

高效毛细管电泳法测定红景天中没食子酸的含量

祝馨怡¹, 罗兴平^{1,2}, 陈立仁¹, 柳春辉¹, 李永民¹

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省药品检验所, 甘肃 兰州 730000)

藏药红景天有高原人参之称, 具有滋补强壮、耐缺氧、抗疲劳、抗辐射、抗病毒、抗癌及适应原样作用, 不但有类似人参、刺五加的滋补强壮作用, 而且在某些方面更优于这两种药物^[1]。已报道的红景天主要成分为红景天苷及其苷元酪醇、没食子酸及其苷类、山柰酚及其苷类、草质素及其苷类^[2], 没食子酸具有较强的抗菌、抗病毒和抗肿瘤作用^[3]。目前, HPLC法^[4]和 TLCS法^[5]测定中药中没食子酸的含量已有报道, 但红景天中没食子酸的含量测定尚未见报道。本实验用高效毛细管电泳法(HPCE法)测定了红景天中没食子酸的含量, 该法快速、灵敏, 结果准确、可靠。可用于红景天药材及其制剂中没食子酸的含量分析。

1 仪器与试剂

P/ACE MDQ 型毛细管电泳仪(Beckman Coulter 公司, 美国); 二极管阵列(PDA)检测器; 石英毛细管柱(河北永年光导纤维厂), 80 cm×75 μm, 有效长度 57 cm。

磷酸氢二钠(分析纯, 北京新光化学试剂厂), 甲醇(色谱纯, 山东省禹王实业有限公司禹城化工厂), 对照品没食子酸(中国药品生物制品检定所), 红景天 *Rhodiola rosea* L. (甘肃省奇正药业公司, 由甘肃省药品检验所鉴定), 所用其他试剂均为分析纯, 实验中配制缓冲液和样品液所用的水均为去离子水(Milli-Q)。

2 方法与结果

2.1 实验条件: 压力进样 0.0034 MPa×8 s; 运行时间 15 min; 分离电压 20 kV(恒压分析); 柱温: 25℃; 检测波长: 214 nm; 运行缓冲液为 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH=7.5)。毛细管在使用前用 0.1 mol/L NaOH、H₂O、运行缓冲液分别冲洗 3 min, 每次进样前用运行缓冲液淋洗 2 min。电泳分离图见图 1。

2.2 缓冲液的制备: 配制 150 mmol/L 磷酸盐储备

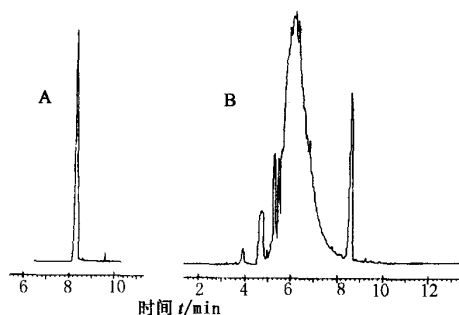


图1 没食子酸(A)和红景天样品(B)的电泳分离图

Fig. 1 Electrophoretogram of gallic acid (A) and *R. rosea* sample (B)

液, 各取适量以制得 pH 为 8.5~5.5, 5~40 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(用 H₃PO₄ 调 pH)。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取没食子酸对照品适量, 加 50% 甲醇制成 0.15 mg/mL 对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备: 取红景天粉末约 1.5 g, 精密称定, 置于 100 mL 锥形瓶中, 精密加 50% 甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取滤液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后即得。

2.5 标准曲线制备: 精密称取没食子酸对照品适量, 加 50% 甲醇制成 0.4 mg/mL 溶液, 作为对照品贮备溶液。精密吸取对照品贮备液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别进样测定峰面积积分值, 以对照品峰面积积分值为纵坐标(Y), 相应对照品质量浓度(X)为横坐标进行线性回归, 计算没食子酸在 0.02~0.2 mg/mL 具有良好线性关系, 线性回归方程为: $Y = 4\,352\,563 X - 25\,946.5$, $r = 0.999\,6$ 。

2.6 精密度试验: 取没食子酸对照品溶液, 在优化电泳条件下重复进样 5 次, 分析测定对照品峰面积积分值, RSD=1.45%, 表明本分析方法精密度较好。

2.7 重现性试验: 取红景天样品(批次 2)按样品测定方法处理后在优化条件下测定, 6 次平行实验, 结

收稿日期: 2004-06-26

基金项目: 中国科学院百人计划

作者简介: 祝馨怡(1976—), 女, 山东青州人, 博士, 主要从事液相色谱研究。

Tel: (0931)8278931 Fax: (0931)8277088 E-mail: chenlr@ns.lzb.ac.cn

果测得红景天样品中含没食子酸分别为 4.17、4.23、4.15、4.18、4.21、4.24 mg/g (RSD=0.85%, $n=6$), 表明样品处理过程和测定方法均有良好的重现性。

2.8 稳定性试验: 取红景天样品溶液, 在 0、0.5、1、2、4、8 h 分别按上述电泳条件分析测定, 记录峰面积积分值, 结果峰面积积分值的 RSD=0.65%。可见样品提取溶液在 8 h 内是稳定的。

2.9 回收率试验: 采用加样回收法, 取红景天(质量分数为 4.18 mg/g)样品共 6 份, 精密称定, 精密加入一定量对照品贮备液(0.168 4 mg/mL), 依法制备供试品溶液、进样, 记录色谱图, 计算平均回收率 97.52%, RSD=1.19%。

2.10 样品测定: 分别取不同批次的红景天样品按样品溶液制备方法处理后在优化分离条件下测定, 计算样品中没食子酸的质量分数, 结果见表 1。

表 1 红景天样品测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of *R. rosea* sample ($n=3$)

批次	没食子酸/(mg·g ⁻¹)	RSD/%
1	2.56	0.68
2	4.18	0.99
3	4.88	1.34
4	3.50	1.83

3 讨论

3.1 缓冲体系的选择: 按常规的毛细管区带电泳方法, 分别考察了硼砂、磷酸盐、Tris-H₃PO₄ 等缓冲液体系作为运行缓冲液时样品的分离情况, 实验发现磷酸盐缓冲液体系对样品的分离效果较好, 没食子酸能够与样品中其他组分完全分离。

3.2 缓冲溶液 pH 值对分离的影响: 选择 20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液作为运行缓冲液, pH 值在 8.5~5.5 变化, 考察 pH 值变化对样品中没食子酸分离的影响, 结果表明随着 pH 值的减小, 没食子酸的迁移时间逐渐延长, 而其他组分的迁移时间变化较小, 因此没食子酸与其他组分的分离更完全。当 pH 为 7.5 时, 没食子酸的迁移时间适中, 峰形较好并且与其他组分可以实现基线分离, 因此选择 pH=7.5 的磷酸盐缓冲体系作为运行缓冲液。

3.3 磷酸盐浓度对分离的影响: 在 pH 为 7.5 时, 考察了 5、10、15、20、30、40 mmol/L 磷酸盐缓冲液

作为运行缓冲液时对样品的分离情况, 研究发现随着盐浓度增加, 没食子酸的出峰时间延长, 而其他组分的出峰时间变化较小, 因此没食子酸与其他组分的分离更加充分。当磷酸盐浓度为 20 mmol/L 时, 没食子酸出峰时间适中, 峰形较好且可以实现与其他组分的基线分离。因此 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH7.5)为最佳运行缓冲液。

3.4 运行电压的选择: 提高分离电压可以缩短分析时间, 实验中比较了 15~25 kV 分离电压时的没食子酸分离情况, 电压为 20 kV 时分离时间合适, 分离效率较高且峰形较好, 因此选择 20 kV 电压作为分离电压。

3.5 检测波长的选择: 取没食子酸对照品溶液为分析对象, 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.5)为运行缓冲液, 在 190~330 nm 进行二极管阵列扫描, 结果 214 nm 为检测波长, 检测灵敏度高, 基线稳定。

3.6 样品提取方法考察: 分别采用 30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇等溶剂对红景天样品进行超声提取比较试验, 结果表明样品用 50% 甲醇超声提取 1 h 效果最佳。

3.7 高效毛细管电泳作为一种新的分离分析方法, 具有高效、快速、操作成本低和试剂用量少等突出优点, 在药物分析中得到日益广泛的应用。本实验建立的红景天药材中没食子酸的毛细管区带电泳(CZE)分离分析法, 可使没食子酸与其他组分得到完全分离, 为红景天及其制剂中没食子酸的含量分析提供了一个很好的色谱参考条件。

References:

- [1] Qian Y C, Qin K, Liu J D. Survey of studies on *Rhodiola kirilowii* [J]. *Acta Chin Med Pharm* (中医药学报), 1999 (5): 34-35.
- [2] Li J S, Wang J X, Zhang J X, et al. Studies on the chemical constituents of *Rhodiola dumulosa* (Franch.) Fu [J]. *J Xi'an Med Univ* (西安医科大学学报), 1997, 18(3): 369-371.
- [3] Shi B, Di Y, He Y J, et al. The pharmacological activities of vegetable tannin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(7): 487-490.
- [4] Sha M, Cao A M, Wang B, et al. Determination of gallic acid in garden burnet by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(2): 99-101.
- [5] Li A Q, Cai K H, Lin L. Quantitative determination of gallic acid in Lihoule Tablets by TLD scanning [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 1999, 18(1): 64-66.