

HPLC 测定猴耳环不同部位中没食子酸和槲皮素的含量

李雪玲, 刘莉, 钟棱, 李沙沙, 翁立冬, 张璐, 刘强*
(南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的: 测定猴耳环药材不同部位没食子酸和槲皮素的含量, 为合理开发利用猴耳环资源提供理论依据。方法: 采用高效液相法, 色谱条件: Kromosil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2% 磷酸溶液梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。结果: 没食子酸和槲皮素的含量均是在叶中最高, 幼枝中次之, 茎干中含量最低, 茎干中没有检测出槲皮素。结论: HPLC 简便可行、重复性好, 适用于猴耳环 2 种成分的同时测定, 可用于猴耳环的质量控制。

[关键词] 猴耳环; 不同部位; 没食子酸; 槲皮素, 含量测定

[中图分类号] 284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0095-03

HPLC Determination of Gallic Acid and Quercetin in Different Parts of *Archidendron clypearia*

LI Xue-ling, LIU Li, ZHONG Reng, LI Sha-sha, WENG Li-dong, ZHANG Lu, LIU Qiang*
(Department of Traditional Chinese Medicine of Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] Objective: To determine gallic acid and quercetin from different parts of *Archidendron clypearia*, and to provide evidence for the rational development and utilization of *A. clypearia*. **Method:** HPLC method was used with Kromosil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), and the mobile phases were acetonitrile and 0.2% phosphoric acid solution with the gradient elution. The flow rate was 1 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 254 nm. **Result:** Both of the content of gallic acid and quercetin are highest in the leaves, lower in the new shoot and lowest in the shoot, even quercetin cannot be tested in the shoot. **Conclusion:** The method can be used to control the quality of *Archidendron clypearia*. It is simple, accurate, reproducible and suitable for simultaneous determination of two active constituents in *Archidendron clypearia*.

[Key words] *Archidendron clypearia*; gallic acid; quercetin

猴耳环为豆科植物猴耳环 *Archidendron clypearia* (Jack.) Nielsen 的干燥叶, 又名围涎树、洗头木、蛟龙木、落地金钱等, 广泛分布于我国南方各省, 具有清热解毒、凉血消肿, 止泻等作用^[1]。猴耳环主要含黄酮类、儿茶酚、鞣质等化合物, 如没食子酸、槲皮素等^[2-3]。在南方地区, 其用药部位习惯并不统一, 有的地区用叶, 有的地区用幼枝及叶, 还有地方

用茎干切片入药。本文建立了 HPLC 同时对猴耳环中没食子酸与槲皮素的含量测定方法, 并对猴耳环的茎干、枝、叶 3 个部位中没食子酸与槲皮素的含量进行了测定, 以为正确评价药用部位的质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪 (真空脱气机、四元泵、二极管阵列检测器、自动进样器、智能恒温柱温箱、ChemStation 化学工作站); SB3200-超声清洗仪 (BRNISON); AB1352S 电子天平 (十万分之一, METT LER TOLEDO)。

1.2 试药 药材猴耳环的叶、茎、枝, 2010 年 7 月采

[收稿日期] 20100903(019)

[第一作者] 李雪玲, 南方医科大学 2007 级中药学本科

[通讯作者] * 刘强, 教授, 博士, 研究方向: 中药新制剂与新剂型, Tel: 020-61648264

自广州从化流溪河公园北侧山坡, 经南方医科大学中医药学院陈兴兴鉴定为豆科植物猴耳环 *A. clypearia*, 分级, 直径小于 0.5 cm 者, 没有明显木质部者定为幼枝, 直径大于 5 cm 者定为茎干, 晒干备用; 没食子酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110831-200302); 槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0081-9304); 乙腈为色谱纯; 水为纯净水; 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸和槲皮素对照品适量, 用 80% 甲醇溶解并稀释成没食子酸 $0.208 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和槲皮素 $0.138 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备溶液。

2.2 供试品溶液的制备 分别精密称取猴耳环叶、枝、茎干 0.998 6, 1.007 3, 0.997 6 g, 精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1) 25 mL, 称定质量, 超声 30 min, 取出, 冷却至室温, 再称定质量, 用提取液补足减失的质量, 摇匀, 滤过。用微孔滤膜(0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.3 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱 Kromasil C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.2% 磷酸溶液梯度洗脱, 洗脱梯度见表 1; 检测波长 254 nm; 流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 猴耳环药材中没食子酸和槲皮素的 HPLC 梯度洗脱条件

| t/min | 乙腈/% | 磷酸/% |
|---------|--------|---------|
| 0 ~ 7 | 8 | 92 |
| 7 ~ 9 | 8 ~ 25 | 92 ~ 75 |
| 9 ~ 35 | 25 | 75 |
| 35 ~ 40 | 25 ~ 8 | 75 ~ 92 |
| 40 ~ 50 | 8 | 92 |

2.4 线性关系考察 取 2.1 项下储备溶液适量, 分别精密吸取该溶液 0.2, 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 移入到 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制成不同浓度梯度的对照品溶液, 分别进样 10 μL , 记录色谱图, 见图 1-A。以对照品进样量(μg) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 进行线性回归。得到没食子酸、槲皮素回归方程分别为 $Y = 0.0006X - 0.0113$ ($r = 0.9998$) 和 $Y = 0.0003X - 0.0094$ ($r = 0.9996$), 结果表明: 在 0.0416 ~ 0.3744 μg 没食子酸进样量与峰面积值呈良好线性关系; 在 0.0276 ~ 0.2484 μg 槲皮素进样量与峰面积值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 取 2.1 项下的对照品溶液连续进样 5 次, 每次 2 μL , 没食子酸和槲皮素的峰面积

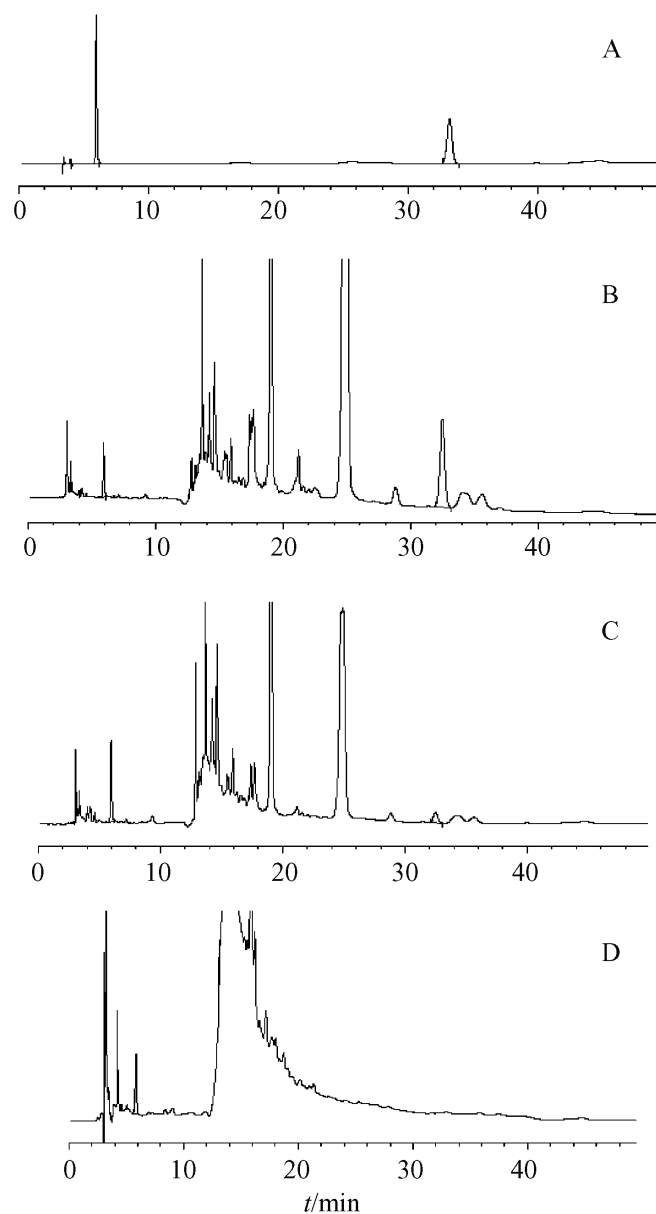


图 1 没食子酸和槲皮素对照品(A)与猴耳环叶(B)、枝(C)、茎(D)的 HPLC

RSD 分别为 0.62%, 1.40%, 表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 取 2.2 项下方法制备的猴耳环叶供试品溶液在 0, 4, 8, 12, 24 h 分别进样 2 μL , 没食子酸和槲皮素的峰面积 RSD 分别为 2.38%, 1.95%, 表明供试品至少在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 按 2.2 项下方法制备的猴耳环叶供试品溶液 5 份, 每次进样 2 μL , 测定没食子酸和槲皮素的平均含量分别为 $1.0466, 2.4464 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 其 RSD 分别为 1.88%, 1.26%, 结果表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的猴耳环叶供试品, 精密加入 2.1 项方法下制备的混合对照品溶液(没食子酸浓度为 $0.114 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 槲皮素浓度为 $0.145 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 适量, 按供试液制备方法, 制成加样供试品溶液, 平行 6 份分别进样 2 μL , 记录色谱图, 计算没食子酸和槲皮素的回收率分别为 100.70%, 99.29%。RSD 分别为 1.40%, 2.53%, 表明本试验方法回收良好(表 2)。

表 2 2 种成分加样回收试验 (n=6)

| 样品 | 样品量 / g | 加入量 / g | 测得量 / g | 回收率 / % | 平均值 / % | RSD / % |
|------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 没食子酸 | 0.0626 1 | 0.068 4 | 0.131 1 | 100.13 | 100.74 | 1.38 |
| | 0.0626 1 | 0.068 4 | 0.132 3 | 101.88 | | |
| | 0.0626 1 | 0.068 4 | 0.130 8 | 99.69 | | |
| | 0.0626 1 | 0.068 4 | 0.131 8 | 101.15 | | |
| | 0.0626 1 | 0.068 4 | 0.132 8 | 102.61 | | |
| | 0.0626 1 | 0.068 4 | 0.130 3 | 98.96 | | |
| 槲皮素 | 0.189 3 | 0.087 0 | 0.274 3 | 97.71 | 99.34 | 2.50 |
| | 0.189 3 | 0.087 0 | 0.274 0 | 97.37 | | |
| | 0.189 3 | 0.087 0 | 0.277 3 | 101.15 | | |
| | 0.189 3 | 0.087 0 | 0.273 1 | 96.32 | | |
| | 0.189 3 | 0.087 0 | 0.280 0 | 101.95 | | |
| | 0.189 3 | 0.087 0 | 0.277 0 | 101.56 | | |

2.8 样品测定 各样品分别作 3 个平行处理,按照 2.1 项条件测定,外标法计算没食子酸和槲皮素的含量,结果见表 3。

表 3 不同部位没食子酸和槲皮素的质量分数 (mg·g⁻¹, n=3)

| 部位 | 没食子酸 | 槲皮素 |
|----|---------|---------|
| 叶 | 1.258 8 | 3.898 7 |
| 枝 | 1.142 2 | 0.288 1 |
| 茎干 | 0.153 7 | - |

3 讨论

由于猴耳环中槲皮素多以槲皮苷的形式存在,而没食子酸也常与鞣质结合在一起,故根据文献 [4] 中的提取溶剂和水解条件,采用甲醇-25% 盐酸溶液(4:1) 混合液超声提取。

在参考文献 [5-6] 的基础上,在实验过程中曾尝试采用甲醇-0.2% 磷酸的流动相与乙腈-0.2% 磷酸

的流动相进行梯度洗脱,发现采用甲醇-0.2% 磷酸的流动相可以使槲皮素的出峰时间缩短,但是槲皮素峰与其他杂质峰无法得到很好的分离。而采用乙腈-0.2% 磷酸系统槲皮素峰峰形较好,分离效果好。由于没食子酸与槲皮素 2 种物质的极性相差较大,需要在同一色谱系统中测定,故采用梯度洗脱。在上述色谱条件下,待测成分与相邻峰达到基线分离,且回收率高,重复性好。

本文首次对猴耳环的不同部位进行了没食子酸和槲皮素的含量测定。结果表明没食子酸与槲皮素的含量均是在叶中含量最高,幼枝中的含量较低,而茎干中的含量最低。目前广东地区猴耳环主要用其枝叶入药,在《广东省中药材标准》中规定是把干燥叶作为其入药部位,从没食子酸和槲皮素成分含量角度考虑,可能是最合理的。本文研究结果也控制猴耳环药材及其制剂的内在质量提供了参考依据。

[参考文献]

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第 1 分册[S]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 11.
- [2] 苏妙贤, 唐之岳, 黄伟欢, 等. 猴耳环化学成分研究[J]. 中药材, 2009, 32(5): 705.
- [3] 李镜友, 罗巧红, 张曼, 等. HPLC 法测定不同采收期猴耳环中没食子酸的含量[J]. 中药材, 2009, 32(6): 915.
- [4] 李艳芳, 夏泉, 许风清, 等. HPLC 法同时测定热淋清制剂中没食子酸和槲皮素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 12(14): 15.
- [5] 梁泰刚, 刘伟, 赵承孝, 等. HPLC 法同时测定养心草中没食子酸、槲皮素和山萘酚的含量[J]. 光谱实验室, 2009, 26(4): 881.

[责任编辑 邹晓翠]