

不同采收时期牻牛儿苗中 4 种酚酸类活性成分的动态分析

尹海波*, 赵晓雨, 涂秀文, 朱明慧, 姜海燕
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:**测定不同采收时期牻牛儿苗中活性成分没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京及鞣花酸的含量,为最佳采收期的确定提供依据。**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, 鞣花酸的线性范围分别为 0.492~4.920 g·L⁻¹ ($r=0.9993$), 0.497~4.970 g·L⁻¹ ($r=0.9997$), 0.995~9.950 g·L⁻¹ ($r=0.9998$), 0.989~9.890 g·L⁻¹ ($r=0.9997$); 平均回收率分别为 100.46% (RSD 2.1%), 99.78% (RSD 1.3%), 100.18% (RSD 1.0%), 100.21% (RSD 1.4%)。**结论:**牻牛儿苗中没食子酸及原儿茶酸的含量在五月末达到最大值, 柯里拉京及鞣花酸的含量在六月末达到最大值。4 种酚酸活性成分总量在六月末达到最高。

[关键词] 牻牛儿苗; 没食子酸; 原儿茶酸; 柯里拉京; 鞣花酸; 采收期

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0121-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130121

Dynamic Variation of 4 Active Component of Phenolic Acids in *Erodium stephanianum* from Different Collection Time

YIN Hai-bo*, ZHAO Xiao-yu, TU Xiu-wen, ZHU Ming-hui, JIANG Hai-yan

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

[Abstract] **Objective:** To determine the contents of the active components gallic acid, protocatechuic acid, corilagin and ellagic acid in *Erodium stephanianum* from different collection time and to define the best collection time for this herb. **Method:** The RP-HPLC method was applied and the 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 was set at 259 nm, and the column temperature was 30 ℃. **Result:** The liner ranges of gallic acid, protocatechuic acid, corilagin and ellagic acid were 0.492-4.920 g·L⁻¹ ($r=0.9993$), 0.497-4.970 g·L⁻¹ ($r=0.9997$), 0.995-9.950 g·L⁻¹ ($r=0.9998$), 0.989-9.890 g·L⁻¹ ($r=0.9997$), respectively. The average recoveries were 100.46% (RSD 2.1%), 99.78% (RSD 1.3%), 100.18% (RSD 1.0%), 100.21% (RSD 1.4%), respectively. **Conclusion:** The content of gallic acid and protocatechuic acid, in *E. stephanianum* increased to the maximum value in late May, the content of corilagin and ellagic acid increased to the maximum value in late June. Four acids active compounds increased to the maximum in late June.

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

[收稿日期] 20130626(001)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2009A498); 校杏林青蓝工程杰出青年基金项目(115065)

[通讯作者] *尹海波, 教授, 硕士研究生导师, 从事种质资源鉴定及中药的品质评价的研究, Tel: 15998530628, 0411-87586004, E-mail: yhb0528@sina.com

牻牛儿苗习称长嘴老鹳草^[1],为商品老鹳草的主流商品^[2]。牻牛儿苗的主要成分为鞣质、黄酮类、有机酸及挥发油等^[3],具有广谱抗菌、抗病毒及抗氧化等多种药理作用。在不同生长时期牻牛儿苗生药中各成分含量不同。李克明等^[4]曾采用 HPLC 法对不同采收月份牻牛儿苗中柯里拉京的含量进行了测定比较。李丰文等^[5]曾采用 HPLC 法对不同采收月份野老鹳草中没食子酸,鞣花酸的含量进行测定比较。上述实验研究由于选取的评价指标较少,因而无法全面评价药材的质量,所确定的最佳采收季节也具有一定的片面性。因此本文以没食子酸,原儿茶酸,柯里拉京,鞣花酸为指标,采用 HPLC 对不同采收月份牻牛儿苗中 4 种活性成分的含量进行测定,对全面评价药材的质量,确定最佳采收时期提供一定的实验依据。

1 仪器与试药

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),SPD-10A 型紫外检测器(日本岛津),CP225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

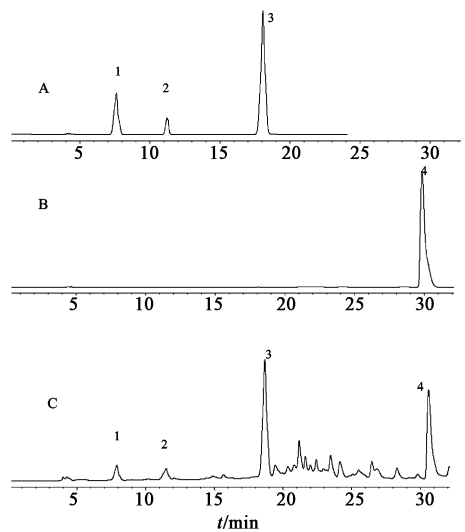
对照品:没食子酸(中国药品生物制品检定所,批号 110831-200302),原儿茶酸(中国药品生物制品检定所,批号 110809-200604),柯里拉京(上海融禾,批号 100526),鞣花酸(上海融禾,批号 091227)。甲醇和磷酸为色谱纯,水为重蒸水;其他均为分析纯。

牻牛儿苗样品由本院药用植物教研室尹海波教授鉴定为牻牛儿苗科牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd. 地上部分,凭证标本保存于本院药用植物教研室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[7] AgilentTC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相(A)甲醇-0.4% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱程序(0~15 min, 16%~35% A; 15~16 min, 35%~43% A; 16~31 min, 43%~53.5% A; 31~33 min, 53.5%~53.5% A),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 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,鞣花酸的分离度 > 1.5,拖尾因子在 0.95~1.05,分离度良好。见图 1。

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 10 mL 棕色量瓶中,制成每 1 mL 分别含没食子酸 0.492 mg、原儿茶酸 0.497 mg、柯里拉京 0.995 mg 的混合对照品溶液,摇匀,即得。另取鞣花酸适量,置于 10 mL 棕



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

色量瓶中,用二甲基亚砷定容至刻度,制成每 1 mL 含 0.989 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 1, 2, 4, 6, 8, 10 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),进行线性回归,结果表明,各组分在各自浓度范围内线性关系良好,线性方程、线性范围及相关系数见表 1。

表 1 牻牛儿苗中 4 种酚酸类成分的线性范围及线性关系

对照品	线性方程	线性范围/μg	r
没食子酸	$Y = 2\ 630.3X - 192.2$	0.492 ~ 4.920	0.999 3
原儿茶酸	$Y = 6\ 465.9X + 68.7$	0.497 ~ 4.970	0.999 7
柯里拉京	$Y = 5\ 256.2X + 220.8$	0.995 ~ 9.950	0.999 8
鞣花酸	$Y = 5\ 512.1X + 278.1$	0.989 ~ 9.890	0.999 7

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、鞣花酸峰面积的 RSD 分别为 2.1%, 2.5%, 1.7%, 1.3%。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,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

酸含量的 RSD 分别为 1.6%、2.4%、1.1%、2.3%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液，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、鞣花酸峰面积的 RSD 分别为 0.7%、2.1%、2.7%、1.5%。

2.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品(100518)共 6 份，分别精确加入一定量的没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸对照品，混匀后，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 牻牛儿苗中 4 种对照品加样回收率试验

对照品	称样量 /g	样品 中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
没食子酸	1.052 5	6.48	6.50	12.92	99.08	100.72	2.6
	1.038 2	6.40	6.50	13.15	103.85		
	1.046 3	6.45	6.50	13.12	102.62		
	1.021 5	6.19	6.50	12.47	96.62		
	0.998 7	6.15	6.50	12.71	100.92		
	1.061 2	6.51	6.50	13.09	101.23		
原儿茶酸	1.052 5	6.03	6.00	12.15	102.00	100.14	2.7
	1.038 2	5.90	6.00	11.78	98.00		
	1.046 3	6.06	6.00	12.23	102.83		
	1.021 5	6.07	6.00	11.95	98.00		
	0.998 7	6.00	6.00	11.82	97.00		
	1.061 2	6.04	6.00	12.22	103.00		
柯里拉京	1.052 5	11.81	12.00	23.56	97.92	100.70	2.0
	1.038 2	11.82	12.00	24.02	101.67		
	1.046 3	11.78	12.00	23.63	98.75		
	1.021 5	11.80	12.00	23.86	100.50		
	0.998 7	11.89	12.00	24.25	103.00		
	1.061 2	11.99	12.00	24.27	102.33		
鞣花酸	1.052 5	7.02	7.00	13.81	97.00	100.29	2.1
	1.038 2	7.05	7.00	13.94	98.43		
	1.046 3	7.06	7.00	14.13	101.00		
	1.021 5	6.92	7.00	14.07	102.14		
	0.998 7	6.95	7.00	14.11	102.29		
	1.061 2	6.98	7.00	14.04	100.86		

2.9 样品的测定 取 2010 年 5 月底至 10 月初于河北省沽源县采集的 10 批牻牛儿苗药材，经干燥、粉碎后，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 及图 2。

表 3 不同采收期牻牛儿苗 4 种成分的质量分数(n=6) %

批号	采集时间	没食子酸	原儿茶酸	柯里拉京	鞣花酸
1	2010-05-18	0.62	0.60	1.18	0.69
2	2010-06-03	0.45	0.47	1.01	0.69
3	2010-06-18	0.46	0.27	1.28	1.15
4	2010-07-03	0.28	0.10	1.00	0.73
5	2010-07-18	0.28	0.08	0.98	0.80
6	2010-08-03	0.21	0.06	0.62	0.72
7	2010-08-18	0.21	0.07	0.76	0.75
8	2010-09-03	0.26	0.09	0.74	0.78
9	2010-09-18	0.19	0.10	0.63	0.76
10	2010-10-03	0.16	0.06	0.34	0.53

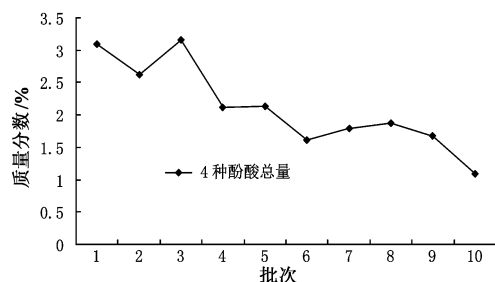


图 2 4 种酚酸总量在不同采收期的动态变化

3 讨论

3.1 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 处有最大吸收波长，原儿茶酸在 259 nm 处有最大吸收波长，柯里拉京在 274 nm 处有最大吸收波长，鞣花酸在 255 nm 处有最大吸收波长。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、甲醇-磷酸盐缓冲体系，经多次实验，最终确定了以甲醇-0.4% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱，可使得没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸达到基线分离，峰形好，保留时间相对适中，分离度较好，均 > 1.5，可作为该药材含量测定的检测方法。

3.2 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，发现热回流提取待测成分的含量明显提高，故采取乙醇加热回流的方法。通过采用正交设计法 $L_9(3^4)$ 对乙醇加热回流的提取工艺，进行优化，考察了提取溶剂量、提取时间

和提取次数的3个水平,测得结果表明,30倍80%乙醇热回流提取3次,每次1h为最佳提取方法。

3.3 含量测定结果 鞣质类成分为牻牛儿苗药材中的一类主要成分,其中最主要的为老鹳草素,可水解为其他鞣质和有机酸,本文所测的4种成分为其主要的水解产物,一定程度上代表了该药材的质量。没食子酸具有抗炎、抗肿瘤的作用,且毒性很低,可作为潜在的阻止肿瘤发生的化学预防剂^[8];原儿茶酸具有祛痰、平喘、解蛇毒、抗血小板凝集的作用^[9];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、抗炎等广泛的生物活性,具有很大的药用价值^[10];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^[11]。本文以4种成分为指标对老鹳草药材的主流品种牻牛儿苗中活性成分的动态变化进行了研究,对确定该药材的最佳采收期具有一定的指导意义。据实验结果可知,不同采收时期4种成分的含量均呈现一定的动态变化,但规律不一致;六月底的样品(从花期到果实近成熟期)中4种酚酸含量总和达到最大值,因此可确定从花期到果实近成熟期为该药材的最佳采收期,这与《中国药典》规定的采收时期相一致。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,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.
- [3] 金晴昊,崔京浩,郭建鹏. 老鹳草的研究进展[J]. 时珍国医国药,2005,16(9):840.
- [4] 李克明,张永文,陈玉武. 不同采收月份老鹳草生药中柯里拉京的含量比较[J]. 中成药,2004,26(10):819.
- [5] 李丰文,金欣,姚岚,等. 不同采收时期内野老鹳草中活性成分的动态变化研究[J]. 中药材,2010,33(10):1545.
- [6] 赵晓雨,尹海波. RP-HPLC同时测定牻牛儿苗中4种酚酸类活性成分含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(22):3137.
- [7] 吴雪钗,于波涛,侯艾林,等. 没食子酸稳定性研究[J]. 西南国防医药,2006,16(5):484.
- [8] 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[J]. 中国中药杂志,2009,34(9):1141.
- [9] 李昌勤. HPLC测定蜜柑草中柯里拉京的含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(16):1711.
- [10] 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[J]. 赤峰学院学报,2010,26(10):49.

[责任编辑 邹晓翠]

《中国医药导报》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国医药导报》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的国家级医药卫生类科技核心期刊,现为旬刊,国内统一刊号:CN11-5539/R,国际标准刊号 ISSN1673-7210,邮发代号:80-372,本刊系中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,并被万方数据、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中国期刊全文数据库、解放军医学图书馆中文生物医学期刊文献数据库、中文科技期刊数据库收录。每期定价20元,全年36期优惠价540元。

本刊设有专家论坛、研究进展、论著、临床研究、药理与毒理、中医中药、生物医药、病理分析、药品鉴定、制剂与技术、药物与临床、麻醉与镇痛、医学检验、影像与介入、护理研究、教学研究、药物经济学、科研管理、政策研究、医药监管等栏目,是广大医药科研、教育、临床等人员开阔视野、交流经验、增进学术交流的贴身参谋和得力助手,也是发表学术论文的园地。在本刊发表的论文可获得继续教育学分。本刊订户凭订阅单复印件投稿优先发表,来稿注明单位名称、地址、电话、联系人姓名。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-601 邮编:100025
投稿热线:010-59679061 59679063 发行热线:010-59679533
传真:010-59679056 投稿信箱:yyzx68@vip.163.com
网址:www.yiyadaobao.com.cn