

HPLC 同时测定猴耳环消炎胶囊中没食子酸与槲皮素的含量

陈艳伟¹, 张欢², 杨世磊¹, 王春富¹, 梁卉^{1*}

(1. 大连医科大学附属第一医院临床药学, 辽宁 大连 116011;
2. 大连医科大学药学院 辽宁 大连 116044)

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法同时测定猴耳环消炎胶囊中没食子酸与槲皮素的含量。方法: 伊利特 Hypersil BDS-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱进行色谱分离, 以甲醇-磷酸溶液梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL。结果: 没食子酸和槲皮素分别在 15.0 ~ 180 (r = 0.999 6), 1.25 ~ 15.0 mg·L⁻¹ (r = 0.999 7) 线性关系良好; 平均回收率分别为 98.2% 和 99.2%, RSD 分别为 0.7% 和 0.5%。结论: 方法操作简便, 精密度高, 结果准确, 可同时测定猴耳环消炎胶囊中没食子酸与槲皮素的含量, 可用于猴耳环胶囊的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱; 猴耳环消炎胶囊; 没食子酸; 槲皮素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)09-0126-03

[doi] 10.11653/syfy2013090126

Determination of Gallic Acid and Quercetin in Pithecellobium Clypearia Antiphlogistic Capsule by HPLC

CHEN Yan-wei¹, ZHANG Huan², YANG Shi-lei¹, WANG Chun-fu¹, LIANG Hui^{1*}

(1. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, China;
2. College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of gallic acid and quercetin in Houerhuan Xiaoyan Jiaonang. **Method:** The analytical column was Hypersil BDS-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), and the mobile phase was methanol-phosphate solution with the gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 254 nm. The column temperature was kept at 30 °C, and the sample volume was 10 μL. **Result:** A good linearity was obtained in the range of 15.0-180.0 mg·L⁻¹ (r = 0.999 6) and 1.25-15.0 mg·L⁻¹ (r = 0.999 7) for gallic acid and quercetin respectively, and the average recovery was 98.2% (RSD 0.7%) and 99.2% (RSD 0.5%) respectively. **Conclusion:** The method is convenient, accurate, precise and can be used in the content determination of gallic acid and quercetin in Pithecellobium clypearia antiphlogistic capsule at the same time, and can be used for the quality control of this capsule.

[Key words] HPLC; Pithecellobium clypearia antiphlogistic capsule; gallic acid; quercetin

猴耳环, 豆科、猴耳环属, 属多年生乔木围廷树, 性味苦涩寒, 功效清热解毒、收湿敛疮, 是治疗多种热毒症候独特的南方药材^[1-2]。猴耳环消炎胶囊具有清热解毒、消炎止痛、止泻之功效, 适用于上呼吸

道感染、急性咽喉炎、急性扁桃体炎、急性肠炎、亦可用于细菌性痢疾^[3]。猴耳环主要含黄酮类、儿茶酚、鞣质等化合物^[4-5], 其中, 槲皮素对肠胃道有止泻、消炎镇痛的作用, 没食子酸有极好的抗炎、抗病毒作用^[6-7], 与猴耳环消炎胶囊的药理作用相同, 是其主要有效成分^[8]。目前尚没有对猴耳环消炎胶囊中没食子酸与槲皮素二者同时进行测定研究的文献。为了有效地控制产品质量, 笔者参考相关报道^[3,9-13], 建立了同时测定猴耳环消炎胶囊中没食子酸与槲皮素含量的高效液相色谱法。

[收稿日期] 20120904(003)

[第一作者] 陈艳伟, 硕士, 主管药师, 从事临床药学及制剂质量控制研究, E-mail: chenyanweile@163.com

[通讯作者] * 梁卉, 硕士, 主任药师, 从事中药制剂质量控制研究, E-mail: dyyyly@yeah.net

1 仪器与试药

日本岛津 LC-2010C HT 型高效液相色谱仪,伊利特 Hypersil BDS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),UV Detector 检测器,LC Solution 工作站;赛多利斯仪器(北京)有限公司 1/万分析天平,Delta320 pH 计,SK-1 快速型混匀器,超声器,津腾溶液过滤器。

没食子酸对照品,中国药品生物制品检定所,批号 110831-200803;槲皮素对照品,中国药品生物制品检定所,批号 100081-200907;猴耳环消炎胶囊,广州市花城制药厂,批号 Z44020132;蒸馏水,自制蒸馏水,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过;磷酸,石家庄市黄磷厂,批号 38056;盐酸,分析纯,批号 20061017;甲醇,美国 Tidea 公司,批号 1010910。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 伊利特 Hypersil BDS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-磷酸溶液梯度洗脱,见表 1,流速 1 mL · min⁻¹,检测波长 254 nm,柱温 30 °C,进样体积 10 μL。

表 1 HPLC 梯度洗脱条件

t/min	甲醇/%	磷酸/%
0 ~ 1	10	90
1 ~ 2.5	10 ~ 50	90 ~ 50
2.5 ~ 8.5	50	50
8.5 ~ 9.5	50 ~ 10	10 ~ 90
9.5 ~ 18	10	90

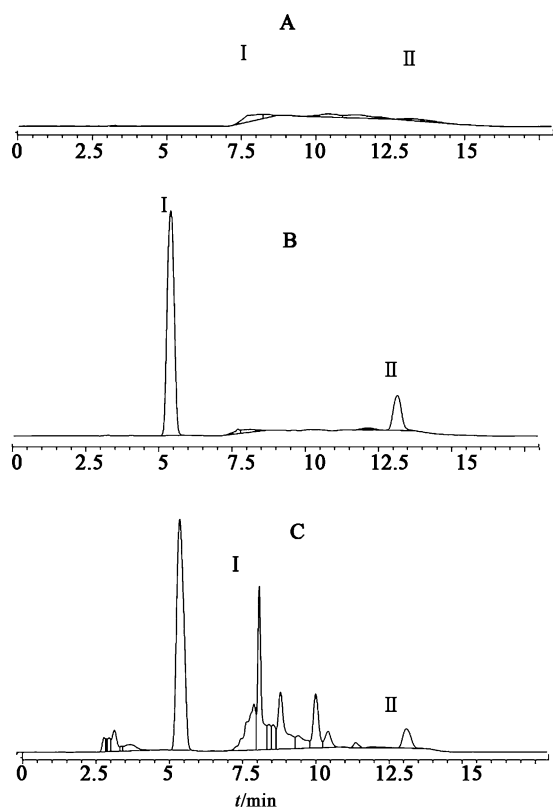
2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取没食子酸对照品和槲皮素对照品适量,用甲醇-0.2% 磷酸溶液(4:1)溶解并稀释成没食子酸和槲皮素质量浓度分别为 60, 5 mg · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取剥去外壳的胶囊粉末 100 mg 置于 50 mL 量瓶中,加甲醇-36% 盐酸(4:1)40 mL,超声 40 min,放置室温,以甲醇定容,充分摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 干扰试验 按 2.1 项下的色谱条件,分别取空白溶液、对照品溶液及供试品溶液适量进样,记录色谱图,见图 1。各峰之间分离度良好,结构表明空白基质对没食子酸与槲皮素测定无干扰。

2.4 线性关系考察 精密称取没食子酸对照品 10 mg 与槲皮素对照品 10 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,得没食子酸和槲皮素质量浓度均为 1 g · L⁻¹ 的储备液;精密量取没食子酸和槲皮素储备液,以甲醇-



A. 空白;B. 混合对照品;C. 供试品;I. 没食子酸;II. 槲皮素
图 1 猴耳环消炎胶囊 HPLC

水(4:1)稀释成没食子酸和槲皮素浓度分别为 15.0/1.25, 30/2.5, 60/5, 120/10, 180/15 的对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件进行测定,进行回归分析。结果表明没食子酸和槲皮素分别在 15 ~ 180, 1.25 ~ 15 mg · L⁻¹ 关系良好,回归方程分别为 $Y = 20\ 974X - 11\ 218$ ($r = 0.999\ 7$), $Y = 44\ 877.7X + 2\ 006.0$ ($r = 0.999\ 7$)。

2.5 精密度试验 取 2.2.1 项下方法配制对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件重复进样 6 次,结果没食子酸及槲皮素 RSD 分别为 0.15%, 0.95%, 表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取去壳的猴耳环胶囊粉末,精密称取 5 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,并按 2.1 项下色谱条件进行平行测定,结果没食子酸平均含量 33.8 mg · g⁻¹ (RSD 0.24%), 槲皮素平均含量 1.45 mg · g⁻¹ (RSD 1.73%), 表明此方法重复性良好。

2.7 回收率试验 取已知含量的猴耳环叶供试品,分别加入 3 mL 质量浓度为 1 g · L⁻¹ 的没食子酸储备液和 150 μL 质量浓度为 1 g · L⁻¹ 的槲皮素储备液,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 10 μL , 记录色谱图, 计算没食子酸和槲皮素的回收率见表 2。

表 2 回收率试验

成分	加入量	样品中量	测得量	回收率	平均回	RSD
	/mg	/mg	/mg	/%	收率/%	/%
没食子酸	30	33.9	63.42	98	98	0.61
	30	33.9	63.07	97		
	30	33.9	63.44	98		
	30	33.9	63.46	98		
	30	33.9	63.11	99		
	30	33.9	63.41	97		
槲皮素	1.5	1.43	2.94	101	99	1.8
	1.5	1.43	2.92	99		
	1.5	1.43	2.91	98		
	1.5	1.43	2.90	98		
	1.5	1.43	2.96	102		
	1.5	1.43	2.91	98		

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 在 2.1 项下色谱条件下, 分别于 0, 1, 2, 6, 8 h 进样, 记录色谱图, 结果没食子酸和槲皮素峰面积 RSD 分别为 0.3%, 1.5%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.9 含量测定 按 2.2.2 方法配置 6 份供试品溶液进行含量测定, 样品中没食子酸平均含量 33.87 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, RSD 0.22%; 槲皮素平均含量 1.43 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 1.46%。

3 讨论

猴耳环主要含有黄酮类、儿茶酚胺类、鞣质等化合物, 如没食子酸和槲皮素等。有关文献[6]在做过正交试验比较后, 发现采用不同比例的甲醇-水, 甲醇-盐酸溶液提取, 发现甲醇-水提取的样品只能检测到没食子酸, 而甲醇盐酸混合溶液提取的样品能同时检测出两种成分, 由于猴耳环中槲皮素多以槲皮苷形式存在, 故选择甲醇-36% 盐酸(4:1)进行水解提取。

文献报道, 没食子酸在 213, 273 nm 处有最大吸收, 槲皮素在 254, 372 nm 处存在最大吸收, 由于样品中没食子酸浓度高, 故选择了 254 nm 检测波长。

由于没食子酸与槲皮素极性差别较大, 采用甲醇-水流动相进行梯度洗脱, 流动相中加入磷酸, 发现没食子酸保留有所加强, 减少脱尾使没食子酸和

槲皮素峰形对称。梯度变化的过程中, 由于流动相比例的变化, 会造成基线的漂移。对流动相在使用之前进行过滤和脱气, 可减少漂移现象。

[参考文献]

[1] 陈元胜, 叶永才. 广东省中药材标准. 第一册[M]. 广州: 广东科学技术出版社, 2004: 197.

[2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 613.

[3] 聂少平, 王远兴, 谢明勇, 等. 高效液相色谱法测定猴耳环消炎胶囊中没食子酸的含量[J]. 实用中西医结合临床, 2003, 3(2): 3.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 李药兰, 李克明, 苏妙贤, 等. 猴耳环抗病毒有效成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(5): 397.

[7] 郭晓宇, 王乃利, 宝丽, 等. 猴耳环的化学成分及其对 T 淋巴细胞增殖的影响[J]. 中国药学: 英文版, 2007, 16(3): 208.

[8] 刘永刚, 王晓东, 张小兵. 猴耳环质量标准研究[J]. 中国药师, 2008, 11(1): 29.

[9] 刘起中, 张家国, 李京平. HPLC 测定猴耳环消炎片中没食子酸含量[J]. 中成药, 2001, 23(9): 687.

[10] 李雪玲, 刘莉, 钟棱, 等. HPLC 测定猴耳环不同部位中没食子酸和槲皮素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 95.

[11] 叶蕪芝, 陈鹏程, 杨建萍, 等. HPLC 法测定梅花入骨丹中没食子酸与槲皮素含量[J]. 福建中医药大学学报, 2011, 21(1): 35.

[12] 李慧, 许亮, 徐保利. HPLC 测定地锦草中没食子酸、槲皮素及山奈素含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 100.

[13] 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, 14(12): 15.

[责任编辑 顾雪竹]