

可变波长同时测定泸州龙眼没食子酸和鞣花酸的含量

刘艳¹,熊伟²,田吉¹,何兵^{1*}

(1. 泸州医学院药物与功能性食品研究中心,四川 泸州 646000;
2. 泸州医学院公共卫生系,四川 泸州 646000)

[摘要] 目的:建立同时测定泸州龙眼肉、核、皮中没食子酸和鞣花酸含量的 HPLC 方法。方法:依利特 Sino Chrom ODS-BP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液, 梯度洗脱, 改变波长测定 (0 ~ 11.5 min, 215 nm, 测定没食子酸; 11.5 ~ 25 min, 255 nm, 测定鞣花酸), 柱温 30 °C, 流速 1 mL · min⁻¹, 进样量 10 μL。结果:没食子酸在 0.229 ~ 2.29 μg, 鞣花酸在 0.412 5 ~ 4.125 μg 峰面积与进样量有良好的线性关系 ($r = 0.999 9$), 平均回收率 ($n = 9$) 分别为 98.27% (RSD 0.63%), 98.31% (RSD 0.88%)。结论:该方法灵敏、准确、重复性好,可用于泸州龙眼中没食子酸和鞣花酸的含量测定。

[关键词] 龙眼; 没食子酸; 鞣花酸; 高效液相色谱法; 可变波长

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0084-03

Determination of Gallic Acid and Ellagic Acid in *Dimocarpus longan* by Variable Wavelength of HPLC

LIU Yan¹, XIONG Wei², TIAN Ji¹, HE Bing^{1*}

(1. Research Center for Drug and Function Food of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China;
2. Luzhou medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of the gallic gallic acid and ellagic ellagic acid indifferent part of *Dimocarpus longan*. **Method:** An HPLC method was performed on a SinoChrom ODS-BP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) at 30 °C. The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid with gradient elution and changeable wavelength detection (0-11.5 min, 215 nm for gallic acid and 11.5-25 min, 255 nm for ellagic acid). The flow rate was 0.8 mL · min⁻¹ and the sample size was 10 μL. **Result:** The calibration curve of gallic gallic acid and ellagic ellagic acid showed good linearity over the range of 0.229-2.29 μg ($r = 0.999 9$), 0.412 5-4.125 μg ($r = 0.999 9$). The average recoveries were 98.27% (RSD 0.63%), 98.31% (RSD 0.88%). **Conclusion:** This method is sensitive, accurate, reproducible, it can be used for the quality control of longan.

[Key words] longan; gallic acid; ellagic acid; HPLC; variable wavelength

龙眼是无患子科龙眼属植物龙眼的假种皮,味甘,性温,具补益心脾、养血安神之功效^[1],用于心悸怔忡、健忘、失眠、贫血、月经过多者,为常用的补血药。其种子、果皮、根及叶也可入药,种子的药名

为龙眼核,能止血、止痛、理气化湿;果皮药名龙眼壳,能散邪、祛风、聪耳明目。龙眼肉含维生素、葡萄糖、蔗糖及酒石酸等;龙眼核含皂苷、色素和多种氨基酸;其多酚类成分研究几乎未见报道。现代医学研究表明,龙眼肉具有明显的抗衰老、提高免疫力、抗癌的作用^[2]。根据其抗氧化的作用作者推测其中含有鞣花酸等酚类成分。目前,国内文献多是单独测定鞣花酸和没食子酸,由于两类成分最大吸收波长分别在 215, 256 nm, 其紫外吸收光谱扫描显示几乎无交叉吸收区域,要让两类成分均在同一图谱

[收稿日期] 20110401(004)

[基金项目] 泸州市科技局指导性项目(泸市科[2007]64号)

[第一作者] 刘艳, 硕士, 助理研究员, 从事中药新制剂研究, Tel:15283007251, E-mail:liuyanlucky@126.com

[通讯作者] * 何兵, 硕士, 副研究员, 从事药物分析研究, Tel:13982770721, E-mail:150704809@qq.com

中反应出来,需用可变波长同时测定。龙眼主产广西、福建、广东、四川、台湾等地,泸州地区龙眼已有1 500年的栽培历史,在国内颇有名气,全区龙眼年产量近6 000 t。为更好的利用和开发泸州龙眼资源,试验采用二极管阵列检测器的可变波长检测功能,分别在鞣花酸和没食子酸的最大吸收波长处测定,建立泸州龙眼的含量测定方法,为其质量控制、药材鉴别以及进一步开发利用提供科学依据^[3]。

1 仪器与试剂

戴安高效液相色谱仪(P680A 四元低压梯度泵, PDA-100 二极管阵列检测器, TCC-100 柱温箱, Chromeleon 色谱工作站), 瑞士 Precisa 电子天平(XR 205SM-DR 型), CQX25-06 型超声波清洗器(上海必能信超声有限公司)。

鞣花酸对照品,纯度 > 98%, 购于天津一方科技有限公司;没食子酸对照品,纯度 > 98%, 购于中国药品生物制品检定所,批号 110831-200803;乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。龙眼 10 批,2010 年 9 月采至四川省泸州市张坝桂圆林,经泸州医学院生药鉴定教研室税丕先教授鉴定为无患子科龙眼属植物龙眼 *Dimocarpus longan* Lour 的果实。

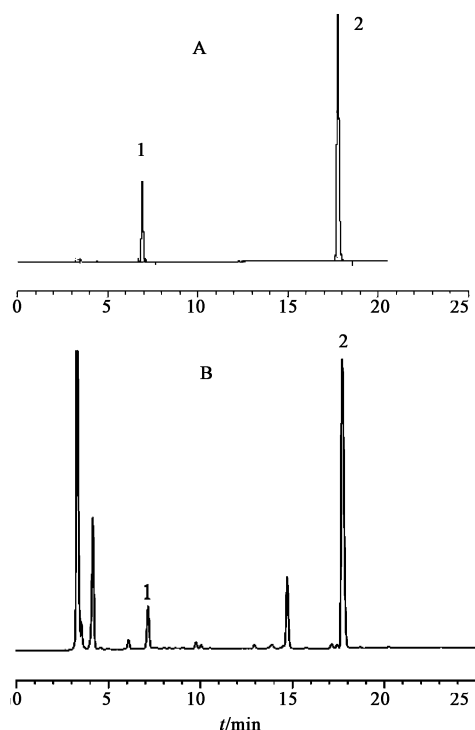
2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱依利特 SinoChrom ODS-BP (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液,梯度洗脱(0 min ~ 20 min ~ 25 min, 96% ~ 65% 乙腈);检测波长(0 ~ 11.5 min, 215 nm; 11.5 ~ 25 min, 255 nm),柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的配制 分别精密称取没食子酸和鞣花酸对照品适量,置棕色量瓶中,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含没食子酸 0.091 6 mg、鞣花酸 0.165 mg 的混合溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取药材细粉(过 60 目筛)1 g, 25 mL 丙酮溶液浸泡 6 h, 超声提取 30 min, 过滤, 少量丙酮洗涤, 合并滤液, 水浴挥干丙酮, 加 10% 盐酸溶液 10 mL 及 0.1 g Vc, 90 ℃ 水浴 30 min 水解, 再挥干盐酸溶液, 用 50% 甲醇溶解, 定容至 25 mL 量瓶中, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 作为供试品溶液^[4]。

2.4 系统适应性实验 分别精密吸取上述对照品溶液, 供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 记录色谱图, 结果见图 1。在试验条件下, 没食子酸和鞣花酸保留时间分别为



A. 混合对照品; B. 龙眼核; 1. 没食子酸; 2. 鞣花酸

图 1 龙眼 HPLC 色谱图

6.98, 17.75 min。与其相邻色谱峰的分度度均 > 1.5, 拖尾因子分别为 1.05, 1.04, 理论塔板数分别为 26 076, 95 067。

2.5 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定峰面积, 以峰面积 A 对进样量 C(μg) 进行回归, 得标准曲线方程:

$$\text{没食子酸 } A = 131.13 C - 0.8739 (r = 0.9995)$$

$$\text{鞣花酸 } A = 146.17 C - 0.6968 (r = 0.9995)$$

结果表明, 没食子酸在 0.229 ~ 2.29 μg, 鞣花酸在 0.4125 ~ 4.125 μg, 峰面积与进样量有良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 测得没食子酸、鞣花酸的峰面积 RSD 分别为 1.06%, 0.95% (n = 6)。表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取本品供试品溶液, 分别于制备后 0, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样测定, 测得没食子酸、鞣花酸的峰面积 RSD 分别为 1.21%, 0.96%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取同一批样品, 按 2.3 项下方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定, 计算没食子酸、鞣花酸的平均含量, 其 RSD 分别为 1.12%, 1.35%, 1.14%, 1.26% (n = 6)。表明本方

法重复性良好。

2.9 加样回收试验 精密称取已知含量的龙眼核细粉 9 份,每份约 0.5 g,分成 3 组,每组 3 份,分别精密添加没食子酸 $2.0823\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,鞣花酸 $16.9701\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,的混合对照品溶液 2,2.5,3 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按上述色谱条件测定,并计算回收率。结果没食子酸、鞣花酸的平均回收率($n=9$)分别为 98.27% (RSD 0.63%), 98.31% (RSD 0.88%)。

2.10 样品测定 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL ,按上述色谱条件测定并按外标法计算 2 种成分的含量,结果见表 1。结果显示,龙眼核中没食子酸和鞣花酸含量均较多。

表 1 泸州龙眼核、皮、肉中 2 种成分含量测定($n=3$) %

样品	没食子酸		鞣花酸	
	含量	RSD	含量	RSD
龙眼核(丙酮提取)	1.056	0.43	8.48	0.28
龙眼皮(丙酮提取)	0.403	0.59	3.71	0.32
龙眼肉(丙酮提取)	0.162	0.66	0.789	0.25
龙眼核(50%乙醇提取)	1.961	0.85	5.61	0.44
龙眼皮(50%乙醇提取)	0.512	0.64	1.98	0.39
龙眼肉(50%乙醇提取)	0.387	0.50	0.36	0.93
龙眼核(水提取)	1.49	0.57	0.089	0.48
龙眼皮(水提取)	0.128	0.91	0.000	0.40
龙眼肉(水提取)	0.001	0.63	0.000	0.88

3 讨论

针对含量测定配制供试品溶液的不同提取方法(超声、回流及索氏提取),不同提取溶剂(丙酮、50%乙醇、水),不同溶剂体积(10,25,50 mL)及不同提取时间(15,30,45,60 min)分别考察。结果龙眼核以 25 mL 丙酮超声提取 30 min,10% 盐酸溶液 10 mL 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 水解,鞣花酸含量最高;龙眼核以 25 mL 50% 乙醇超声提取 30 min,10% 盐酸

溶液 10 mL 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 水解,没食子酸含量最高,杂质峰较少。

结果表明龙眼核中没食子酸、鞣花酸含量均较高,且水解对其含量影响较大。我们在实验中发现,水提取物中成分组成非常复杂,样品不经水解直接进入样分析,70 min 内有包括上述两种待测成分在内的 50 多个色谱峰被分离出来,因此,样品液不经水解直接分析所需时间长,且对色谱柱的柱效要求非常高,给分析测定带来一定的难度。将样品水解后,由于多种多酚类化合物具有相同的水解产物,因而使样品溶液所含成分大大减少,所需分析时间缩短,柱效要求更适中,水解后样品中没食子酸和鞣花酸总量平均值达到 1.49%,8.48%。综合上述原因,我们将该药材水解后再进行含量测定。

采用二极管阵列检测器在 190~600 nm 分别扫描混合对照品及供试品溶液中没食子酸、鞣花酸的紫外吸收,对照品和供试品中的各成分的最大吸收峰分别为 216,255 nm。根据各成分保留时间的差异,在 0~20 min 设定测定波长 216 nm 以测定没食子酸,20 min 后以 255 nm 测定鞣花酸。HPLC 可变波长测定法突破了中药龙眼原有单一成分定量评价质量的限制,实现了中药材多个成分的同时定量测定,这种方法必将在中药质量控制方面具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005.
- [2] 黄建蓉,黄建蓉,李琳,等.龙眼肉生理功效和活性成分的研究进展[J].食品工业科技,2007,28(3):221.
- [3] 刘紫全,叶云,黄群莲.泸州龙眼与沿海地区龙眼生活环境比较分析[J].时珍国医国药,2006,17(1):131.
- [4] 余欣,王锋,姚岚,等. HPLC 测定野老鹤草中没食子酸和鞣花酸的总量[J].中成药,2010,32(7):1172.

[责任编辑 蔡仲德]