

HPLC 同时测定不同产地猴耳环叶中没食子酸和槲皮素的含量

彭亮¹, 李诒光^{2*}, 陈杰^{1*}, 饶毅¹, 魏惠珍¹, 眭荣春¹, 袁桂平³
(1. 江西中医药大学, 南昌 330006; 2. 江中药业股份有限公司, 南昌 330096;
3. 江西省食品药品检验所, 南昌 330046)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定不同产地猴耳环叶中没食子酸和槲皮素含量的方法。方法:采用 Odyssil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-0.2% 磷酸水溶液 (B) 进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温, 30 ℃, 检测波长 254 nm; 进样量 5 μL。结果:没食子酸在 0.060 2~1.806 μg 线性良好 ($r=0.999\ 5$), 平均回收率为 97.27%, RSD 1.4%; 槲皮素在 0.016 9~0.507 6 μg 线性良好 ($r=0.999\ 6$), 平均回收率为 96.29%, RSD 1.3%。结论:该方法简便可行、重复性好, 适用于猴耳环药材 2 种有效成分的同时测定, 可为猴耳环药材的质量控制提供参考依据。

[关键词] 猴耳环; 高效液相色谱法; 没食子酸; 槲皮素
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2015)11-0077-03
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110077

HPLC Determination of Gallic Acid and Quercetin in Archidendri Folium from Different Producing Areas
PENG Liang¹, LI Yi-guang^{2*}, CHEN Jie^{1*}, RAO Yi¹, WEI Hui-zhen¹, SUI Rong-chun¹, YUAN Gui-ping³
(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangzhong Pharmaceutical Corporation, Nanchang 330096, China; 3. Jiangxi Provincial Institute for Drug and Food Control, Nanchang 330046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a determination method for gallic acid and quercetin in Archidendri Folium from different producing areas. **Method:** HPLC was performed on Odyssil C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), gradiently eluting with acetonitrile as mobile phase A and 0.2% H₃PO₄ as B at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was 254 nm. The injection volume was 5 μL. **Result:** The linearity of gallic acid was good in the range of 0.060 2-1.806 μg ($r=0.999\ 5$), and the average recovery was 97.27% (RSD 1.4%). The linearity of quercetin was good in the range of 0.016 9-0.507 6 μg ($r=0.999\ 6$), and the average recovery of 96.29% (RSD 1.3%). **Conclusion:** The established method is simple, accurate and can be used for the determination of gallic acid and quercetin in Archidendri Folium, it can able to provide reference for quality control of Archidendri Folium.

[Key words] Archidendri Folium; HPLC; gallic acid; quercetin

猴耳环味具有清热解毒、凉血消肿, 止泻等作用^[1-2], 民间常用于治疗疮及化脓性伤口、湿疹等^[3]。猴耳环主要含有黄酮类、酚酸类等成分, 如没食子酸、槲皮素等^[4-5]。没食子酸是猴耳环中消炎、止咳的主要有效成分, 具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤等作用; 槲皮素具有较好的祛痰、止咳、消炎镇痛作用, 用于抗癌、抗心血管疾病和慢性支气管炎的治疗^[6-7]。《广东省

中药材标准》中猴耳环只有性状鉴别和没食子酸薄层鉴别, 不能有效控制药材质量, 本文以没食子酸和槲皮素为指标, 建立其 HPLC 含量测定方法, 为猴耳环质量标准的完善奠定基础。

1 材料

1.1 仪器 1100 系列高效液相色谱仪 (美国安捷伦, 包括 G1379A 型在线真空脱气机, G1311A 型四

[收稿日期] 20140929(005)
[第一作者] 彭亮, 在读硕士, 从事中药质量控制研究, Tel:15079048763, E-mail:602982740@qq.com
[通讯作者] * 李诒光, 博士, 主任中药师, 从事中药质量评价与开发研究, Tel:15979019136, E-mail:lyg@jzjt.com;
* 陈杰, 硕士, 副教授, 从事中药质量评价与开发研究, Tel:15979019631 E-mail:813680107@qq.com

元泵, G1367A 型自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315B 型 DAD 检测器), AB204-N 型分析天平 (Mettler Toledo 上海衡器有限公司)。

1.2 试药 猴耳环药材经江西省食品药品检验所袁桂平主任中药师鉴定, 为豆科植物猴耳环 *Archidendron clypearia* 的干燥略带小枝的叶, 药材来源见表 1。没食子酸、槲皮素对照品 (批号 110831-201204, 100081-200907, 中国食品药品检定研究院), 乙腈为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。

表 1 猴耳环叶样品的来源

Table 1 Source of of Archidendri Folium

编号	批次/产地	采收日期	编号	批次/产地	采收日期
S1	北粤山区-1	2012-07-12	S6	北粤山区-6	2012-08-27
S2	北粤山区-2	2012-09-22	S7	北粤山区-7	2012-08-18
S3	北粤山区-3	2012-07-15	S8	北粤山区-8	2012-06-21
S4	北粤山区-4	2012-06-29	S9	从化太平	2012-08-02
S5	北粤山区-5	2012-07-05	S10	增城中新	2012-07-25

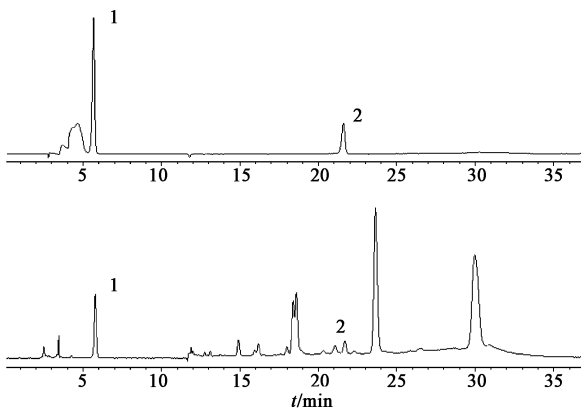
2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、槲皮素对照品适量, 加甲醇溶解制成含没食子酸 0.060 2 g·L⁻¹, 槲皮素 0.016 9 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取猴耳环叶粉末 (过二号筛) 约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 50 mL, 称定质量, 回流提取 1.5 h, 放冷, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取滤液, 即得。

2.3 色谱条件与系统适应性试验 Odyssil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A)-0.2% 磷酸水 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 7 min, 8% A; 7 ~ 17 min, 8% ~ 24% A; 17 ~ 27 min, 24% ~ 27% A; 27 ~ 32 min, 27% ~ 8% A; 32 ~ 37 min, 8% A); 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 254 nm, 进样量 5 μL。结果表明混合对照品溶液和供试品溶液色谱图中没食子酸、槲皮素色谱峰无拖尾, 分离度良好, 见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 1, 5, 10, 20, 30 μL 注入液相色谱仪中, 按上述色谱条件测定。以峰面积为纵坐标, 对照品进样量 (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线。得没食子酸、槲皮素回归方程分别为 $Y = 623.09X + 73.146$ ($r = 0.999\ 5$), $Y = 755.66X + 4.467\ 5$ ($r = 0.999\ 6$), 结果表明没食子酸在 0.060 2 ~ 1.806 μg, 槲皮素在 0.016 9 ~



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 没食子酸; 2. 槲皮素

图 1 猴耳环叶 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of Archidendron Folius

0.507 6 μg 与峰面积均有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取 2.1 项下的混合对照品溶液连续进样 6 次, 按 2.3 项下色谱条件测定, 结果没食子酸、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 0.8%, 1.1%, 表明该方法精密度良好。

2.6 稳定性试验 取样品 S10, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 注入液相色谱仪, 按 2.3 项下色谱条件测定。结果没食子酸、槲皮素峰面积的 RSD 分别为 1.6%, 2.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取样品 S10 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定。结果没食子酸、槲皮素的平均质量分数分别为 17.07, 5.39 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.7%, 1.2%, 表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量样品 S10 粉末 0.1 g, 共 6 份, 精密称定。分别精密加入一定量的没食子酸、槲皮素对照品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果见表 2。

2.9 样品含量测定 取样品 S1 ~ S10, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算各样品中没食子酸和槲皮素的含量, 结果见表 3。

3 讨论

10 个不同产地猴耳环叶中没食子酸和槲皮素含量差异较大, 这可能与不同产地温度、湿度、土质等外部生长环境因素有关, 且没食子酸含量与槲皮素含量无相关性, 不同年份的猴耳环药材含量还有待研究, 以确定各成分含量下限。

文献报道没食子酸与槲皮素在 254, 360 nm 处

表 2 猴耳环叶中没食子酸和槲皮素加样回收率试验

Table 2 Recovery test results of gallic acid and quercetin in Archidendri Folium

成分	取样量/g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
没食子酸	0.102 5	1.75	1.70	3.44	99.41	97.27	1.4
	0.110 9	1.89	1.70	3.55	97.64		
	0.108 9	1.86	1.70	3.49	95.88		
	0.104 6	1.79	1.70	3.41	95.29		
	0.107 9	1.84	1.70	3.51	98.23		
	0.101 2	1.73	1.70	3.38	97.05		
槲皮素	0.102 5	0.55	0.53	1.06	95.22	96.29	1.3
	0.110 9	0.60	0.53	1.12	98.11		
	0.108 9	0.59	0.53	1.10	96.22		
	0.104 6	0.56	0.53	1.07	96.22		
	0.107 9	0.58	0.53	1.09	95.22		
	0.101 2	0.55	0.53	1.05	94.33		

表 3 猴耳环药材中没食子酸和槲皮素含量(n=3)

Table 3 Content of gallic acid and quercetin in Archidendri Folium

(n=3)			mg·g ⁻¹		
编号	没食子酸	槲皮素	编号	没食子酸	槲皮素
S1	9.19	5.53	S6	23.42	3.88
S2	11.12	7.20	S7	11.23	3.72
S3	8.85	4.65	S8	19.65	5.73
S4	8.35	6.69	S9	5.36	3.89
S5	9.04	5.47	S10	17.07	5.39

均有较强吸收^[8-9],但本品在 360 nm 处槲皮素峰面积较小,其色谱峰无法与其他杂质峰完全分离。经过比较,最后选择检测波长为 254 nm。

本实验通过对提取溶剂、提取方法、提取时间进行单因素考察,确定以 50% 乙醇为溶剂,回流提取 1.5 h 为最佳提取条件。

由于没食子酸与槲皮素极性差别较大,需进行梯度洗脱^[10]。在实验过程中曾用甲醇-水、甲醇-0.2% 磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.2% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱。结果表明,以乙腈-0.2% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱时,各色谱峰的峰形和分离度均优于其他流动相系统。

[参考文献]

[1] 张志坚,李镜友,李国强,等. 猴耳环研究进展 [J].

中国药业,2010,19(18):82-84.

[2] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第一册 [S]. 广州: 广东科学技术出版社, 2004: 197-199.

[3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京:人民卫生出版社,1986:613-615.

[4] 苏妙贤,唐之岳,黄伟欢,等. 猴耳环化学成分研究 [J]. 中药材,2009,32(5):705-707.

[5] 李镜友,罗巧红,张曼,等. HPLC 法测定不同采收期猴耳环中没食子酸的含量 [J]. 中药材,2009,32(6): 915-916.

[6] 李药兰,李克明,苏妙贤,等. 猴耳环抗病毒有效成分研究 [J]. 中国中药杂志,2006,31(5):397-399.

[7] Guo X Y, Wang N L, Bo L, et al. Chemical constituents from pithecellobium cbypearia and their effects on T lymphocytes proliferation [J]. J Chin Pharmacem Sci, 2007,16(3):208-212.

[8] 李艳芳,夏泉,许风清,等. HPLC 法同时测定热淋清制剂中没食子酸和槲皮素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(12):15-17.

[9] 梁泰刚,刘伟,赵承孝,等. HPLC 法同时测定养心草中没食子酸、槲皮素和山柰酚的含量 [J]. 光谱实验室,2009,26(4):881-884.

[10] 刘莉莹,康洁,陈若芸. 猴耳环属植物化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2013, 44 (18): 2623-2629.

[责任编辑 顾雪竹]