

高效液相色谱法测定石榴皮中没食子酸的含量

陈威, 来谊, 沈利君 (杭州市萧山区第一人民医院药剂科, 杭州 311200)

摘要:目的 测定石榴皮中没食子酸的含量。方法 采用高效液相色谱法, Zorbax-C₁₈ 色谱柱, 流动相水-二甲基甲酰胺-冰醋酸 (99.82:0.15:0.03), 检测波长 270nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温为室温。结果 在 0.081~0.811 μg·mL⁻¹ 范围内, 没食子酸峰面积 (Y) 与其进样量 (X) 呈良好的线性关系 ($r=0.9999$), 平均日内、日间 RSD 为 1.01% 和 1.60% ($n=6$), 不同浓度的平均回收率为 98.35%, RSD=1.63% ($n=6$)。结论 该法快速简便, 稳定可靠, 专属性强。

关键词: 没食子酸; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917.720.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)05-0386-03

Determination of gallic acid in megranates pericarp with HPLC

CHEN Wei, LAI Yi, SHEN Li-jun (*Department of Pharmacy, the First People's Hospital of Xiaoshan, Hangzhou 311200, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the content of gallic acid in megranate's-pericarp with HPLC. **METHODS** A zorbax C-18 column (250mm × 4.6mm, 5 μm) was used. The mobile phase was water-dimethylformamide-glacial acetic acid (99.82:0.15:0.03), and detected at 270nm; with flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the temperature of column was at room temperature. **RESULTS**

作者简介: 陈威, 男 (1973年7月~), 理学学士, 毕业于浙江医科大学药学院, 从事医院制剂工作。

The linearity of gallic acid was over the range of $0.081\text{--}0.811\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with the correlation coefficient 0.9999 . The average recoveries of different concentration was 98.35% with $\text{RSD } 1.63\%$ ($n = 6$); the within-day and between-day RSD were 1.01% and 1.60% ($n = 6$), respectively. **CONCLUSION** The method is convenient, stable, reliable and special for the determination of gallic acid in *Megranate's pericarp*.

KEY WORDS gallic acid; HPLC; content determination

石榴皮系石榴科植物石榴 *Punica granatum* L. 的干燥果皮, 具有涩肠止泻、止血、驱虫之功效。用于久泻、久痢、便血等症。鞣质、没食子酸是石榴皮中主要的有效成分。中国药典 2000 年版采用皮粉法测定鞣质的含量。有文献报道用紫外分光光度法测定石榴皮中没食子酸的含量^[1]。笔者建立高效液相色谱法测定石榴皮中没食子酸的含量, 方法快速简便, 稳定可靠, 专属性强。

1 试剂与试药

仪器: Agilent 1100 型高效液相仪, G1314 (VWD 检测器), Agilent Chem station 工作站。TU-1800 型紫外可见分光光度计 (北京普析); QC-250 型超声波清洗器 (上海超声波

仪器厂)。

试药: 没食子酸对照品 (批号 0831-9501, 鉴别用, 购自中国药品与生物制品检定所), 经高效液相色谱面积归一化法测定其含量为 98.9% 。石榴皮产地为陕西。甲醇为色谱纯, 水为双重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Zorbax C_{18} ($250\text{mm} \times 4.6\text{mm}$, $5\mu\text{m}$); 流动相: 水-二甲基甲酰胺-冰醋酸 ($99.82:0.15:0.03$); 检测波长: 270nm ; 流速: $1\text{mL}/\text{min}$; 柱温: 室温。理论板数按没食子酸峰计算应不低于 3000 (见图 1)。

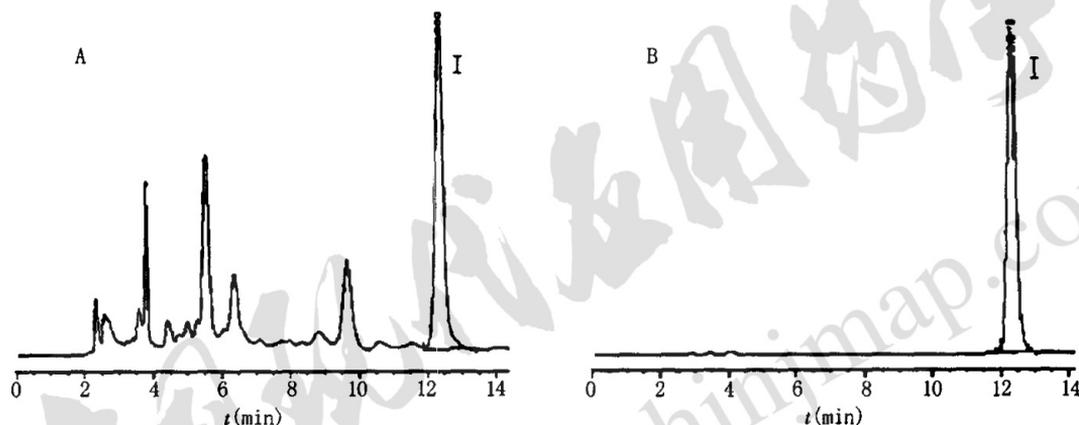


图 1 石榴皮与没食子酸对照品液相图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of meggranates pericarp (A) and gallic acid (B)

A. 石榴皮; B. 没食子酸; I. 没食子酸 (gallic acid)

2.2 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸对照品适量, 加 1% 醋酸溶液制成每 1mL 含 $24\mu\text{g}$ 的溶液, 即得。

2.3 线性关系的考察

精密称取没食子酸 20.5mg 置 100mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 精密量取 $1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0\text{mL}$ 置 50mL 量瓶中, 加入 0.5mL 冰醋酸, 加水稀释至刻度, 混匀, 以微孔滤膜 ($0.45\mu\text{m}$) 滤过, 取续滤液, 进样 $20\mu\text{L}$ 。以进样量 $X (\mu\text{g})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 得回归方程: $Y = 24957X - 50502$, $R = 0.9999$ 说明没食子酸进样量在 $0.081\text{--}0.811\mu\text{g}$ 范围内, 与峰面积之间呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

取对照品溶液重复测定 6 次, 峰面积分别为 $1329.56, 1336.47, 1328.1, 1340.31, 1341.55, 1343.67$, $\text{RSD} = 0.49\%$ 。由不同实验人员在第 1 到第 6 天每天进样一次, 峰面积分别为 $1340.36, 1334.28, 1350.68, 1352.45,$

$1338.65, 1354.27$, $\text{RSD} = 0.62\%$ 。在不同型号的 Agilent 高效液相色谱仪上再次连续进样 6 次, 峰面积分别为 $1305.41, 1298.56, 1310.22, 1307.54, 1295.66, 1315.02$, $\text{RSD} = 0.55\%$ 。

2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液 (批号 1) 在 $0\text{--}6\text{h}$ 内每隔一定时间测定, 共测定 6 次, 记录峰面积, 结果为: $939.142, 957.759, 960.145, 961.689, 967.758, 958.006$, $\text{RSD} = 1.01\%$ ($n = 6$), 说明样品溶液在室温条件下 6h 内稳定。

2.6 重复性试验

取同一批样品 6 份, 按样品含量测定项下依法平行操作, 测定每份样品中没食子酸含量, $\text{RSD} = 1.60\%$ 。

2.7 回收率试验

取已知含量的样品, 分别添加没食子酸对照品, 按上述测定条件测定, 计算回收率。结果平均回收率 = 98.35% , $\text{RSD} = 1.63\%$ 。见表 1。

2.8 石榴皮中没食子酸含量

表 1 样品回收率试验结果

Tab 1 Recovery of the method

样品中没食子酸的量 A(mg)	加入没食子酸的量 B(mg)	实测没食子酸的量 C(mg)	回收率 (C-A)/B(%)
0.952	1.00	1.94	98.8
1.018	1.00	1.99	97.2
0.960	1.00	1.97	101.0
0.902	1.00	1.87	96.8
0.878	1.00	1.85	97.2
0.880	1.00	1.87	99.0

取石榴皮粉末(过三号筛)约 0.5g,精密称定,置于圆底烧瓶中,加水 50mL,加热回流 3h,放冷,滤过,滤液置 100mL 量瓶中,加冰醋酸 1mL,加水至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液。按拟定的色谱条件,精密吸取对照品溶液及样品溶液各 20μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,按峰面积值外标法计算含量。测定样品 3 批,每批 3 份,结果见表 2。

表 2 石榴皮中没食子酸的含量测定结果 (n=3)

Tab 2 Content of gallic acid in megranates pericarp (n=3)

批号	没食子酸的含量 (mg/g)	RSD(%)
1	4.34	1.13
2	4.23	0.68
3	4.28	1.46

3 讨论

3.1 检测波长的选择:称取没食子酸约 1.0mg,置 100mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,用 TU-1800 型紫外可见分光光度计在 200~400nm 处扫描,选择测定波长为 270nm。

3.2 没食子酸可溶于水、甲醇、乙醇等极性溶剂,本实验选用水回流提取,并通过回流 2,3,4h,发现 3h 与 4h 的结果几乎一致,说明回流 3h 即可提取完全。

3.3 曾尝试采用甲醇-0.1%磷酸=15:85,甲醇-1%冰醋酸=17:83,乙腈-0.05%磷酸=5:95,水-四氢呋喃-冰醋酸-甲醇=154:40:1:5 等溶剂系统作流动相,发现其效果均不理想,经摸索筛选采用本实验所用色谱条件为最佳,没食子酸与其他组分色谱峰得到较好分离。

3.4 王克英^[2]报道,20 批不同产地的石榴皮的没食子酸的含量最高为 0.93%,最低为 0.33%,与本实验中同一产地陕西的含量为 0.53%。他们采用的是酸水解后进行的测定,而且还经过萃取的过程,而本实验采用直接用水提取测定其游离的没食子酸,没食子酸的含量应该比文献^[2]要准确。至于有文献报道的石榴皮中没食子酸的含量为 4%的,那是 1929 年,Emmanuel Flacomio 分析了新鲜石榴果皮的成分石榴皮含鞣质 10.4%~21.3%,蜡 0.8%,树脂 4.5%,甘露醇 1.8%,糖 2.7%,树胶 3.2%,菊粉 1.0%,黏质 0.6%,没食子酸 4.0%以及苹果酸、果胶、草酸钙、异槲皮甙和石榴皮碱等。我们认为可能是也采用的是水解的方法或者未采用高效液相色谱法为检测方法。因此,本实验采用的方法对于测定石榴皮中游离没食子酸的方法是可靠的。

参考文献

- [1] 杨巧荷,贾海鹰,于海涛,等.全石榴和石榴皮中没食子酸含量测定的比较.中国民族医药杂志,2003,9(1):34-35.
- [2] 王克英.石榴皮中没食子酸定性定量方法研究[J].中国中药杂志,2005:1171.

收稿日期:2005-04-06