

HPLC 法测定壮药羊开口中没食子酸和鞣花酸的量

邹 准¹, 寿晓云¹, 闵建国^{1,3}, 周艳林^{1,2}, 刘华钢², 邹节明^{1*}

1. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

2. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

3. 广西师范大学化学化工学院, 广西 桂林 541004

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定羊开口中没食子酸和鞣花酸的方法。方法 采用 Phenomenex C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相: 乙腈 (A) -0.2% 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱, 0~10 min, 5% A; 10~15 min, 5%~12% A; 15~50 min, 12% A; 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 35 ℃。结果 没食子酸、鞣花酸的线性范围分别为 0.095~0.950 μg ($r=0.9999$)、0.123~1.839 μg ($r=0.9998$), 平均回收率分别为 100.15%、97.20%, RSD 分别为 2.54%、2.16%。结论 本测定方法简便、准确、重现性好, 适用于羊开口的质量控制。

关键词: 羊开口; 没食子酸; 鞣花酸; 质量控制; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)11-2206-03

Determination of gallic acid and ellagic acid in Zhuang Medicine radix and rhizome of *Melastomus normale* by HPLCZOU Zhun¹, SHOU Xiao-yun¹, MIN Jian-guo^{1,3}, ZHOU Yan-lin^{1,2}, LIU Hua-gang², ZOU Jie-ming¹

1. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China

2. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China

Key words: radix and rhizome of *Melastomus normale*; gallic acid; ellagic acid; quality control; HPLC

壮药羊开口为野牡丹科植物展毛野牡丹 *Melastomus normale* D. Don 和野牡丹 *M. candidum* D. Don 的根和根茎^[1], 壮族称为棵芒难, 又名野牡丹根、痢疾罐、白爆牙郎、大金香炉、老虎杆等, 分布于广西、云南、贵州、四川、福建、重庆等地。味甘、酸、涩, 性温, 具有收敛、止血、解毒的功效, 用于泄痢、崩漏带下、内外伤出血, 《广西中药材标准》、《广西壮族自治区壮药质量标准》均有记载。羊开口作为三金片系列产品和野牡丹颗粒的重要原料, 现有质控标准除了简单的性状鉴别外, 尚未见有关测定的报道, 本课题组通过化学成分分离研究, 发现其主要含以没食子酸和鞣花酸为代表的鞣酸类化合物^[2], 现代研究表明此类成分具有良好的抗氧化、抗菌及抗癌变等作用^[3]。本实验采用 HPLC 法同步测定羊开口中没食子酸和鞣花酸的量, 为羊开口质量标准及临床应用研究提供依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, 996 检测器,

Empower 色谱工作站, 超声波清洗仪 (Branson bug40-60, 上海必能信公司), XP205 电子分析天平 (Mettler Toledo)。没食子酸和鞣花酸对照品均为本实验室自制 (质量分数大于 98%); 羊开口药材, 采自广西、广东、福建、贵州等地, 经桂林三金药业股份有限公司钟小清高级工程师鉴定为展毛野牡丹 *Melastomus normale* D. Don 和野牡丹 *Melastomus candidum* D. Don 的根和根茎, 见表 1。乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

表 1 样品信息

Fig.1 Information of samples

编号	品种	产地	编号	品种	产地
1	展毛野牡丹	广西恭城	6	展毛野牡丹	贵州都匀
2	野牡丹	广西防城	7	展毛野牡丹	贵州安顺
3	展毛野牡丹	广西玉林	8	展毛野牡丹	福建漳州
4	展毛野牡丹	广东韶关	9	野牡丹	福建三明
5	展毛野牡丹	广东清远	10	展毛野牡丹	四川泸州

收稿日期: 2012-05-11

基金项目: “十二五” 国家科技重大专项 (2011ZX09201-201-17)

作者简介: 邹 准, 男, 硕士, 研究方向为中药新药开发。Tel: (0773)5842588 E-mail: zouzhu@hotmial.com

*通讯作者 邹节明 Tel: (0773)5842588 E-mail: zjm@sanjin.com.cn

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.2%磷酸溶液 (B), 梯度洗脱, 0~10 min, 5% A; 10~15 min, 5%~12% A; 15~50 min, 12% A; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 35 ℃。在上述色谱条件下, 理论塔板数以鞣花酸峰计不低于 3 000, 各被测组分与相邻峰之间分离度均大于 1.5, 色谱图见图 1。

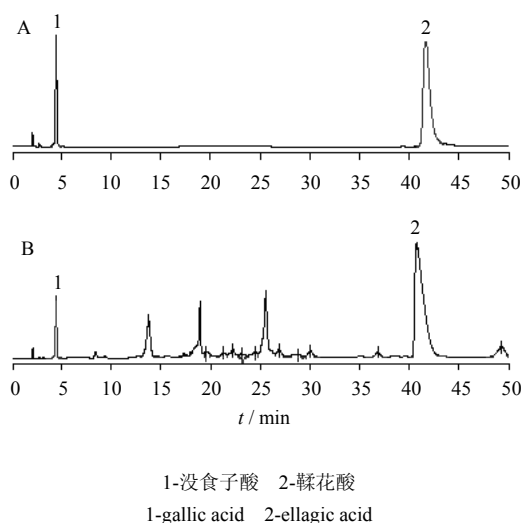


图1 混合对照品 (A) 及样品 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取没食子酸和鞣花酸对照品适量, 置棕色瓶中, 加 DMSO 制成含没食子酸 95.0 μg/mL、鞣花酸 122.6 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取各样品粉末 (过 3 号筛) 约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 80%丙酮 25 mL, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 45 min, 滤过, 蒸干, 残渣加 DMSO 25 mL 使溶解, 作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1、2、4、8、10、15 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 以峰面积为横坐标 (X), 以进样量为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得没食子酸回归方程为 $Y=6.289 \times 10^{-7}X-1.460 \times 10^{-2}$, $r=0.999\ 9$, 鞣花酸回归方程为 $Y=1.704 \times 10^{-7}X-9.450 \times 10^{-3}$, $r=0.999\ 8$ 。结果表明没食子酸和鞣花酸分别在 0.095~0.950、0.123~

1.839 μg 内具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密称取 1 号样品粉末 2 g, 制备供试品溶液, 进样 10 μL, 重复进样 6 次, 测定没食子酸和鞣花酸峰面积, 并分别计算质量分数, 测得没食子酸和鞣花酸质量分数的 RSD 分别为 0.87%、1.46%。

2.6 稳定性试验

精密称取 1 号样品粉末 2 g, 制备供试品溶液, 在室温下保存, 分别于 0、1、2、4、6、8、24 h 精密吸取供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定没食子酸和鞣花酸峰面积值, 并分别计算质量分数, 测得没食子酸和鞣花酸质量分数的 RSD 分别为 1.89%、2.15%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取 1 号样品粉末 6 份, 分别制备供试品溶液, 分别测定并计算没食子酸和鞣花酸量, 测得样品中没食子酸和鞣花酸质量分数的 RSD 分别为 2.25%、2.47%, 结果表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已测定的羊开口药材 1 g, 平行 6 份, 精密称定, 分别精密加入没食子酸和鞣花酸对照品溶液各 10 mL (以 80%丙酮溶解, 质量浓度分别为 0.046、0.054 mg/mL), 制备供试品溶液, 测定并计算回收率, 没食子酸和鞣花酸的加样回收率分别为 100.15%、97.20%, RSD 分别为 2.54%、2.16%。

2.9 样品测定

取各批次羊开口粉末 (过 3 号筛) 约 2.0 g, 各 2 份, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 分别测定其中没食子酸和鞣花酸质量分数, 结果见表 2。

表2 羊开口中没食子酸和鞣花酸的测定结果 (n=3)
Table 2 Determination of gallic acid and ellagic acid in radix and rhizome of *M. normale* (n=3)

编号	质量分数 / (mg·g ⁻¹)		编号	质量分数 / (mg·g ⁻¹)	
	没食子酸	鞣花酸		没食子酸	鞣花酸
1	0.332	0.646	6	0.243	0.416
2	0.243	0.372	7	0.204	0.237
3	0.178	0.225	8	0.311	0.133
4	0.096	0.101	9	0.104	0.321
5	0.089	0.234	10	0.076	0.222

3 讨论

3.1 前处理条件的选择

实验发现鞣花酸在甲醇等常规有机溶剂中均很难溶解^[4], 反复试验发现 80%丙酮能有效提取和溶解鞣花酸, 对比了超声提取、加热回流提取, 发现 80%丙酮超声提取 45 min 与回流 2 h 效果相当, 故选择简便的超声提取; 因丙酮在 254 nm 检测波长下, 在 4 min 左右产生很强的溶剂干扰峰, 若直接进样分析, 严重影响保留时间相近的没食子酸的检测, 故 80%丙酮提取后, 需将滤液蒸干, 加 DMSO 溶解以确保难溶性的鞣花酸成分能转移完全。

3.2 检测波长和流动相的选择

所测定成分均具有较强的紫外吸收, 没食子酸的最大吸收波长为 271 nm, 鞣花酸的最大吸收波长为 254 nm, 对比不同波长下色谱峰分离效果和对称性, 发现以 254 nm 作为测定波长较好; 又因二者极性相差很大, 经试验采用乙腈-0.2%磷酸溶液梯度

洗脱, 能在较短时间内实现分离检测。

3.3 羊开口药用来源的探讨

实验结果表明羊开口不同产地、不同来源药材中两个主要成分的质量分数虽有波动, 但均能有效检出, 故民间将此两个基源植物均作为羊开口药用来源具有一定科学依据, 为了羊开口药材资源合理开发与可持续利用, 建议深入开展同属不同种羊开口植物的物质基础研究。

参考文献

- [1] 蒋受军, 钟小清, 吕高荣, 等. 羊开口药材的名实考证 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1555-1557.
- [2] 邹节明, 钟小清, 吕高荣, 等. 广西特色中草药资源选编 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [3] 丁运生, 孙小虎, 李有桂, 等. 鞣花酸及其衍生物研究进展 [J]. 合肥工业大学学报, 2008, 31(11): 1809-1812.
- [4] 袁永兵, 张兰珍, 郭亚健, 等. RP-HPLC 法测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的含量 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(1): 56-58.