

HPLC 法测定畚药地稔药材中没食子酸和槲皮素

刘敏¹, 李水福^{1*}, 程科军²

1. 丽水市食品药品检验所, 浙江 丽水 323000

2. 同济大学丽水中药研究院, 浙江 丽水 323000

摘要: 目的 建立畚药地稔药材中没食子酸和槲皮素的测定方法。方法 采用高效液相色谱法测定, 色谱柱为 Agilent-SB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-0.4%磷酸水溶液(B), 梯度洗脱 0~7 min, 5% A; 7~9 min, 5%~35% A; 9~11 min, 35%~55% A; 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃; 检测波长 254 nm。结果 没食子酸和槲皮素的线性范围分别为 0.081 4~0.326 0 μg ($r=0.999\ 8$), 0.027 1~0.136 0 μg ($r=0.999\ 6$); 平均加样回收率分别为 97.72% (RSD=0.90%), 99.75% (RSD=1.39%)。结论 该方法简便易行、准确、重现性好, 可用于畚药地稔药材的质量控制。

关键词: 地稔; 没食子酸; 槲皮素; HPLC; 质量控制

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)04-0721-03

Determination of gallic acid and quercetin in traditional She Medicine—*Melastoma dodecandrum* by HPLC

LIU Min¹, LI Shui-fu¹, CHENG Ke-jun²

1. Lishui Institute for Food and Drug Control, Lishui 323000, China

2. Tongji University-Lishui Institute of Traditional Chinese Medicine, Lishui 323000, China

Key words: *Melastoma dodecandrum* Lour.; gallic acid; quercetin; HPLC; quality control

畚药地稔为野牡丹科植物地稔 *Melastoma dodecandrum* Lour. 的全草, 畚族称为嘎狗噜或粪桶板, 又名山地稔、地葡萄、金头石榴、铺地锦、落地稔、地茄等, 分布于长江以南的江西、福建、浙江、广西、广东、贵州、云南等省区, 瑶族、畚族等少数民族民间使用较广泛^[1-2]。现有《广东药材标准》和《浙江省中药炮制规范》2005 年版正式收载该药, 特别是《浙江省中药炮制规范》以畚药的名义收载, 而且据本课题组开发的畚医药数据库统计, 有 20 多个地稔处方是极具开发前景的天然药物。临床用于治疗高热、肿痛、咽喉肿痛、牙痛、赤白血痢疾、黄疸、水肿、痛经、崩漏、带下、疔疮、毒蛇咬伤等病症^[3]。现有研究表明, 地稔含有多糖、黄酮类、氨基酸、酚类、常量和微量元素、色素等多种化学成分, 具有止血、抗氧化、抑制糖基化终末产物(AGE)的生成、镇痛抗炎、降糖等作用^[4-6]。没食子酸具有抗菌、抗病毒等作用, 槲皮素具有较好的祛痰、止咳作用, 并有一定的平喘作用, 此外还有降低血压、增强毛细血管抵抗力、

减少毛细血管脆性、调血脂、扩张冠状动脉、增加冠脉血流量等作用。因此, 以此两种成分同时控制其药材、饮片、提取物及其制剂的质量有较大的意义。

本实验采用 HPLC 法测定地稔中没食子酸和槲皮素, 研究表明该方法简便易行、准确、重复性好, 可用于畚药地稔药材的质量控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 电子天平(XS104, 上海恒刚衡器天平有限公司)。地稔药材采自丽水市莲都区, 经丽水市食品药品检验所中药师李水福主任鉴定为野牡丹科植物地稔 *Melastoma dodecandrum* Lour. (根据采集时间确定批号分别为 20100501、20100613、20100822、20110726、20110802、20110811); 没食子酸对照品(批号 110831-200803)、槲皮素对照品(批号 100081-200907, 质量分数为 96.5%)均购自中国药品生物制品检定所。甲醇为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。

收稿日期: 2011-12-15

基金项目: 浙江丽水市重点课题(20100410)

作者简介: 刘敏, 女, 硕士, 主要研究方向为中药质量控制及分析等。Tel: (0578)2138744 E-mail: 2001lm2005@163.com

*通讯作者 李水福 Tel: (0578)2155989 E-mail: lsf6789@126.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent-SB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇 (A)-0.4%磷酸溶液 (B), 梯度洗脱: 0~7 min, 5% A; 7~9 min, 5%~35% A; 9~11 min, 35%~55% A; 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长为 254 nm。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸和槲皮素对照品适量, 置同一 50 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成含没食子酸 271.4 μg/mL、槲皮素 271 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取经粉碎, 过 3 号筛的地稔药材 (批号 20110802) 粉末 4.0 g (同时另取本品测定水分) 置锥形瓶中, 精密加入 50 mL 甲醇-15% 盐酸 (4:1), 密塞, 称定质量, 加热回流提取 3 h, 放冷至室温, 再称定质量, 用提取溶剂补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取 5 mL 滤液置 10 mL 量瓶中, 用提取溶剂稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 滤液即为供试品溶液。

2.4 系统适应性试验

分别精密吸取对照品和供试品项下溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 见图 1。在

该色谱条件下, 没食子酸、槲皮素与其他成分可达到基线分离, 分离度均大于 1.5。对照品色谱峰与供试品色谱峰中相对应色谱峰的紫外光谱吸收均一致。结果表明在上述色谱条件下没食子酸和槲皮素具有良好的分离效果。

2.5 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液适量, 分别制成没食子酸质量浓度为 16.284、27.140、37.996、48.852、65.136 μg/mL, 槲皮素质量浓度为 5.42、10.84、16.26、21.68、27.10 μg/mL 的对照品溶液, 准确吸取 5 μL, 按上述确定的色谱条件进行测定, 分别以对照品的 (X) 为横坐标, 峰面积积分值 (Y) 为纵坐标, 得没食子酸回归方程为 $Y=2 \times 10^6 X+2.3026$, $r=0.9998$, 槲皮素回归方程为 $Y=6 \times 10^4 X+5.1521$, $r=0.9996$ 。结果表明, 没食子酸和槲皮素分别在 0.0814~0.3260、0.0271~0.1360 μg 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

精密吸取对照品溶液 5 μL, 连续进样 5 次, 测得其峰面积, 计算没食子酸峰面积的 RSD 为 0.46%, 槲皮素峰面积的 RSD 为 0.41%。

2.7 稳定性试验

精密吸取“2.3”项下制备的供试品溶液各 5 μL, 分别在 0、4、8、12、24 h 依次进样, 测得其峰面积, 计算没食子酸峰面积的 RSD 为 0.83%, 槲皮素峰面积的 RSD 为 0.43%。

2.8 重复性试验

精密称取同一地稔药材 (批号 20110802) 粉末 5 份, 照“2.3”项下制备, 进样 5 μL, 按干燥品计算, 没食子酸和槲皮素质量分数分别为 1.00、0.31 mg/g, RSD 分别为 0.86%、1.42%。

2.9 加样回收率试验

取已测定的地稔药材 (批号 20110802) 6 份, 各约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入没食子酸、槲皮素对照品溶液 1 mL (质量浓度分别为 1.76、0.590 mg/mL), 按“2.3”项下方法, 制备供试品液, 进样 5 μL, 测定没食子酸和槲皮素量, 计算得没食子酸和槲皮素回收率分别为 97.72%、99.75%, RSD 分别为 0.90%、1.39%。

2.10 样品测定

取不同批号的样品粉末 (过 3 号筛) 约 4.0 g, 各 2 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别测定并计算质量分数。结果见表 1。

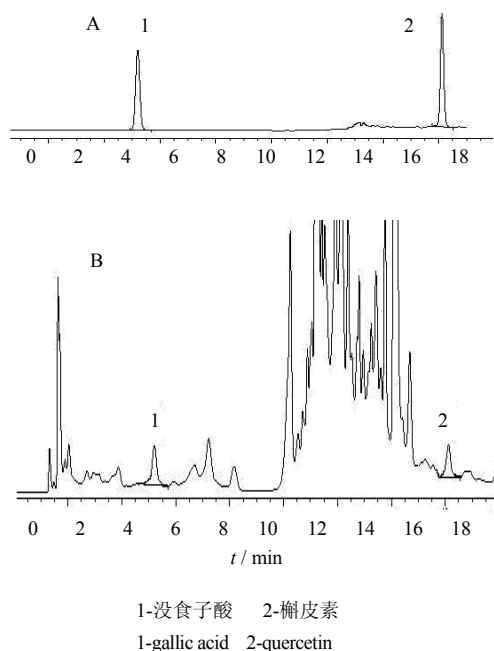


图 1 混合对照品 (A) 和地稔供试品 (B) 溶液的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

表1 地稔药材中没食子酸和槲皮素的测定结果 ($n=3$)Table 1 Determination of gallic acid and quercetin in *M. dodecandrum* ($n=3$)

批号	没食子酸 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	槲皮素 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
20100501	0.99	0.28
20100613	0.85	0.29
20100822	1.02	0.26
20110726	0.96	0.33
20110802	1.00	0.31
20110811	1.92	0.24

3 讨论

经紫外扫描发现, 没食子酸在 273、223 nm 波长处有最大吸收, 槲皮素在 254、359 nm 波长处有最大吸收。经过比较发现在 254 nm 时, 2 个对照品吸收峰的峰形良好, 吸收较强, 所以选择 254 nm 为检测波长。

因没食子酸、槲皮素的极性差异较大, 曾尝试采用乙腈-0.2%磷酸溶液、甲醇-0.2%磷酸溶液、甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相, 进行梯度洗脱。结果发现, 以甲醇-0.4%磷酸溶液进行梯度洗脱的分析效果较优, 分析时间短, 分离度较高。

本实验发现采用甲醇-盐酸混合溶液提取的样品能同时检测出 2 种成分, 且盐酸酸度对提取影响

较大, 通过比较发现以甲醇-15%盐酸 (4:1) 作为提取溶剂能将药材中的两种成分提取完全。

没食子酸和槲皮素为畲药地稔药材中的药理活性成分, 目前, 尚无同时测定两种成分的研究报道。本实验采用 HPLC 法同时测定畲药地稔药材中没食子酸和槲皮素的量, 研究表明该方法简便易行、准确、重复性好, 可用于畲药地稔药材的质量控制。

致谢: 丽水市食品药品检验所中药师李建良副主任组织的采药小组以及中药室全体同志对本课题的大力支持与帮助。

参考文献

- [1] 覃迅云, 罗金裕, 高志刚. 中国瑶药学 [M]. 南宁: 广西民族出版社, 2002.
- [2] 陈志英, 李水福. 浅谈畲药地稔的研究概况 [J]. 中草药, 2007, 38(7): 附 1.
- [3] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [4] 廖宝珍, 阙惠卿, 林 绥. 地稔的研究进展 [J]. 海峡药学, 2007, 19(12): 3-7.
- [5] 雷后兴, 鄢连和, 李水福, 等. 畲药地稔水煎液的镇痛抗炎作用研究 [J]. 中国民族医药杂志, 2008, 14(3): 45-47.
- [6] 李 丽, 周 芳, 黄琼珍. 地稔的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 广西中医学院学报, 2011, 14(1): 73-75.