

RP-HPLC 同时测定牻牛儿苗中 4 种酚酸类 活性成分含量

赵晓雨, 尹海波*

(辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要 目的:建立 HPLC 同时测定牻牛儿苗中没食子酸,原儿茶酸,柯里拉京,鞣花酸的含量测定方法。方法:采用 RP-HPLC, Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 0.4% 磷酸水溶液-甲醇为流动相梯度洗脱,流速 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 259 nm, 柱温 30 ℃。结果:没食子酸,原儿茶酸,柯里拉京,鞣花酸的线性范围为 0.059 ~ 2.360 g · L⁻¹ (r = 0.999 6), 0.017 ~ 0.672 g · L⁻¹ (r = 0.999 9), 0.351 ~ 14.04 g · L⁻¹ (r = 0.999 9), 0.151 ~ 6.040 g · L⁻¹ (r = 0.999 8)。平均回收率 (n = 3) 分别为 99.45% (RSD 1.5%), 98.65% (RSD 1.7%), 100.3% (RSD 2.0%), 98.90% (RSD 1.2%)。结论:该含量测定的方法快速、准确、可靠,重复性好,可为药材的质量控制提供依据。

关键词 牻牛儿苗; 没食子酸; 原儿茶酸; 柯里拉京; 鞣花酸; HPLC

牻牛儿苗科植物牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd. 的干燥地上部分,商品习称长嘴老鹳草^[1],为商品老鹳草的主流^[2],分布于我国北部,具有祛风除湿、通经活络、清热解毒、止痢等功效,临床上主要用于风湿痹痛、麻木拘挛、筋骨伤痛、泄泻痢疾等多种疾病的治疗。牻牛儿苗主要含有鞣质、黄酮、酚酸及挥发油类化合物,研究发现酚酸类成分为鞣质的水解产物,是药材中的主要有效成分,其中所含的没食子酸具有抗炎、抗肿瘤的作用,可作为潜在的阻止肿瘤发生的化学预防剂^[3],原儿茶酸具有祛痰、平喘、解蛇毒、抗血小板凝集的作用^[4],柯里拉京具有抗肿瘤、抗氧化、抗动脉粥样硬化、降血压、抑制病毒、抗菌、抗炎等生物活性^[5],鞣花酸具有天然抗氧化、清除体内自由基、保护低氧缺血所致的脑损伤等作用^[6]。同时该药材在我国历版药典中均无明确的含量测定项,为了更加全面、客观地评价药材的质量,开发利用该药材资源,本实验建立了测定没食子酸,原儿茶酸,柯里拉京,鞣花酸这 4 种活性成分的 HPLC 方法,并对不同产地的牻牛儿苗药材进行了含量分析,为该药

材的质量控制提供依据。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, Agilent TC-C₁₈ 色谱柱, SPD-40A 紫外检测器, 四元低压梯度泵, 柱温箱, KQ3200 超声波清洗(昆山市超声仪器有限公司), CP225D 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

对照品没食子酸(中国药品生物制品检定所, 110831-200302), 原儿茶酸(中国药品生物制品检定所, 110809-200604), 柯里拉京(上海融禾, 100526), 鞣花酸(上海融禾, 091227), 甲醇和磷酸为色谱纯, 水为重蒸水; 其他均为分析纯。

自采 26 个不同产地的牻牛儿苗药材, 于 2009 年 8 月—2010 年 8 月收集, 由本院药用植物教研室尹海波副教授鉴定为牻牛儿苗地上部分, 凭证标本保存于本院药用植物教研室。见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A 为甲醇, B 为 0.4% 磷酸水溶液; 梯度洗脱程序 0 ~ 15 min, 16% ~ 25% A; 15 ~ 16 min, 25% ~ 30% A; 16 ~ 17 min, 30% ~ 45% A; 17 ~ 18 min, 45% ~ 45% A; 18 ~ 31 min, 45% ~ 53.5% A; 31 ~ 33 min, 53.5% ~ 53.5% A; 流速 0.8 mL · min⁻¹; 检测波长为 259 nm; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。在此色谱条件下没食子酸, 原儿茶酸, 柯里拉京, 鞣花酸的分离大于 1.5, 拖尾因子在 0.95 ~ 1.05, 分离度良好, 色谱图见图 1。

稿件编号 20110108003

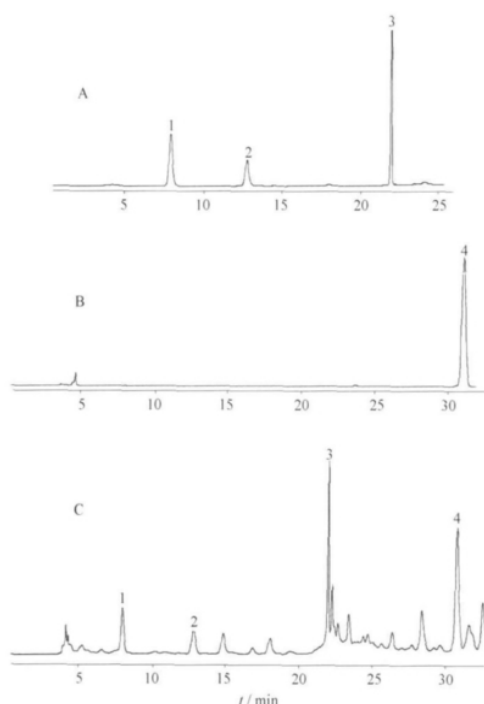
基金项目 辽宁省教育厅项目(2009A498)

通信作者 * 尹海波, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为中药资源及药材的品质评价, Tel: (0411) 87586003, E-mail: yhb0528@sinacna.com

作者简介 赵晓雨, 硕士研究生

表1 牻牛儿苗样品来源信息

No.	产地	生态环境	No.	产地	生态环境	No.	产地	生态环境
1	辽宁大连	路边草丛	10	黑龙江杜尔伯特	路边草丛	19	山东青岛	海边路旁
2	辽宁葫芦岛	路边草丛	11	黑龙江大庆	路边草丛	20	山东潍坊	山坡田埂
3	辽宁锦州	路边草丛	12	黑龙江泰来	路边草丛	21	山东济南	山坡田埂
4	辽宁熊岳	路边草丛	13	河北易县狼牙山	田埂石缝	22	北京密云	山坡路旁
5	辽宁沈阳	路边田埂	14	河北兴隆	山坡草丛	23	北京延庆	湖边路旁
6	吉林通榆三家子	路边草丛	15	河北易县清西陵	河塘路旁	24	北京鹫峰森林公园	路边草丛
7	吉林白城	路边草丛	16	河北沽原	田埂路旁	25	天津蓟县	山坡草甸
8	吉林通榆边昭镇	路边草丛	17	内蒙古科尔沁	路边草丛	26	陕西乾县	山坡路旁
9	黑龙江齐齐哈尔	路边草丛	18	内蒙古通辽	路边草丛			



1. 没食子酸; 2. 原儿茶酸; 3. 柯里拉京; 4. 鞣花酸。

图1 3种混合对照品(A)、鞣花酸对照品(B)和样品(C) HPLC图

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京适量,用甲醇定容至25 mL棕色量瓶中,制成每1 mL分别含没食子酸0.118 0 mg,原儿茶酸0.033 6 mg,柯里拉京0.702 0 mg的混合对照品溶液,摇匀,即得。另取鞣花酸适量,置于25 mL棕色量瓶中,用二甲基亚砷定容至刻度,制成每1 mL含0.302 0 mg的单一对照品溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密称定牻牛儿苗药材粉末2 g,加石油醚脱脂1 h,弃去石油醚,残渣加30倍80%的乙醇,回流提取3次,每次1 h,过滤,合并滤液,浓缩并用甲醇定容至25 mL量瓶中,作为供试

品溶液备用。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取各对照品储备液,以0.5,1,5,10,15,20 μL 按上述色谱条件连续进样,测得峰面积积分值,以进样量(μg)为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京和鞣花酸的回归方程分别为: $Y = 3\,093.2X - 5.51$, $r = 0.999\,6$; $Y = 2\,994.3X + 23.17$, $r = 0.999\,9$; $Y = 1\,441.4X + 105.23$, $r = 0.999\,9$; $Y = 8\,164.8X + 511.31$, $r = 0.999\,8$ 。结果表明,没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京和鞣花酸分别在0.059 ~ 2.36, 0.017 ~ 0.672, 0.351 ~ 14.04, 0.151 ~ 6.04 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取样品溶液10 μL ,连续重复进样6次,记录峰面积,测得没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸含量的RSD分别为2.4%, 2.7%, 1.8%, 1.2%。表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取同一样品6份(辽宁大连),按2.3供试品溶液制备项下方法操作,在2.1色谱条件下进行测定,计算没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸峰面积,RSD分别为1.9%, 2.2%, 0.5%, 1.9%,表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温下放置,分别于0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h测定,记录峰面积,结果表明,供试品溶液在24 h内稳定性良好,没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸峰面积,RSD分别为2.1%, 2.6%, 1.5%, 1.6%。

2.8 回收率试验 精密称定已知准确含量的牻牛儿苗药材粉末1 g共9份,3份为一组,每组按低,中,高浓度分别精密加入没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸的对照品,按2.3供试品溶液制备项下方法操作,在上述色谱条件下进行分析。计算回收率,结果见表2。

表 2 4 种对照品加样回收率($n=3$)

成分	原有量 / μg	加入量 / μg	测得值 / μg	回收率 /%	RSD /%
没食子酸	126.13	100.87	224.24	98.78	2.4
		126.08	248.35	98.47	1.0
		151.42	280.60	101.10	1.1
原儿茶酸	27.48	22.02	49.68	100.36	1.1
		27.45	54.19	98.56	1.8
		33.05	58.73	97.03	2.2
柯里拉京	570.79	456.56	997.25	97.07	1.9
		570.58	1167.16	102.26	2.3
		685.02	1275.02	101.53	1.7
鞣花酸	336.30	268.97	595.24	98.35	0.2
		336.27	676.84	100.63	1.4
		403.85	723.27	97.72	2.0

2.9 样品的测定 精密称取 26 个不同产地牻牛儿苗药材粉末各 2 g, 按 2.3 供试品溶液制备项下操作, 在上述色谱条件下进行分析。测定结果见表 3。

表 3 不同产地牻牛儿苗 4 种成分的含量($n=3$)

No.	没食子酸	原儿茶酸	柯里拉京	鞣花酸
1	1.347	0.604	12.76	3.173
2	0.732	0.623	11.80	2.828
3	0.583	0.235	8.628	2.526
4	0.451	0.235	6.206	2.124
5	0.557	0.152	9.497	2.592
6	0.278	0.103	0.634	1.437
7	0.582	0.299	5.535	2.900
8	0.372	0.112	2.143	1.803
9	0.229	0.363	0.439	2.761
10	0.266	0.024	2.187	0.834
11	0.156	0.050	0.876	0.521
12	0.205	0.030	1.892	0.792
13	0.974	0.102	7.213	3.204
14	0.620	0.051	5.198	1.571
15	1.090	0.137	11.86	3.204
16	0.644	0.116	3.120	2.496
17	0.126	0.027	0.571	0.336
18	0.366	0.107	4.419	2.331
19	0.420	0.296	1.298	0.393
20	0.807	0.497	10.67	1.966
21	1.343	0.641	10.63	3.741
22	0.767	0.058	2.137	1.919
23	0.530	0.048	0.963	1.039
24	0.383	0.027	0.763	1.015
25	1.402	0.237	6.366	2.697
26	0.670	0.806	11.41	2.520

3 讨论

3.1 对照品的配制 在对照品溶液的配制过程中, 发现鞣花酸在甲醇中微溶, 无法与其他 3 种待测对照品一起溶于甲醇中配成混合对照品溶液, 故把鞣花酸单独溶于二甲基亚砜中进行测定。

3.2 色谱条件的优化 本实验分别对 4 种待测成分对照品溶液在紫外 200 ~ 400 nm 进行扫描, 结果表明没食子酸在 272 nm 处有最大吸收, 原儿茶酸在 259 nm 处有最大吸收, 柯里拉京在 274 nm 处有最大吸收, 鞣花酸在 255 nm 处有最大吸收。综合考虑在 259 nm 条件下进行测定, 被测各成分均能得到较好的响应, 故确定 259 nm 为检测波长。同时在确定流动相系统时, 分别比较了不同梯度的甲醇-水、乙腈-水和甲醇-磷酸盐缓冲体系, 经多次试验, 最终确定了以甲醇-0.4% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱, 可使各待测成分得到理想的分离, 其中 0.4% 的磷酸可有效地抑制色谱峰的拖尾现象。

3.3 提取方法的选择 通过对提取方式(甲醇超声、乙醇热回流)的考察, 发现热回流提取所得待测成分的含量明显提高, 故采取乙醇加热回流的方法。在此基础上采用正交设计法 $L_9(3^4)$ 对乙醇加热回流的提取工艺进行了优化, 考察了提取溶剂量、提取时间和提取次数 3 因素的 3 个水平, 测定结果表明, 最佳提取方法为 30 倍 80% 的乙醇, 回流提取 3 次, 每次 1 h。

3.4 含量测定结果 本实验采用 RP-HPLC 测定了 26 个不同产地的牻牛儿苗药材中 4 种酚酸类成分的含量, 结果表明没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京和鞣花酸为不同产地牻牛儿苗药材的共有成分, 虽然不同产地牻牛儿苗中 4 种成分的含量差异较大, 但均以柯里拉京的含量最高, 鞣花酸次之, 而没食子酸和鞣花酸含量相对较低。

同时通过比较不同产地的成分含量与药材的生态环境可知, 辽宁大连所产样品的 4 种成分的含量相对最高, 黑龙江大庆所产样品的 4 种成分的含量相对最低, 结合采样地点发现大连地区多风、土壤干燥、日照充足及降水量小; 而大庆地区风少、土壤湿润、日照不足及降水量大。该分析结果可为药材的生态适宜条件的确定提供一定的试验数据。

参考文献

- [1] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 113.
- [2] 陈玉武, 李克明, 李药兰, 等. 牻牛儿苗化学成分研究 [J]. 中

- 草药,2007,38(8):1148.
- ④ 常连举,张宗和,黄嘉玲,等. 没食子酸的制备与应用综述
⑤. 生物化学工程,2010,44(4):48.
- ④ 杨洁,王世祥,兰薇,等. 冰片对原儿茶酸在家兔体内药动学的影响 ⑤. 中国中药杂志,2009,34(9):1141.
- ④ 陈一燕,陈崇红. 柯里拉京药理活性研究进展 ⑤. 中国现代应用药学,2010,27(5):390.
- ④ 杨洪亮,张翼口,王晓芳,等. 鞣花酸对肿瘤细胞增殖抑制和诱导凋亡作用的初步研究 ⑤. 赤峰学院学报,2010,26(10):49.

Simultaneous determination of four acids active compounds in *Erodium Stephanianum* by RP-HPLC

ZHAO Xiaoyu, YIN Haibo*

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a RP-HPLC method for the determination of four acids compounds including gallic acid, protocatechuic acid, corilagin and ellagic acid in *Erodium Stephanianum*. **Method:** The RP-HPLC separation was performed on an Agilent TC-C₁₈ analytical column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol (A)-water containing 0.4% H₃PO₄ (B) with gradient elution mode at the flow rate of 0.8 mL · min⁻¹. The detection wavelength was set at 259 nm, and the column temperature was 30 °C. **Result:** The liner ranges of gallic acid, protocatechuic acid, corilagin and ellagic acid were 0.059-2.360 g · L⁻¹ (r = 0.999 6), 0.017-0.672 g · L⁻¹ (r = 0.999 9), 0.351-14.040 g · L⁻¹ (r = 0.999 9), and 0.151-6.040 g · L⁻¹ (r = 0.999 8), respectively. The average recoveries (n = 3) were 99.45% (RSD 1.5%), 98.65% (RSD 1.7%), 100.3% (RSD 2.0%), and 98.90% (RSD 1.2%), respectively. **Conclusion:** The method is simple and accurate with a good reproducibility and can be used for quality control of *Erodium stephanianum*.

[Key words] *Erodium stephanianum*; gallic acid; protocatechuic acid; corilagin; ellagic acid; HPLC

doi: 10.4268/cjcmm20112216

责任编辑 丁广治

《中国当代医药》杂志征订启事

《中国当代医药》杂志是中华人民共和国卫生部主管,中国保健协会、当代创新(北京)医药科学研究院主办的医药卫生专业期刊,本刊已被万方数据数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊数据库全文收录,系中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。现为旬刊,国内刊号:CN11-5786/R,国际刊号:ISSN 1674-4721,邮发代号:2-515,定价:每期20元,通过本刊发行部订阅全年杂志优惠价为540元。

主要栏目: 研究进展、论著、短篇论著、临床研究、药理与毒理、药品鉴定、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、中医中药、护理研究、工作探讨、医护论坛等50多个栏目。根据全国继续医学教育委员会的《继续医学教育学分授予与管理办法》学分授予标准,在本刊发表的论文可获得国家级继续教育学分。

本刊出版周期短,来稿无论录用与否均在短期内告知作者。对省、部级以上部门立项的科研论文以及本刊订户的论文予以优先刊登。本刊订户凭订阅单复印件投稿,同等条件优先录用。欢迎各医药单位、院校、厂家刊登广告。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-602,邮编:100025

投稿热线:010

59679076 59679077,发行热线:010-59679533,传真:010-59679056

投稿邮箱:ddy@vip.163.com,网址:www.dangdaiyiyao.com。