

大黄末中没食子酸的鉴别及含量测定方法研究

蔡文金, 包爱情, 陆春波

(浙江省兽药饲料监察所, 杭州 310012)

[收稿日期] 2015-09-06 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 1-0052-04 [中图分类号] S853.7

[摘要] 为了完善大黄末的质量控制方法,对大黄末中没食子酸的薄层鉴别和含量测定方法分别进行了研究。采用薄层色谱法鉴别没食子酸以及高效液相色谱法测定其含量。选用 Agilent Eclipse XDB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 甲醇-0.05% 磷酸溶液 (5:95) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长为 271 nm。试验结果没食子酸在 1.064~106.4 μg/mL 浓度范围内, 线性关系良好 ($r = 1.0000$); 平均回收率 ($n = 6$) 为 97.84% ($RSD = 0.61\%$)。薄层色谱斑点清晰, 分离度好。本方法准确灵敏, 可用于大黄末中没食子酸的质量控制。

[关键词] 大黄末; 没食子酸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

Study on the Determination and Identified of Gallic Acid in Rhubarb Powder

Cai Wen-jin, Bao Ai-qing, Lu Chun-bo

(Zhejiang Province Institute of veterinary Drug and Feedstuff, Hangzhou 310012, China)

Abstract: To perfect the quality control method of rhubarb powder. Gallic acid was identified by thin layer chromatography (TLC) and determined by high performance liquid chromatography (HPLC). A chromatographic column of Agilent Eclipse XDB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used, with the mobile phase of methanol-0.05% phosphoric acid solution (5:95) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was at 271 nm. The calibration curves were linear in ranges of 1.064~106.4 μg/mL ($r = 1.0000$) for gallic acid; the average recoveries ($n = 6$) was 97.84% ($RSD = 0.61\%$). The method is accurate and sensitive for the quality control of rhubarb powder.

Key words: rhubarb powder; gallic acid; TLC; HPLC

大黄末收载于《中国兽药典》二〇一〇年版二部,为单味大黄制成的中兽药散剂^[1]。具有健胃消食,泻热通肠,凉血解毒,破积行瘀功效,用于食欲不振,实热便秘,结症,疮黄疔毒,目赤肿痛,烧伤烫伤,跌打损伤,还可以用于治疗鱼肠炎,烂鳃,腐皮^[2]。大黄为常用中药,主要含有蒽醌类、二苯乙烯苷类、苯丁酮类,鞣质及相关的多酚类成分。现

代药理表明蒽醌类为大黄泻下作用的主要有效成分,没食子酸等鞣质为大黄收敛止血作用的主要有效成分^[3]。大黄末现行质量标准中仅有蒽醌类的薄层色谱鉴别和含量测定,无鞣质的鉴别和含量测定。查阅文献,未发现有 大黄中没食子酸薄层色谱鉴别的相关报道,本试验参照石榴皮药材中的没食子酸鉴别^[1]和含量测定方法^[4-5],对大黄末中没食

子酸的薄层鉴别和含量测定方法分别进行了研究。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, 配 Waters 2996 二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司; AUTOMATIC TLC SAMPLER 4 全自动点样仪, ADC2 自动展开仪和 TLC VISUALIZER 薄层色谱成像系统, 瑞士 KAMAG 公司; XS-205 电子天平(感量 0.01 mg), 瑞士 METTLER TOLEDO 公司; KQ-500E 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

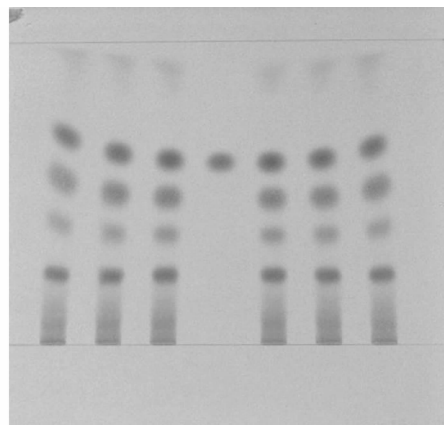
1.2 试剂与材料 甲醇为色谱纯, Merck 公司, 其余试剂均为分析纯; 实验用水为 milli-Q 超纯水。硅胶 G 薄层板, 100 mm × 200 mm, 厚度 0.20 ~ 0.25 mm, 青岛海洋化工厂生产。没食子酸对照品(中国食品药品检定检验院, 批号: 110831-201204, 含量: 89.9%)。大黄末样品(批号分别为 20141101, 20141102, 20141103), 浙江歌德动物药业生产; 大黄末样品(批号分别为 20150301, 20150302, 20150303, 20141203), 浙江东贸药业生产。

2 方法与结果

2.1 没食子酸的薄层色谱鉴别 取供试品 10 g, 加无水乙醇 30 mL, 加热回流 1 h, 滤过, 取滤液蒸干, 加水 20 mL 使溶解, 滤过, 滤液用石油醚(60 ~ 90 °C)提取 2 次, 每次 20 mL, 弃去石油醚液, 水液再用乙酸乙酯振摇提取 2 次, 每次 20 mL, 合并乙酸乙酯液, 蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。另取没食子酸对照品 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。照薄层色谱法, 吸取上述两种溶液各 5 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷(用水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(6:5:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 1% 三氯化铁乙醇溶液。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。斑点清晰, 分离度好。结果见图 1。

2.2 没食子酸的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.05%



1 供试品(批号20141101); 2 供试品(批号20141102);
3 供试品(批号20141103); 4 对照品; 5 供试品(批号20150301);
6 供试品(批号20150302); 7 供试品(批号20150303)

图1 没食子酸薄层鉴别图谱

磷酸溶液(5:95); 流速 1.0 mL/min; 采集波长 200 ~ 400 nm, 分辨率为 1.2 nm; 进样量: 20 μL; 柱温 30 °C。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品 23.68 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 为对照品储备液。精密量取上述溶液 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得 21.29 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取大黄末约 0.1 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加水 20 mL, 超声提取 30 min, 静置 30 min, 再加水至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.4 系统适应性试验 分别取对照品溶液、供试品溶液注入液相色谱仪, 同时记录光谱图和 271 nm 处的色谱图, 分别见图 2、图 3。在该色谱条件下, 理论板数按没食子酸峰计为 10403, 没食子酸可以得到很好的分离。

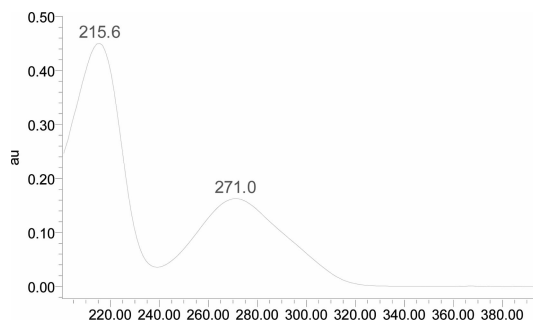


图2 没食子酸光谱图

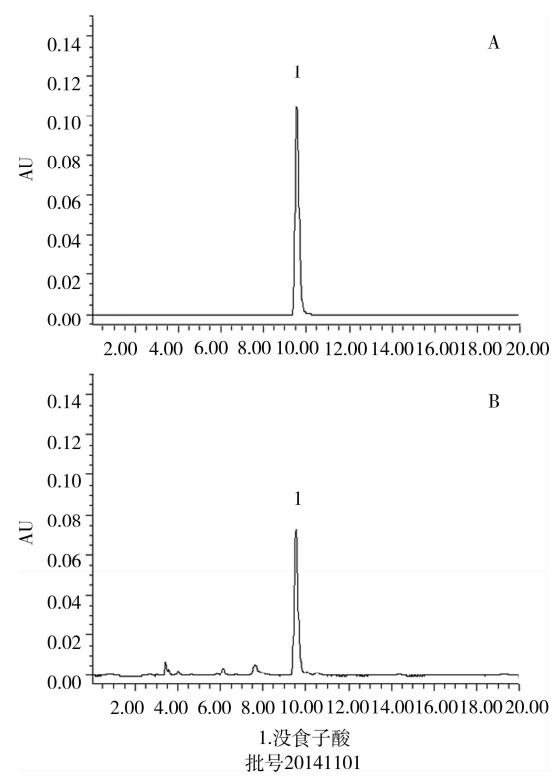


图3 对照品溶液(A)和供试品溶液(B)色谱图

2.2.5 线性关系考察 分别精密量取对照品储备液适量,用水稀释成浓度约为1、2、5、10、20、50、100 μg/mL的系列溶液,精密量取20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。以浓度(*X*)为横坐标,峰面积(*Y*)为纵坐标,绘制标准曲线,所得线性方程为:

$Y = 64897X - 11277 (r = 1.0000)$ 。结果表明没食子酸对照品溶液在1.064 ~ 106.4 μg/mL浓度范围内,线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密量取浓度为53.22 μg/mL的对照品溶液20 μL注入液相色谱仪,按2.2.1色谱条件连续进样6次,记录色谱图。结果没食子酸峰面积的相对标准偏差(*RSD*)为0.4%,表明精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一批供试品溶液(批号20141103),分别在样品处理后的0、2、4、6、8、12 h进样,测定峰面积相对标准偏差(*RSD*)为0.8%,表明溶液在12 h内稳定。

2.2.8 重复性试验 取大黄末样品(批号20141103)5份,按“2.2.3”项下的方法制备供试品溶液,分别进样测定含量。结果样品中没食子酸含量的相对标准偏差(*RSD*)为0.7%,说明方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取“2.2.8”项下已测含量的大黄末样品(批号20141103)0.05 g,共6份,精密称定,置25 mL量瓶中,分别加212.9 μg/mL没食子酸对照品储备液850 μL,按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下条件检测,回收率结果见表1。

表1 回收率试验结果

编号	取样量/g	样品含量/μg	添加量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
1	0.0504	179.4	181.0	353.2	98.00	97.84	0.61
2	0.0501	178.4	181.0	353.6	98.39		
3	0.0511	181.9	181.0	354.2	97.60		
4	0.0526	187.3	181.0	356.3	96.74		
5	0.0512	182.3	181.0	357.1	98.29		
6	0.0521	185.5	181.0	359.3	98.04		

2.2.10 样品的测定 取供试品溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法计算没食子酸含量,结果见表2。

3 讨论与小结

3.1 TLC 鉴别中展开系统以及薄层板的选择 考

察了乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(10:1:1:1)、甲苯(用水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(6:3:1)、石油醚(60~90℃)(用水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(6:5:1)以及环己烷(用水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(6:5:1)4种展开系统,结果表明:采用乙酸乙酯-丁

表 2 大黄末中没食子酸含量测定结果		
样品批号	没食子酸含量/(mg·g ⁻¹)	相对偏差/%
20141101	3.81	0.8
20141102	3.74	0.7
20141103	3.56	0.8
20150301	3.24	0.6
20150302	3.29	0.4
20150303	3.25	0.5
20141203	2.52	0.8

酮-甲酸-水(10:1:1:1)色谱系统分离度较差;采用甲苯(用水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(6:3:1)R_f值为0.16,偏小;采用石油醚(60℃~90℃)(用水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(6:5:1)以及环己烷(用水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(6:5:1)分离度均较好,R_f值分别为0.57和0.60,但前者的斑点有扩散,综合考虑采用环己烷(用水饱和)-乙酸乙酯-甲酸(6:5:1)作为展开系统。

对硅胶G薄层板及聚酰胺薄膜做了比较,采用5 μL点样,喷以1%三氯化铁乙醇溶液以后观察,硅胶G薄层板显色更清晰,因此选用硅胶G薄层板。

3.2 含量测定中流动相及超声条件的选择 采用DAD在200 nm~400 nm进行全波长扫描,没食子酸对照品,在215.6 nm与271.0 nm波长处有最大吸收,215.6 nm波长太短,试剂容易产生干扰,故选择271 nm波长作为检测波长。参考文献^[4-6]对流动相的组成及不同比例进行了考察,发现流动相中加入磷酸有助于改善峰型,减少拖尾。选择甲醇-0.1%磷酸溶液(15:85)、甲醇-0.05%磷酸溶液(5:95)、乙腈-0.05%磷酸溶液(5:95)等系统作为流动相,试验结果发现,采用甲醇-0.05%磷酸溶液(5:95)为流动相,没食子酸与其他组分色谱峰可以得到较好的分离。

分别选择超声、加热回流、浸渍30 min的方法考察,结果表明超声与回流提取效果相当,均好于浸渍,考虑到超声操作便捷,故采用超声方法。考

察水、25% 甲醇、50% 甲醇、75% 甲醇超声提取30 min,结果表明水的提取效果最佳,这与范晓红等的研究^[7]基本一致。

超声15、30、45 min,考察超声时间对试验的影响,结果表明提取时间在15 min时提取不够充分,而当提取时间延长至45 min时与30 min并无显著差异。故选择超声时间为30 min。

本试验所采用的大黄末来自2个兽药企业7批次样品,不同批次大黄末样品中没食子酸的含量存在一定差异。但因采用的大黄药材受炮制加工^[8]等因素影响较大,要制订含量限度尚需进行收集大量样品进一步研究。

结果表明,在该薄层色谱条件下,没食子酸的薄层色谱斑点清晰,分离度好;在该液相色谱条件下,没食子酸峰与相邻组分峰的分离度好,该方法的精密度、重复性、回收率试验均符合规定,操作简便、快速,可作为制定大黄末质量标准的参考依据。

参考文献:

[1] 中国兽药典委员会. 中国兽药典二〇一〇年版二部[S].

[2] 中国兽药典委员会. 兽药使用指南中药卷二〇一〇年版[S].

[3] 匡海学. 中药化学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:94.

[4] 王云,李丽,张村,等. 大黄5种饮片没食子酸和儿茶素的含量比较影响[J]. 中国中药杂志,2010,35(17):2267-2269.

[5] 沈华,王正,李蕾,等. HPLC法同时测定没食子提取物中没食子酸、没食子酸甲酯和没食子酸乙酯的含量[J]. 齐鲁药事,2014,33(11):631-632.

[6] 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):1104-1106.

[7] 范晓红,李治建,斯拉甫,艾白,等. 没食子中没食子酸含量测定及总鞣质提取方法的研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(5):1119-1121.

[8] 雷鹏,李新中,朱诗塔,等. 不同炮制方法对大黄中没食子酸含量的影响[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(6):477-479.

(编辑:陈希)