

HPLC测定覆盆子中没食子酸含量

李天傲, 谭喜莹^{2*} (1. 浙江大学城市学院医学与生命科学学院, 杭州 310015; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

摘要:目的 用高效液相色谱法测定覆盆子中没食子酸的含量。方法 采用 Alltech C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.4%磷酸水溶液 (10:90), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 278 nm, 柱温室温。结果 没食子酸在 5.24 ~ 104.80 μg·mL⁻¹浓度范围呈良好的线性关系, $r=0.9992$, 平均回收率为 97.6%, RSD为 1.9%。结论 本法稳定性、重现性好, 可作为覆盆子药材质量控制的依据之一。

关键词:覆盆子; 没食子酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R287 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)03-0235-03

Quantitative Determination of Gallic Acid in Fructus Rubi by HPLC

LI Tian-ao¹, TAN Xi-ying^{2*} (1. Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China; 2. Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the content of gallic acid in Fructus Rubi by HPLC. **METHODS** The analysis was carried out on C₁₈ column (250mm × 4.6mm, 5 μm). Mobile phase was MeOH-0.4% H₃PO₄ (10:90), flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the wavelength was set at 278 nm. **RESULTS** The linearity of gallic acid was in the range of 5.24 ~ 104.80 μg·mL⁻¹ ($r=0.9992$), and the average recovery was 97.6%, RSD = 1.9%. **CONCLUSION** This method is simple, sensitive and accurate to determine the content of gallic acid in Fructus Rubi.

KEY WORDS: Fructus Rubi; gallic acid; HPLC

中药覆盆子为蔷薇科悬钩子属植物掌叶覆盆子 (*Rubus chingii* Hu)的近成熟果实。性微温,味甘酸,入肝肾经,具补肝肾、缩小便、助阳固精、明目之功效,临床上主要用于治疗阳痿、遗精、虚劳、目暗^[1]。现代药理研究表明其具有抗诱变、延缓衰老和免疫增强等作用^[2]。中国药典 2005年版中覆盆子仅有性状和鉴别项,缺少控制药材质量的方法,本试验首次采用高效液相色谱法对覆盆子中的没食子酸进行测定^[3],方法简便、快捷,灵敏度高,重复性好,可作为覆盆子药材质量控制的依据之一。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10ATVP高效液相色谱仪,日本岛津 SPD-10AVP紫外检测器,浙江大学 N2000型色谱工作站。

没食子酸对照品由中国药科大学梁敬钰教授提供(经

HPLC峰面积归一化法检测其纯度不低于 99%)。覆盆子药材 3批购于浙江省药材市场,经中国药科大学宋学华教授鉴定。甲醇为色谱纯,水为重蒸水,磷酸等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Alltech C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4%磷酸水溶液 (10:90); 检测波长: 278 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

2.2 对照品溶液和供试品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸对照品适量,加甲醇制成 0.262 mg·mL⁻¹的溶液,作为对照品储备液。取储备液 1.0 mL,至 10 mL量瓶中,加流动相至刻度,得每 1 mL含 26.2 μg的溶液作为对照品溶液。

作者简介: 李天傲,男, * 通讯作者: 谭喜莹,女,硕士 Tel: (025) 86617141

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)0.5 g 精密称定,加入 20 mL 水煎煮 2 h 滤过,滤器用适量的水进行洗涤,滤液并入同一容器中,蒸干滤液,残渣精密加入甲醇 10 mL,称重,超声 15 min 用甲醇补足失重,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 空白溶剂试验 吸取甲醇 20 μL 作为空白溶液注入高效液相色谱仪,结果表明溶剂对没食子酸的测定无干扰,见图 1。

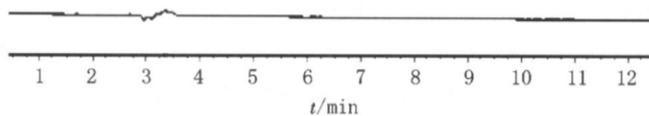


图 1 空白图谱

Fig 1 Chromatogram of blank

2.3.2 线性关系的考察 分别精密取对照品储备液 0.2

表 1 覆盆子中没食子酸加样回收率试验结果

Tab 1 Result of recovery of gallic acid in Fructus Rubi

编号	取样量 /g	样品含量 /μg	对照品加入量 /μg	测得总量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.2543	76.29	75.2	150.32	75.12	98.5	97.6	1.9
2	0.2457	73.70	75.2	147.84	72.64	98.6		
3	0.2521	75.63	75.2	149.15	73.95	97.8		
4	0.2556	76.68	75.2	148.20	73.00	95.2		
5	0.2534	76.01	75.2	147.90	72.70	95.7		
6	0.2498	74.94	75.2	150.12	74.92	100.0		

2.4 含量测定

分别取三份覆盆子样品约 0.5 g 精密称定,按“2.2.2”项下制备供试品溶液。在选定的色谱条件下外标法测定没食子酸的含量,结果见表 2。对照品及供试品色谱图见图 2 和图 3。

表 2 覆盆子中没食子酸的含量测定结果 (n=3)

Tab 2 Content of gallic acid in Fructus Rubi (n=3)

批号	没食子酸 /%
041001	0.030
041002	0.029
041003	0.029

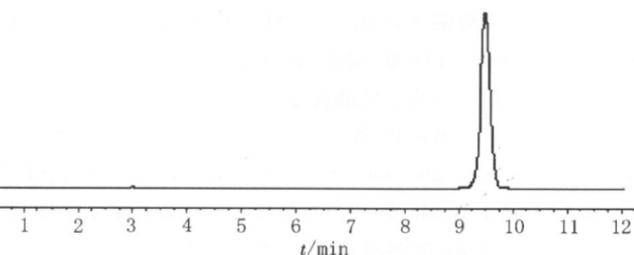


图 2 没食子酸对照品的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC chromatograms of gallic acid

0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,分别取 20 μL 注入液相色谱仪,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程 $Y = 20860X + 4208$ $r = 0.9992$ 结果表明没食子酸在 5.24~104.8 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.3.3 进样精密度试验 精密吸取没食子酸对照品溶液 20 μL,连续进样 6 次,测定其峰面积的 RSD=0.3%,表明进样精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 后测定,结果其峰面积的 RSD 为 0.7%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 取同一批覆盆子药材 6 份,按“2.2.2”项下制备成供试品溶液,分别进样 20 μL,测定没食子酸的含量为 0.3 mg·g⁻¹ 的 RSD 为 0.4%,表明方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 (0.3 mg·g⁻¹) 0.25 g 精密加入对照品适量,配成中间浓度溶液,按“2.2.2”项下方法操作,平行操作 6 份,计算加样回收率。平均回收率为 97.6%,RSD 为 1.9%,结果见表 1。

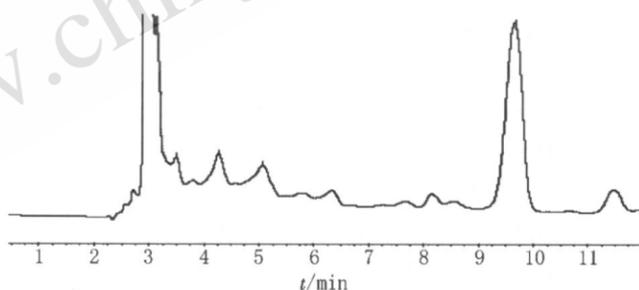


图 3 覆盆子样品的 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC chromatograms of sample of Fructus Rubi

3 讨论

3.1 提取方法的考察^[4-7]: 分别考察了甲醇超声、70% 甲醇超声、流动相超声、水煎液蒸干后甲醇超声四种方法,结果表明,甲醇超声的提取效率很低,70% 甲醇超声的提取效率与甲醇相当且有干扰,流动相超声提取效率较前两者高但干扰更大,水煎液蒸干后甲醇超声的提取效率最高且干扰小。

3.2 色谱条件的选择: 分别考察了甲醇-冰醋酸溶液、甲醇-磷酸溶液两种色谱系统,在甲醇-冰醋酸溶液系统中峰型前沿,调整冰醋酸的浓度亦不能解决。而甲醇-磷酸溶液系统中当磷酸浓度达到 0.4% 时峰形比较理想,分离良好。

3.3 本实验首次建立了覆盆子药材中没食子酸的含量测定

方法,为该药材和其制剂的质量评价提供了一个定量依据。

REFERENCES

- [1] Dictionary of Chinese Herbal Medicines(中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House, 1977: 2161.
- [2] PI H F, WU J Z. Study on the chemical constituents and pharmacological effect of Fructus Rubi [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中医药学刊), 2003, 21(12): 2169.
- [3] XIE Y H, MIAO J R, LIU W Q. Studies on the Chemical Constituents from Fructus Rubi[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2005, 02, 99-100.
- [4] WANG J B, CHEN L, WANG Y, *et al.* Determination of gallic acid in phyllanthus by RP-HPL [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(1): 126.
- [5] HE X, LI Y J, LIU L N, *et al.* Determination of gallic acid in Melastoma dodecandrum by RP-HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2005, 30(3): 180.
- [6] ZHANG Y, ZHANG L M, GAO Y S, *et al.* Determination of Gallic Acid in Discolor Cinquefoil Herb by RP-HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2006, 26(3): 355-356.
- [7] HOU H C, LIANG Q, LU X C. Determination of Gallic Acid in Galla Chinensis and Galla Halepensis by HPLC [J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2005, 6(3): 38-39.

收稿日期: 2007-05-24