

石胆草药材质量控制分析

曲琰¹, 徐保利^{2*}

(1. 辽宁中医药大学杏林学院, 沈阳 110167; 2. 中国人民解放军第210医院, 辽宁大连 116021)

[摘要] 目的:利用高效液相色谱法建立测定石胆草中丁香酸、香草酸和阿魏酸含量的方法。方法:利用高效液相色谱法对石胆草中丁香酸、香草酸和阿魏酸含量进行。色谱条件:Agilent TC₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),柱温40℃,流动相乙腈(A)-0.02%磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~22 min,10%~13% A;22~30 min,13% A),流速1 mL·min⁻¹,检测波长290 nm。结果:香草酸在0.092~0.46 μg呈良好的线性关系($r=0.9997$),平均回收率98.47%,RSD 1.7% ($n=6$);丁香酸在0.092~0.46 μg呈良好的线性关系($r=0.9996$),平均回收率为98.07%,RSD 1.9% ($n=6$);阿魏酸在0.0736~0.368 μg呈良好的线性关系($r=0.9995$),平均回收率为98.58%,RSD 1.4% ($n=6$);6个批次石胆草药材中香草酸、丁香酸及阿魏酸的质量分数分别为0.265,0.159,0.085 mg·g⁻¹。结论:该研究表明所建的高效液相色谱法可以对石胆草中的香草酸、丁香酸及阿魏酸进行检测,方法简便,专属性强,方法可靠,可作为石胆草药材的定量控制方法。

[关键词] 石胆草; 香草酸; 丁香酸; 阿魏酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0071-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160071

Quality Control Method for *Corallodiscus flabeilatus* by HPLC

QU Yan¹, XU Bao-li^{2*}

(1. College of Xinglin, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110167, China;
2. 210th Hospital of PLA, Dalian 116021, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of the contents of vanillic acid, syringic acid, and ferulic acid in the *Corallodiscus flabeilatus*. **Method:** The contents of vanillic acid, syringic acid, and ferulic acid were detected under the following conditions: Agilent TC₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, with acetonitrile (A) -0.2% phosphoric acid solution (B) as the mobile phase for gradient elution (0-22 min, 10%-13% A; 22-30 min, 13% A). The detection wavelength was 290 nm. The column temperature was 40℃, and flow rate was 1 mL·min⁻¹. **Result:** Vanillic acid showed a good linear relationship within the range of 0.092-0.46 μg ($r=0.9997$), with an average recovery of 98.47% and RSD of 1.7% ($n=6$). Syringic acid showed a good linear relationship within the range of 0.092-0.46 μg ($r=0.9996$), with an average recovery of 98.07% and RSD of 1.9% ($n=6$). Ferulic acid showed a good linear relationship within the range of 0.0736-0.368 μg ($r=0.9995$), with an average recovery of 98.58% and RSD of 1.4% ($n=6$). The results showed the content was 0.265 mg·g⁻¹ for vanillic acid, 0.159 mg·g⁻¹ for syringic acid and 0.085 mg·g⁻¹ for ferulic acid in tested 6 batches of *C. flabeilatus*. **Conclusion:** The study showed that the HPLC method could detect the contents of vanillic acid, syringic acid, and ferulic acid in *C. flabeilatus*. This method is simple, highly specific, and reliable, which can be used for the quantitative control of *C. flabeilatus*.

[Key words] *Corallodiscus flabeilatus*; vanillic acid; syringic acid; ferulic acid

[收稿日期] 20160325(017)

[第一作者] 曲琰, 硕士, 讲师, 从事中药炮制研究, Tel:13840018157, 024-31679920, E-mail:quyan821107@126.com

[通讯作者] * 徐保利, 博士, 副研究员, 从事中药质量控制研究, Tel:0411-3984710039847094, E-mail:xubaoli1981@hotmail.com

石胆草又名石莲花、镇心草、石花、牛耳草,以全草入药。石胆草多分布于云南、广西、湖北、河南等地,主要用于清热除湿、解毒消肿、散瘀止血等^[1]。石胆草中含有苯乙醇苷^[2-3]、黄酮碳苷类^[4]、木质素类和酚酸类等成分^[5-6]。笔者在对石胆草进行药效学考察发现,石胆草可以减轻二甲苯引起的小鼠耳肿胀、减少热板实验时小鼠的舔足次数及潜伏时间,说明石胆草具有较好的抗炎解热镇痛作用。植物中的各种酚酸成分具有显著的药理学活性,如抗肿瘤、抗炎、抗病毒、免疫调节、抗凝血、清除自由基作用等已被越来越多人所重视^[7-8]。随着中药现代化发展的不断深入,对中药材质量控制的研究要求更加精确,最理想的分析方法是在简便操作的同时又能检测到尽可能多的化合物,从而提供更多的样品信息。石胆草指纹图谱及苯乙醇苷类含量测定已有文献报道^[9-10],但其酚酸类的含量测定方法并不多,因此本实验通过优化色谱条件,建立了同时测定石胆草中香草酸、丁香酸及阿魏酸^[6]含量的方法,为更好的开发石胆草这一质量资源提供理论依据。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(紫外检测器, Agilent),XB120A 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),KQ-3000 型超声波清洗器(江苏昆山超声仪器有限公司)。

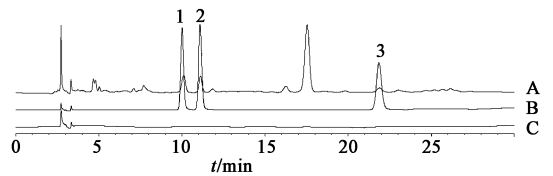
石胆草药材购于亳州药材市场,经第 210 医院徐保利副研究员鉴定为苦苣苔科植物石胆草 *Corallodiscus flabeilatus* 的全草。对照品香草酸(批号 151116),丁香酸(批号 151020)和阿魏酸(批号 151203),均购于成都普菲德生物技术有限公司,经归一化法检测纯度 $\geq 98\%$ 。检测用磷酸、甲醇、乙腈、三氟乙酸,所用试剂均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 40 °C,流动相乙腈(A)-0.02% 磷酸(B)溶液,梯度洗脱(0 ~ 22 min, 10% ~ 13% A; 22 ~ 30 min, 13% A),流速 1 mL · min⁻¹,检测波长 290 nm。典型 HPLC 色谱见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 取对照品适量,精密称定,加甲醇制成含香草酸、丁香酸、阿魏酸 46, 46, 36.8 mg · L⁻¹ 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 称取石胆草粉末(过 60 目筛)1 g,精密称定,精密加入 80% 甲醇超声提取 3 次(50, 40, 40 mL),每次 20 min,过滤,合并提取液,过滤,精密量取续滤液 50 mL,置蒸发皿中蒸干,残



1. 香草酸; 2. 丁香酸; 3. 阿魏酸

图 1 石胆草供试品(A)、混合对照品(B)及空白溶剂对照(C)典型 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Corallodiscus flabeilatus* (A), reference substance (B) and negative control (C)

渣加 80% 甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇定容,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液,制备香草酸、丁香酸质量浓度为 9.2, 18.4, 27.6, 36.8, 46 mg · L⁻¹, 阿魏酸 7.36, 14.72, 22.08, 29.44, 36.8 mg · L⁻¹ 的系列对照品溶液,分别注入液相色谱仪测定,以对照品进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,得回归方程香草酸 $Y = 106.29X - 65.21$ ($r = 0.9997$),丁香酸 $Y = 131.9X - 78.7$ ($r = 0.9996$),阿魏酸 $Y = 92.578X - 33.23$ ($r = 0.9995$)。结果表明香草酸、丁香酸、阿魏酸分别在 0.092 ~ 0.46, 0.092 ~ 0.46, 0.073 6 ~ 0.368 μg 峰面积与进样量有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取香草酸、丁香酸及阿魏酸对照品溶液及同一供试品溶液 10 μL,重复进样 6 次,测定峰面积,结果香草酸、丁香酸及阿魏酸对照品峰面积 RSD 分别为 0.8%, 2.8%, 1.5%; 供试品峰面积 RSD 分别为 1.5%, 1.7%, 2.8%。表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,每 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测定,结果显示 10 h 内供试品溶液中香草酸、丁香酸及阿魏酸峰面积 RSD 分别为 1.6%, 0.8%, 1.1%。表明稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批样品,称取 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,测得香草酸、丁香酸及阿魏酸质量分数分别为 1.195, 0.544, 0.357 g · L⁻¹, RSD 分别为 1.4%, 1.8%, 1.7%, 表明重复性好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的石胆草各 6 份,每份 0.5 g,精密称定,分别加入适量的对照品溶液,按上述方法测定,计算回收率,结果见表 1。

2.9 耐用性试验 分别选用不同的色谱条件测试对照品溶液和供试品溶液,考察方法在测试条件有较小波动时的耐用程度。耐用性测试条件,检测波长在原色谱条件波长 290 nm 基础上变更 ± 5 nm,即

表 1 石胆草中 3 种成分的加样回收率试验

Table 1 Recovery rate of *Corallodiscus flabeilatus*

成分	称样量 /g	样品中量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
香草酸	0.501 2	0.130	0.130	0.258	98.5	98.5	1.7
	0.500 4	0.130	0.130	0.261	100.8		
	0.503 4	0.131	0.130	0.257	96.9		
	0.498 8	0.130	0.130	0.256	96.9		
	0.501 5	0.130	0.130	0.261	100.85		
	0.502 1	0.131	0.130	0.257	96.9		
丁香酸	0.501 2	0.080	0.080	0.158	97.5	99.0	1.8
	0.500 4	0.080	0.080	0.161	101.3		
	0.503 4	0.081	0.080	0.159	97.5		
	0.498 8	0.080	0.080	0.160	100.0		
	0.501 5	0.080	0.080	0.161	101.3		
	0.502 1	0.080	0.080	0.158	97.5		
阿魏酸	0.501 2	0.040	0.040	0.079	97.5	98.6	1.4
	0.500 4	0.040	0.040	0.079	97.5		
	0.503 4	0.040	0.040	0.080	100.0		
	0.498 8	0.040	0.040	0.080	100.0		
	0.501 5	0.040	0.040	0.079	97.5		
	0.502 1	0.040	0.040	0.080	100.0		

表 3 石胆草中酚酸类含量测定方法耐用性测试

Table 3 Results of durability test for phenolic acid in *Corallodiscus flabeilatus*

条件	香草酸		丁香酸		阿魏酸		总量 /mg·g ⁻¹	总含量差值 /%
	出峰时间 /min	质量分数 /mg·g ⁻¹	出峰时间 /min	质量分数 /mg·g ⁻¹	出峰时间 /min	质量分数 /mg·g ⁻¹		
规定方法	10.10	0.267	11.10	0.162	21.90	0.088	0.517	-
295 nm	10.22	0.265	11.30	0.169	22.41	0.091	0.525	1.55
285 nm	10.09	0.263	10.90	0.160	21.52	0.085	0.508	1.74
流速 0.8 mL·min ⁻¹	13.89	0.312	15.21	0.181	24.89	0.111	0.604	16.83
流速 1.2 mL·min ⁻¹	7.62	0.245	8.01	0.145	17.82	0.082	0.472	8.70
色谱柱 1	10.11	0.264	11.12	0.161	21.72	0.085	0.510	1.35
色谱柱 2	9.98	0.266	11.01	0.164	21.85	0.086	0.516	0.19
梯度 1	12.09	0.301	13.98	0.165	26.08	0.082	0.548	6.00
梯度 2	8.01	0.231	9.07	0.158	18.91	0.095	0.484	6.38

3 讨论

检测波长的确定,利用紫外检测器对 3 种酚酸的混合对照品溶液进行全波长扫描,在 290 nm 处出现最大吸收,且从 HPLC 色谱可以看出在 290 nm 条件下色谱峰信息完整,锋利度较好,基线平稳,干扰最少,故选择 290 nm 为检测波长。

色谱条件的优化,参考相关文献,酚酸类成分检测主要采用乙腈-0.1% 乙酸水^[11]、乙腈-0.05% 三氟乙酸^[12]、甲醇-0.2% 磷酸水^[13] 流动相系统。本实验在参考以上文献的基础上,对甲醇-磷酸水溶液、乙

腈-磷酸水溶液和乙腈-三氟乙酸水溶液等流动相体系进行了考察,最终以乙腈-0.2% 磷酸水溶液作为流动相时,分析时间较短,基线平稳,峰形较好,分离度较佳。在较短时间内实现了石胆草中香草酸、丁香酸和阿魏酸的快速分离。

表 2 流动相条件变更

Table 2 Change of mobile phase

原色谱梯度		耐用性色谱梯度-1		耐用性色谱梯度-2	
时间 /min	溶液 B 比例/%	时间 /min	溶液 B 比例/%	时间 /min	溶液 B 比例/%
0	90	0	92	0	88
22	87	25	89	25	85
30	87	60	89	60	85

2.10 样品含量测定 取不同产地及批次的石胆草药材,并对其中的香草酸、丁香酸及阿魏酸进行含量测定,结果见表 4。

腈-磷酸水溶液和乙腈-三氟乙酸水溶液等流动相体系进行了考察,最终以乙腈-0.2% 磷酸水溶液作为流动相时,分析时间较短,基线平稳,峰形较好,分离度较佳。在较短时间内实现了石胆草中香草酸、丁香酸和阿魏酸的快速分离。

耐用性系指在测定条件有小的变动时,测定结果不受影响的承受程度,为使方法用于常规检验提供依据而越来越多的应用于中药及复方的检测中^[14-16]。本实验在主峰拖尾因子 < 2.0,主峰与杂质峰必须达到基线分离的前提下(分离度 > 1.5),

表 4 不同产地及批次 3 种成分质量分数测定

Table 4 Analysis results of *Corallodiscus flabeilatus* from different regions and batches

产地	批号	香草酸	丁香酸	阿魏酸
贵州	20151002	0.267	0.162	0.088
	20150914	0.262	0.159	0.091
安徽	151102	0.270	0.164	0.078
	151023	0.265	0.170	0.092
	151012	0.260	0.140	0.085
云南	20151011	0.266	0.161	0.078

分别考察在 (290 ± 5) nm, 流速 (1.0 ± 0.2) mL · min⁻¹, 流动相配比变化 ± 2% 及不同品牌色谱柱, 测定同一供试品溶液含量, 结果表明波长、色谱柱对测定结果无显著影响; 流速、流动相比比例在某一节点上对样品测定结果有一定影响, 在含量测定时应注意这两因素。

本实验采用 HPLC 法建立了同时测定石胆草中香草酸、丁香酸和阿魏酸含量的方法, 并进行了方法学及耐用性试验的验证。结果显示所建方法使待测成分不受干扰, 测定的结果可以反映石胆草酚酸类成分的特征。所建检测方法简便、稳定, 可用于石胆草药材的质量控制。

[参考文献]

[1] 朱成兰, 张庆芝, 郑丽云. 石胆草的生药学研究[J]. 云南中医中药杂志, 2005, 26(1): 34-35.

[2] 郑晓珂, 李军, 冯卫生. 石胆草的苯乙醇苷类成分研究[J]. 中草药, 2002, 33(10): 881-883.

[3] 郑晓珂, 李军, 冯卫生, 等. 石胆草中苯乙醇苷的分离与结构鉴定[J]. 药学学报, 2003, 38(2): 116-119.

[4] 冯卫生, 郑晓珂, 刘云宝, 等. 石胆草中黄酮苷的分离与结构鉴定[J]. 药学学报, 2004, 39(2): 110-115.

[5] 姚尧, 吴春艳, 郝倩, 等. 石胆草化学成分的研究[J]. 昆明理工大学学报: 自然科学版, 2012, 37(5): 64-68.

[6] 郑晓珂, 李军, 冯卫生, 等. 石胆草化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 926-928.

[7] 林焯, 陈静. 常用民族药植物中酚酸类化合物的提取、纯化及生物活性研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2014, 9(9): 39-41.

[8] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 253-255.

[9] 郑晓珂, 魏悦, 冯卫生. 河南产石胆草 HPLC 指纹图谱研究[C]. 北京: 第六届中国药学会学术年会, 2006.

[10] 王彦志, 刘媛媛, 郑晓珂, 等. RP-HPLC 同时测定石胆草中 4 中主要成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(19): 1517-1520.

[11] 严贵亮, 段建荣. HPLC 法测定川芎-当归要对中酚酸类成分的含量[J]. 中国药师, 2015, 18(10): 1718-1720.

[12] 程巧鹭, 郭增喜, 陈碧莲. RP-HPLC 法同时测定香丹注射液中 5-羟甲基糠醛和酚酸类成分的含量[J]. 医药导报, 2015, 3(1): 95-98.

[13] 王飞, 包永睿, 孟宪生, 等. 不同产地余甘子酚酸类成分 HPLC 指纹图谱研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(4): 31-33.

[14] 田明, 李伟, 孙宏宇, 等. 高效液相色谱测定条件的耐用性试验研究[J]. 中医药学报, 2010, 38(3): 77-80.

[15] 徐小飞, 潘雪峰, 张慧晔, 等. 一测多评法同时测定板蓝根中 4 种核苷及 (R,S)-告依春[J]. 中成药, 2014, 36(7): 1444-1449.

[16] 祁秀玲, 于永军, 王晓琦, 等. 香黄通便胶囊中木香烃内脂、去木香烃内脂含量测定的研究[J]. 中医药导报, 2014, 11(12): 95-98.

[责任编辑 顾雪竹]