

HPLC 测定壮药羊开口中 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的含量

刘立辉, 黄丽玲, 唐林波, 常 华, 邹 洵*

桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

摘要: 目的 建立 HPLC 测定壮药羊开口中 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的含量方法。方法 采用 Welch Materials Ultimate AQ C₁₈ 反相色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 采用梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 246 nm, 柱温为 35 ℃。结果 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷进样量在 0.02~0.60 μg 内与峰面积线性关系良好 ($r=1.000\ 0$); 平均回收率为 105.58%, RSD 为 2.27%。结论 该方法简便、重复性好、准确度高, 可用于壮药羊开口的质量控制。

关键词: 羊开口; 野牡丹; 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷; HPLC; 质量控制

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)05-1582-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.025

Determination of 4-O-β-D-glucopyranosyl-3,3',4'-tri-O-methylelagic acid in Zhuang Medicine *Radix Melastomatis Normalis* by HPLC

LIU Li-hui, HUANG Li-ling, TANG Lin-bo, CHANG Hua, ZOU Xun

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

Abstract: Objective To establish a HPLC method for the determination of 4-O-β-D-glucopyranosyl-3,3',4'-tri-O-methylelagic acid in Zhuang Medicine *Radix Melastomatis normalis*. **Methods** A Welch Materials Ultimate AQ C₁₈ reverse phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile-water containing 0.2% phosphoric acid solution with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 246 nm and the temperature of column was 35 ℃. **Results** The linear relationship between 4-O-β-D-glucopyranosyl-3,3',4'-tri-O-methylelagic acid injection amount and peak area was good in the range of 0.02—0.60 μg ($r=1.000\ 0$). The average recovery was 105.58% with RSD of 2.27%. **Conclusion** The method is simple, reproducible and accurate, and can be used for the quality control of Zhuang Medicine *Radix Melastomatis normalis*.

Key words: *Radix Melastomatis normalis*; *Melastoma normale* D. Don; 4-O-β-D-glucopyranosyl-3,3',4'-tri-O-methylelagic acid; HPLC; quality control

羊开口 *Radix Melastomatis normalis*, 壮药名为棵芒难, 为野牡丹科 (Melastomaceae) 野牡丹属 *Melastoma* L. 植物展毛野牡丹 *Melastoma normale* D. Don 的干燥根, 为广西壮族地区习用药材, 收载于《广西壮族自治区壮药质量标准 (第一卷)》, 味甘、酸、涩, 微温, 具有收敛、止血、解毒的功效, 用于泄痢、崩漏带下、内外伤出血^[1]。羊开口是中成药三金片系列产品的重要原料之一, 但现有质量标准并没有关于羊开口的含量测定项, 仅有

少量文献报道测定羊开口中没食子酸和鞣花酸的含量研究^[2-3]。

本课题组前期对羊开口进行了化学成分研究, 发现 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷为羊开口的特征性成分之一^[4]。此外, 文献报道此类成分具有良好的抗肿瘤、抗氧化、抗菌和抗病毒等药理活性, 且该类成分的化学性质相对比较稳定^[5-6]。因此, 选择 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷作为羊开口的含量测定指标成分。鉴

收稿日期: 2022-08-05

基金项目: 广西创新驱动发展科技重大专项 (桂科 AA17202045)

作者简介: 刘立辉 (1983—), 男, 硕士, 工程师, 研究方向为中药新药研发。Tel: (0773)5823082 E-mail: andyliulihui@163.com

*通信作者: 邹 洵, 男, 硕士, 研究方向为中药新药研发。Tel: (0773)5842588 E-mail: xunzou@hotmail.com

于现有羊开口的质量标准较简单,缺少含量测定项,本实验对羊开口的特征性成分之一的 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷进行 HPLC 含量测定研究,以期为羊开口质量标准的完善提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);2996 PDA 检测器(美国 Waters 公司);Empower 2 色谱工作站;BRANSON BUG 40-60 超声波清洗仪(上海必能信公司,功率 250 W,频率 40 kHz);XP 205 型电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司, $d=0.01$ mg);GF-200 型电子天平(日本 AND 公司, $d=0.001$ g);MILLI-Q 型密理博超纯水仪(德国 Merck 公司);DZF-6500 型真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试药

3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品为本课题组自制,通过解析其 MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 数据,并参照文献报道^[7]确定结构, HPLC 峰面积归一化法计算其质量分数大于 99.0%。乙腈、甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司),高效液相用水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

15 批羊开口药材分别采自广西各地,经中国科学院广西植物研究所蒋水元研究员鉴定均为野牡丹科植物展毛野牡丹 *M. normale* D. Don 的干燥根,具体产地见表 1。

表 1 羊开口产地信息

编号	产地
1	广西桂林市恭城县
2	广西桂林市永福县
3	广西柳州市鹿寨县
4	广西贺州市八步区
5	广西梧州市苍梧县
6	广西来宾市武宣县
7	广西来宾市金秀县
8	广西贵港市桂平市
9	广西玉林市福绵区
10	广西防城港市上思县
11	广西南宁市上林县
12	广西钦州市灵山县
13	广西崇左市凭祥市
14	广西百色市平果市
15	广西河池市环江县

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取干燥至恒定质量的 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品适量,精密称定,加二甲基亚砷溶解制成含 0.02 mg/mL 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 80 目筛)约 2.0 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 80%丙酮 25 mL,称定质量,密塞,超声提取(功率 250 W,频率 40 kHz) 60 min,放冷至室温,再称定质量,用 80%丙酮补足减失的质量,摇匀,静置,吸取上清液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

Welch Materials Ultimate AQ C₁₈ 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相 A 相为乙腈, B 相为 0.2%磷酸水溶液,梯度洗脱程序: 0~50 min, 90%~70% B; 50~51 min, 70%~90% B。体积流量为 1.0 mL/min,检测波长为 246 nm,柱温为 35 °C,进样量为 10 μL。在此条件下,理论塔板数按 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷峰计算不得低于 80 000, 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷色谱峰与相邻的其他色谱峰的分离度应大于 1.5。色谱图见图 1。

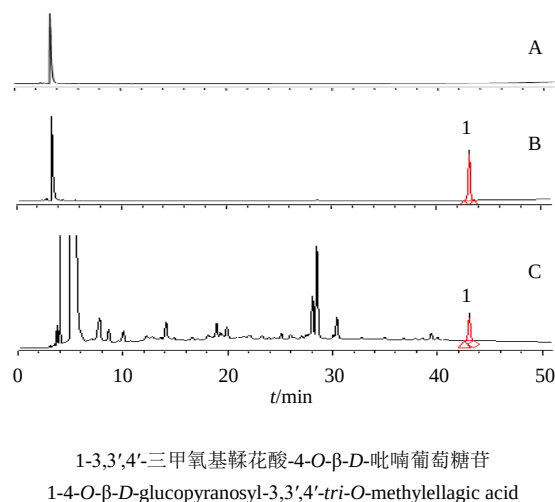


图 1 二甲基亚砷空白溶剂 (A)、3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品 (B) 和供试品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of dimethyl sulfoxide blank solvent (A), 4-O-β-D-glucopyranosyl-3,3',4'-tri-O-methylelagic acid (B) and test substance (C)

2.4 线性关系考察

分别精密吸取 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品溶液 1、2、5、10、15、20 和 30 μL 注入液相色谱仪,按“2.3”项下色谱条件测定并记录相应色谱峰面积,以对照品进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,进行线性回归,得回归方程 $Y=6.0 \times 10^6 X-1.910 5 \times 10^4$, $r=1.000 0$ 。结果表明,3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷在 0.02~0.60 μg 内其进样量与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取同一批羊开口样品粉末(8号样品)约 2.0 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次测定,计算得到 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的质量分数的 RSD 为 1.72%。

2.6 稳定性试验

取同一批羊开口样品粉末(8号样品)约 2.0 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于配制后 0、1、2、4、8、24 h 按“2.3”项下色谱条件进样测定,计算得到 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的质量分数的 RSD 为 2.53%。

2.7 重复性试验

取同一批羊开口样品粉末(8号样品)约 2.0 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,分别按“2.3”项下色谱条件进样测定,计算得到 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的质量分数的 RSD 为 1.00%。

2.8 加样回收率试验

取已知含量的同一批羊开口样品粉末(8号样品)约 1.0 g,平行 6 份,精密称定,分别精密加入 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对照品溶液 1.0 mL(质量浓度为 0.25 mg/mL),按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别按“2.3”项下色谱条件进样测定,计算得到 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的平均加样回收率为 105.58%, RSD 为 2.27%。

2.9 样品测定

分别取 15 批不同产地的羊开口样品粉末各约 2.0 g,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样测定,计算各样品中 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的含量,结果见表 2。由表 2 结果可知,15 批羊开口样品中均可检

出 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,但产地不同,样品中 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的含量差异较大。造成各地区产生含量差异的原因,可能是因为广西地处中国地势第二阶梯中的云贵高原东南边缘,地势呈现西北向东南倾斜,地貌复杂多变,土壤酸性有差异,气候带较多,各地光照和气温不同,使羊开口的生长和 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的成分积累受多方面的影响。此外,羊开口的生长年限、采收期、产地加工方法不同,也会影响其含量。

表 2 羊开口中 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷的含量测定结果($n=2$)

Table 2 Determination of 4-O-β-D-glucopyranosyl-3,3',4'-tri-O-methylelagic acid in *Radix Melastomatis Normalis* ($n=2$)

编号	3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷/%
1	0.030
2	0.052
3	0.039
4	0.032
5	0.028
6	0.062
7	0.024
8	0.028
9	0.042
10	0.084
11	0.053
12	0.029
13	0.072
14	0.034
15	0.027

3 讨论

本实验考察了不同提取方法(冷浸、超声和回流)、不同提取溶剂(甲醇、80%甲醇、80%乙醇和 80%丙酮)、不同溶剂用量(20、25、50 mL)和不同提取时间(30、60、90 min),结果以 80%丙酮 25 mL 超声提取 60 min 效率最高。

本实验考察了不同流动相(甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液)的洗脱效果。经实验,在其他色谱条件不变的情况下,采用乙腈-0.2%磷酸水溶液为流动相,所得色谱图中

3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷的基线较平稳,分离度、峰对称性最好,故选用乙腈-0.2%磷酸水溶液为本实验的流动相。

本实验曾采用 PDA 检测器 3D 模式在 200~400 nm 对 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷的对照品溶液进行全波长扫描,结果显示 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷的最大吸收波长为 246 nm,故选择 246 nm 作为本实验的检测波长。

由 15 批不同产地的羊开口药材的含量测定结果可知,3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷的含量虽有波动,但均能有效检出,并且具有很好的药理活性,故将此成分作为羊开口的含量测定指标成分是有一定科学依据的。为了更好地控制羊开口药材的质量,建议继续深入开展不同产地、不同生长年限、不同采收期和不同产地加工方法的羊开口药材的 3,3',4'-三甲氧基鞣花酸-4-O- β -D-吡喃葡萄糖苷的含量测定研究,以便积累数据,为制定科学的含量限度提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 广西壮族自治区壮药质量标准 (第 1 卷) [S]. 2008: 211-212.
- [2] 邹准,寿晓云,闵建国,等. HPLC 法测定壮药羊开口中没食子酸和鞣花酸的量 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2206-2208.
- [3] 黄瑞松,陆峥琳,高雪锋,等. HPLC 测定羊开口中的鞣花酸 [J]. 华西药学杂志, 2017, 32(1): 81-83.
- [4] 叶羽苗,闵建国,刘立辉,等. 不同基源的瑶药羊开口 HPLC 特征图谱对比研究 [J]. 新中医, 2019, 51(4): 22-25.
- [5] 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: 自然科学版, 2008, 31(11): 1809-1812.
- [6] 韩奇亨,张春红,龚雪,等. 鞣花酸类化合物在野牡丹科植物中的分布与药理活性研究 [J]. 中药材, 2018, 41(12): 2962-2967.
- [7] 赵友兴,杨丹,马青云,等. 金锦香的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1061-1065.

[责任编辑 时圣明]