

重庆产泽漆中总酚酸与没食子酸的含量分析

张丹¹, 郑秀云², 曹伟国^{1*}, 王刚¹, 颜学伟¹ (1.重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331; 2.四川省邛崃市医疗中心医院设备科, 四川 邛崃 611530)

摘要: 目的 建立泽漆中总酚酸与没食子酸含量分析的方法, 研究重庆产泽漆中总酚酸与没食子酸的含量。方法 采用 $\text{FeCl}_3\text{-K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 比色法测定泽漆中总酚酸的含量, 以没食子酸为对照品, 检测波长为 720 nm; 采用 HPLC 测定泽漆中没食子酸的含量, 色谱柱为 Hypersil C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸(10:90), 流速为 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长为 270 nm。结果 分光光度法测定泽漆总酚酸在 6.75~67.5 μg 内线性关系良好($r=0.999\ 5$), 平均加样回收率为 97.41%。HPLC 测定没食子酸在 0.52~5.2 μg 内线性关系良好($r=0.999\ 8$), 平均加样回收率为 98.02%。重庆不同产地泽漆中总酚酸与没食子酸的含量均存在一定差异, 总酚酸含量为 5.327~5.464 mg $\cdot$ g⁻¹, 没食子酸含量为 0.995~1.087 mg $\cdot$ g⁻¹。结论 本方法适用于泽漆中酚酸类物质的质量分析, 本研究可以为泽漆的质量控制提供参考。

关键词: 比色法; 高效液相色谱法; 泽漆; 总酚酸; 没食子酸

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)05-0443-04

Content Analysis on Total Phenolic Acid and Gallic Acid in *Ephorbia Helioscopia* L. in Chongqing

ZHANG Dan¹, ZHENG Xiuyun², CAO Weiguo^{1*}, WANG Gang¹, YAN Xuewei¹ (1. TCM College of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 401331, China; 2. Equipment Department of the Central Hospital of Qionglai in Sichuan Province, Qionglai 611530, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method to determine and study the content of total phenolic acid and gallic acid in *Ephorbia helioscopia* L. in Chongqing. **METHODS** The content of total phenolic acid was determined by ferric chloride-ferricyanatum Kalium colorimetric method. In this method, gallic acid was used as the reference substance and UV detection wavelength was 720 nm. The content of gallic acid in *Ephorbia helioscopia* L. was determined by HPLC with an Hypersil C_{18} column(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm). The chromatographic conditions included the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% phosphoric acid water solution(10:90) at a flow rate of 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, and UV detection wavelength was 270 nm. **RESULTS** A good linear relationship at the range of 6.75–67.5 μg ($r=0.999\ 5$) was obtained while determining total phenolic acid and the average recovery was 97.41%. Also a good linear relationship at the range of 0.52–5.2 μg ($r=0.999\ 8$) was obtained while determining total gallic acid and the average recovery was 98.02%. The content of total phenolic acid and gallic acid in various populations were different. The content of total phenolic acid in *Ephorbia helioscopia* L. was 5.327–5.464 mg $\cdot$ g⁻¹. The content of gallic acid in *Ephorbia helioscopia* L. was 0.995–1.087 mg $\cdot$ g⁻¹. **CONCLUSION** The method is suitable for quality control of *Ephorbia helioscopia* L.. The experiment can be reference to the quality appraisal for *Ephorbia helioscopia* L.. **KEY WORDS:** colorimetry; HPLC; *Ephorbia helioscopia* L.; total phenolic acid; gallic acid

泽漆为大戟科植物 *Euphorbia helioscopia* L.的全草^[1-2], 又名猫眼儿草、五朵云及五灯头, 据《本草纲目》记载有利水消肿、消痰退热等功效, 民间常用于治疗宫颈癌、食道癌、肝炎、梅毒等。泽漆主要含有二萜脂类、酚酸类和黄酮类化合物等^[3]。由于泽漆中酚酸类化合物主要包括没食子酸和以没食子酸为苷元的苷类, 具有明显的抗肿瘤活性^[4-5], 且目前尚未见关于泽漆中酚酸类物质含量的研究, 本研究拟以总酚酸和没食子酸为评价指标, 尝试对道地产区重庆产泽漆药材进行质量分析, 为泽漆资源的开发利用提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-2010A 高效液相色谱仪, CLASS-VP 色谱工作站; 龙尼柯 UV-2102PC 紫外可见分光光度计; 昆山禾创 KH5200DA 数控超声波清洗器; Millipore 溶剂过滤系统; METIER TOLEDO AG204 万分之一电子分析天平。

1.2 试剂

没食子酸对照品(批号: 110831-200302, 中国药品生物制品检定所, 纯度: 99.1%); 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其余所用试剂均为分析纯。

作者简介: 张丹, 女, 硕士, 讲师 Tel: 13452905093
Tel: 13389679838 E-mail: cwgzd2001@sohu.com

E-mail: danzhang2001@sina.com

*通信作者: 曹伟国, 男, 副教授

1.3 药材样品

本实验泽漆样品采自重庆南川、南岸、沙坪坝和江津, 样品经重庆医科大学中药教研室王刚副教授鉴定为泽漆 *Euphorbia helioscopia* L.。

2 方法和结果

2.1 总酚酸的含量测定^[6]

2.1.1 没食子酸对照品溶液的制备 精密称取 105 °C 减压干燥至恒重的没食子酸 13.5 mg, 置于 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得没食子酸对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 将泽漆样品粉碎, 过筛(40 目), 精密称取 1.0 g, 置索氏提取器中, 加石油醚 60 mL, 加热提取 30 min, 弃去石油醚提取液。将药渣转移至具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 浸泡 30 min 后, 超声 60 min, 放冷后称定重量, 用 50% 乙醇补足减失的重量, 过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.1.3 测定波长的选择 取没食子酸对照品溶液和供试品溶液各 0.5 mL, 分别置 25 mL 棕色量瓶中, 加无水乙醇至 5 mL, 再分别精密加入 0.3% 十二烷基硫酸钠溶液 2 mL 和 0.5% 铁氰化钾-1% 三氯化铁(1:1)混合液 2 mL, 摇匀, 暗处放置 5 min, 加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液至 25 mL, 摇匀, 暗处放置 20 min。参照中国药典 2010 年版附录紫外-分光光度法, 以溶剂为空白, 在 190~800 nm 波长内测定吸收光谱。结果对照品与供试品溶液吸收光谱基本一致, 在 720 nm 波长处有最大吸收, 且供试品溶液显色前在此处无干扰, 因此选 720 nm 为测定波长。

2.1.4 线性关系考察 精密量取没食子酸对照品溶液稀释 1 倍后再分别取 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL 置 25 mL 棕色量瓶中, 加无水乙醇至 5 mL, 再分别精密加入 0.3% 十二烷基硫酸钠溶液 2 mL 和 0.5% 铁氰化钾-1% 三氯化铁(1:1)混合液 2 mL, 摇匀, 暗处放置 5 min, 加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液至 25 mL, 摇匀, 暗处放置 20 min。以第 1 管做空白对照, 测定吸光度。以吸光度 A 为纵坐标, 以对照品质量 $M(\text{mg})$ 为横坐标, 得回归方程: $A=12.074M+0.237$, $r=0.999\ 5$, 表明没食子酸在 6.75~67.5 μg 内线性关系良好。

2.1.5 仪器精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 6 份, 按“2.1.4”项下显色方法显色后, 于 720 nm 处测定吸光度, 计算吸光度的 RSD 为 2.39%。

2.1.6 重复性试验 精密量取同一批泽漆样品细粉 6 份, 每份 1.0 g, 分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取供试品溶液 0.5 mL, 按“2.1.4”项下方法显色后, 于 720 nm 处测定吸光度, 计算吸光度的 RSD 为 2.26%。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 6 份, 每份 0.5 mL, 分别按“2.1.4”项下方法显色后, 分别于 0, 15, 30, 60, 90, 120 min 测定吸光度, 结果吸光度的 RSD 为 2.15%, 表明样品溶液在 120 min 内稳定。

2.1.8 加样回收率试验 取已知总酚酸含量的泽漆药材细粉 6 份, 每份 1.0 g, 分别精密加入没食子酸对照品溶液适量, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.4”项下显色方法显色后, 于 720 nm 处测定吸光度, 计算加样回收率为 97.41%, RSD 为 3.56%, 表明该方法回收率良好, 结果见表 1。

表 1 泽漆中总酚酸加样回收率测定结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery rate of total phenolic acid in *Euphorbia helioscopia* L. ($n=6$)

取样量/g	已知量/mg	加入量/mg	测得量/ mg	回收率/%	平均 回收率/%	RSD/%
1.027	5.505	5.4	10.42	97.84	97.41	3.56
1.015	5.440	5.4	10.68	97.09		
1.103	5.912	5.4	11.05	96.92		
0.982	5.264	5.4	10.87	103.84		
1.055	5.655	5.4	10.56	94.49		
0.993	5.322	5.4	10.42	94.31		

2.1.9 样品总酚酸含量测定 精密吸取供试品溶液 0.5 mL 置 25 mL 棕色量瓶中, 按“2.1.4”项下显色方法显色后, 于 720 nm 处测定吸光度, 并计算样品中总酚酸的含量, 结果见表 3。

2.2 没食子酸的含量测定^[6-7]

2.2.1 高效液相色谱条件 色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸(10:90); 检测波长: 270 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL , 理论板数按没食子酸计不低于 3 000, 在此条件下各组分得到良好分离, 色谱图见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸 6.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 80% 乙醇溶解并定容, 摇匀, 即得对照品储备溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 将泽漆样品粉碎成细

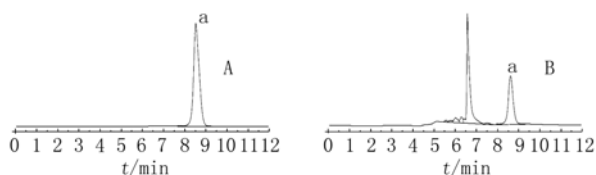


图1 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; a-没食子酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-sample; a-gallic acid

粉,过筛(40目),精密称取药材细粉,每份约5g,置100mL具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇50mL,密塞,称定重量,浸泡30min后,超声60min,放冷再称定重量,用50%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液即得。

2.2.4 线性关系考察 精密量取没食子酸对照品溶液适量,加50%乙醇制成系列标准溶液,进样测定。以色谱峰面积 A 对进样量 $M(\mu\text{g})$ 进行线性回归,回归方程为 $A=3\,660\,041\,M+244\,910$, $r=0.999\,8$ 。结果表明没食子酸在 $0.52\sim 5.2\,\mu\text{g}$ 内线性关系良好。

2.2.5 仪器精密度试验 精密吸取没食子酸对照品溶液 $20\,\mu\text{L}$,按“2.2.1”项下色谱条件,重复进样6次,记录色谱峰面积,RSD为1.56%,表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 对同一批泽漆按“2.2.3”项下方法平行制备6份,按“2.2.1”项下色谱条件,进样测定,记录没食子酸色谱峰面积,并计算RSD为1.95%。

2.2.7 稳定性试验 取供试品溶液分别在室温下于0,1,2,4,6,8h进样,记录没食子酸的峰面积,计算RSD为2.29%,表明供试品溶液在8h内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 精密称取已知没食子酸含量的泽漆药材细粉6份,每份约2.0g,分别精密加入没食子酸对照品溶液适量,按“2.2.3”项下方法处理,并按“2.2.1”项下色谱条件测定,计算平均加样回收率为98.02%,RSD为2.88%,结果见表2。

2.2.9 样品测定 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 $20\,\mu\text{L}$,按“2.2.1”项下色谱条件测定,以外标法计算样品中没食子酸的含量,结果见表3。

3 讨论

天然酚酸类化合物具有清除自由基、抗菌消炎、抑制血栓形成等生物活性。从实验结果可以

表2 泽漆没食子酸的加样回收率测定结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery rate of total gallic acid in *Ephorbia helioscopia* L. ($n=6$)

取样量/g	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.044	2.222	2.1	4.159	97.01	98.02	2.88
1.979	2.151	2.1	4.193	97.23		
2.058	2.237	2.1	4.148	95.76		
1.969	2.140	2.1	4.317	103.18		
1.931	2.099	2.1	4.182	99.19		
1.985	2.158	2.1	4.149	95.78		

表3 样品测定结果($n=6$)

Tab 3 The results of sample determination ($n=6$)

样品	总酚酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%	没食子酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
重庆沙坪坝	5.360	1.67	1.087	1.96
重庆南岸	5.327	2.32	1.038	1.74
重庆南川	5.464	2.09	0.998	1.71
重庆江津	5.336	2.83	0.995	1.65

看出,重庆产泽漆中总酚酸与没食子酸的含量随产地的变化而存在差异,但总体基本稳定,总酚酸含量为 $5.327\sim 5.464\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,没食子酸的含量约为 $0.995\sim 1.087\,\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

泽漆作为一种民间药物,尚未建立质量控制标准,由于其含有多种酚酸类物质,本试验建立了泽漆中总酚酸与没食子酸含量分析的方法,可以较好的反应泽漆中总酚酸与没食子酸的含量,该方法简单、快捷,重复性好,可以为泽漆药材的质量控制研究提供参考。

本试验在提取泽漆中总酚酸时考察了乙醇、80%乙醇、50%乙醇、水4种提取溶剂,比较了超声提取和加热回流提取2种方法,结果以50%乙醇超声提取60min和50%乙醇加热回流提取120min的提取率最高,而超声提取易于操作,因此选50%乙醇超声提取60min为样品制备方法。

本研究中泽漆总酚酸的含量测定采用铁氰化钾-三氯化铁显色体系,也叫做普鲁士蓝法,实验过程中对其显色条件进行了考察。首先考察了 0.05 、 0.1 和 $0.2\,\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3种不同浓度盐酸对实验结果的影响,结果显示在 $0.1\,\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液中显色稳定性较优,因此选用 $0.1\,\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸作为溶媒。其次考察了加入铁氰化钾-三氯化铁显色试剂1,2和4mL3种用量对实验结果的影响,结果表明显色剂加入2mL时吸光(下转第450页)

(上接第 445 页)度最大且显色稳定,因此显色剂加入体积选用 2 mL。另外还比较了显色时间对显色结果的影响,供试品溶液加入显色体系以后,在 15~40 min 内显色稳定,本试验选用 20 min 为显色时间。

REFERENCES

- [1] State Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Herbal Medicine (中华本草)[M]. Vol 12. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1999: 782-785.
- [2] Jiangsu New Medical College. The Dictionary of Chinese Herbal Medicine(中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1999: 1464-1465.
- [3] YANG L, CHEN H X, GAO W Y. Advances in studies on chemical constituents in *Euphorbia helioscopia* and their biological activities [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2007, 38(10): 1585-1589.
- [4] FENG W S, GAO L, ZHENG X K, et al. Polypenols of *Euphorbia helioscopia* [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2009, 7(1): 37-39.
- [5] YANG L, CHEN H X, GAO W Y. Studies on the chemical constituents and its antitumor activities from *Euphorbia helioscopia* L[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2008, 20(4): 575-577.
- [6] FU Y R, ZHANG W M, CHEN G M, et al. Determination of gallic acid and total phenolic in *Sedum Aizoon* L. [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2006, 28(7): 1016-1018.
- [7] LI T A, TAN X Y. Quantitative determination of gallic acid in *Fructus Rubi* by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2008, 25(3): 234-236.

收稿日期: 2010-09-10