

HPLC 测定地锦草中没食子酸、槲皮素及山柰素含量

李慧,许亮,徐保利,管慧洁,何华,王冰*
(辽宁中医药大学,辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:建立同时测定地锦草药材中槲皮素、山柰素和没食子酸含量的高效液相色谱法。方法:采用 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm×150 mm,5 μm) 柱分离,以甲醇和 0.4% 磷酸水溶液进行梯度洗脱,柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹。结果:没食子酸在 0.051 8~0.621 6 μg 线性关系良好,平均回收率在 102.17% (RSD 2.83%),槲皮素在 0.070 2~0.702 0 μg 线性关系良好,平均回收率在 97.80% (RSD 2.42%),山柰素在 0.020 4~0.408 0 μg 线性关系良好,平均回收率在 98.02% (RSD 2.72%)。结论:操作简便,准确度高,重复性好,可作为地锦草质量控制方法之一。

[关键词] 地锦草; 高效液相色谱法; 没食子酸; 槲皮素; 山柰素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)07-0100-03

Determination of Gallic Acid, Quercetin and Kaempferol in
Euphorbia humifusa Herba by HPLC

LI Hui, XU Liang, XU Bao-li, GUAN Hui-jie, HE Hua, WANG Bing*
(Liaoning University of Chinese Traditional Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for determining quercetin, kaempferol and gallic acid in *Euphorbia humifusa* herba. **Method:** The analysis was performed on a column Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm), the solvent system composed of methanol-0.4% phosphoric. The column temperature was at 30 ℃, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** Quercetin, kaempferol and gallic acid were linear in the range of 0.070 2-0.702 0, 0.020 4-0.408 0, 0.051 8-0.621 6 μg. The average recovery of quercetin, kaempferol and gallic acid was 97.80% (RSD 2.42%), 98.02% (RSD 2.728%), 102.17% (RSD 2.83%). **Conclusion:** The method is quick, simple, and reproducible, which can be used to control the quality of *Euphorbia humifusae* herb.

[Key words] *Euphorbia Humifusa* herba; HPLC; gallic acid; quercetin; kaempferol

地锦草为大戟科植物地锦或斑地锦的干燥全草,具有清热解毒、凉血止血、利湿退黄的功效,常用于治疗痢疾、肠炎、咳血、便血、崩漏、疮疥痈肿,湿热黄疸等^[1]。地锦草主要含有黄酮类、没食子酸、鞣质类化学成分,其鲜汁、水煎剂、醇提液均有抗菌作用。临床常用中药,也是一种维吾尔药材和蒙药材,在《中国药典》、《中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔药材分册》和《内蒙古药材标准》均有记载^[2]。其中没食子酸具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒等生物学活性,槲皮素、山柰素等黄酮类化合物是地锦草抗菌、止血、抗氧化的主要有效成分。本实验建立高效液相色谱法测定地锦草中没食子酸、槲皮素、山柰素的含量的方法,目的是为了更好的控制地锦草药材的质量,保证该临床用药安全有效。

1 仪器和试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,VWD 检测器(G1314A),四元泵(G1311A)(美国 Agilent 公司),电子天平(瑞士 Mettler Toledo AG285,AE240)。

[收稿日期] 20110410(003)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2009A496);辽宁中医药大学青年药学人才基金课题(YXRC0920)

[第一作者] 李慧,在读硕士研究生,从事药用植物种质资源与品质评价研究

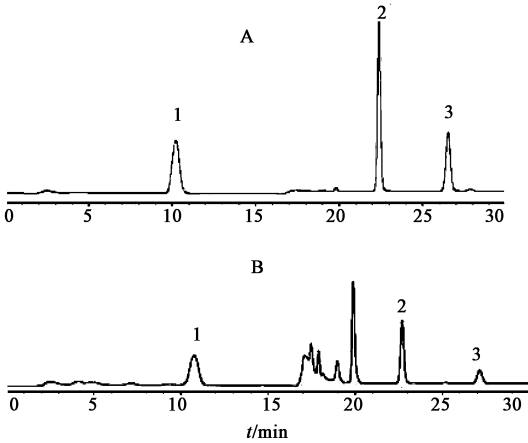
[通讯作者] *王冰,教授,博士研究生导师,从事药用植物资源与鉴定研究, Tel: 0411-87586004, yzbwang@lnutcm.edu.cn

没食子酸、槲皮素、山柰素(贵州迪大生物工程有限公司,纯度均>98%)。甲醇为分析纯和色谱纯,重蒸馏水,盐酸、磷酸为分析纯。

地锦草为2009年10月采于辽宁省大连市双D港,经辽宁中医药大学药学院王冰教授鉴定为大戟科植物地锦 *Euphorbia humifusa* Willd. 或斑地锦 *E. maculata* L. 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 甲醇(A)-0.4% 磷酸水溶液(B)为流动相梯度洗脱(0~13 min), 2% A; 13~14 min, 2%~52% A; (14~30 min, 52% A), 流速1.0 mL·min⁻¹; 柱温30℃; 检测波长为梯度波长(0~12.5 min, 270 nm, 12.5~30.0 min, 360 nm)。理论塔板数按槲皮素、山柰素和没食子酸计算均不低于20 000。



1. 没食子酸;2. 槲皮素;3. 山柰素;A. 对照品; B. 药材样品
图1 地锦草 HPLC 色谱

2.2 对照品溶液的制备 分别取没食子酸、槲皮素和山柰素对照品,精密称定,加甲醇并稀释到刻度,摇匀,制成质量浓度分别为0.518,0.702,0.408 g·L⁻¹的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取本品粉末(过60目

筛)约3.0 g,精密称定,置250 mL圆底烧瓶中,精密加入80%甲醇100 mL,称定质量,加热回流1.5 h,放冷,再称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液40 mL,精密加入25%盐酸溶液14 mL,置85℃水浴中水解30 min,取出,迅速冷却,转移至100 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取上述对照品溶液1, 2,4,6,8,10 μL,按2.1项的色谱条件分别进样,没食子酸、槲皮素、山柰素的线性方程为 $Y = 2\,830.3X + 2.357\,1$ ($r = 0.999\,8$); $Y = 2\,997.3X - 22.906$ ($r = 0.999\,8$); $Y = 3\,260.8X - 27.26$ ($r = 0.999\,9$), 分别在0.051 8~0.621 6, 0.070 2~0.702 0, 0.020 4~0.408 0 μg 线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液,连续进样6次,记录峰面积,结果没食子酸、槲皮素和山柰素峰面积的RSD分别为1.96%, 2.09%, 2.84%。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在0, 2,4,6,8,12 h进样,记录峰面积,结果没食子酸、槲皮素和山柰素峰面积的RSD分别为1.96%, 2.86%, 1.41%。表明供试品溶液在0~12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同批药材6份,精密称定,按2.3项下供试品溶液制备方法制备并测定,RSD 2.17%, 2.85%, 1.50%。表明本试验重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量地锦草粉末6份,每份约1.5 g,精密称定,添加混合对照品适量,按2.3项下供试品溶液制备方法制备并测定,计算,没食子酸、槲皮素、山柰素的平均回收率分别为102.17%, RSD 2.83% ($n = 6$), 97.80%, RSD 2.42% ($n = 6$), 98.02%, RSD 2.72% ($n = 6$)。见表1~3。

2.9 样品测定 按上述色谱条件测定,并计算没食子酸、槲皮素和山柰素的含量。见表4。

表1 没食子酸加样回收率

No.	取样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1.500 2	2.863	2.642	5.507	92.70	102.17	2.83
2	1.500 4	2.869	2.642	5.484	94.77		
3	1.499 7	2.868	2.642	5.505	99.81		
4	1.500 5	2.870	2.642	5.615	103.90		
5	1.509 0	2.886	2.642	5.699	106.48		
6	1.505 2	2.903	2.642	5.677	105.02		

表 2 槲皮素加样回收率

No.	取样量/g	样品中含槲皮素量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1.500 2	2.961	3.851	6.560	93.47	97.80	2.42
2	1.500 4	2.967	3.851	6.729	97.70		
3	1.499 7	2.966	3.851	6.709	97.20		
4	1.500 5	2.967	3.851	6.778	98.95		
5	1.509 0	2.984	3.851	6.827	99.81		
6	1.505 2	3.000	3.851	6.838	99.68		

表 3 山柰素加样回收率

No.	取样量	样品中含山柰素含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	1.500 2	0.779	2.168	2.893	97.53	98.02	2.72
2	1.500 4	0.781	2.168	2.851	95.52		
3	1.499 7	0.780	2.168	2.857	95.82		
4	1.500 5	0.781	2.168	2.875	96.63		
5	1.509 0	0.785	2.168	2.967	100.69		
6	1.505 2	0.785	2.168	2.994	101.91		

表 4 地锦草药材中 3 种成分测定(n = 2)

mg·g⁻¹

No.	种名	拉丁学名	没食子酸含量	槲皮素含量	山柰素含量
1	斑地锦	<i>Euphorbia maculata</i> L.	1.47	1.76	0.75
2	斑地锦	<i>Euphorbia maculata</i> L.	1.39	1.66	1.10
3	斑地锦	<i>Euphorbia maculata</i> L.	1.91	2.39	0.55
4	斑地锦	<i>Euphorbia maculata</i> L.	2.23	3.17	0.87
5	斑地锦	<i>Euphorbia maculata</i> L.	2.35	2.29	0.65
6	斑地锦	<i>Euphorbia maculata</i> L.	1.26	0.61	0.20
7	斑地锦	<i>Euphorbia maculata</i> L.	2.66	3.09	1.57
8	斑地锦	<i>Euphorbia maculata</i> L.	1.35	2.31	0.54
9	地锦	<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	2.88	1.75	1.31
10	地锦	<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	1.09	0.60	0.17
11	地锦	<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	1.50	2.58	0.40
12	地锦	<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	2.11	1.52	1.20
13	地锦	<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	3.06	2.66	0.90
14	地锦	<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	1.91	1.35	1.35
15	地锦	<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	1.92	2.04	1.43
16	地锦	<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	1.87	2.30	0.64
17	地锦	<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	1.06	0.97	0.11

3 讨论

地锦草中酚酸类化合物大多以糖苷的形式存在,主要为槲皮素及苷、山柰素及苷等^[3-5]。直接测定地锦草药材中没食子酸、槲皮素、山柰素的含量,发现其含量很低,直接测定可能难以准确反映其中黄酮的实际含量,因此本实验采取酸水解后测定其没食子酸、槲皮素和山柰素的含量,获得较为满意的效果。

对于水解条件的选择,采用的 2010 年版《中国药典》的水解条件,盐酸浓度不宜过高,酸性太强对进样阀和色谱柱的腐蚀作用较大。色谱条件考察时,发现流动相的 pH 对色谱峰的峰形及分离度影响很大,比较甲醇-不同浓度的磷酸溶液等多种溶剂系统,确定流动相为甲醇-0.4% 磷酸梯度洗脱,得到

的色谱峰峰形尖锐,分离度高,且基线较稳定。

本实验利用高效液相色谱法测定没食子酸、槲皮素、山柰素的含量尚属首次,该方法简便、准确、重复性好,为地锦草药材提供了多指标质量控制依据。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:337.
[2] 买买提江·阿布都瓦克,龚千锋.地锦草的研究概况[J].江西中医学院学报,2008,20(4):78.
[3] 褚小兰,范崔生.地锦类中草药的化学成分和药理研究概况[J].中国野生植物资源,1998,17(2):18.
[4] 邢俊波,水彩虹,刘云.高效液相色谱法测定地锦草中槲皮素和含量[J].中国中药杂志,2002,27(10):758.
[5] 雷鹏,刘韶,李新中,等.HPLC 测定地锦草中槲皮素、山柰素的含量[J].中药材,2005,28(8):666.

[责任编辑 蔡仲德]