

【化学测定方法】

HPLC 法测定扎冲十三味丸中没食子酸的含量

许勇, 郑征伟, 诸艳蓉, 王柯, 季申*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

【摘要】目的: 采用高效液相色谱法测定扎冲十三味丸中没食子酸含量。方法: 样品经 50% 甲醇超声提取后, 采用色谱柱 ULTIMATE XB - C18 (0.46 × 25 cm 5 μm), 以乙腈 - 0.05% 磷酸溶液 (5:95) 为流动相, 检测波长为 270 nm。结果: 线性范围为 0.003925 μg ~ 3.925 μg, $r = 0.9999$; 平均加样回收率 ($n = 9$) 为 96.5%。结论: 该方法灵敏度高、专属性好、操作简便、重现性好。

【关键词】 高效液相色谱法; 没食子酸; 扎冲十三味丸

【中图分类号】 O657.7⁺²

【文献标识码】 A

【文章编号】 1004 - 8685(2012)07 - 1560 - 03

Determination of gallic acid in Zhachong Shisan Wei Pill by HPLC

XU Yong¹, JIA Zheng - wei, ZHU Yan - rong, WANG Ke, JI Shen*

(Shanghai Institute of Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 **Objective:** To develop an HPLC method for the determination of gallic acid in Zhachong Shisan Wei Pill. **Methods:** The chromatography column was ULTIMATE XB - C18 (0.46 × 25 cm 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile - 0.05% phosphonic acid (5:95). The determination wavelength was set at 270 nm. **Results:** Linear range was 0.003925 μg ~ 3.925 μg, $r = 0.9999$; The average recovery was 96.5% ($n = 9$). **Conclusion:** The method is simple, sensitive, accurate, specific and reproducible.

【Key words】 HPLC; Gallic acid; Zhachong Shisan Wei Pill

扎冲十三味丸是由诃子、石菖蒲、制草乌、木香、人工麝香等 13 味中药制成的丸剂, 具有祛风通窍、舒筋活血、镇静安神等功效。原标准收载于国家食品药品监督管理局标准 YBZ03922009^[1] 与卫生部药品标准蒙药分册^[2] 两个标准中, 质量标准中已有显微鉴别、铁盐的化学鉴别、薄层鉴别以及木香中的木香烃内酯、去氢木香烃内酯的含量测定项。诃子为处方中的君药, 具有涩肠止泻、敛肺止咳、降火利咽等功效^[3]。没食子酸为诃子中主要有效成分之一。为控制药品质量, 保证临床用药的安全性和有效性, 我们建立了反相高效液相色谱法测定扎冲十三味丸中没食子酸含量的方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, Agilent1100 紫外 - 可见光检测器, Agilent1100 色谱工作站, 没食子酸对照品购自中国药品生物制品检定所 (批号 0831 - 9505, 纯度 100.0%); 乙腈为色谱纯 (MERCK 公司), 其余试剂均为分析纯 (中国医药 (集团) 上海化学试剂公司); 样品: 扎

冲十三味丸 8 批, 分别由内蒙古制药有限责任公司 A、内蒙古制药有限责任公司 B、内蒙古制药有限责任公司 C、内蒙古制药有限责任公司 D 提供, 阴性样品由内蒙古制药有限责任公司 A 提供。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取没食子酸对照品 10 mg, 置 20 ml 量瓶中, 加 50% 甲醇溶液溶解, 并定容至刻度, 精密吸取 1 ml 置 20 ml 量瓶中, 加含 0.5% 维生素 C 的 50% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液 取重量差异项下的本品, 研细, 混匀, 取约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇溶液 20 ml, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方量制备缺诃子药材的阴性样品, 照“2.1.2”项下方法制备阴性样品溶液。

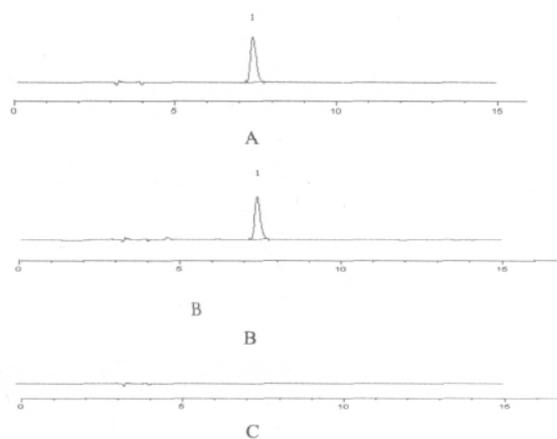
2.2 色谱条件

色谱柱: ULTIMATE XB - C18 (0.46 × 25 cm, 5 μm); 柱温: 30℃; 流动相: 乙腈 - 0.05% 磷酸溶液

【作者简介】 许勇 (1976 -), 女, 硕士, 主管药师, 主要从事中药质量研究。

* 通讯联系人, E-mail: ji_shen2006@yahoo.com.cn

(5:95)。检测波长:270 nm;柱温 30℃;进样量:5 μl,理论板数按没食子酸峰计算,不低于 6000,按上述色谱条件进行测定,结果样品中没食子酸与相邻峰分离度大于 1.8,阴性样品溶液在与没食子酸色谱峰相同位置处无干扰峰,表明样品中其他成分对没食子酸的测定无干扰(见图 1)。



A. 对照品; B. 样品; C. 阴性样品; 1. 没食子酸

图 1 高效液相色谱图

2.3 线性关系的考察

精密称取没食子酸对照品适量,加 50% 甲醇溶液制成浓度为 0.3925 mg/ml 的对照品溶液①和含 0.5% 维生素 C 的 50% 甲醇溶液稀释的浓度为 0.03925 mg/ml 的对照品溶液②。分别精密吸取对照品溶液②0.1 μl、0.5 μl、5 μl、10 μl;对照品溶液①5 μl、10 μl 注入液相色谱仪,记录峰面积。以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,进行回归分析,得回归方程为: $Y = 2824.72X - 10.68$ $r = 0.9999$ 。

结果表明,没食子酸在 0.003925 μg ~ 3.925 μg 范围内进样量与峰面积线性关系良好。

2.4 精密度试验

精密吸取 0.03925 mg/ml 的对照品溶液,按上述色谱条件连续进样 6 次,没食子酸峰面积的 RSD 为 0.5%,结果表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

按“2.1.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,没食子酸含量为 0.96 mg/丸, RSD 为 1.7%。

2.6 供试品溶液稳定性试验

取同一供试品溶液,在上述色谱条件下,分别于 0 h, 6 h, 8 h, 13 h, 17 h 进样测定,结果没食子酸峰面积的 RSD 为 0.4%。表明供试品溶液在 17 h 内基本稳定。

2.7 加样回收率试验

取本品(内蒙古制药有限责任公司 A 提供,批号:20100927)粉末(过三号筛)约 0.05 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,一式 9 份,以 3 份为一组,分别精密加入没食子酸对照品溶液(2)(0.3925 mg/ml) 1.0 ml、1.2 ml、0.8 ml,精密加入 50% 甲醇溶液 20 ml,称定重量,超声

处理(功率 500 W 频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定重量,分别用 50% 甲醇溶液补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,进样分析,记录峰面积,测定,结果见表 1。

表 1 没食子酸准确度试验

样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均 (%)	RSD (%)
0.202540	0.471	0.654773448	96.015	96.5	1.4
0.239590	0.471	0.687612248	95.121		
0.204022	0.471	0.653517136	95.434		
0.199576	0.3925	0.576698640	96.082		
0.213408	0.3925	0.590336880	96.032		
0.237614	0.3925	0.612517290	95.516		
0.202540	0.314	0.511240288	98.312		
0.206492	0.314	0.517430160	99.024		
0.205010	0.314	0.509136368	96.855		

2.8 样品测定

按上述供试品溶液的制备方法和测定条件,测定 8 批样品中没食子酸的含量,用外标法计算,结果见表 2。

表 2 没食子酸样品测定结果

生产厂家	编号	含量(mg/丸)	平均(mg/丸)
内蒙古制药有限责任公司 A	1	0.85	0.67
	2	0.78	
	3	0.96	
内蒙古制药有限责任公司 B	4	0.46	
内蒙古制药有限责任公司 C	5	1.15	
内蒙古制药有限责任公司 D	6	0.38	
	7	0.38	
	8	0.41	

3 讨论

3.1 流动相的摸索

对①乙腈-水(5:95)②乙腈-0.05%磷酸溶液(5:95)二个流动相系统进行了考察。经试验,流动相系统①得到供试品色谱中,没食子酸未被洗脱出来;流动相系统②得到的供试品的色谱中,没食子酸峰与周围杂质峰分离度较好,没食子酸峰在 7 min 出峰,故最终确定流动相为流动相系统②。

3.2 检测波长的确定

经二极管阵列检测器进行紫外光谱扫描,样品色谱图中没食子酸色谱峰的紫外光谱与对照品一致,在 270 nm 处有最大吸收,故确定检测波长为 270 nm。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

没食子酸的含量测定方法文献已报道的有高效液相色谱法^[4-7]、紫外分光光度法^[8]、流动注射化学发光增强法^[9]、流动注射双安培法^[10]等,但复方制剂扎冲十三

味丸中没食子酸的含量测定方法未见报道。因考虑到本品为多味中药材制成的中成药,其中可能含有可水解的鞣质,加热提取后会水解成没食子酸,故选择超声处理的提取方式。并且我们对 20% 甲醇、50% 甲醇、甲醇 3 种提取溶剂进行了考察,结果,在 20% ~ 50% 甲醇的范围内,随着甲醇比例的提高,没食子酸的提取效率显著增加,当采用纯甲醇进行提取时,没食子酸的提取效率反而降低。故确定提取溶剂为 50% 甲醇。并考察了 10 min、30 min、60 min 的超声提取时间,结果表明,超声处理 30 min 已经完全能将样品中的没食子酸提取出来,故本试验最终确定超声时间为 30 min。

3.4 对照品稳定性的考察

有文献报道,没食子酸在中性和碱性条件下,较不稳定,容易降解^[11]。不同的抗氧化剂对其具有一定的保护作用。试验过程中,发现没食子酸的稀溶液(40 μg/ml 50% 甲醇溶液稀释),室温下放置,稳定性较差,放置 3 h 后的没食子酸的峰面积变化的 RSD 为 12.6%。而其浓溶液(浓度为 0.5 mg/ml)却较为稳定。故在对照品溶液的配制过程中,将没食子酸对照品的浓溶液用含 0.5% 维生素 C 的 50% 甲醇溶液稀释,结果发现加入抗氧化剂维生素 C 后,没食子酸对照品的稀溶液

在 28 h 内的峰面积变化的 RSD 为 0.6%。

[参考文献]

- [1] YBZ03922009. 国家食品药品监督管理局标准[S].
- [2] ZZ-8300. 卫生部药品标准蒙药分册[S].
- [3] 中华人民共和国药典[S]. 一部. 2010.
- [4] 任源, 堵年生. HPLC 测定没食子中没食子酸的含量[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(1): 71-72.
- [5] 王征, 卢向阳, 曹庸, 等. HPLC 法同时测定没食子酸与没食子酸烷基酯的含量[J]. 科学技术与工程, 2005, 5(11): 729-732.
- [6] 陈晓洁. 高效液相色谱法测定泌淋胶囊中没食子酸的含量[J]. 海峡药学, 2008, 20(12): 55-57.
- [7] 侯惠婵, 梁前, 卢迅聪, 等. 五倍子、没食子中没食子酸的含量[J]. 中国药品标准, 2005, 6(3): 38-39.
- [8] 陈连剑, 刘新宇, 郭华. 紫外分光光度法测定猴耳环消炎片中没食子酸的含量[J]. 广东医学院学报, 1998, 16(4): 322-323.
- [9] 谢成根, 容涛. 流动注射化学发光增强法测定中药没食子中没食子酸[J]. 分析仪器, 2007, 2: 35-37.
- [10] 张君才, 白育伟, 党宏岗. 流动注射双安培法测定没食子酸[J]. 分析科学学报, 2005, 21(1): 69-71.
- [11] 吴雪钗, 于波涛, 侯艾林. 没食子酸稳定性研究[J]. 西南国防医药, 2006, 16(5): 484-485.

(收稿日期: 2012-02-15)

(上接第 1557 页)

与实际情况相符的检验结果。同时提示,饮用水氯化消毒技术的应用,使水体病原微生物对人类的危害得到控制的同时,也给人类带来了另一类危害健康的物质—消毒副产物。三卤甲烷是其产生的主要副产物之一,所以自来水加氯消毒副产物应引起高度重视,如何使之控制在—较低的水平,有待于进一步试验研究。

[参考文献]

- [1] 孙仕萍, 李艳, 段江平. 饮用水中 5 种卤代烃的顶空大口径毛细管

气相色谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(2): 158-160.

- [2] 罗添, 周志荣, 林少彬. 吹扫捕集气相色谱质谱法测定饮用水中挥发性有机物[J]. 卫生研究, 2006, 35(4): 504-507.
- [3] 许瑛华, 朱炳辉, 杨业, 等. 吹扫捕集—气相色谱法测定生活饮用水中挥发性有机物[J]. 卫生研究, 2006, 35(5): 644-646.
- [4] GB/T 5750.8-2006. 生活饮用水标准检验方法有机物指标[S].
- [5] GB/T 5750.10-2006. 生活饮用水标准检验方法消毒副产物指标[S].

(收稿日期: 2012-03-01)

(上接第 1559 页)

表 2 自来水中邻苯二甲酸酯的加标回收率结果(n=6)

组分	检出量 (mg/L)	加标量 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)	加标量 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
DMP	ND	0.004	96.8	3.8	0.020	90.2	3.3
DEP	ND	0.004	91.5	6.8	0.020	92.3	3.1
DOP	ND	0.004	88.4	4.2	0.020	105.4	4.9

注: ND - 未检出

3 小结

本方法用超声辅助萃取与液液微萃取技术结合,对样品进行前处理后用高效液相色谱法测定水中的邻苯二甲酸酯,符合《生活饮用水卫生标准生活饮用水标准检验方法》要求。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国国家标准. 生活饮用水卫生标准生活饮用水标准检验方法[M]. 北京: 中国标准出版社出版, 2006: 246-247.
- [2] GBZ2-2002. 工作场所所有害因素职业接触限值[S].
- [3] 张克荣. 水质理化检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 146-147.
- [4] 林兴桃, 王小逸, 陈明, 等. 固相萃取高效液相色谱法测定水中邻苯二甲酸酯类环境激素[J]. 环境科学研究, 2004, 17(5): 71-74.
- [5] 周欣, 臧晓欢, 王东跃, 等. 分散液相微萃取—气相色谱联用测定葡萄中百菌清、克菌丹和灭菌丹残留[J]. 分析化学, 2009, 37(1): 41-45.
- [6] 刘美华, 邱彬, 陈国南, 等. 超声辅助离子液体分散液相微萃取—高效液相色谱法测定废水中雌激素的研究[J]. 分析测试技术与仪器, 2009, 15(3): 151-157.

(收稿日期: 2012-02-21)