

HPLC 测定不同产地砂仁中原儿茶酸和香草酸的含量

邹晓红, 刘梦楚, 蓝伦礼, 曹骋, 江滨, 曾元儿*
(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定砂仁中原儿茶酸和香草酸的含量,并对不同产地砂仁的原儿茶酸和香草酸含量进行比较。**方法:**采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以甲醇-0.1% 甲酸水为统计相进行梯度洗脱,柱温 35 ℃,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样体积 15 μL,检测波长 260 nm。**结果:**原儿茶酸在 0.000 7 ~ 0.008 9 g·L⁻¹ 呈良好的线性关系,平均回收率 100.4% (RSD 3.2%);香草酸在 0.000 6 ~ 0.030 3 g·L⁻¹ 呈良好的线性关系,平均回收率 99.3% (RSD 2.8%)。对 24 批不同产地砂仁样品的原儿茶酸及香草酸含量测定结果进行聚类分析,结果显示不同产地砂仁样品分为两大类,一类为阳春砂与绿壳砂,另一类为进口壳砂仁、艳山姜伪品及加工方式为生晒的云南产阳春砂。**结论:**该方法简便、准确、重复性好,可用于不同产地砂仁中原儿茶酸和香草酸含量测定,为鉴别不同产地的砂仁样品提供参考。砂仁中香草酸含量受其加工方式影响含量变化明显。

[关键词] 不同产地;砂仁;原儿茶酸;香草酸;聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0062-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080062

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170214.0845.018.html>

[网络出版时间] 2017-02-14 8:45

Simultaneous Determination of Protocatechuic Acid and Vanillic Acid in Amomi Fructus by HPLC

ZOU Xiao-hong, LIU Meng-chu, LAN Lun-li, CAO Cheng, JIANG Bin, ZENG Yuan-er*

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To determinate the contents of protocatechuic acid and vanillic acid in Amomi Fructus by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and compare the contents of protocatechuic acid and vanillic acid in Amomi Fructus from different regions. **Method:** The determination was performed on Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with methanol-0.1% formic acid solution as mobile phase for gradient elution, and the wavelength was set at 260 nm. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹; column temperature was 35 ℃ and injection volume was 15 μL. **Result:** Protocatechuic acid showed good linearity in the range of 0.000 7-0.008 9 g·L⁻¹, and the average recovery was 100.4% (RSD 3.2%). Vanillic acid showed good linearity in the range of 0.000 6-0.030 3 g·L⁻¹, and the average recovery was 99.3% (RSD 2.8%). The 24 batches of Amomi Fructus samples were divided into two main groups by clustering analysis. One was *Amomum villosum* and *A. villosum* var. *xanthioides*. The other was the imported Amomi Fructus, *Alpinia zerumbet* and *A. villosum* from Yunnan that directly dried without fire curing. **Conclusion:** The established method is simple, accurate, and with good repeatability, which can be used to determine the contents of protocatechuic acid and vanillic acid in Amomi Fructus from different regions, providing reference to distinguishing the samples from different regions. In addition,

[收稿日期] 20160720(009)

[基金项目] 云南省教育厅南药研究协同创新中心专项(2011)

[第一作者] 邹晓红,在读硕士,从事中药质量评价与研究开发, Tel:18825147721, E-mail:1070742833@qq.com

[通讯作者] *曾元儿,博士,教授,从事中药及其制剂质量标准研究, E-mail:zengyuaner@163.com

the content of vanillic acid in Amomi Fructus was affected significantly by the drying method.

[Key words] different regions; Amomi Fructus; procatechuic acid; vanillic acid; clustering analysis

砂仁具有化湿开胃,温脾止泻,理气安胎的功效^[1]。砂仁的主要药效成分包括乙酸龙脑酯、樟脑、柠檬烯、龙脑等挥发性成分^[2-3]。除了含有大量的挥发性成分外,其还包括酚类、黄酮类、多糖、无机物等多种非挥发性成分^[3-5]。砂仁化学成分研究主要集中于挥发油部分,对其他非挥发性成分研究程度不足,相关的质量评价标准尚未建立^[3,4]。尚建华等^[6]认为砂仁非挥发性成分具有非常显著的药理活性;砂仁水提物具有较强的抗氧化、抑菌、抗炎等作用^[7-8]。研究表明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、清除自由基作用等,并且被越来越多人所重视^[9-10]。其中原儿茶酸具有抗菌、抗氧化、介导肿瘤细胞凋亡等作用^[11-13]。香草酸有抗细菌和抗真菌作用,体外显示还具抗炎活性^[14-15]。砂仁的研究中,对香草酸及原儿茶酸的研究较少,其含量测定方法亦未见文献报道。为了更全面地评价砂仁的质量以及充分开发利用砂仁药材资源,有必要对原儿茶酸和香草酸进行探讨研究,建立相对全面的含量测定方法,为非挥发性成分的深入研究提供基础。本文拟建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定砂仁中原儿茶酸和香草酸含量的方法,比较两者在不同产地的砂仁中的含量差异,为砂仁的鉴别及全面质量评价提供参考。

1 材料

L20A 型高效液相系统(CTO-10AS 型柱温箱, DGU-20A5 型高压四元泵带真空脱气机, SPD-M20A 型二极管阵列紫外检测器, LC-solution 色谱工作站, 日本岛津公司), Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), AEG-200 型分析天平(日本 Shimadzu 公司), BP211D 型 1/10 万电子天平(瑞士 Sartorius 公司)。

原儿茶酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110809-201205), 香草酸对照品(成都普菲德生物技术有限公司, 批号 151116), 纯度均 > 98%。本实验用砂仁样品, 1~7 号砂仁样品分别在广东省阳春县、广西长桥村以及云南种植基地或种植户获得, 其余在广州市清平路、广西大同巷及爱店口岸、浦寨口岸和云南螺蛳湾等大型中药材市场采购, 来源及批号详细信息见表 1。所有砂仁样品由广州中医药大学中药鉴定教研室黄海波副教授与广州中医药大学高明副教授鉴定其品种分别为姜科植物阳春

砂 *Amomum villosum*, 绿壳砂 *A. villosum* var. *xanthioides* 或海南砂 *A. longiligulare* 的干燥成熟果实, 其加工方式根据其有无烟熏味判断, 若有烟熏味则认为火焙加工, 若无则一律记为生晒加工。色谱甲醇(德国 Merck 公司), 分析纯甲醇, 超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~25 min, 5%~15% B; 25~50 min, 15%~40% B; 50~60 min, 40%~90% B), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 进样量 15 μL, 柱温 35 °C, 检测波长 260 nm。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取原儿茶酸和香草酸对照品, 加适量甲醇溶解并定容至刻度, 配制原儿茶酸和香草酸质量浓度分别为 0.024 6, 0.060 6 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 砂仁样品(带壳)捣碎, 取本品粗粉约 2 g, 精密称定, 至 150 mL 圆底烧瓶中, 精密加入 20% 甲醇 70 mL, 称定质量, 水浴加热回流提取 60 min, 放冷后称定质量, 用 20% 甲醇补足减失的质量, 滤过。取续滤液 30 mL, 用石油醚 15 mL 脱脂, 取下层溶液, 蒸干, 以 20% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 制得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取 2.2 项下原儿茶酸对照品溶液 0.15, 0.3, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.5 mL, 香草酸对照品溶液 0.05, 0.3, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.5 mL, 对应混合并稀释定容至 5 mL, 配制成不同质量浓度的混合对照品溶液。分别注入液相色谱仪, 按 2.1 项下色谱条件进行分析测定, 以原儿茶酸或香草酸的进样质量浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归分析, 得原儿茶酸回归方程为 $Y = 9.0 \times 10^7 X - 18\ 917$ ($r = 0.999\ 6$); 香草酸回归方程为 $Y = 6.0 \times 10^7 X - 3\ 655.9$ ($r = 0.999\ 6$)。结果表明, 原儿茶酸在 0.000 7~0.008 9 g·L⁻¹, 香草酸在 0.000 6~0.030 3 g·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.4.2 专属性考察 取原儿茶酸、香草酸混合对照品溶液和云南金平县马鞍底砂仁供试品溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 各成分分离度良好,

表 1 24 批砂仁样品的来源信息

Table 1 Source information of 24 batches Amomi Fructus

No.	来源	采购日期	加工方式	鉴定结果
1	云南金平县黄牛克	2015-09-15	生晒	阳春砂 (<i>Amomum villosum</i>)
2	云南金平县马鞍底	2015-09-16	火焙	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
3	云南勐腊尚勇南浪村	2015-09-06	火焙	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
4	云南金平县大寨	2015-09-17	生晒	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
5	云南勐腊县尚勇	2015-08-01	生晒	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
6	云南勐腊县勐伴镇	2015-08-02	生晒	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
7	云南勐腊县补蚌村	2015-08-03	火焙	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
8	云南瑞丽	2015-08-04	火焙	进口砂仁 (<i>Amomum</i> sp.)
9	云南(小包)	2014-11-01	火焙	进口砂仁 (<i>Amomum</i> sp.)
10	云南蒙自	2016-03-29	生晒	绿壳砂 (<i>A. villosum</i> var. <i>xanthioides</i>)
11	云南	2015-11-03	生晒	艳山姜 (<i>Alpinia zerumbet</i>)
12	广东阳春市永宁镇高寨村沙坪	2015-08-15	生晒	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
13	广东阳春市春城蟠龙金花坑	2015-08-28	火焙	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
14	广东阳春市春湾镇大垌村三坑	2015-08-14	生晒	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
15	广西长桥村	2014	生晒	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
16	广西龙城	2014-07-22	生晒	进口砂仁 (<i>Amomum</i> sp.)
17	广西大同巷	2015-07-24	生晒	进口砂仁 (<i>Amomum</i> sp.)
18	老挝(春砂仁)	2015-08-26	火焙	阳春砂 (<i>A. villosum</i>)
19	老挝(绿壳砂)	2015-08-25	火焙	绿壳砂 (<i>A. villosum</i> var. <i>xanthioides</i>)
20	老挝(砂仁)	2015-07-27	生晒	伪品砂仁 (<i>Amomum</i> sp.)
21	越南(埔寨口岸)	2015-08-16	生晒	伪品砂仁 (<i>Amomum</i> sp.)
22	缅甸	2015-06-15	生晒	进口砂仁 (<i>Amomum</i> sp.)
23	广西(海南砂仁)	2015-07-25	生晒	进口砂仁 (<i>Amomum</i> sp.)
24	广西(艳山姜)	2015-07-26	生晒	艳山姜 (<i>A. zerumbet</i>)

混合对照品和砂仁供试品色谱见图 1。

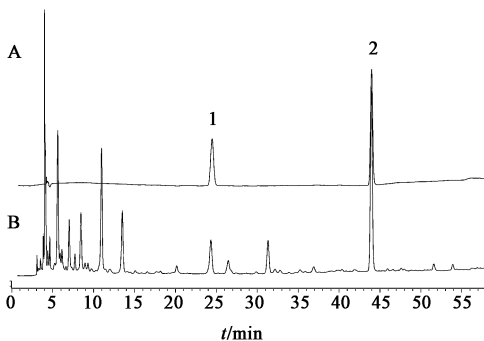


图 1 混合对照品 (A) 及金平县马鞍底砂仁供试品 (B) 的 HPLC
Fig. 1 HPLC of standard substance (A) and Amomi Fructus sample (B)

2.4.3 精密度试验 取同一份对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图。结果原儿茶酸和香草酸的峰面积 RSD 分别为 1.2%, 0.4%,表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份砂仁供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,分别于制备后 0,2,4,6,8,

12,24 h 进样分析,记录色谱图,结果原儿茶酸和香草酸的峰面积 RSD 分别为 2.9%,1.7%,表明供试品溶液中的 2 个待测成分在 24 h 内稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批砂仁药材(云南金平县马鞍底),分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,结果原儿茶酸和香草酸的平均质量分数分别为 0.039 0,0.233 0 mg·g⁻¹,RSD 分别为 3.7%,2.4%,表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 取已知含量的同一批砂仁样品(云南金平县马鞍底)1 g,平行 6 份,精密称定,置圆底烧瓶中,每份精密加入新配制的原儿茶酸对照品溶液(0.107 0 g·L⁻¹)0.5 mL,香草酸对照品溶液(0.148 8 g·L⁻¹)1.5 mL,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进行分析,计算加样回收率。结果原儿茶酸和香草酸的平均加样回收率分别为 100.4%,99.3%,RSD 分别为 3.2%,2.8%。见表 2。

表 2 砂仁中原儿茶酸和香草酸的加样回收率试验

Table 2 Results of recovery test of protocatechuic acid and vanillic acid

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/%
原儿茶酸	1.001 6	0.039 1	0.053 5	0.093 3	101.3	100.4	3.2
	1.001 0	0.039 0	0.053 5	0.090 3	95.9		
	1.000 6	0.039 0	0.053 5	0.094 3	103.2		
	1.000 3	0.039 0	0.053 5	0.091 3	97.8		
	1.000 4	0.039 0	0.053 5	0.094 9	104.5		
	1.004 3	0.039 2	0.053 5	0.092 7	100.0		
香草酸	1.001 6	0.233 4	0.223 2	0.454 2	98.9	99.3	2.8
	1.001 0	0.233 2	0.223 2	0.465 2	103.9		
	1.000 6	0.233 1	0.223 2	0.452 6	98.3		
	1.000 3	0.233 1	0.223 2	0.458 4	101.0		
	1.000 4	0.233 1	0.223 2	0.447 6	96.1		
	1.004 3	0.234 0	0.223 2	0.452 3	97.8		

2.5 含量测定 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 对 24 批不同产地的砂仁样品按 2.1 项下色谱条件

进行测定, 各批砂仁中原儿茶酸和香草酸含量见表 3。

表 3 24 批砂仁中原儿茶酸和香草酸含量测定

Table 3 Determination results of protocatechuic acid and vanillic acid of 24 batches Amomi Fructus

mg · g⁻¹

No.	原儿茶酸	香草酸	No.	原儿茶酸	香草酸
1	0.047 6	0.087 9	13	0.040 5	0.156 6
2	0.039 0	0.233 0	14	0.018 4	0.127 4
3	0.015 5	0.191 3	15	0.072 0	0.029 5
4	0.044 6	0.084 0	16	0.036 6	0.062 0
5	0.055 0	0.027 4	17	0.052 8	0.033 0
6	0.032 9	0.011 5	18	0.023 9	0.111 5
7	0.069 2	0.176 7	19	0.031 4	0.285 2
8	0.030 0	0.069 2	20	0.052 7	0.091 4
9	0.029 1	0.061 7	21	0.041 2	0.075 1
10	0.032 9	0.292 0	22	0.042 1	0.066 0
11	0.042 5	0.014 6	23	0.019 6	0.040 0
12	0.015 7	0.188 7	24	0.038 2	0.014 0

2.6 不同产地砂仁中原儿茶酸及香草酸含量聚类分析 使用 IBM SPSS Statistics 20 的质心聚类法对不同产地的砂仁样品原儿茶酸及香草酸含量测定结果进行系统聚类, 采用平方欧氏距离 (squared Euclidean distance) 获得聚类分析结果, 见图 2。

由图 2 可知, 通过对原儿茶酸及香草酸含量测定结果进行聚类分析, 结果显示不同产地的砂仁样品可分为两大类, 第一类共有 9 批样品, 为阳春砂与绿壳砂, 来源分别为广东阳春、云南金平县马鞍底、云南勐腊尚勇南浪村、云南勐腊县补蚌村、老挝 (春砂仁) 和云南蒙自、老挝 (绿壳砂)。其余样品聚为第二类, 共 15 批, 分别为进口的壳砂仁、艳山姜伪品及加工方式为生晒的云南产阳春砂。

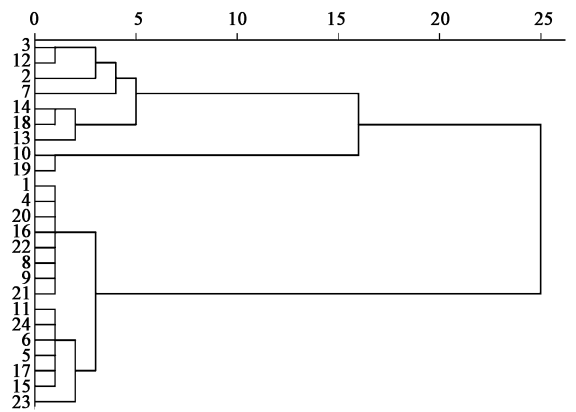


图 2 24 批不同产地砂仁中原儿茶酸及香草酸含量的聚类分析树状关系

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of protocatechuic acid and vanillic acid in 24 batches Amomi Fructus

3 结果

本实验建立了 HPLC 同时测定砂仁中原儿茶酸和香草酸含量的方法,方法学考察表明精密度、重复性、稳定性和加样回收试验均符合标准,可用于砂仁样品的提取、分离、纯化工艺研究中对原儿茶酸和香草酸的含量测定。利用所建立的方法对 24 批不同产地的砂仁样品进行含量测定,并对含量测定结果进行聚类分析,结果表明可以把阳春砂、绿壳砂和非药典收载的进口壳砂仁、艳山姜伪品区分开来。同时结果显示,1~7 号云南产砂仁中,产地相近,但生晒的样品(1,4,5,6 号)的香草酸的含量远远低于火焙的样品(2,3,7 号)。

本实验可为鉴别不同产地的砂仁提供参考,从非挥发性成分入手对砂仁的质量评价提供依据,为砂仁非挥发性成分的深入研究提供依据,建立相对全面的含量测定方法,以建立确实合理的砂仁药材全面质量控制方法。本实验揭示了砂仁样品的加工方式对某些化学成分的含量影响明显,提示应对砂仁药材的加工方式进行规范,以减少流通市场砂仁样品质量参差不齐的情况。

4 讨论

实验过程中对供试品溶液的制备方法进行了考察,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,结果显示溶剂用量为 70 mL,提取 1 次,时间为 60 min 时的提取效率最大。故本实验选用了 20% 甲醇作为提取溶剂,水浴回流 60 min,溶剂用量为 70 mL,提取 1 次作为供试品溶液的制备方法。

砂仁共有 3 种基源,收载于 2015 年版《中国药典》一部,分别为阳春砂、绿壳砂与海南砂。2015 年版《中国药典》标准中对挥发油及乙酸龙脑酯含量进行了相关规定。有研究者认为挥发油因其组成和性质都不稳定,作为定量标准不够完善^[6];乙酸龙脑酯结构明确,含量较高,且具有与功效主治相关的药理活性,可作为砂仁质量标准评价的指标;而砂仁非挥发性成分具有非常显著的与药性一致的药理活性,有待于进一步研究。

严娅娟等^[16]发现在砂仁的研究中,学者们对含量较低的化学成分研究较少,有关药理活性的作用部位和物质基础不甚明确^[16]。研究表明,原儿茶酸和香草酸与砂仁具有相类似的药理活性,都具有抗氧化、抑菌等作用,原儿茶酸和香草酸是否作为砂仁药材的药效物质基础未能明确,值得进一步探讨研究。由于挥发油和乙酸龙脑酯并不能完全代表砂仁药材产生功效的物质基础,因此需要进一步追踪研

究非挥发性成分中的活性物质,为砂仁药材的进一步开发和资源的充分利用提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:253.
- [2] 徐开宇,邢学锋,许文学,等. 砂仁的化学成分及相关药理作用研究的新进展[J]. 中国中医药现代远程教育,2014,12(15):100-101.
- [3] 陆山红,赵荣华,么晨,等. 砂仁的化学及药理研究进展[J]. 中药药理与临床,2016,32(1):227-230.
- [4] 刘梦楚,邹晓红,蓝伦礼,等. 基于电子鼻及顶空-气质联用技术结合化学计量学区分不同产地的砂仁[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(6):35-42.
- [5] 陈程,付琛,叶文才,等. 阳春砂仁的酚性成分研究[J]. 中药材,2012,35(4):571-573.
- [6] 尚建华,苏敏,苏梅,等. 砂仁中各部位的药效学研究[J]. 中草药,2006,37(增刊):36-38.
- [7] GUO D J, CHENG H L, CHAN S W, et al. Antioxidative activities and the total phenolic contents of tonic Chinese medicinal herbs [J]. Inflammopharmacology, 2008, 16(5):201-207.
- [8] 唐建阳,刘凤娇,苏明星,等. 砂仁提取物的抗菌及抗氧化效应研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2012,51(4):789-792.
- [9] 曲琰,徐保利. 石胆草药材质量控制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(16):71-74.
- [10] 王晓梅,王小青,王新玲,等. 新疆鼠尾草总酚酸的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):162-165.
- [11] 张宏宁,安春娜,徐曼,等. 原儿茶酸抗 PC12 细胞氧化损伤作用[J]. 中国新药杂志,2014,23(3):347-350.
- [12] GUAN S, BAO Y M, JIANG B, et al. Protective effect of protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* on hydrogen peroxide-induced oxidative PC12 cell death[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 538(1/3):73-79.
- [13] Tseng T H, Hsu J D, Lo M H, et al. Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin[J]. Cancer Lett, 1998, 126(2):199-207.
- [14] 杜怡昊,刘建华,李计龙,等. 川楝子中香草酸含量测定研究[J]. 天然产物研究与开发,2011,23(6):1103-1106.
- [15] 陈章宝. 掌叶蝎子草药理活性及作用机制研究[D]. 重庆:西南大学,2012.
- [16] 严娅娟,曹曼,张丹雁,等. 砂仁现代药理的国内外研究[J]. 轻工科技,2013(7):52-53.

[责任编辑 顾雪竹]