

# 高效液相色谱法测定互叶白千层中没食子酸的含量\*

## Determination of Gallic Acid in *Melaleuca alternifolia* by HPLC

陈明生<sup>1,2</sup>, 黄艳<sup>1,2</sup>, 林霄<sup>1,2</sup>, 柴玲<sup>1,2</sup>, 稂文旺<sup>1,2</sup>, 李齐修<sup>1,2</sup>, 刘布鸣<sup>1,2\*\*</sup>

CHEN Ming-sheng<sup>1,2</sup>, HUANG Yan<sup>1,2</sup>, LIN Xiao<sup>1,2</sup>, CHAI Ling<sup>1,2</sup>, LANG Wen-wang<sup>1,2</sup>, LI Qi-xiu<sup>1,2</sup>, LIU Bu-ming<sup>1,2</sup>

(1. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022; 2. 广西壮族自治区中医药研究院, 广西南宁 530022)

(1. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi Institute of Traditional Medical and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, 530022, China)

**摘要:** 为了建立用高效液相色谱测定互叶白千层中没食子酸含量的方法, 为互叶白千层的质量标准制定提供方法和依据, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定互叶白千层中没食子酸含量。色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6mm × 250mm, 5μm), 流动相为乙腈-0.2%磷酸(3:97), 检测波长 274nm, 柱温为室温, 流速 1ml/min。结果, 没食子酸在 0.2016~1.2096 μg 范围内呈良好线性关系 ( $r = 0.9991$ ), 平均回收率为 101.87%, RSD 为 1.76% ( $n = 9$ )。本方法简便可行, 重现性好, 可以作为互叶白千层中没食子酸含量的测定方法。

**关键词:** 没食子酸 高效液相色谱 含量测定 互叶白千层

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2012)01-0071-03

**Abstract:** A high-performance liquid chromatography(HPLC) method was developed for the determination of gallic acid in *Melaleuca alternifolia*, which provided the basis for establishing the quality standard of *Melaleuca alternifolia*. The determination was performed on Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6mm × 250mm, 5μm) column with acetonitrile-0.2% phosphoric acid(3:97) as mobile phase with flow rate of 1.0 ml/min at detection wavelength of 274 nm. And the column temperature was set at room temperature. The average recovery rate ( $n = 9$ ) of gallic acid was 101.87% and RSD was 1.76%. This method is simple, rapid, accurate and reliable, and is suitable for the quality control of gallic acid in *Melaleuca alternifolia*.

**Key words:** gallic acid, HPLC, determination, *Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betehe) Cheel

互叶白千层系桃金娘科(Myrtaceae)白千层属(*Melaleuca* L.)互叶白千层 [*Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betehe) Cheel], 原产于澳大利亚和新西兰的部分地区<sup>[1]</sup>。我国的两广、海南、福建等地在上世纪 90 年代引种并形成了一定的种植规模, 如广西的南宁、钦州等地均有种植加工基地, 资源十分丰富。互叶白千层枝叶挥发油俗称茶树油, 油中含多种生物活性成分<sup>[2,3]</sup>, 对细菌、真菌和病毒具有

较强的杀灭和抑制作用, 在香料、医药领域广泛应用; 此外还应用于日用卫生品、皮肤保健品、化妆品、药品等行业<sup>[4~7]</sup>, 具有较高的市场经济价值。除了挥发油成分外, 文献报道互叶白千层中含有没食子酸等有机酸<sup>[8]</sup>, 还分离得到了黄酮、甾体、长链脂肪烃、长链脂肪酸以及三萜皂苷类等化合物<sup>[8~10]</sup>。本研究采用高效液相色谱法, 对其中的没食子酸进行定量分析方法研究, 为药材质量的多指标控制及进一步开发利用, 提供基础化学数据, 为白千层药材的质量标准研究奠定基础和依据。

### 1 实验仪器与试剂

仪器主要有威玛龙 UC-3282 HPLC Pump、UC-

收稿日期: 2011-11-17

作者简介: 陈明生(1982-), 男, 研究实习员, 主要从事质量标准研究。

\* 广西科学基金项目(2010GXNSFB013085)资助。

\*\* 通讯作者: 刘布鸣, 男, 研究员, 主要从事中药和天然药化学成分与

质量标准研究。Email: liubuming@yahoo.com.cn.

广西科学 2012 年 2 月 第 19 卷第 1 期

71

3292 检测器高效液相色谱仪和威玛龙色谱工作站。

试药主要有没食子酸对照品、互叶白千层植物、甲醇、乙腈、水、磷酸及其它试剂。没食子酸对照品(供含量测定用,批号 2009218)由金测分析技术有限公司提供,经 HPLC 用面积归一化法测定,纯度大于 98%。互叶白千层植物采自广西南宁、钦州,经广西中医药研究院中药研究所赖茂祥研究员鉴定为桃金娘科白千层属植物互叶白千层 (*Melaleuca alternifolia* (Maiden et Betehe) Chee1)。甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,磷酸及其它试剂均为分析纯。

## 2 实验方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil(钻石) C<sub>18</sub> (4.6mm × 250mm, 5μm)。流动相为乙腈-0.2%磷酸(3:97)。检测波长 274nm,柱温为室温,进样量 20μl,理论塔板数按没食子酸计算不低于 4000。

### 2.2 提取条件的选择

比较超声时间的结果显示,超声 1h 的提取率显著高于 0.5h,但是与超声 1.5h 的提取率相当(见表 1),表明超声 1h 基本可以将样品中的没食子酸基本提取完全。为了缩短分析时间,本实验选择超声时间为 1h。

表 1 互叶白千层在不同超声处理时间的测定结果

Table 1 Extraction of *M. alternifolia* (Maiden et Betehe) Chee1 in different extracting time

时间 Time(h)	含量 Contents(μg/g)
0.5	80.56
1.0	90.88
1.5	91.25

### 2.3 对照品溶液及供试品溶液的制备

精密称取没食子酸对照品适量,加 10% 甲醇制成 30.23μg/ml 的对照品溶液,色谱图如图 1 所示。

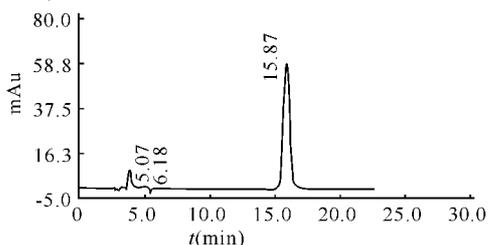


图 1 没食子酸对照品溶液色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance of gallic acid

精密称取互叶白千层药材粉末 1g,置入具塞锥形瓶中,精密加入 10% 甲醇 25ml,超声 1h,放置冷却至室温,过滤,滤液蒸至 1ml,加 10% 甲醇定容至 5ml

容量瓶中,再用 0.45μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得供试品溶液。色谱图如图 2 所示。

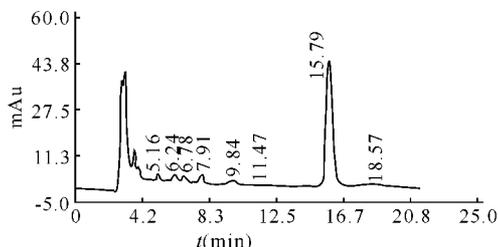


图 2 没食子酸供试品溶液色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of sample substance of gallic acid

### 2.4 线性关系考察

称取没食子酸对照品溶液 50.39mg,置入 50ml 容量瓶中,加 10% 甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得 1.0078mg/ml 标准品溶液,精密吸取 0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml、0.5ml、0.6ml 标准品溶液至 10ml 容量瓶,加流动相稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件进行测定。以对照品溶液进样量为横坐标,峰面积积分为纵坐标进行线性回归,得回归方程为  $y = 3116399.2347x - 10605.4667$ ,  $r = 0.9991$ 。结果表明,对照品溶液在 0.2016~1.2096μg 范围呈良好的线性关系。

### 2.5 精密度、稳定性和重现性实验

取同一供试品溶液连续重复进样 6 次,结果没食子酸峰面积的 RSD 值为 0.85%。实验的精密度好。

取同一供试品溶液,每隔 2h 进样,进行到 12h 考察,结果没食子酸峰面积的 RSD 值为 0.95%。实验的稳定性良好。

精密称取同一批次互叶白千层药材样品各 6 份,按上述供试品溶液制备方法和色谱条件测定峰面积并计算,结果没食子酸的平均含量为 90.88μg/g, RSD = 1.53%。实验的重现性良好。

### 2.6 加样回收率实验

精密称取已测知含量的药材样品(没食子酸平均含量为 90.88μg/g) 0.5g,共 9 份,精密加入 1.0078mg/ml 的没食子酸,其中,3 份分别加 0.8ml,3 份分别加 1.0ml,3 份分别加 1.2ml,按上述供试品溶液制备方法和色谱条件测定峰面积并计算。结果没食子酸的加样平均回收率为 101.86%, RSD = 1.76%。详见表 2。

### 2.7 样品含量测定

分别取不同产地的互叶白千层,按上述供试品溶液制备方法和色谱条件依次测定没食子酸含量,结果(表 3)显示,5 个产地的互叶白千层样品中没食子酸的最高含量为 113.7μg/g,最低含量为 80.92μg/g。

表 2 没食子酸加样回收试验结果

Table 2 Recovery results of gallic acid

样品含量 Sample content ( $\mu\text{g}$ )	加入量 Dosage ( $\mu\text{g}$ )	实测量 Measured value ( $\mu\text{g}$ )	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
45.46	36.28	82.42	101.87	101.86	1.76
45.45	36.28	83.17	103.97		
45.47	36.28	82.88	103.11		
45.48	45.35	90.71	99.74		
45.49	45.35	92.72	104.15		
45.49	45.35	92.11	102.80		
45.56	54.42	99.84	99.74		
45.69	54.42	101.03	101.69		
45.50	54.42	99.76	99.71		

表 3 互叶白千层样品中没食子酸含量测定结果( $n=5$ )

Table 3 Results of gallic acid from different region( $n=5$ )

产地 Region	采集日期 Collection date	含量 Content( $\mu\text{g/g}$ )
广西南宁 Nanning Guangxi	2011-06	113.7
广西南宁 Nanning Guangxi	2011-07	96.1
广西南宁 Nanning Guangxi	2011-08	111.2
广西南宁 Nanning Guangxi	2011-09	163.6
广西钦州 Qinzhou Guangxi	2009-08	80.92

### 3 结论

本实验建立了互叶白千层药材中没食子酸含量测定的 HPLC 法。本次研究完善和增加了互叶白千层药材的含量测定方法,为药材的多成分多指标质量控制,提高药材质量标准及进一步开发利用提供了更多的实验基础和化学数据。

#### 参考文献:

[1] Shabir G A. Method development and validation for the

GC-FID assay of p-cymene in tea tree oil formulation [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005,39:681-684.

[2] 叶开富,刘布鸣,苏小川. 茶树油芳香水的化学成分分析 [J]. 广西科学, 2008,15(2):173-175.

[3] 杨辉,刘布鸣,韦刚. 1,8-桉叶素型互叶白千层精油的质量标准研究 [J]. 广西科学, 2011,18(1): 52-55.

[4] 金其璋. 什么是茶树油? [J]. 香料香精化妆品, 2001(3):37-39.

[5] 丁恺. 茶树油的性质、应用及市场发展 [J]. 牙膏工业, 2005(1):44-46.

[6] 张孝祺,林雄,吴玉鏊,等. 广东互叶白千层茶树油产品主要成分的质量标准研究 [J]. 广东化工, 2002(6): 12-16.

[7] 刘布鸣,彭维. 白千层挥发油化学成分分析 [J]. 分析测试学报, 1999,18(6):70-72.

[8] 刘布鸣,董晓敏,黄艳,等. 互叶白千层的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011,42(7):1282-1284.

[9] Vieira T R,Barbosa LCA,Maltha C R A,et al. Chemical constituents from *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) [J]. Quimica Nova, 2004,27(4):536-539.

[10] 林霄,董晓敏,黄艳,等. 互叶白千层脂溶性成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国民族民间医药, 2010,19(20):154-154,156.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第 70 页 Continue from page 70)

[2] 陈全斌,杨瑞云,义祥辉,等. RP-HPLC 法测定罗汉果鲜果及甜甙中总黄酮含量 [J]. 食品科学, 2003,24(5):133-135.

[3] 陈全斌,义祥辉,余丽娟,等. 不同生长周期的罗汉果鲜果中甜甙 V 和总黄酮含量变化规律研究 [J]. 广西植物, 2005,25(3):274-277.

[4] 陈全斌,杨建香,义祥辉,等. 罗汉果叶中黄酮甙元的研究 [J]. 广西植物, 2006,26:217-220.

[5] 陈全斌,杨建香,程忠泉,等. 罗汉果叶黄酮甙的分离与结构鉴定 [J]. 广西科学, 2006,13(1):35-36,42.

[6] 陈全斌,喻彬,沈种苏,等. 不同生长周期罗汉果叶中总黄酮含量变化规律研究 [J]. 广西科学, 2006,13(4):300-

302.

[7] 陈全斌,杨建香,义祥辉,等. RP-HPLC 法测定罗汉果叶中总黄酮含量 [J]. 广西科学, 2005,12(1):43-45.

[8] 陈全斌,苏小建,沈种苏,等. 罗汉果叶黄酮抗氧化能力研究 [J]. 食品研究与开发, 2006,27(10):189-191.

[9] 陈全斌,沈钟苏,韦正波,等. 罗汉果黄酮活血化痰药理作用研究 [J]. 广西科学, 2005,12(4):316-319.

[10] 陈全斌,义祥辉. 罗汉果叶黄酮及其制备工艺:中国, ZL200310110827X[P]. 2007-05-02.

(责任编辑:陈小玲)