

## HPLC同时测定乌柏叶片中4种单宁的含量

李晓琼<sup>1</sup>, 曹辉庆<sup>2</sup>, 唐军<sup>3\*</sup>, 郭文锋<sup>2\*</sup>

(1. 广西大学林学院, 南宁 530004;

2. 广西壮族自治区农业科学院广西遗传改良与生物技术重点开放实验室, 南宁 530007;

3. 广西壮族自治区农业科学院生物技术研究所, 南宁 530007)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 同时测定乌柏叶片中 4 种单宁类物质(没食子酸、儿茶素、单宁酸、鞣花酸)含量的方法。方法:采用 ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 磷酸水-乙腈进行梯度洗脱, 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 25 °C, 检测波长 270 nm 下, 测定 5 个乌柏种群叶片中 4 种单宁类物质的含量。结果:没食子酸、儿茶素、单宁酸、鞣花酸分别在 0.001 ~ 0.048 ( $r = 0.997\ 1$ ), 0.005 ~ 0.238 ( $r = 0.999\ 7$ ), 0.004 ~ 0.191 ( $r = 0.999\ 2$ ), 0.002 ~ 0.095 g · L<sup>-1</sup> ( $r = 0.999\ 4$ ) 与色谱峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 97.4% (RSD 2.0%), 98.3% (RSD 1.7%), 98.7% (RSD 1.6%), 98.1% (RSD 1.7%)。5 个乌柏种群叶片提取液中, 没食子酸、儿茶素、单宁酸、鞣花酸的平均质量分数分别为 0.112, 3.380 7, 17.139 3, 1.354 7 g · L<sup>-1</sup>。结论:本研究提供了一种能在 30 min 内同时、快速、准确分析乌柏叶提取物中没食子酸、儿茶素、单宁酸、鞣花酸含量的方法, 缩短这 4 种单宁类物质的检测时间, 为其他富含单宁类物质的植物开发利用提供了试验基础。

**[关键词]** 单宁; 儿茶素; 鞣花酸; 没食子酸; 乌柏

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)10-0051-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015100051

### Simultaneous Determination of Four Tannins in Leaf Extracts of *Sapium sebiferum* by HPLC

LI Xiao-qiong<sup>1</sup>, CAO Hui-qing<sup>2</sup>, TANG Jun<sup>3\*</sup>, GUO Wen-feng<sup>2\*</sup> (1. The College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Lab, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 3. Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To established a simultaneously method to determine four kinds of tannins (gallic acid, catechin, tannic acid, ellagic acid) in leaf extracts of *Sapium sebiferum*. **Method:** Samples were detected on the ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), eluted with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid as mobile phase in a gradient mode. The procedure was at column temperature of 25 °C, detection wavelength of 270 nm and flow rate of 1 mL · min<sup>-1</sup>. Four tannins in leaf extracts of five *S. sebiferum* populations were then detected. **Result:** There were good linear relationships between the concentrations and the peak area of gallic acid, catechin, tannic acid, and ellagic acid in the ranges of 0.002-0.095 ( $r = 0.997\ 1$ ), 0.005-0.238 ( $r = 0.999\ 7$ ), 0.004-0.191 ( $r = 0.999\ 2$ ), 0.001-0.048 g · L<sup>-1</sup> ( $r = 0.999\ 4$ ), respectively. The average recoveries were 97.4% with RSD of 2.0%, 98.3% with RSD of 1.7%, 98.7% with RSD of 1.6%, and 98.1% with RSD of 1.7%, respectively. The mean concentrations of gallic acid, catechin, tannic acid, and ellagic acid in leaf extracts of five *S. sebiferum* populations were 0.112, 3.380 7, 17.139 3, 1.354 7 g · L<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** We found a simple, rapid and accurate method to simultaneously determine the

**[收稿日期]** 20140626(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(1360458, 31460115); 中国博士后基金项目(2014M552286); 广西农科院科技发展基金项目(2011JZ01); 广西自然科学基金项目(2011GXNSFB018053, 2012GXNSFBA053043)

**[第一作者]** 李晓琼, 博士, 讲师, 从事植物生理生化研究, Tel: 0771-3271428, E-mail: lixiaoqiong100@163.com

**[通讯作者]** \* 郭文锋, 博士, 副研究员, 从事植物生理生化研究, Tel: 0771-3279431, E-mail: wenfeng\_guo@126.com;

\* 唐军, 博士, 副研究员, 从事植物化学研究与开发, Tel: 0771-3279431, E-mail: tangjun0209@163.com

concentrations of gallic acid, catechin, tannic acid, and ellagic acid in *S. sebiferum* leaves extracts within 30 minutes, and may provide methodological basis to the exploration of other plant resources that are rich in tannins.

[Key words] tannin; catechin; ellagic acid; gallic acid; *Sapium sebiferum*

乌柏具有清热解毒、消积、利水通便等功效<sup>[1]</sup>。现代药理试验表明乌柏具有离体抑菌、消炎、降压、降胆固醇、抗单纯疱疹病毒及抗癌等<sup>[2-6]</sup>。和其他大戟属植物一样,乌柏叶片中含有大量的酚类物质,特别是单宁的含量很高。而单宁类物质具有抗菌消炎、清除自由基、降血压、抗病毒和抗氨基脲敏感性胺氧化酶等功效<sup>[3,5,7-8]</sup>,因此对该类成分在药材中进行研究开发十分必要。目前尚无乌柏药材的定量测定报道,而单宁类物质含量测定报道多为单一单宁成分 HPLC 测定或分光光度计法测定单宁酸的含量<sup>[9-10]</sup>,尚未有同时测定多种单宁成分含量的报道。本研究采用 HPLC 对乌柏中没食子酸、儿茶素、单宁酸和鞣花酸 4 种单宁含量进行同时测定,为乌柏叶资源的开发利用提供一种高效、快速的质量检测方法。

### 1 材料

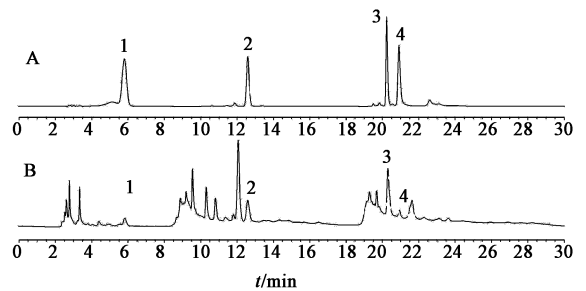
Ultimate3000 型高效液相色谱仪 (Dionex 公司),UV-1700 型紫外分光光度计(日本岛津)。

单宁酸(批号 1401-SS-4)购自中国林科院林产化工研究所,鞣花酸(批号 476-66-4)购自上海生工生物工程技术有限公司,没食子酸(批号 110831-201204)和儿茶素(批号 110877-201203)购自中国食品药品检定研究院。乙腈为色谱纯,水为纯净水(杭州娃哈哈),其他试剂均为分析纯。乌柏叶片分别采自湖南、湖北、广东、广西和浙江等省份,经郭文锋副教授鉴定为大戟科乌柏 *Sapium sebiferum* 的叶。乌柏叶片置于 80 °C 烘箱中烘干,粉碎,过 850 μm 筛后备用。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速 1 mL · min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,检测波长 270 nm,流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B, pH 2.15)进行梯度洗脱(0 ~ 5 min, 5% A; 5 ~ 6 min, 5% ~ 15% A; 6 ~ 15 min, 15% A; 15 ~ 25 min, 15% ~ 23A)。在此色谱条件下,4 种单宁类物质能很好地实现基线分离。见图 1。

**2.2 对照品溶液的制备** 精确称取没食子酸对照品 20 mg,乙腈溶解并定容至 10 mL,配置成 2 g · L<sup>-1</sup> 的没食子酸对照品溶液。精确称取鞣花酸 20 mg,用二甲亚砜溶解并定容至 10 mL,配置成 2 g · L<sup>-1</sup>



A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 没食子酸; 2. 儿茶素; 3. 单宁酸; 4. 鞣花酸

图 1 乌柏 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Sapium sebiferum*

的鞣花酸对照品溶液。精确称取单宁、儿茶素各 10 mg,乙腈溶解并定容至 10 mL,分别配制成 1 g · L<sup>-1</sup> 的单宁酸、儿茶素对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 准确称取乌柏粉末 100 mg,加甲醇-0.1% 磷酸(1:1)10 mL 浸泡 24 h,常温超声处理 1 h,离心(2 500 r · min<sup>-1</sup> 30 min),取上清液,过 0.45 μm 滤膜即得。

**2.4 线性关系考察** 分别取没食子酸、儿茶素、鞣花酸、单宁酸对照品溶液 1, 5, 0.5, 4 mL,配制成混合母液,将母液加乙腈分别稀释 1, 5, 10, 20, 50, 100 倍,混匀,在色谱条件下进样,进样体积 10 μL 测定。以对照品浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,得没食子酸、儿茶素、单宁酸、鞣花酸的标准曲线分别为  $Y = 67.896X + 0.9086 (r = 0.9971)$ ,  $Y = 61.241X + 0.0355 (r = 0.9997)$ ,  $Y = 70.455X + 0.7444 (r = 0.9991)$ ,  $Y = 30.853X + 2.2143 (r = 0.9993)$ ,分别在 0.002 ~ 0.09, 0.005 ~ 0.238, 0.004 ~ 0.191, 0.001 ~ 0.048 g · L<sup>-1</sup> 线性关系良好。

**2.5 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,测定,4 种单宁成分峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 1.5%, 1.4%, 1.6%,表明仪器精密度良好。

**2.6 重复性试验** 按照 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,进样 10 μL,测定,4 种单宁成分含量的 RSD 分别为 1.6%, 1.7%, 1.3%, 1.9%,表明本方法重复性良好。

**2.7 稳定性试验** 取同一份供试品溶液,分别在室温放置 0, 3, 6, 9, 12 h 后,测定,测得 4 种单宁成分

峰面积的 RSD 分别为 2.0% , 2.1% , 1.7% , 2.1% , 结果显示供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.8 加样回收率试验** 精密称定乌柏叶片样品 9 份,各 50 mg,分别加入没食子酸(10 mg·L<sup>-1</sup>),儿茶素(200 mg·L<sup>-1</sup>),单宁酸(2 g·L<sup>-1</sup>),鞣花酸(200 mg·L<sup>-1</sup>)对照品溶液各 0.25,0.5,0.75 mL,按 2.3 项下方法处理,在上述色谱条件下进样分析,计算加样回收率,结果 4 种成分回收率平均值分别为 97.4% ,98.3% ,98.7% ,98.1% ,见表 1。

表 1 乌柏叶片中 4 种单宁成分的加样回收率

Table 1 Recoveries of four tannins in *Sapium sebiferum*

| 成分   | 样品<br>中量<br>/mg | 加入量<br>/mg | 测得量<br>/mg | 回收率<br>/% | RSD<br>/% |
|------|-----------------|------------|------------|-----------|-----------|
| 没食子酸 | 0.005 32        | 0.002 50   | 0.007 76   | 97.6      | 2.0       |
|      | 0.005 42        | 0.002 50   | 0.007 93   | 100.4     |           |
|      | 0.005 34        | 0.002 50   | 0.007 80   | 98.4      |           |
|      | 0.005 31        | 0.005 00   | 0.010 14   | 96.6      |           |
|      | 0.005 36        | 0.005 00   | 0.010 16   | 96.0      |           |
|      | 0.005 40        | 0.005 00   | 0.010 18   | 95.6      |           |
|      | 0.005 47        | 0.007 50   | 0.012 91   | 99.2      |           |
|      | 0.005 38        | 0.007 50   | 0.012 54   | 95.5      |           |
|      | 0.005 29        | 0.007 50   | 0.012 80   | 100.1     |           |
| 儿茶素  | 0.097 1         | 0.050 0    | 0.147 3    | 100.4     | 1.7       |
|      | 0.096 0         | 0.050 0    | 0.145 7    | 99.4      |           |
|      | 0.096 7         | 0.050 0    | 0.145 2    | 97.0      |           |
|      | 0.096 2         | 0.100 0    | 0.196 3    | 100.1     |           |
|      | 0.096 8         | 0.100 0    | 0.194 5    | 97.7      |           |
|      | 0.096 4         | 0.100 0    | 0.192 9    | 96.5      |           |
|      | 0.096 5         | 0.150 0    | 0.241 7    | 96.8      |           |
|      | 0.096 9         | 0.150 0    | 0.245 0    | 98.7      |           |
|      | 0.091 7         | 0.150 0    | 0.242 8    | 100.7     |           |
| 单宁酸  | 0.982 5         | 0.500 0    | 1.474 6    | 98.4      | 1.6       |
|      | 0.984 3         | 0.500 0    | 1.472 2    | 97.6      |           |
|      | 0.983 2         | 0.500 0    | 1.487 1    | 100.8     |           |
|      | 0.984 4         | 1.000 0    | 1.989 5    | 100.5     |           |
|      | 0.982 8         | 1.000 0    | 1.955 6    | 97.3      |           |
|      | 0.983 7         | 1.000 0    | 1.944 8    | 96.1      |           |
|      | 0.984 0         | 1.500 0    | 2.481 0    | 99.8      |           |
|      | 0.983 0         | 1.500 0    | 2.466 4    | 98.9      |           |
|      | 0.983 6         | 1.500 0    | 2.448 6    | 97.7      |           |

续表 1

| 成分  | 样品<br>中量<br>/mg | 加入量<br>/mg | 测得量<br>/mg | 回收率<br>/% | RSD<br>/% |
|-----|-----------------|------------|------------|-----------|-----------|
| 鞣花酸 | 0.088 8         | 0.050 0    | 0.139 0    | 100.4     | 1.7       |
|     | 0.090 2         | 0.050 0    | 0.138 8    | 97.2      |           |
|     | 0.089 4         | 0.050 0    | 0.138 5    | 98.2      |           |
|     | 0.088 7         | 0.100 0    | 0.188 9    | 100.2     |           |
|     | 0.089 2         | 0.100 0    | 0.187 2    | 98.0      |           |
|     | 0.088 6         | 0.100 0    | 0.184 0    | 95.4      |           |
|     | 0.089 0         | 0.150 0    | 0.233 8    | 96.5      |           |
|     | 0.088 5         | 0.150 0    | 0.237 1    | 99.1      |           |
|     | 0.089 8         | 0.150 0    | 0.235 2    | 96.9      |           |

**2.9 样品含量测定** 取乌柏叶片样品,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,按照 2.1 项下色谱条件进样 10 μL 测定,测得样品中各单宁成分的含量,结果见表 2。

表 2 乌柏叶片样品中 4 种成分的含量测定

Table 2 Content of four tannins in *Sapium sebiferum* mg·g<sup>-1</sup>

| No. | 来源 | 没食子酸    | 儿茶素     | 单宁酸      | 鞣花酸     |
|-----|----|---------|---------|----------|---------|
| 1   | 湖南 | 0.163 3 | 2.993 3 | 15.346 7 | 1.496 7 |
| 2   | 湖北 | 0.143 3 | 3.666 7 | 16.860 0 | 0.566 7 |
| 3   | 广东 | 0.056 7 | 3.596 7 | 18.393 3 | 2.150 0 |
| 4   | 广西 | 0.126 7 | 2.690 0 | 19.626 7 | 1.090 0 |
| 5   | 浙江 | 0.070 0 | 3.956 7 | 15.470 0 | 1.470 0 |

### 3 讨论

单宁类化合物一般是采用水或者有机溶剂提取<sup>[11-13]</sup>,本试验选用甲醇-0.1% 磷酸水(1:1)混合溶液常温浸泡结合超声波处理,能高效地将乌柏叶片中各单宁类物质提取出来。

流动相的选择对物质的分离、峰形及出峰时间起到关键性作用<sup>[14-15]</sup>。流动相 B 一般选用甲醇或者乙腈作为参比溶剂。经过前期预试验比较发现,乙腈的分离效果较甲醇更好,所以本试验流动相选用了乙腈,添加乙二胺调节流动相 pH,可同时改善峰型<sup>[16-17]</sup>。由于样品的成分较为复杂,等梯度洗脱无法达到良好的分离效果,根据没食子酸、儿茶素、单宁酸、鞣花酸 4 种物质极性不同,本试验采用上述的梯度洗脱,尽可能地增大目标峰与杂质峰的分度,以达到最佳分离效果。

乌柏叶片中 4 种单宁类物质含量差异较大,经过比较发现,乌柏叶中大量存在的是单宁酸,而没食子酸、鞣花酸及儿茶素的含量相对较少。4 种单宁

类物质在不同地理种群乌柏叶片中含量差异也较大,没食子酸、儿茶素、单宁酸、鞣花酸的含量分别介于 0.057 ~ 0.16, 2.69 ~ 3.96, 15.35 ~ 19.63, 0.567 ~ 2.15 mg·g<sup>-1</sup>,这可能与不同地区的土壤环境、日照长短等因素有关。

[参考文献]

[1] Kane C M, Menna J, Yeh Y C. Methyl gallate, methyl-3, 4, 5-trihydroxy-benzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virusin *in vitro* I purification and characterization of methyl gallate from *Sapium sebiferum* [J]. Bioscience Rep, 1988, 8(1): 85-94.

[2] Chaudhary H J, Zeb A, Bano A, et al. Antimicrobial activities of *Sapium sebiferum* L. belonging to family Euphorbiaceae [J]. J Med Plant Res, 2011, 5(24): 5916-5919.

[3] Fu R, Zhang Y T, Guo Y R, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the phenolic extracts of *Sapium sebiferum* (L.) Roxb. leaves [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(2):517-524.

[4] Joshi P, Priya B, Gahlot M. Anti-oxidant, antibacterial and phytochemical studies of leaves extract of *Sapium sebiferum* [J]. Int J Chem Sci, 2012, 10(4): 1805-1814.

[5] Huang B, Huang Z, Xu X, et al. Analgesic and anti-inflammatory effect of extract of *Sapium sebiferum* leaves on animal model [J]. Chin Tradit Pat Med, 2004, 26(6):476-479.

[6] Ishimaru K, Arakawa H, Neera S. Medicinal and aromatic plants. 28[M]. Berlin Heidelberg:Springer, 1994:426-444.

[7] Koshimizu K, Ohigashi H, Tokuda H, et al. Screening

of edible plants against possible anti-tumor promoting activity [J]. Cancer Lett, 1988, 39(3):247-257.

[8] Wen L, Wang Y, Lu D, et al. Preparation of KF/CaO nanocatalyst and its application in biodiesel production from Chinese tallow seed oil [J]. Fuel, 2010, 89(9): 2267-2271.

[9] 成春喜, 耿芹. HPLC法测定从五倍子提取的单宁酸中焦性没食子酸的含量 [J]. 化学与生物工程, 2007, 24(4):23-24.

[10] 耿娜娜, 李学英, 顾丁, 等. Folin-Denis 分光光度法测定五倍子中单宁酸的含量 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(19):11848-11850,11915.

[11] He Y, Wu Q, Hansen SH, et al. Differentiation of tannin-containing herbal drugs by HPLC fingerprints [J]. Die Pharmazie, 2013, 68(3):155-159.

[12] 武予清, 郭予元. 棉花植株中的单宁测定方法研究 [J]. 应用生态学报, 2000, 11(2):243-245.

[13] 钱彩虹, 吴谋成. 植物单宁制备方法研究进展 [J]. 现代农业科学, 2009, 16(3):54-56.

[14] 郭志谋, 张秀莉, 徐青, 等. 亲水作用色谱固定相及其在中药分离中的应用 [J]. 色谱, 2009, 27(5): 675-681.

[15] 赵景婵, 郭治安, 常建华, 等. 有机酸类化合物的反相高效液相色谱法的分离条件研究 [J]. 色谱, 2001, 19(3):260-263.

[16] 李敬慈, 丁天惠. 乙二胺改善硅胶柱高效液相色谱法分离和测定糖 [J]. 分析化学, 1994, 22(9): 869-872.

[17] Yang H, Thyron FC. Determination of six pharmaceuticals and their degradation products in reversed-phase high performance liquid chromatography by using amine additives [J]. J Liq Chromatog R T, 1998, 21(9):1347-1357.

[责任编辑 顾雪竹]