

HPLC测定头花蓼及制剂热淋清颗粒中没食子酸的含量

王爽¹, 张丽艳^{2*}, 谢宇³, 潘雯婷², 李孟林³

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 贵阳中医学院药理学系, 贵阳 550002;
3. 贵州威门药业股份有限公司, 贵阳 550000)

[摘要] 目的: 建立头花蓼及热淋清颗粒中没食子酸的含量测定方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, Diamonsil™ (钻石) C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-N,N-二甲基甲酰胺-冰醋酸(1:95:3:1), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 272 nm, 柱温 25 °C。结果: 没食子酸在 0.139 6 ~ 1.396 0 μg 线性良好($r = 0.999\ 97$)。头花蓼平均回收率 99.35%, RSD 为 2.61%, 热淋清颗粒平均回收率 97.86%, RSD 为 0.73%。结论: 该法重复性好, 专属性强, 可用于控制头花蓼药材及其单方制剂热淋清颗粒的质量。为头花蓼药材规模化种植提供科学依据。

[关键词] 头花蓼; 热淋清颗粒; 没食子酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0112-04

Determination of Gallic Acid in *Polygonum capitatum* and Relinqing Granules by HPLC

WANG Shuang¹, ZHANG Li-yan^{2*}, XIE Yu³, PAN Wen-ting², LI Meng-lin³

(1. Zhejiang Chinese Medical University College of Pharmacy, Hangzhou 310053, China;
2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine Department of Pharmacy, Guiyang 550002, China;
3. Guizhou Wei Door Pharmaceutical, Guiyang 550000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of the contents of gallic acid in *Polygonum capitatum* and Relinqing granules. **Method:** The reserved HPLC method was achieved. Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with MeOH-H₂O-DMF-HAc (1:95:3:1) as amobile phase at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and detection wavelength was at 272 nm and the column temperature was at 25 °C. **Result:** The calibration curve was linear in the range of 0.139 6-1.396 0 μg ($r = 0.999\ 97$). The average recovery rate of gallic acid in *P. capitatum* was 99.35% (RSD 2.61%), and was 99.35% (RSD 0.73%) in Relinqing granules. **Conclusion:** The method is reliable, specific and with good repeatability. It can be used for the quality control of *P. capitatum* and Relinqing granules and provide a science bases for the planting of polygonum capitatum.

[Key words] *Polygonum capitatum*; Relinqing granules; gallic acid

[收稿日期] 20110920(010)

[基金项目] 黔科合重大专项(20086020); 十一五科技支撑项目(2009BAI74B01-4); [2010]筑科农合同字第1-中~12号

[第一作者] 王爽, 大学本科在读, 研究方向: 中药学, Tel: 13639073195, E-mail: 727821294@qq.com

[通讯作者] *张丽艳, 教授, 大学本科, 硕士生导师, 从事中药质量控制与新药研究, Tel: 13984870641, E-mail: zly1964@163.com

头花蓼为蓼科植物头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch. -Ham. ex D. Don 的干燥全草或地上部分, 是贵州别具特色的苗药资源之一, 具清热利湿、解毒止痛、活血散瘀、利尿通淋功效。同时, 头花蓼又是贵州省中药现代化重点发展的“十大苗药”和重点培育发展的“十大中药产业链”的品种之一。收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003年版^[1]。长期临床应用表明, 头花蓼在治疗泌尿系统感染方面具有显著的疗效。其单方制剂——热淋清颗粒,

具有清热解毒、利尿通淋之功,是国家中药保护品种;同时又被遴选为国家基本用药目录及国家基本医疗保险目录,收载于2010年版《中国药典》^[2]。因头花蓼药材及其成方制剂热淋清颗粒的质量标准^[1]均较为简单,不能很好的评价药材及制剂内在品质。其中,头花蓼药材只规定了以槲皮素为指标的含量测定方法。大量文献表明^[3]头花蓼除黄酮类成分外,没食子酸也是头花蓼及其制剂的主要有效成分,抗菌消炎效果显著^[4]。故本实验以没食子酸为指标,对头花蓼药材及其单方制剂热淋清颗粒中没食子酸的测定方法进行了研究。

1 仪器与试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪,安捷伦液相色谱系统化学工作站,AG135型电子天平(Mettler-Toledo),CSF-1B超声波清洗仪。头花蓼样品来源于贵州施秉头花蓼GAP基地及贵州主要产地,经贵阳中医学院魏升华教授鉴定为蓼科植物头花蓼 *P. capitatum* 的干燥地上部分。热淋清颗粒(贵州威门药业股份有限公司)。

没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号110831-200302),甲醇为色谱纯,水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 DiamonsilTM(钻石)C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水-*N,N*-二甲基甲酰胺-冰醋酸(1:95:3:1),柱温25℃,检测波长272 nm,流速1.0 mL·min⁻¹。理论板数按没食子酸峰计算,不低于2 000。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品适量,加50%甲醇制成每1 mL含0.07 mg的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 头花蓼药材供试品溶液制备 取头花蓼药材粉末(过60目筛),约0.4 g,精密称定,置100 mL锥形瓶中,精密加蒸馏水25 mL,称定质量,加热回流2 h,放冷,称定质量,加水补足减失质量,摇匀,静置,滤过,滤液过0.45 μm的微孔滤膜,即得。

2.3.2 热淋清颗粒供试品溶液制备 将本品装量差异下的内容物,研细,取约0.2 g,精密称定,置25 mL量瓶中,加50%甲醇20 mL,超声处理1 h(功率250 W,频率40 KHz),放冷,加50%甲醇至刻度,摇匀,静置,滤过,滤液过0.45 μm的微孔滤膜,即得。

2.3.3 测定方法 精密吸取对照品溶液、头花蓼药材供试品溶液、热淋清颗粒(无糖型)供试品溶液各

10 μL,热淋清颗粒(含糖型)供试品溶液20 μL注入液相色谱仪测定,即得。

2.4 系统适用性试验及专属性考察 分别吸取对照品溶液、头花蓼药材供试品溶液、热淋清颗粒(无糖型)供试品溶液、阴性供试品溶液各10 μL注入色谱仪,记录色谱图,见图1。

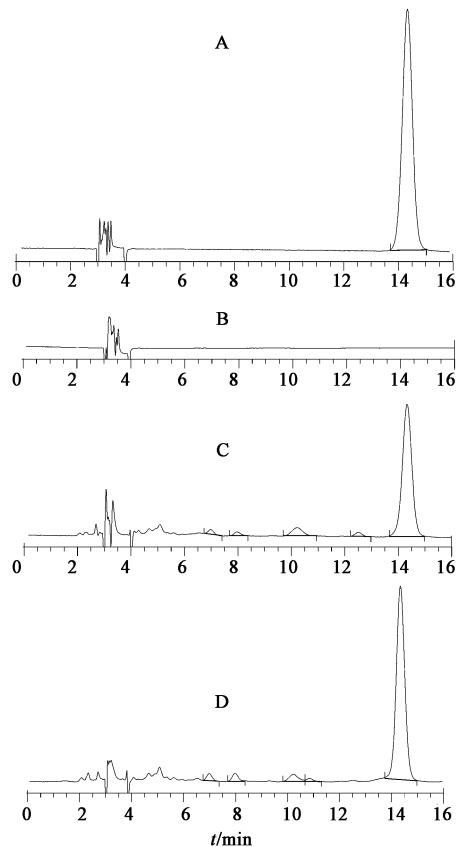


图1 头花蓼药材及热淋清颗粒 HPLC

2.5 线性关系的考察 精密吸取浓度为0.139 6 g·L⁻¹的对照品溶液1, 2, 4, 6, 8, 10 μL注入液相色谱仪,按已定的色谱条件进行测定,记录峰面积。以对照品的μg数为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,其回归方程 $A = 2\ 872.004\ 2\ C + 0.362\ 466$ ($r = 0.999\ 97$),结果表明没食子酸在0.139 6 ~ 1.396 0 μg线性良好。

2.6 精密度试验 分别精密吸取同一没食子酸对照品溶液(0.069 8 g·L⁻¹)10 μL,重复进样6次,按已定的色谱条件分别测定没食子酸的峰面积,结果RSD 0.23%,说明仪器的精密度良好。

2.7 重复性试验

2.7.1 热淋清颗粒重复性试验 分别精密称取同一批号热淋清颗粒粉末各6份,按2.3.2项下供试品溶液制备方法及色谱条件,测定没食子酸的平均含量为7.74 mg·g⁻¹,RSD 0.44%。结果表明该方

法的重复性良好。

2.7.2 头花蓼药材重复性试验 分别精密称取同一产地头花蓼药材粉末 6 份,按 2.3.1 项下的方法进行制备。没食子酸平均含量为 $0.204 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 2.67%,结果表明该方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验

2.8.1 热淋清颗粒供试品溶液 按没食子酸供试品溶液制备方法处理所得的供试品溶液,按已定的色谱条件,对没食子酸供试液分别在 0,1,2,4,6,8 h 进行测定,结果没食子酸峰面积的 RSD 0.46%,表明没食子酸供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.8.2 头花蓼药材供试品溶液 按没食子酸供试品溶液制备方法处理所得的供试品溶液,按已定的色谱条件,对没食子酸供试液分别在 0,1,2,4,6,20 h 进行测定,结果没食子酸峰面积的 RSD 0.27%,表明没食子酸供试品溶液在 20 h 内稳定。

2.9 回收率试验

2.9.1 热淋清颗粒加样回收率试验 精密称取已知含量的同一热淋清颗粒样品 9 份(无糖型),加入没食子酸对照品溶液,按没食子酸供试品液的制备项下的方法处理,制备所需溶液,按已定的色谱条件测定,计算回收率,结果样品中没食子酸平均回收率为 97.86%,RSD 0.73%。说明已定的方法具有良好的回收率,可用于测定热淋清颗粒中没食子酸的含量(表 1)。

表 1 没食子酸加样回收率试验

No.	样品中的 含量/mg	加入量 /mg	测出量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.778 6	0.605 2	1.369 1	97.57		
2	0.777 1	0.605 2	1.371 5	98.22		
3	0.776 3	0.605 2	1.368 2	97.80		
4	0.774 8	0.756 5	1.521 9	98.76		
5	0.777 1	0.756 5	1.506 7	96.75	97.86	0.73
6	0.775 5	0.756 5	1.514 9	97.74		
7	0.772 5	0.907 8	1.652 3	96.92		
8	0.784 1	0.907 8	1.675 9	98.24		
9	0.781 0	0.907 8	1.677 5	98.76		

2.9.2 头花蓼药材加样回收率试验 精密称取已知含量的同一头花蓼药材样品 9 份,加入没食子酸对照品溶液,按没食子酸供试品液的制备项下的方法处理,制备所需溶液,按已定的色谱条件测定,计算回收率,结果样品中没食子酸平均回收率为 99.35%,RSD 2.61%。说明已定的方法具有良好的回收率,可用于测定头花蓼药材中没食子酸的含量(表 2)。

表 2 头花蓼药材没食子酸加样回收率试验

No.	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测出量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.412 0	0.336	0.735 1	96.16		
2	0.416 4	0.336	0.762 2	102.92		
3	0.409 1	0.336	0.756 8	103.48		
4	0.416 4	0.420	0.827 3	97.83		
5	0.411 3	0.420	0.824 7	98.43	99.35	2.61
6	0.411 9	0.420	0.830 1	99.64		
7	0.407 9	0.504	0.894 1	96.47		
8	0.409 1	0.504	0.905 9	98.57		
9	0.405 2	0.504	0.912 4	100.63		

3 样品测定

3.1 热淋清颗粒样品测定 取 10 个不同批号(071101, 080405, 080201, 070502, 070803, 071201,070505, 080102, 080501, 070304)的无糖型热淋清颗粒样品及 10 个不同批号(070105, 070906, 061208,060804, 070605, 070705, 070306, 080203, 060905,060902)的含糖型热淋清颗粒样品,按上述方法测定($n=3$),结果样品中没食子酸分别为每袋 31.07, 35.43, 30.75, 29.87, 29.21, 23.34, 34.67, 18.40, 30.29, 33.16, 26.82, 28.05, 35.08, 24.44, 37.24, 21.23, 32.31, 26.34, 30.12, 29.50 mg。

3.2 头花蓼药材样品测定 取不同产地(贵州施秉头花蓼 GAP 基地,贵州盘县洒基乡落嘎村峰子岩,贵州水城阿嘎乡马场村,贵州盘县盘关,贵州贵阳高坡)的头花蓼药材样品,按上述方法测定($n=3$),结果样品中没食子酸分别为 0.18,0.15,0.13, 0.12,0.27 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

4 讨论

4.1 检测波长的选择 取没食子酸对照品溶液进行紫外扫描(240~400 nm),结果在 272 nm 处有最大吸收,故选择 272 nm 作为检测波长。

4.2 流动相的选择 按文献中茅向军^[5]等以甲醇-水-N,N-二甲基甲酰胺-冰醋酸(1:81:15:3)、王祥培^[6]等以乙腈-0.4%磷酸(5z95)、黄夏敏^[7]以乙腈-0.05%磷酸水溶液(5:95)为流动相进行试验,结果样品中没食子酸峰分离度达不到要求,故在该色谱条件的基础上对流动相的比例进行调整,经摸索在正文色谱条件下没食子酸峰具有较好的分离度。

4.3 方法的选择 实验过程中还对供试品溶液的提取方法分别进行了考察。加热回流、超声处理 60

铁包金中不同部位总黄酮含量比较

毛海立*, 周德超, 龙成梅, 杨艳

(黔南民族师范学院化学与化工系, 贵州 都匀 558000)

[摘要] 目的: 考察了贵州都匀产铁包金不同部位总黄酮含量的差异。方法: 以乙醇作为回流提取溶剂提取铁包金中总黄酮。以芦丁为对照品, 采用紫外分光光度法测定铁包金中的总黄酮。结果: 芦丁标准品溶液浓度在 $5 \sim 30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 与吸光度有良好线性关系, 回归方程为 $Y = 0.0112X + 0.0419$ ($r = 0.9991$), 平均加样回收率 98.56%, 精密密度试验 RSD 值为 0.279%, 重复性试验 RSD 为 0.634%, 稳定性试验 RSD 1.49%。以此方法测定, 铁包金叶和茎部中黄酮含量分别为 12.3%, 1.42%, 叶中总黄酮含量是茎部的 8.7 倍。结论: 贵州都匀产铁包金叶和茎部中黄酮含量存在较大差异, 叶部位具有较大的药用开发价值和前景。

[关键词] 铁包金; 紫外分光光度法; 总黄酮

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0115-03

Comparison and Determination of Total Flavonoids in Different Parts of *Berchemia lineata*

MAO Hai-li*, ZHOU De-chao, LONG Cheng-mei, YANG Yan

(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Qiannan Normal College for Nationalities, Duyun 558000, China)

[Abstract] **Objective:** The content distribution of total flavonoids in different parts of *Berchemia lineata* from city of DuYun in Guizhou was investigated. **Method:** Flavonids in different parts of *Berchemia Lineate* (L) DC. were extracted by ethanol as solvent reflux, The total flavonoids were determined by spectrophotometry, rutin as control sample. **Result:** The absorbency and concentration of rutin have good linear correlation in the range of $5\text{-}30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The regression equation was $Y = 0.0112X + 0.0419$ ($r = 0.9991$), the average recovery rate was 98.56%, Accuracy experiment RSD 0.279%, repeatability test RSD 0.634%, stability test RSD 1.49%, the contents of total flavonoids in leaf and stem was respectively 12.30% and 1.42%, that the means content of total flavonoids in leaf is 8.7 times higher than that in stem. **Conclusion:** the content of total flavonoids in the leaf and in the stem has a big difference, thereby the leaf of *B. lineate* from Duyun in Guizhou has value to be

[收稿日期] 20110408(009)

[通讯作者] *毛海立, 副教授, 从事现代仪器分析方法及分析化学研究, E-mail: maohaili@126.com

min, 经反复实验发现: 超声提取的重复性差, 故最终确定了前述提取方法采用回流提取。

[参考文献]

- [1] 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 2003: 147.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 VI D.
- [3] 杨阳, 杨颖博, 宋文武, 等. 头花蓼的化学成分 II [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 92.
- [4] 陈百泉, 李昌勤, 常星, 等. 头花蓼对 α -葡萄糖苷酶的抑制活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16

(8): 151.

- [5] 茅向军, 许乾丽, 熊慧林, 等. 高效液相色谱法测定热淋清胶囊中没食子酸的含量[J]. 中国中药杂志. 2002, 27(8): 589.
- [6] 王祥培, 万德光, 王强, 等. HPLC 测定不同产地的头花蓼中没食子酸的含量[J]. 华西药理学杂志, 2007, 22(2): 204.
- [7] 黄夏敏. 高效液相色谱法测定生津咽喉片中没食子酸的含量[J]. 中药新药与临床药理学, 2002, 13(1): 37.

[责任编辑 蔡仲德]