

维药刺山柑果实中香草酸和原儿茶酸的含量测定

王响华¹, 陈文^{2*}, 郭小娜²
(1. 哈密红星医院药剂科, 新疆 哈密 839000;
2. 新疆石河子大学药学院, 新疆 石河子 832000)

[摘要] 目的:建立同时测定刺山柑果实中香草酸和原儿茶酸含量的高效液相色谱法。方法:采用 Dikma Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水梯度洗脱, 紫外检测波长 258 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹。结果:刺山柑果实中香草酸和原儿茶酸分别在 0.001 50~0.009 00, 0.005 80~0.034 8 μg 呈良好的线性关系, ($r=0.999\ 9$); 平均加样回收率 ($n=3$) 分别为 105% (RSD 1.90%) 103% (RSD=1.81%)。结论:该方法操作简单、结果可靠、重复性好、定量准确, 可用于刺山柑果实中原儿茶酸和香草酸的含量测定。

[关键词] 高效液相色谱法; 刺山柑; 香草酸; 原儿茶酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)23-0071-03

Determination of Vanillic Acid and Protocatechuic Acid
in *Capparis spinosa* by HPLC

WANG Xiang-hua¹, CHEN Wen^{2*}, GUO Xiao-na²
(1. Pharmacy of Hongxing Hospital, Hami 839000, China; 2. Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] Objective: To establish a HPLC method for simultaneous determination of vanillic acid and protocatechuic acid in *Capparis spinosa*. Method: The samples were separated on a C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), the mobile phase was consisted of methanol-0.1% phosphoric acid with gradient elution at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 258 nm. Result: The calibration curves for vanillic acid and protocatechuic acid were linear in the range of 0.001 50-0.009 00, 0.005 80-0.034 8 μg respectively. All the correlation coefficient were 0.999 9, and the average recoveries ($n=3$) were 105% and 103% with corresponding RSDs of 1.90% and 1.81% respectively. Conclusion: The method is simple, accurate and sensitive and can be used to determine the content of the vanillic acid and protocatechuic acid in *C. spinosa*.

[Key words] *Capparis spinosa*; HPLC; vanillic acid; protocatechuic acid

刺山柑果实为白花菜科山柑属植物的果实, 又称野西瓜、槌果藤等, 其性温, 具有祛风、消肿、止痛等作用^[1]。是维药部颁标准的常用维吾尔药材, 民间主要用于抗风湿痛风病^[10]等。其化学成分主要

生物碱、酚酸类、黄酮类、挥发油、脂肪族类芥子油苷等^[2-3], 具有抗应激、抗损伤、抗肿瘤、抗氧化、降血脂、抗炎止痛等药理作用^[4-9]。前期的研究表明酚酸类成分是其主要的有效部位^[11], 维药部颁标准中无有效成分的含量测定。本实验建立了同时测定刺山柑果实中原儿茶酸及香草酸含量的高效液相色谱方法, 为刺山柑果实药材及后续制剂的质量控制标准提供依据。

1 仪器及试剂

高效液相色谱仪 (配有 LC-20AT 泵, SPD-M20A 检测器, CBM-20A 控制器, SIL-20A 自动进样器, CTO-10AS 柱温箱日本岛津公司), KQ-250DB 数控

[收稿日期] 20120507(014)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目 (2012BAI30B00); 石河子大学科学技术研究发展计划课题 (ZRKX2009YB21)

[第一作者] 王响华, 本科, 副主任药师, E-mail: 642329608@qq.com

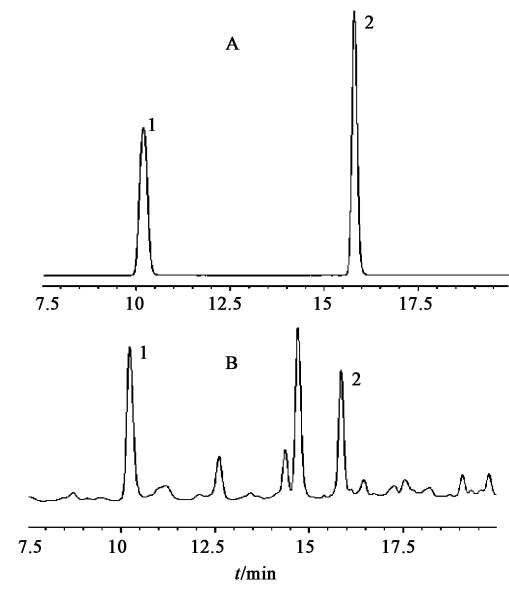
[通讯作者] * 陈文, 教授, 从事药物制剂与新剂型研究, Tel: 13179930326, E-mail: chen-wen2000@126.com

超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司), Sartorius BP211D 十万分之一分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),艾柯超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司),微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂),高速离心机(上海冠戈实业有限公司)。

刺山柑果实(干果购于乌鲁木齐,产于阿克苏,经石河子大学成玉怀教授鉴定为刺山柑果实 *Capparis spinosa* L.);原儿茶酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110809-200604);香草酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110776-200402);甲醇为色谱纯,磷酸、乙醇及其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 固定相:Dikma Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1%磷酸水梯度洗脱(0~40 min,甲醇 20%~100%),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30℃,检测波长 258 nm,进样量 10 μL。依上述色谱条件,吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL 分别进样,在对照品溶液和供试品溶液色谱峰具有相同保留时间,见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 原儿茶酸;2. 香草酸
图 1 香草酸与原儿茶酸的 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 精密称取香草酸对照品 1.87 mg 及原儿茶酸对照品 2.90 mg 置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得到质量浓度分别为 75.0,116 mg·L⁻¹的对照品贮备液。

2.3 供试品溶液的制备 称取刺山柑果实粉末

25.0 g,加入 70% 的乙醇 200 mL 浸润,80℃水浴回流提取 3 次,每次 30 min。合并 3 次提取液,过滤、浓缩至 100 mL 以内,并用盐酸调节 pH 3。将浓缩液置于分液漏斗中,加入与药液等体积乙醚振摇萃取,取醚层并低温将其挥干,残渣用流动相溶解置 25 mL 离心(10 000 r·min⁻¹, 5 min)取上清液即得供试品溶液,微孔滤膜过滤,备用。

2.4 线性关系考察 精密量取 2.2 项下香草酸对照品贮备液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL 及原儿茶酸对照品贮备液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,流动相定容,摇匀,制得混合对照品溶液,取 10 μL 进样,按照上述色谱条件测定。以峰面积(Y)为纵坐标,对照品浓度(X)为横坐标,绘制标准曲线。结果表明香草酸及原儿茶酸分别在 0.001 50~0.009 00, 0.005 80~0.034 8mg 线性关系良好,相应的回归方程及相关系数分别为 $Y = 4.70 \times 10^4 X + 0.075 \times 10^4$ ($r = 0.9999$); $Y = 4.98 \times 10^4 X + 0.022 \times 10^4$ ($r = 0.9999$)。

2.5 精密度试验 精密量取香草酸、原儿茶酸混合对照品溶液(香草酸质量浓度为 75 mg·L⁻¹,原儿茶酸质量浓度为 116 mg·L⁻¹)重复进样 5 次,每次进样 10 μL,以峰面积计算 RSD,其中香草酸及原儿茶酸的相对标准偏差(RSD)分别为 0.240%, 0.210%。

2.6 重复性试验 按照 2.3 项下方法制备 5 份供试品溶液,分别进样 10 μL,依照上述选择的色谱条件测定,结果香草酸的平均含量为 22.0 μg·g⁻¹其 RSD 0.950%,原儿茶酸的平均含量为 13.4 μg·g⁻¹其 RSD 1.73%。

2.7 稳定性试验 按照供试品溶液的制备方法制备各供试品溶液。在室温分别放置 0, 2, 4, 6, 12 h 后进样 10 μL 依照上述选择的色谱条件测定,结果香草酸含量的 RSD 1.94%,原儿茶酸含量的 RSD 1.32%。

2.8 加样回收率试验 称取刺山柑果实粉末 25.0 g 用 70% 的乙醇 200 mL 浸润,加入精密称定的混合对照品(设低、中、高浓度),提取。精密量取提取液,放入小烧杯中甲醇超声溶解,转移置 10 mL 量瓶中并定容摇匀,离心(10 000 r·min⁻¹, 5 min)之后取上清液,进样 3 次每次 10 μL,依照上述选择的色谱条件测定。结果见表 1。

2.9 样品含量测定 按 2.3 项下供试品溶液的制备方法制备 5 份供试品溶液,依照上述选择的色谱条件,进样 10 μL,结果见表 2。

表 1 香草酸及原儿茶酸加样回收率 (n=3)

成分	平均	样品中	加入量	平均	加样	平均加样	RSD
	称样量	平均含量		测得量	回收率	回收率	
	/g	/μg	/μg	/μg	/%	/%	/%
香草酸	25.0	57.5	46.1	107	105	105	1.90
			46.2	107	106		
			46.1	106	104		
			57.1	118	106		
			57.0	119	108		
			57.1	117	104		
			69.2	129	102		
			69.2	128	102		
			69.1	130	106		
原儿茶酸	25.0	33.6	26.9	60.8	101	103	1.81
			26.9	61.0	101		
			26.8	60.7	101		
			33.5	68.8	105		
			33.4	69.0	106		
			33.7	68.6	104		
			40.4	75.0	103		
			40.5	74.9	102		
			40.3	74.5	102		

表 2 样品中 2 种成分的含量测定 μg·g⁻¹

批号	香草酸	原儿茶酸
20110303	23.9	13.7
20110312	22.9	13.5
20110318	23.0	13.5
20110326	22.7	13.3
20110410	22.6	13.3

3 小结与讨论

多次试验结果表明,在等梯度的情况下,只用甲醇和水溶液做流动相同时测定原儿茶酸及香草酸,难以使两者达到较好检测水平。流动相加入磷酸后,发现原儿茶酸和香草酸分离的选择性提高了。根据实验中色谱峰的出峰规律,最终将甲醇-磷酸水-0.1% H₃PO₄(梯度洗脱)作为定量检测用的流动相条件。

[参考文献]

[1] 刘勇民. 维吾尔药志. 下册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技出版社,1999;868.

[2] Özcan M, Äkgl A. Influence of species, harvest date and size on composition of capers (*Capparis spinosa* L.) flower buds [J]. Nahrung, 1998, 42: 102.

[3] 甘永祥,陈文,王新春,等. 刺山柑果实的化学成分[J]. 石河子大学学报:自然科学版, 2009, 27 (3): 334.

[4] Trombetta D, Occhiuto F, Perri D. Antiallergic and Antihistaminic effect of two extracts of *Capparis spinosa* L. flowering buds [J]. Phytother Research. 2005, 19 (1): 29.

[5] Arslan R, Bektas N, Ozturk Y. Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice [J]. Ethnopharmacology, 2008, 131: 28.

[6] Matsuyama M O Villareal K, El Omri J Han A, Isoda H. Effect of tunisian *Capparis spinosa* L. extract on melanogenesis in b16 murine melanoma cells [J]. Nat Med. 2009, 63;468.

[7] T Kulisic-bilusic, Ivica Blažević, Branka dejanović, et al. Evaluation of the antioxidant activity of essential oils from Caper (*Capparis spinosa* L.) and sea fennel (*Crithmum maritimum*) by different methods [J]. Food Biochemistry. 2010, 34: 286.

[8] M Eddouks, A Lemhadri, J B Michel. Hypolipidemic activity of aqueous extract of *Capparis spinosa* L. in normal and diabetic rats [J]. Ethnopharmacology, 2005, 98: 345.

[9] Trombetta D, Occhiuto F, Perri D, et al. Antiallergic and anti-histaminic effect of two extracts of *Capparis spinosa* L. flowering buds [J]. Phytotherapy Res, 2005, 19(1): 29.

[10] 罗俊, 谢阳. 维药刺山柑果治疗痛风风湿病 15 例 [J]. 中国民族医药杂志, 1999, 5(2): 3.

[11] 张华,朱晓薇,甘永祥,等. 不同提取方法对槲果藤指标成分及主要药效的影响[J]. 中成药, 2010, 32 (2): 298.

[责任编辑 顾雪竹]