

唐古特大黄中 2 种鞣质类成分的含量测定

曹伟国, 颜学伟*, 张丹(重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331)

摘要: **目的** 测定唐古特大黄中 2 种鞣质类成分没食子酸和儿茶素的含量。**方法** 用高效液相色谱法, 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液, 采用梯度洗脱, 检测波长为 280 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为室温, 按外标法定量。**结果** 没食子酸的平均加样回收率为 98.6%, RSD 为 1.28%; 儿茶素的平均加样回收率为 98.8%, RSD 为 1.37%。**结论** 所建立的方法可准确、快速有效地测定唐古特大黄药材中鞣质类物质的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 唐古特大黄; 没食子酸; 儿茶素

中图分类号: R918.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)03-0260-03

Determination of Two Tannin Compounds in *Rheum Tanguticum* Maxim.ex Balf.

CAO Weiguo, YAN Xuewei*, ZHANG Dan(Traditional Chinese Medicine College of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 401331, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the contents of gallic acid and catechin in *Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf. **METHODS** HPLC was established on Kromasil C₁₈ column with gradient elution. The mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 280 nm, and the column temperature was room temperature and the quantification used external standard method. **RESULTS** The average recovery of gallic acid was 98.6%, and the RSD was

基金项目: 重庆市产学研合作技术创新项目(104)

作者简介: 曹伟国, 男, 硕士, 讲师 Tel: (023)60659023

E-mail: cwgzd2001@sohu.com

*通信作者: 颜学伟, 男, 副教授

Tel: 13320211361 E-mail: yan-xue-wei@tom.com

1.28%. The average recovery of catechin was 98.8%, and the RSD was 1.37%. **CONCLUSION** The method is quick, simple and accurate, and it can be used for the determination of tannins in *Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf..

KEY WORDS: HPLC; *Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf.; gallic acid; catechin

唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf.)为蓼科植物,是药典中大黄药材的来源之一,其化学成分十分复杂,主要包括蒽醌类衍生物,鞣质类化合物,芪类以及树脂类物质等成分。鞣质类化合物作为大黄的一类药效成分,目前已有研究证明其具有止血、抑菌、抗凝血、促进氮代谢、改善肾功能、抑制血管紧张素转换酶、治疗精神病、消炎镇痛和抗病毒等作用。大黄中鞣质含量较高,一般可达到10%~30%,鞣质通常分为水解型和缩合型,没食子酸和儿茶素分别是这两类鞣质的主要单体,而目前同时测定此2种成分含量的研究道相对较少。本试验采用HPLC同时测定了唐古特大黄中没食子酸和儿茶素的含量,旨在建立一种新的测定方法,结果表明方法简便,重复性好,可以作为唐古特大黄中鞣质类物质的质量控制方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 515 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Empower pro 色谱工作站(美国 Waters 公司), Millipore 溶剂过滤系统(美国 Milipore 公司), METIER TOLEDO AG204 万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 试剂

没食子酸、儿茶素对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为110831-200302, 110877-200001,供含量测定用),甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其余所用试剂均为分析纯。

1.3 药材样品

药材样品的采集时间为2007年10月,唐古特大黄样品采自四川阿坝,共采样6份,每份为5 kg,样品经本校中药教研室王刚副教授鉴定为唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf.。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex kromasac C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 为甲醇, B 为 0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~10 min, A 甲醇 5% 等度洗脱, 10~60 min, A 甲醇(5%~100%); 检测波长: 280 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温室温; 进样量: 10 μL, 在此条件下各组分得到良好分离,

高效液相色谱图见图1。

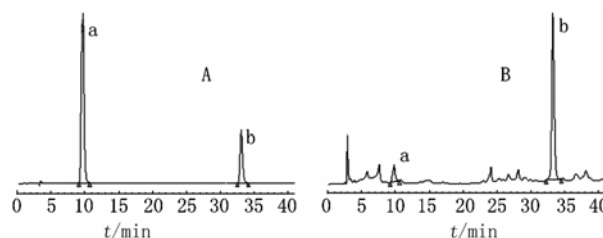


图1 高效液相色谱图

A-对照品; B-唐古特大黄; a-没食子酸; b-儿茶素

Fig 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-*Rheum tanguticum* Maxim.ex Balf.; a-gallic acid; b-catechin

2.2 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸 6.53 mg, 儿茶素 8.43 mg, 分别置 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得对照品贮备液。

2.3 样品溶液的制备

将大黄根茎切片晾干后, 随机取少量样品粉碎成细粉, 各取 3 份样品, 每份约 0.2 g, 精密称取, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声 60 min, 放冷再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL 作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密量取没食子酸和儿茶素对照品贮备液适量混合, 加甲醇制成系列对照品溶液, 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, 没食子酸和儿茶素的回归方程分别为 $A=168\,525\,M-6\,241(r=0.999\,9)$, $A=44\,896\,M+734(r=0.999\,9)$ 。结果表明, 没食子酸和儿茶素分别在 0.013 1~0.131 μg 和 0.016 9~0.169 μg 内线性关系良好。

2.5 精密度试验

在“2.1”色谱条件下, 对同一对照品溶液重复进样 6 次, 测得没食子酸和儿茶素峰面积的 RSD 分别为 1.44% 和 1.96%。

2.6 重复性试验

在“2.1”色谱条件下, 对同一批样品按“2.3”项下方法平行制备 6 份, 分别进样 10 μL, 同时取混合对照品溶液进样 10 μL, 按外标法测定其含量并计算 RSD, 没食子酸为 2.46%, 儿茶素为 2.29%。

2.7 中间精密度试验

取重复性试验的溶液作为供试液，在另一天，选用另一台高效液相色谱仪，由另外研究人员在“2.1”色谱条件下进行测定，测得没食子酸平均标示含量为(99.10±0.72)%，RSD 为 2.57%，儿茶素平均标示含量为(98.93±0.86)%，RSD 为 2.84%。

2.8 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 10 μL，在室温下于 2, 8, 16, 24, 48 h 分别进样，并测定峰面积，计算 RSD，没食子酸为 1.75%，儿茶素为 2.07%，表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的大黄药材细粉 6 份，每份约 0.2 g，精密称定，分别精密加入高、中、低 3 种浓度的没食子酸对照品和儿茶素对照品溶液适量，按“2.3”项下方法制备，每种浓度制备 3 份，并在“2.1”色谱条件下测定，计算平均回收率，结果见表 1、表 2。

表 1 没食子酸的加样回收率测定结果(n=9)

Tab 1 Recovery test of gallic acid (n=9)

已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.885	0.704	1.591	100.3		
0.890	0.704	1.568	96.3		
0.884	0.704	1.575	98.2		
0.881	0.880	1.742	97.8		
0.891	0.880	1.757	98.4	98.6	1.28
0.888	0.880	1.745	97.4		
0.885	1.056	1.929	98.9		
0.886	1.056	1.946	100.4		
0.887	1.056	1.937	99.4		

表 2 儿茶素的加样回收率测定结果(n=9)

Tab 2 Recovery tests of catechin (n=9)

已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
4.104	3.280	7.258	96.2		
4.127	3.280	7.377	99.1		
4.100	3.280	7.284	97.1		
4.086	4.100	8.137	98.8		
4.133	4.100	8.258	100.6	98.8	1.37
4.117	4.100	8.151	98.4		
4.102	4.920	9.040	100.4		
4.110	4.920	9.003	99.4		
4.115	4.920	9.000	99.3		

2.10 样品测定

分别精密吸取对照品混合溶液和供试品溶液各 10 μL，按“2.1”色谱条件进行测定，以外标法计算样品中没食子酸和儿茶素的含量，结果见表 3。

表 3 样品测定结果(n=6)

Tab 3 The analytical results of samples(n=6)

样品	没食子酸/mg·g ⁻¹	儿茶素/mg·g ⁻¹
唐古特大黄	4.34	21.69
	4.41	20.15
	4.42	19.78
	4.38	19.94
	4.50	20.67
	4.43	20.45

3 结论

样品的前处理是保证含量测定结果准确的关键，本研究比较了超声提取，加热回流提取和冷浸过夜提取、实验结果表明，超声提取和冷浸过夜提取含量明显高于加热回流提取，可能是因为鞣质类物质遇热不稳定。超声提取方法操作简便，故样品提取采用超声提取法。在提取溶剂的选择中，考察了甲醇、50%甲醇和水，结果甲醇提取液中鞣质含量较低，用 50%甲醇和水提取测得鞣质的含量接近，但用 50%甲醇所提取的供试品溶液杂质干扰峰最少，故采用 50%甲醇为提取溶剂。

鞣质类化合物作为唐古特大黄中一类重要的药效成分，其含量的测定对于唐古特大黄的质量控制具有重要意义，本试验采用 HPLC 测定唐古特大黄中鞣质类化合物的含量，方法简便、快速，结果准确、可靠，可作为唐古特大黄质量控制的方法。

REFERENCES

[1] Ch.P(2005)Vol I (中国药典 2005 年版.一部)[S]. 2005: 8-9.
[2] XU X P, WANG S, HUANG Y. Determination of gallinic acid in 4 tibetan medicines by HPLC [J]. West Chin J Pharm Sci (华西药科学杂志), 2003, 18 (6): 448-450.
[3] DING M Y, NI W W. Separation of tannins in rhubarb and its analysis by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2004, 22(6): 605-608.
[4] LUO W Y, LI J P, ZHANG Y Z. To compare the methods of determination of tannins in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 1990, 10(4): 249-250.

收稿日期: 2009-04-15