

RP-HPLC法同时测定3种不同大黄炮制品中没食子酸、桂皮酸和儿茶素的含量[△]

魏江存^{1,2*}, 谢臻², 杨正腾³, 马家宝³, 秦祖杰^{1#}, 王成龙¹, 黄冬美¹, 朱文润⁴, 陈圣斌³, 韩倩²(1.广西国际壮医院壮瑶药研发中心, 南宁 530201; 2.广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 3.广西中医药大学第一附属医院药学部, 南宁 530023; 4.中山大学药学院, 广州 510275)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)22-3053-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.22.06

摘要 目的:建立同时测定3种不同大黄炮制品中没食子酸、桂皮酸、儿茶素含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Thermo Scientific™ Hypersil GOLD Dim, 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱), 检测波长为278 nm, 流速为1.0 mL/min, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μL。结果:没食子酸、桂皮酸、儿茶素的检测进样量线性范围分别为0.126 2~1.262 0 μg($r=0.999 9$)、0.036 2~0.362 0 μg($r=0.999 9$)、0.177 9~1.779 4 μg($r=0.999 8$); 定量限分别为25.4、28.2、62.5 ng, 检测限分别为6.2、3.6、11.8 ng; 精密性、稳定性、重复性、耐用性试验的RSD均小于3%; 加样回收率分别为94.64%~102.71% (RSD=2.74%, $n=9$)、95.35%~102.49% (RSD=2.44%, $n=9$)、93.65%~103.66% (RSD=3.27%, $n=9$)。含量测定结果显示, 熟大黄中没食子酸、桂皮酸含量较高, 两种成分含量大小顺序均依次为熟大黄>水蒸熟大黄>生大黄; 生大黄中儿茶素含量较高, 该成分含量大小顺序依次为生大黄>水蒸熟大黄>熟大黄。结论:本方法灵敏、可靠、重复性好, 可用于同时测定3种不同大黄炮制品中没食子酸、桂皮酸和儿茶素的含量。

关键词 大黄; 炮制品; 没食子酸; 桂皮酸; 儿茶素; 反相高效液相色谱法; 含量测定

Simultaneous Determination of Gallic Acid, Cinnamic Acid and Catechin in 3 Processed Products of *Rheum officinale* by RP-HPLC

WEI Jiangcun^{1,2}, XIE Zhen², YANG Zhengteng³, MA Jiabao³, QIN Zujie¹, WANG Chenglong¹, HUANG Dongmei¹, ZHU Wenrun⁴, CHEN Shengbin³, HAN Qian²(1. Zhuangyao Pharmaceutical Research and Development Center, Guangxi International Zhuang Medical Hospital, Nanning 530201, China; 2. School of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China; 3. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of TCM, Nanning 530023, China; 4. School of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of gallic acid, cinnamic acid and catechin in 3 processed products of *Rheum officinale*. METHODS: RP-HPLC method was established. The determination was performed on Thermo Scientific™ Hypersil GOLD Dim column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 278 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range of gallic acid, cinnamic acid and catechin were 0.126 2-1.262 0 μg($r=0.999 9$), 0.036 2-0.362 0 μg($r=0.999 9$) and 0.177 9-1.779 4 μg($r=0.999 8$), respectively. Quantitative limits were 25.4, 28.2, 62.5 ng, and detection limits were 6.2, 3.6, 11.8 ng, respectively. RSDs of precision, stability, repeatability and durability tests were all less than 3%. The recoveries ranged from 94.64%-102.71% (RSD=2.74%, $n=9$), 95.35%-102.49% (RSD=2.44%, $n=9$), 93.56%-103.66% (RSD=3.27%, $n=9$). The determination results showed that the contents of gallic acid and cinnamic acid in prepared *R. officinale* were higher, and the order of both were prepared *R. officinale*>steamed *R. officinale*>raw *R. officinale*. The content of catechin in raw *R. officinale* was higher, and the order of it was raw *R. officinale*> steamed *R. officinale*>prepared *R.*

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81360524、81660659); 国家中医药管理局中医药科研实验室项目(No.国中医药发[2009]21号); 广西高校中青年骨干教师科研基础能力提升项目(No.2019KY0341)

* 药师, 硕士。研究方向: 中药、民族药质量分析及其药效机制。E-mail: 960837714@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师。研究方向: 民族药学、中医内科学教学与科研。E-mail: 109741754@qq.com

officinale. CONCLUSIONS: The method is sensitive, reliable and reproducible. It can be used to determine the contents of gallic acid, cinnamic acid and catechins in 3 processed products of *R. officinale* simultaneously.

KEYWORDS *Rheum officinale*; Processed products; Gallic acid; Cinnamic acid; Catechin; RP-HPLC; Content determination

我国共有大黄 45 个品种和 2 个亚种,其中只有掌叶大黄(*Rheum palmatum* L.)、唐古特大黄(*R. tanguticum* Maxim. ex Balf.)或药用大黄(*R. officinale* Baill.)的干燥根和根茎作为药用部位被收录至 2015 年版《中国药典》(一部)^[1-2]。大黄在《神农本草经》中被列为中品,《本草纲目》中也有相关记载^[3-4],可内服外用,具有止血、通阻、解毒之功效^[5]。临床常用饮片为生大黄、熟大黄、醋大黄、酒大黄和大黄炭^[6]。不同饮片的化学成分、药效性能以及临床作用可能会随炮制条件的不同而有所差异,即中药炮制前后其化学成分的含量会发生变化^[7-8]。如生大黄泻下作用较强,若煎煮时间过久,其泻下成分被破坏,使泻下作用减弱;熟大黄的主要成分为鞣质,具有止泻作用,因此大黄生用能致泻,熟用则止泻止痢^[9-11]。

大黄主要含有黄酮类、鞣质类、蒽醌类、蒽酮类等成分,以往大多数研究仅以大黄炮制前后蒽醌类成分为指标^[12-14]。而鞣质类成分作为大黄的有效成分之一,具有降低血尿素氮水平、抗炎、抗菌、抗肿瘤、调节免疫等药理作用^[15-16]。虽然有研究发现,大黄炮制前后其鞣质类成分没食子酸和儿茶素的含量均明显变化,但该研究的观察指标较少^[17]。同时,目前尚无比较不同炮制方法对大黄中鞣质类成分含量影响的研究,也未见相关标准对其含量进行规定。基于此,本研究采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定了 3 种不同大黄炮制品中没食子酸、桂皮酸和儿茶素等 3 种鞣质类成分的含量,旨在为其质量标准研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695 型 HPLC 仪,包括四元泵、真空脱气泵、自动进样器、柱温箱(美国 Waters 公司);SHB-III 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);TGL-16G 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);DHG-9203A 型电热恒温鼓风干燥箱、HWS-26 型电热恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司);YQ-520C 型超声波清洗机(上海音波声电科技公司);Secura225D-1CN 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 药品与试剂

没食子酸对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号:160928,纯度:>98%)、桂皮酸对照品(批号:20161126,纯度:>98%)、儿茶素对照品(批号:20161221,纯度:>98%)均由宝鸡市晨光生物科技有限公司提供;甲醇为色谱纯,乙醇、磷酸等均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

大黄饮片(产地:四川绵州市平武县,批号:170307001)购自广东康美药业有限公司,经广西中医药大学药学院李斌副教授鉴定为蓼科植物药用大黄(*R. officinale* Baill.)的干燥根茎,按 2015 年版《中国药典》(四

部)“0213”炮制通则^[18]和《全国中药饮片炮制规范》^[19]进行炮制,制得生大黄、水蒸熟大黄、熟大黄等 3 种大黄炮制品饮片。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Thermo Scientific™ Hypersil GOLD Dim (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表 1);检测波长:278 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	A, %	B, %	时间, min	A, %	B, %
0	2	98	45	52	48
16	11	89	58	60	40
25	19	81	65	82	18
33	35	65			

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取没食子酸对照品 6.31 mg、桂皮酸对照品 3.62 mg、儿茶素对照品 8.897 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,得各成分单一对照品贮备液。取上述没食子酸、儿茶素对照品贮备液各 1 mL,桂皮酸对照品贮备液 0.5 mL,置于同一 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制得没食子酸、桂皮酸、儿茶素质量浓度分别为 63.10、18.10、88.97 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 将炮制品饮片粉碎,取粉末 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加 70% 甲醇 20 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:30 kHz)处理 20 min,放冷,再次称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。3 种炮制品饮片均同法操作。

2.2.3 空白对照溶液 以 70% 甲醇为空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验

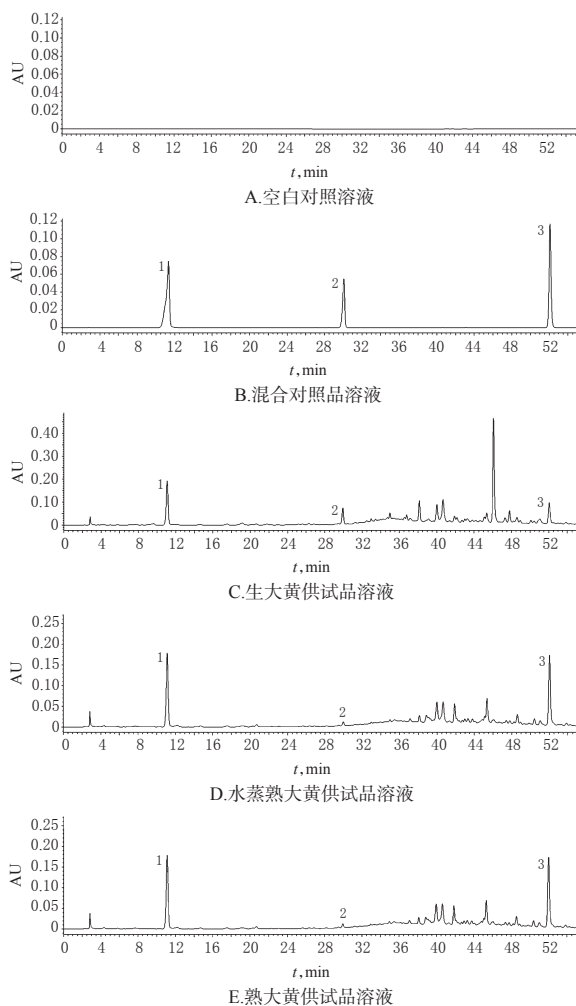
取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 1。由图 1 可知,理论板数以没食子酸峰计均不低于 3 000,所有色谱峰的分离度均大于 1.5,空白对照对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液 2、5、8、10、12、15、20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表 2。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,用甲醇倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比 10:1、3:1 分别计算定量限、检测限。结果,没食子酸、桂皮酸、儿茶素的定量限分别为 25.4、28.2、62.5 ng,检测限分别为 6.2、3.6、11.8 ng。



注: 1. 没食子酸; 2. 桂皮酸; 3. 儿茶素
Note: 1. gallic acid; 2. cinnamic acid; 3. catechin

图1 高效液相色谱图

Tab 1 HPLC chromatograms

表2 回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
没食子酸	$y=3.0 \times 10^5 x + 14\ 323$	0.999 9	0.126 2~1.262 0
桂皮酸	$y=9.0 \times 10^5 x + 7\ 937$	0.999 9	0.036 2~0.362 0
儿茶素	$y=971\ 252x + 9\ 096$	0.999 8	0.177 9~1.779 4

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,没食子酸、桂皮酸、儿茶素峰面积的RSD分别为0.81%、2.34%、0.71% ($n=6$),表明仪器精密度较好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(生大黄饮片)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、桂皮酸、儿茶素峰面积的RSD分别为2.68%、0.88%、1.59% ($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

将生大黄饮片粉碎,精密称取粉末0.5 g,共6份,按

“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标一点法计算样品中3种成分的含量。结果,0.5 g生大黄饮片中平均含没食子酸、桂皮酸、儿茶素4.281 5、0.711 8、3.201 8 mg,RSD分别为0.92%、2.95%、1.97% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

将生大黄饮片粉碎,精密称取粉末0.25 g,共9份,分别加入一定量的混合对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 3 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %		
没食子酸	0.250 5	1.072 5	0.8500	1.889 8	96.15	98.42	2.74		
	0.250 9	1.074 2	0.850 0	1.933 4	101.08				
	0.251 1	1.075 1	0.850 0	1.918 9	99.28				
	0.252 5	1.081 1	1.062 5	2.125 2	98.27				
	0.252 1	1.079 4	1.062 5	2.058 2	95.12				
	0.251 6	1.077 2	1.062 5	2.168 5	102.71				
	0.253 2	1.084 1	1.250 0	2.329 6	99.64				
	0.252 8	1.082 4	1.250 0	2.265 4	94.64				
	0.251 9	1.078 5	1.250 0	2.314 1	98.85				
	0.250 5	0.178 3	0.144 0	0.320 3	98.61			99.18	2.44
	0.250 9	0.178 6	0.144 0	0.315 9	95.35				
	0.251 1	0.178 7	0.144 0	0.323 0	100.21				
0.252 5	0.179 7	0.172 8	0.345 1	95.72					
0.252 1	0.179 4	0.172 8	0.356 5	102.49					
0.251 6	0.179 1	0.172 8	0.351 7	99.88					
0.253 2	0.180 2	0.216 0	0.394 0	98.98					
0.252 8	0.179 9	0.216 0	0.400 1	101.90					
0.251 9	0.179 3	0.216 0	0.394 2	99.49					
儿茶素	0.250 5	0.802 1	0.636 2	1.397 9	93.65	98.63	3.27		
	0.250 9	0.803 3	0.636 2	1.445 6	100.96				
	0.251 1	0.804 0	0.636 2	1.415 9	96.18				
	0.252 5	0.808 5	0.795 2	1.570 7	97.85				
	0.252 1	0.807 2	0.795 2	1.631 5	103.66				
	0.251 6	0.805 6	0.795 2	1.591 6	98.84				
	0.253 2	0.810 7	0.959 9	1.755 5	98.43				
	0.252 8	0.809 4	0.959 9	1.794 3	102.60				
	0.251 9	0.806 5	0.959 9	1.713 2	95.46				

2.10 耐用性试验

将生大黄饮片粉碎,取粉末适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件,分别以不同检测波长(268、273、278 nm)、不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)、不同柱温(25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)进样测定,记录峰面积并按外标一点法计算样品中3种成分的含量(以0.5 g生大黄饮片所含待测成分质量计),结果见表4。结果表明,该方法耐用性良好。

2.11 样品含量测定

取3种大黄饮片粉末,每份0.5 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行操作3次,记录峰面积并按外标一点法计算样品含量(以0.5 g饮片所含待测成分质量计),结果见表5。

表4 耐用性试验结果

Tab 4 Results of durability tests

项目	条件	没食子酸		桂皮酸		儿茶素	
		含量,mg	RSD,%	含量,mg	RSD,%	含量,mg	RSD,%
检测波长	268 nm	4.211 8	1.46	0.704 5	1.95	3.184 2	1.28
	273 nm	4.215 3	2.36	0.709 4	1.86	3.201 6	2.51
	278 nm	4.301 2	2.13	0.716 2	1.59	3.252 7	1.82
流速	0.8 mL/min	4.202 5	1.74	0.702 6	1.06	3.181 6	1.67
	1.0 mL/min	4.310 8	2.68	0.715 1	1.12	3.191 7	2.98
	1.2 mL/min	4.301 2	2.32	0.706 9	2.61	3.240 1	1.27
柱温	25 °C	4.250 6	1.72	0.697 1	2.31	3.189 1	2.04
	30 °C	4.283 7	2.60	0.712 4	1.02	3.207 4	1.91
	35 °C	4.203 0	1.26	0.703 8	1.95	3.192 8	2.58

表5 样品含量测定结果(n=3,mg)

Tab 5 Results of content determination of samples (n=3,mg)

样品	没食子酸	桂皮酸	儿茶素
生大黄	4.303 8	0.721 0	3.259 1
水蒸熟大黄	6.719 5	1.189 3	0.571 1
熟大黄	7.299 8	1.432 9	0.449 8

3 讨论

在前期预试验中,笔者参考相关文献^[4,11],分别以水、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇和无水甲醇为提取溶剂进行比较。结果发现,以70%甲醇为提取溶剂时样品中没食子酸、桂皮酸、儿茶素的含量相对较高,故选择以70%甲醇为提取溶剂。同时又参考相关文献^[17],分别对加热回流、超声、冷浸等提取方法进行比较。结果发现,加热回流提取所得样品杂质较多且在色谱中不易分离,样品中3种成分含量易受加热温度等因素影响而出现不稳定的现象;冷浸提取所得样品中3种成分含量较低;超声提取所得样品中3种成分含量较高且杂质较少,故选择超声提取。此外,笔者还比较了甲醇-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.2%甲酸水溶液、甲醇-0.3%甲酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.2%磷酸水溶液、甲醇-0.3%磷酸水溶液、甲醇-0.1%冰醋酸水溶液、甲醇-0.2%冰醋酸水溶液、甲醇-0.3%冰醋酸水溶液等不同流动相体系对色谱峰的影响。结果,以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相时样品中3种成分的分度均较好,且可与杂质峰达到基线分离,故选择以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱。

生大黄、水蒸熟大黄、熟大黄均为较常见的大黄炮制品,因此笔者测定了上述3种不同大黄炮制品中鞣质类成分的含量并进行了比较。含量测定结果显示,熟大黄中没食子酸、桂皮酸含量较高,上述两种成分含量大小顺序均依次为熟大黄>水蒸熟大黄>生大黄,其原因可能与大黄中的其他成分在炮制过程中受热后发生化学变化或水解而转化为没食子酸和桂皮酸有关^[17];生大黄中儿茶素含量较高,该成分含量大小顺序依次为生大黄>水蒸熟大黄>熟大黄,其原因可能与儿茶素受热极不稳定或发生水解反应有关^[6,20]。

综上所述,该方法灵敏、可靠、重复性好,可用于同

时测定3种不同大黄炮制品中没食子酸、桂皮酸和儿茶素的含量。

参考文献

- [1] 王亦君,冯舒涵,程锦堂,等.大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(13):227-234.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:23-24.
- [3] 魏江存,陈勇,谢臻,等.中药大黄炮制品的化学成分及药效研究进展[J].中国药房,2017,28(25):3569-3574.
- [4] 于建玉,廖欣,丁厚伟,等.中药大黄药理作用研究进展及其临床应用[J].中国现代药物应用,2016,10(11):286-287.
- [5] 傅兴圣,陈菲,刘训红,等.大黄化学成分与药理作用研究新进展[J].中国新药杂志,2011,20(16):1534-1538,1568.
- [6] 颜永刚,尹立敏,王红艳,等. HPLC法同时测定大黄炮制品中10种化学成分的含量[J].中国药房,2016,27(27):3839-3842.
- [7] 魏江存,陈勇,谢臻,等.紫外-可见分光光度法测定生大黄和醋大黄的总蒽醌含量[J].井冈山大学学报(自然科学版),2017,38(6):88-92.
- [8] 魏江存,陈勇,谢臻,等.紫外-可见分光光度法测定大黄不同炮制品总蒽醌含量[J].广州化工,2017,45(17):126-128.
- [9] 龚千锋.中药炮制学[M].北京:中国中医药出版社,2012:8.
- [10] 李燕,隋峰,刘亮亮,等.大黄各炮制品提取物泻下作用的比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):151-154.
- [11] 刘亮亮,隋峰,闫美娟,等.大黄炮制品各组泻下作用的比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(17):161-165.
- [12] 陈艳琰,唐于平,陈嘉倩,等.大黄资源化学研究进展与利用策略[J].中草药,2018,49(21):5170-5178.
- [13] 李先端,黄璐琦.炮制对中药大黄5种蒽醌成分含量的影响[J].中国中药杂志,2005,30(12):904-906,943.
- [14] 张勉,徐德然,任强,等.大黄类药材炮制前后蒽醌类化合物含量的变化[J].中国药理学杂志,2005,40(7):499-501.
- [15] 侯娟,雷钰,熊桐桐,等.大黄鞣质研究与应用概述[J].青海草业,2017,26(2):44-48.
- [16] 徐先祥.儿茶素的药理作用研究综述[J].郑州轻工业学院学报(自然科学版),2012,27(4):60-64.
- [17] 王云,李丽,张村,等.大黄5种饮片中的没食子酸和儿茶素的含量比较研究[J].中国中药杂志,2010,35(17):2267-2269.
- [18] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:31-32.
- [19] 卫生部药政管理局.全国中药饮片炮制规范[S].1988年版.北京:人民卫生出版社,1988:6.
- [20] 朱玥,金哲雄.鞣质类化合物的研究进展[J].黑龙江医药,2015,28(1):23-25.

(收稿日期:2019-04-16 修回日期:2019-09-24)

(编辑:陈宏)