HPLC 测定扶芳藤中原儿茶酸的含量

赵立春[1,2],刘琦[2,3],王佳菲[2,3],杨更亮[2,3*]
(1. 广西中医药大学附属瑞康医院,南宁 530011;
2. 河北省药物质量研究重点实验室,河北 保定 071002; 3. 河北大学药学院,河北 保定 071002)

[摘要] **目的:**建立扶芳藤药材中原儿茶酸的含量测定方法。**方法:**利用 HPLC 测定扶芳藤中原儿茶酸的含量,采用 Ulitimate XB-C_{18}(2)色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.6% 冰醋酸水溶液(27∶73),柱温室温,流速 0.7 mL·min^{-1},检测波长 260 nm,进样量 10 μL。**结果:**原儿茶酸的回归方程为 $A = 1.395 \times 10^7 C - 1.12 \times 10^4$ ($r = 0.999\ 9$)。原儿茶酸在 0.005 ~ 1 μg 呈良好的线性关系。原儿茶酸的平均回收率为 105.3%,RSD 1.52%。**结论:**采用此法测定扶芳藤中原儿茶酸的含量,准确可靠,可用于该药材的质量控制。

[关键词] 扶芳藤; 原儿茶酸; 高效液相色谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)16-0083-03
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160083

Determination of Protocatechuic Acid in Euonymus Fortunei with HPLC Method

ZHAO Li-chun[1,2], *LIU Qi*[2,3], *WANG Jia-fei*[2,3], *YANG Geng-liang*[2,3*]
(1. *Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning* 530011, *China*;
2. *Hebei Key Laboratory of Drug Quality Research*, *Baoding* 071002, *China*;
3. *College of Pharmacy*, *Hebei University*, *Baoding* 071002, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: The study aimed to establish a method to determine the content of protocatechuic acid in Euonymus Fortunei. **Method**: High performance liquid chromatography (HPLC) was used for the determination of protocatechuic acid in Euonymus Fortunei. This method was established on a Ulitimate XB-C_{18} (2) column with the mobile phase consisting of methanol-0.6% glacial acetic acid (27∶73) and the flow rate of 0.7 mL · min^{-1} at the room temperature, the detection wavelength was 260 nm. The injection volume was 10 μL. **Result**: The regression equation of protocatechuic acid was $A = 1.39 \times 10^7 C - 1.12 \times 10^4$, the correlation coefficient $r = 0.999\ 9$. The protocatechuic acid in the range of 0.005-1 μg displayed a good linear relationship. And the average recoveries of protocatechuic acid were 105.3%, RSD were 1.52%. **Conclusion**: The determination of the protocatechuic acid content in Euonymus Fortunei by this method is accurate and reliable, which can be used for quality control of the medicines.

[**Key words**] Euonymus Fortunei; protocatechuic acid; HPLC

扶芳藤系卫矛科植物,又名爬行卫矛,主要分布在我国山西、陕西、河南、山东、江苏、浙江、安徽、江西、湖南、湖北、广西、贵州、云南等地[1-2]。由于其自然分布广、适应性强等特点,各地引种栽培的范围逐渐扩大,许多地区植物志都有扶芳藤的记载[3-5]。本品始载于唐《本草拾遗》,明朝李时珍《本草纲目》

[收稿日期] 20131113(023)
[基金项目] 广西科技攻关重大专项计划项目(0201205-1-5)
[第一作者] 赵立春,博士,副研究员,从事药物分析及新药开发研究,Tel:0771-2335098,E-mail:37473690@qq.com
[通讯作者] * 杨更亮,教授,博士生导师,从事药物分析研究,Tel:0312-5971107,E-mail:hyzlc@126.com

将其称为“主治一切血，一切气，一切冷，大主风血腰脚，去百病。久服延年，变白不老”的佳品[6-7]。具有益气血、补肝肾、舒筋活络等功效，用于治疗气血虚弱、腰肌劳损、风湿痹痛、跌打骨折、创伤出血、咯血、月经不调等[8-12]。

扶芳藤主要含有卫矛醇、黄酮类、儿茶素类、三萜以及多糖等化学成分[13-16]。杨群英等[17]采用双波长薄层扫描法测定了扶芳藤风湿片中卫矛醇的含量；覃洁萍等[18]建立了高效液相色谱蒸发光散射(HPLC-ELSD)测定卫矛醇含量的方法；赖红芳等[19]运用微波技术提取扶芳藤中的多酚，用比色法测定多酚含量；辛华等[20]建立了柱前衍生化法将卫矛醇衍生化，然后用气相色谱法测定扶芳藤中卫矛醇的含量。

对于扶芳藤茎叶中酚酸类成分的报道[10]，仅有报道从扶芳藤藤茎的三氯甲烷提取物中分离得到原儿茶酸等酚酸类化合物[9]。本文采用高效液相色谱法对扶芳藤中原儿茶酸的含量进行了测定，为扶芳藤及其制剂的质量控制提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 FL2200 型高效液相色谱仪及紫外检测器(浙江福立分析仪器有限公司，FL9500 色谱工作站)，BT25S 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司)，FA2104B 型电子分析天平(上海佑科仪器有限公司)。

1.2 试药 原儿茶酸对照品(阿拉丁试剂有限公司，批号 40230)、扶芳藤样品(购自广西中医药大学附属瑞康医院)，甲醇(色谱纯，天津市康科德科技有限公司)，其他试剂均为分析纯。

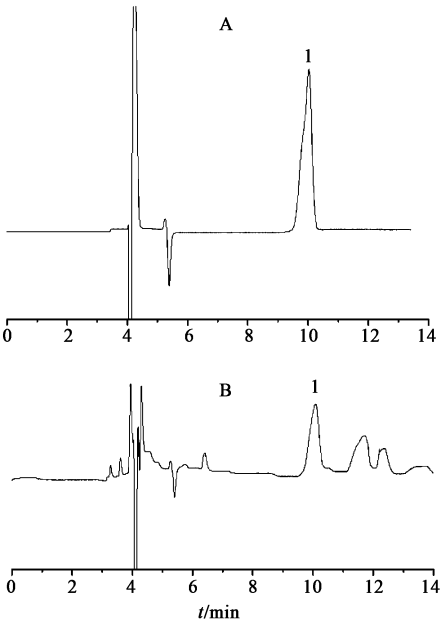
2 方法与结果

2.1 色谱条件 Ulitimate XB-C_{18}(2)色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，流动相甲醇-0.6% 冰醋酸水溶液(27∶73)，柱温室温，流速 0.7 mL·min^{-1}，检测波长 260 nm，进样量 10 μL。见图 1。

2.2 对照品溶液制备 精密称取原儿茶酸对照品适量，加甲醇制成 0.1 g·L^{-1}的原儿茶酸对照品储备液。精密量取 0.5 mL 置 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得 0.005 g·L^{-1}的原儿茶酸对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 精密称取扶芳藤粗粉 0.1 g，加 2 mL 甲醇，超声 40 min，离心，取上清液。将扶芳藤粗粉按以上步骤再超声提取 2 次，合并 3 次提取液置 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

2.4 标准曲线的制备 分别精密量取原儿茶酸对照品储备液 0.05，0.1，0.2，0.5，1，2，5，10 mL，置 10 mL量瓶中，加入甲醇至刻度。分别进样，测定峰面积。以质量浓度 C(g·L^{-1})为横坐标，峰面积 A 为纵坐标，得线性回归方程为 $A = 1.39 \times 10^7 C - 1.12 \times 10^4$ ($r = 0.999\ 9$)，表明本品在 0.005～1 μg 呈良好的线性关系。



1. 原儿茶酸

图 1 原儿茶酸对照品(A)和扶芳藤样品(B)的 HPLC

2.5 精密度试验 精密吸取原儿茶酸对照品溶液(0.005 g·L^{-1})10 μL，连续进样 6 次，按上述色谱条件测定原儿茶酸峰面积，RSD 1.7%，表明试验所用仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密称取扶芳藤粗粉 0.1 g，按 **2.3** 项下方法制备扶芳藤供试品溶液。在 0，2，4，6，8，12 h 分别进样，按上述色谱条件测定，原儿茶酸的平均质量分数为 0.190 mg·g^{-1}，RSD 1.6%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批次的扶芳藤样品 6 份，按 **2.3** 项下方法制备扶芳藤供试品溶液。按上述色谱条件测定，原儿茶酸的平均质量分数为 0.192 mg·g^{-1}，RSD 0.9%，表明样品的重复性良好。

2.8 加样回收率考察 精密称取已知含量的扶芳藤 0.1 g，共 9 份(相当于每份含样品量 10 mg)，分别精密加入 0.1 g·L^{-1}的原儿茶酸对照品溶液 140，200，260 μL(各 3 份)，摇匀，按 **2.3** 项下方法制备，进样测定。结果见表 1。

2.9 样品测定 精密称取扶芳藤粗粉 0.1 g，按 **2.3** 项下方法制备供试品溶液进样，按上述色谱条

表 1　扶芳藤中原儿茶酸的加样回收率

加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.001 40	0.003 40	107.0		
0.001 40	0.003 41	107.9		
0.001 40	0.003 38	106.4		
0.002 00	0.004 00	105.0		
0.002 00	0.004 01	105.7	105.3	1.5
0.002 00	0.003 99	104.3		
0.002 60	0.004 62	104.7		
0.002 60	0.004 58	102.9		
0.002 60	0.004 60	103.8		

注:称样量均为 0.1 g,样品中量均为 1.90 μg。

件测定,以外标法计算扶芳藤中原儿茶酸的质量分数为 0.190 $mg \cdot g^{-1}$。

3　讨论

实验中比较分析了不同甲醇-水(20∶80,25∶75,27∶73,30∶70,40∶60,50∶50)的分离效果。结果表明,随着流动相中甲醇体积分数的增加,原儿茶酸保留时间逐渐减少;当甲醇-水为(27∶73)时,原儿茶酸可以达到基线分离。加入冰醋酸后,其峰形得到改善,当冰醋酸在水溶液中的体积比超过 0.6% 后,对峰形基本不再产生影响。因此,最终确定以甲醇-0.6% 冰醋酸水溶液(27∶73)为流动相。

曾采用索氏提取和超声提取进行比较,发现超声提取,使有效成分提取充分,提取时间短,且能耗较低。因此采用超声提取方法。

采用甲醇、95% 乙醇、乙酸乙酯分别作为提取溶剂。测定结果显示,甲醇为溶剂时,测定结果最高,提取比较完全,故采用甲醇作为提取溶剂。

比较料液比为 1∶10,1∶20,1∶30,1∶40,1∶50 时,样品中原儿茶酸的峰面积。结果发现随着料液比的增大,原儿茶酸的峰面积呈先增大后减小的趋势。这有可能是因为在高料液比的条件下,原料药中其他物质在甲醇中的溶解度增加,溶入提取液中,使得原儿茶酸的浓度降低。因此,选择峰面积最大的 1∶20 较为合适。

考察了超声提取 10,20,30,40,50,60 min,测定样品中原儿茶酸的峰面积。结果发现 10 ~ 40 min 之间,随着超声提取时间的增加,原儿茶酸的峰面积增加,且增加明显;当时间达到 40 min 后,原儿茶酸的峰面积有所降低。表明超声时间为 40 min 时,原儿茶酸提取得比较完全,选择超声时间为 40 min 时较为合适。

采用高效液相色谱方法对扶芳藤中的原儿茶酸进行定量分析,对照品和供试品溶液中的原儿茶酸与其他组分得到基本分离,保留时间基本一致,样品制备简单,分离效果好。方法的线性范围及分析结果的精密度、准确度和回收率能够满足对原儿茶酸定量分析的要求。

[参考文献]

[1] 潘青华,宋婉,鲁韧强,等. 扶芳藤种质资源及变异研究[J]. 北京林业大学学报,2004,26(2):58.

[2] 叶勇,覃洁萍,李芸,等. 不同来源扶芳藤药材的 HPLC 指纹图谱比较[J]. 广西中医学院学报,2005,8(4):53.

[3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1999,45(3):9.

[4] 浙江药用植物志编写组. 浙江药用植物志[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1980:757.

[5] 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,1978:303.

[6] 辛华. 广西特产中药材扶芳藤的质量标准研究[D]. 南宁:广西中医学院,2005.

[7] 王建. 药用植物扶芳藤的组织培养[J]. 广西中医学院学报,2004,7(2):62.

[8] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社,1986:1180.

[9] 廖矛川,杨颖达,杨光忠,等. 扶芳藤芳香成分[J]. 中南民族大学学报:自然科学版,2009,28(4):51.

[10] 翟发林,丁青龙,张汉民. 扶芳藤化学成分研究[J]. 南京军医学院学报, 2001,23(4):221.

[11] 翟发林,丁青龙,张汉民. 扶芳藤化学成分研究(Ⅱ)[J]. 西南国防医药,2002,12(4):349.

[12] 王俊亮. 扶芳藤的药用价值[J]. 绿化与生活,2003(3):18.

[13] 唐人九,马广恩,闭宁基. 爬行卫矛化学成分的研究[J]. 华西药学杂志,1989,4(2):76.

[14] 李鹏,李航. 扶芳藤的三萜化合物研究[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(12):847.

[15] 赖红芳,吴志鸿. 微波提取扶芳藤多糖的工艺研究[J]. 中药材,2009,32(2):287.

[16] 侯宝龙,贾旭,巩江,等. 扶芳藤药学研究概况[J]. 安徽农业科学,2011,39(14):8383.

[17] 杨群英,傅强,张爱玢,等. 扶芳藤风湿片中卫矛醇的薄层扫描分析法[J]. 中成药,1996,18(3):13.

[18] 覃洁萍,姚荣,李芸,等. HPLC-ELSD 法测定扶芳藤中卫矛醇的含量[J]. 广西中西药,2008,31(4):58.

[19] 赖红芳,韦瑞松,黄秀香. 扶芳藤多酚的微波辅助提取和含量测定[J]. 河池学院学报,2008,28(5):109.

[20] 辛华,李建华,陈勇,等. 气相色谱法测定不同产地扶芳藤中卫矛醇含量[J]. 广西科学院学报,2006,22(S1):449.

[责任编辑　顾雪竹]