供参考。

参考文献:

[1] 唐伟, 陈再林, 文春艳. 四磨汤口服液治疗新生儿功能性

消化不良 27 例临床观察[J]. 中医药导报, 2010, 16(10): 33-35.

[2] 杨华, 易小兰, 谢金华, 等. HPLC 同时测定四磨汤口服液中辛弗林、槟榔碱和去甲异波尔定的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 79-81.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 365.

[4] 李晨, 范尧夫, 吕涛, 等. 槟榔有效组分的提取分离及其对大鼠胃平滑肌收缩作用影响的研究[J]. 中医学报, 2013, 28(5): 683-685.

[5] 易攀, 汤嫣然, 周芳, 等. 槟榔的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2498-2504.

[6] World Health Organization International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans[R]. 2004.

[7] 易书瀚, 李珂, 杨靖, 等. 槟榔提取物的生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(7): 207-212.

[8] 杨博, 符梦凡, 唐瞻贵. 槟榔碱及机械刺激构建大鼠口腔黏膜下纤维化模型[J]. 华西口腔医学杂志, 2019, 37(3): 260-264.

[9] 蒋志, 陈其城, 曹立幸, 等. 槟榔及其活性物质的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1684-1687.

[10] Wei P, Liu Y J, Wu N, et al. *Areca catechu* L. (Arecaceae): A review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 164: 340-356

[11] Ranadive K J, Ranadive S N, Shivapupkar N M, et al. Betel quid chewing and oral cancer: experimental studies on hamsters[J]. *Int J Cancer*, 1979, 24(6): 835-843.

[12] 王豪. 槟榔水提液和四磨汤口服液中化学成分代谢研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.