

HPLC 测定地榆鞣质提取物中游离没食子酸的含量

徐佳丽¹, 苏柘僮¹, 陈龙¹, 黄晶¹, 杨胜², 杨明^{1,3*}

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 成都医学院, 成都 610083;
3. 江西中医学院中药现代制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 建立一种适于地榆鞣质提取物中游离的没食子酸含量测定的方法, 为地榆鞣质的提取工艺和质量标准研究提供参考。方法: 采用 HPLC, 考察色谱条件、样品溶液制备方法、专属性、线性与范围、精密度、稳定性及回收率, 并测定样品含量。结果: 确定色谱条件如下, 检测波长为 272 nm, 色谱柱为安捷伦 TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.05% 磷酸缓冲液 (5:95), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。样品溶液制备方法、专属性、线性与范围、精密度、稳定性及回收率均符合相关要求。样品中没食子酸含量在 3.21% ~ 4.05%, 均值为 3.71%。结论: 该法科学、合理、可行, 符合简便、快速、准确的要求, 为地榆鞣质的相关研究奠定了基础。

[关键词] 地榆鞣质; 没食子酸; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)20-0084-03

Study on the HPLC Method for Determination of Nomadic Gallic Acid in Diyu Tannin Extract

XU Jia-li¹, SU Zhe-tong¹, CHEN Long¹, HUANG Jing¹, YANG Sheng², YANG Ming^{1,3*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 610075, China;
2. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China;
3. Key Lab of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education,
Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, china)

[Abstract] **Objective:** To found HPLC method for the determination of nomadic gallic acid in diyu tannin extract, then offer some references for the extraction process and quality standard study of diyu tannin. **Method:** The chromatographic condition was investigated. The methods of preparing sample solution, specialization, linearity and linear range, precision, stability, recovery and the content of samples was determined. **Result:** The content of nomadic gallic acid was determined at 272 nm detection wavelength with methyl alcohol-0.05% phosphoric acid aqueous solution (5:95) as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the column temperature was at 30 °C. The methods of preparing sample solution, specialization, linearity and linear range, precision, stability, recovery of this method all met the relative requirements. The content of gallic acid in the preparing sample ranged from 3.21% to 4.05%, the average was 3.71%. **Conclusion:** The results indicated that above-mentioned method was not only scientific, reasonable, feasible, but simple, rapid and accurate as well; what follows next, it can provide the basis for the relative study of tannins.

[Key words] Diyu tannin; gallic acid; hplc; determination

地榆为蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 或长叶地榆 *Sanguisorba off icinalis* L. var. *longifolia* (Bert.) Yu et Li 的干燥根, 广布于我国黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古、四川、贵州、云南、西藏等地, 具有凉血止血、解毒敛疮之功效^[1-3]。地榆主要

[收稿日期] 20111123(007)

[第一作者] 徐佳丽, 硕士, 从事中药生产新技术和新剂型研究, Tel:028-61800127

[通讯作者] * 杨明, 教授, 博士生导师, 从事中药生产新技术和新剂型研究, Tel:028-61800127

含鞣质(17%)、三萜皂苷(2.4~4.0%)等成分^[4]。据课题组前期药效筛选,地榆所含鞣质类成分具有升高白细胞的药理作用,但是,关于地榆鞣质提取物的成药性研究较少。因此,为了深入研究,首先应建立地榆鞣质提取物的质量控制方法。《中国药典》2010年版一部地榆品种项下含量测定方法中选用的指标成分为没食子酸,是一种可水解鞣质(没食子鞣质)的水解产物^[5]。那么,没食子酸是地榆鞣质提取物的质量控制较理想的指标之一。目前,关于没食子酸的测定以HPLC法居多。但是,几乎是针对地榆药材及其制剂中的没食子酸,并且是水解后的没食子酸(水解时间一般需3h),耗时耗工,而对地榆鞣质提取物中游离的没食子酸的含量测定方法鲜见报道。为了建立一种更快速、简便、灵敏的含量测定方法,本文拟建立适于地榆鞣质提取物中游离没食子酸含量测定的方法,为地榆鞣质提取物成药性研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司),BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司),KQ-400DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),SZ-93型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂),DZF-1B型真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.2 试药 地榆(四川科伦天然药业有限公司,批号101205),没食子酸对照品(批号110831-200803,中国药品生物制品检定所),乙腈(色谱纯,Fisher公司),水(重蒸水,自制),微孔滤头(0.45 μm,Millipore公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件^[6-7] 取没食子酸对照品溶液(0.35 g·L⁻¹)进行全波长扫描,扫描范围200~700 nm。结果在272 nm处有最大吸收。因此,在本实验中采用272 nm作为检测波长。

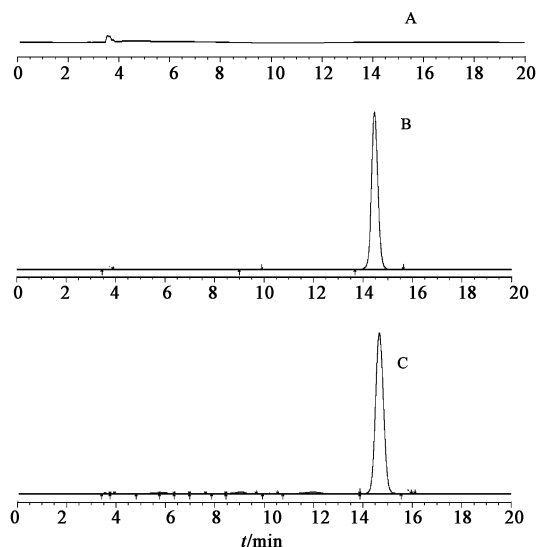
参照《中国药典》2010年版一部地榆药材项下方法以及预试结果,确定色谱柱为安捷伦TC-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.05%磷酸缓冲液(5:95),流速1.0 mL·min⁻¹,柱温30℃,进样量10 μL。

2.2 样品溶液制备 取适量样品细粉约50 mg,精密称定,置10 mL量瓶中,加甲醇约10 mL,超声处理30 min,取出,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过(0.45 μm),取续滤液,即得^[8-9]。

2.3 对照品溶液制备 取对照品适量,精密称定

3.50 mg,置10 mL量瓶中,加甲醇约10 mL,超声处理5 min,取出,放冷至室温,加甲醇至刻度,摇匀,即得(每1 mL中含没食子酸0.35 mg)。

2.4 专属性 分别配制空白溶剂、对照品溶液、样品溶液,以上述色谱条件进行试验,结果见图1,表明该方法专属性良好,各成分和溶剂之间无干扰。



A. 空白溶剂; B. 对照品; C. 样品; 1. 没食子酸

图1 专属性考察

2.5 线性与范围 取精密配制0.35 g·L⁻¹的对照品溶液,以上述色谱条件进样测定,以进样量(μg)为X,峰面积(mv·min)为Y,做线性回归,结果见表2,回归方程为 $Y = 3 \times 10^6 X - 264 197$,没食子酸在3.5~1.4 μg线性关系良好($R^2 = 0.999 9$)。

2.6 精密度 取同一样品6份,各约50 mg,按样品溶液制备方法制备样品溶液。按照上述色谱条件,平行测定6次,结果RSD 3.93%。

2.7 稳定性 取同一样品溶液,按照上述色谱条件,于2,4,6,8,10,12 h分别进样,对稳定性进行考察,结果RSD分别为1.06%,表明样品溶液在12 h内稳定。

2.8 回收率 取同一样品(已知含量为3.69%)9份,各约20 mg,精密称定,分别置10 mL的量瓶中,再分别加入高、中、低3档精密配制0.74 g·L⁻¹的对照品溶液,加甲醇至刻度。按2.2项下规定的方法操作,制成样品溶液,进样试验,测定峰面积,并计算加样回收率。试验结果见表3。结果样品的加样回收率在95.23%~104.90%,RSD 2.97%,表明该方法准确度良好。

$$\text{加样回收率} = \frac{\text{测得量} - \text{样品中含量}}{\text{加入量}} \times 100\%$$

表 1 没食子酸加样回收率 (n=3)

No	称样量 /mg	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	21.01	0.775	269	0.74	1.527	858	101.70
2	20.07	0.740	583	0.74	1.478	085	99.66
3	20.18	0.744	642	0.74	1.477	369	99.02
4	21.03	0.776	007	1.11	1.845	173	96.32
5	19.21	0.708	849	1.11	1.873	234	104.90
6	19.95	0.736	155	1.11	1.841	555	99.59
7	20.45	0.754	605	0.37	1.133	13	102.30
8	20.98	0.774	162	0.37	1.126	531	95.23
9	21.15	0.780	435	0.37	1.153	519	100.83

2.9 样品含量测定 根据上述色谱条件,分别对 6 份样品进行了含量测定,结果见表 4,可得样品中没食子酸含量范围 3.21% ~ 4.05%,平均含量为 3.71%。

表 2 样品含量测定

No	取样量/mg	测得含量/%	平均含量/%
1	33.66	3.88	3.71 ± 0.34
2	30.85	3.69	
3	32.03	4.05	
4	32.91	4.00	
5	35.09	3.21	
6	33.26	3.42	

3 结论

考虑到地榆鞣质提取物质量控制的需求,结合含量测定快速、简便、灵敏的基本原则,在样品溶液制备方法考察时,采用了水、乙醇、50% 甲醇、甲醇等

溶剂进行样品制备,不进行水解处理以提高方法的简便性、快速性。结果表明采用甲醇作为溶剂制备样品,测定专属性好、快速、简便,而其他溶剂均不能排除其他成分对没食子酸出峰的干扰。此外,其他相关方法学考察结果表明,方法精密度高,专属性、准确性、重复性及线性关系良好,回收率满意。本方法科学、合理、可行,符合简便、快速、准确的要求,可为今后地榆鞣质的提取工艺研究及质量标准制订等提供参考意见。

[参考文献]

- [1] 夏红旻,孙立立,孙敬勇,等.地榆化学成分及药理活性研究进展[J].食品与药品,2009,11(7):67.
- [2] 黎俊民.地榆临证应用分析[J].时珍国医国药,2007,18(11):2842.
- [3] 姜贵全,方桂珍,李密.吉林地区地榆的化学成分分析及评价[J].东北林业大学学报,2005,33(3):22.
- [4] 袁振海,孙立立.地榆现代研究进展[J].中国中医药信息杂志,2007,14(3):90.
- [5] 中国药典.一部[S].2010.
- [6] 丁家欣,张秋海,李淑莉,等.HPLC 测定虎耳草中没食子酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(3):19.
- [7] 毛艳,严欢,贺金华,等.RP-HPLC 法测定苏孜阿甫片中没食子酸的含量[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(4):49.
- [8] 张朔生.HPLC 测定炮制前后石榴皮中没食子酸的含量[J].药物分析杂志,2010,30(6):1104.
- [9] 史伟国,王丽敏,刘翠娟,等.地榆不同部位没食子酸的含量测定[J].黑龙江医药科学,2011,34(1):14.

[责任编辑 顾雪竹]