

HPLC 测定五灵脂中原儿茶酸含量

朱翔宇¹, 杨莲菊², 李春^{2*}

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:建立了五灵脂中活性成分原儿茶酸的 HPLC 含量测定方法。方法:采用 Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱;流动相为甲醇-1% 冰醋酸水(5 : 95);流速为 1 mL·min⁻¹;检测波长 260 nm。结果:原儿茶酸的线性范围为 0.019 9 ~ 0.099 5 μg, 线性相关系数为 0.999 9。其精密性、稳定性、重现性和回收率均在允许限定范围内。结论:该方法简便、可靠,为五灵脂药材的质量控制提供了科学依据。

[关键词] 五灵脂;原儿茶酸;高效液相色谱

[中图分类号] R 284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)06-0071-03

Determination of Protocatechuic Acid in *Trogopterus xanthippes* Milne-edwards by High Performance Liquid Chromatography

ZHU Xiang-yu¹, YANG Lian-ju², LI Chun^{2*}

(1. Life Science and Engineering Academy of Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;
2. Institute of Chinese Material Medical, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100007, China)

[Abstract] **Objective:** A method was developed for the quantitative determination of protocatechuic acid in *Trogopterus xanthippes* Milne-Edwards by HPLC. **Method:** The analyst was determined by HPLC with a Hypersil GOLD C₁₈ column and a mobile phase of menthol-1% acetic acid-water(5:95), at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. The UV detection wave length was 260 nm. **Result:** The assay exhibited a good linearity in the concentration range from 0.019 9 to 0.099 5 μg with a correlation coefficient of 0.999 9. The analyst's precision, stabilization, reappearance and recovery were all in limited range. **Conclusion:** This method was reliable and could be used for the quality control of *Trogopterus xanthippes* Milne-Edwards.

[Key words] *Trogopterus xanthippes* Milne-Edwards; protocatechuic acid; HPLC

五灵脂(Faeces Trogopteroi)是哺乳纲鼯鼠科动物复齿鼯鼠 *Trogopterus xanthipes* Milne-Edwards 的干燥粪便,主产于河北、山西等地。具有行血、散瘀、止痛的功效,用于治疗产后子宫复旧不全、毒蛇咬伤、胃脘痛经久不愈等^[1]。原儿茶酸(3,4-二羟苯甲酸, protocatechuic acid)是五灵脂的重要活性成分单体之一^[2]。它是一种水溶性酚酸成分,具有显著降低

心肌耗氧量,提高心肌耐氧能力,减慢心率等药理作用,并且对乙肝病毒的脱氧核糖核酸(DNA)复制具有较强的抑制作用等^[3],同时在体外亦具有明显抑制血小板聚集活性和抗菌活性^[1]。至今未见关于五灵脂质量控制的 HPLC 含量测定方法。本实验采用高效液相色谱法测定五灵脂中原儿茶酸的含量,这将为控制五灵脂药材的质量提供科学依据。

1 仪器与试剂

安捷伦高效液相色谱仪;色谱柱 Hypersil GOLD C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);甲醇为色谱纯,高纯水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。原儿茶酸标准品购自中国药品生物制品检定所,批号 110809-200604。实验用五灵脂药材收购于各地药材市场,由中国中医科学院中药研究所生药室冯学

[收稿日期] 2009-12-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873382)

[第一作者] 朱翔宇,西南交通大学 2008 级硕士研究生,在读。

[通讯作者] *李春,副研究员,主要从事中药化学及质量控制研究;Tel:(010)64014411-2984, E-mail:wenyeli@yahoo.com.cn.

锋副研究员鉴定为鼯鼠科动物复齿鼯鼠 *T. xanthipes* 的干燥粪便。

2 液相条件

2.1 流动相 依据文献资料^[4-5], 对不同比例的甲醇-水、乙腈-水、乙腈-冰醋酸水、甲醇-冰醋酸水的分离效果进行了考察。结果表明, 甲醇-1% 冰醋酸水(5:95)时, 分离效果最好, 原儿茶酸在 10 min 左右出峰, 并在 260 nm 下有较强吸收。

2.2 色谱条件 根据文献和高效液相摸索, 确定色谱条件为色谱柱 Hypersil GOLD C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇-1% 冰醋酸水(5:95); 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长 260 nm; 柱温 35 ℃。

2.3 供试品的制备 取五灵脂粉末(过 2 号筛)1.5 g, 精密称定, 置 500 mL 具塞三角瓶中, 精密加入 150 mL 的 60% 甲醇, 称定质量, 超声 1 h 后, 放冷至室温, 再称定质量, 用 60% 甲醇补足质量, 混匀, 滤过。精密吸取续滤液 100 mL, 回收溶剂, 用 60% 色谱甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜后, 即得。

3 方法与结果

3.1 线性关系考察 精密称定 0.995 mg 原儿茶酸标准品, 用色谱甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 振摇混匀后, 用量程为 1 mL 的移液管移取 1 mL 配制的 0.099 5 mg·mL⁻¹ 的标准品溶液, 再次定容至 10 mL 容量瓶中, 添加色谱甲醇至刻度线, 混匀后制得的标

准品浓度为 0.009 95 mg·mL⁻¹。分别精密注入 2, 4, 6, 8, 10 μL 对照品溶液到高效液相仪中测定。以进样量(μg)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

结果表明, 原儿茶酸在 0.019 9 ~ 0.099 5 μg 呈良好线性关系。Y = 3.54 × 10³X + 3.725, r = 0.999 8。

3.2 精密度试验 精密称取供试品粉末 1.507 5 g, 置于 500 mL 三角瓶中, 准确加入 60% 甲醇 150 mL, 按供试品制备方法制备。连续进样 5 次, 进样量 10 μL。以峰面积计算精密度, 结果表明 RSD 0.316%。

3.3 重复性试验 取本品粉末约 1.5 g, 5 份, 精密称定, 置于 500 mL 三角瓶中, 精密加入 60% 甲醇 150 mL, 称重, 按供试品制备方法制备, HPLC 测定, 原儿茶酸含量的 RSD 为 0.956%。

3.4 稳定性试验 精密称取本品粉末 1.507 5 g, 置于 500 mL 三角瓶中, 精密加入 60% 甲醇 150 mL, 按供试品方法制备。分别于配制后 0, 2, 4, 8, 24 h 进行 HPLC 测定, 峰面积的 RSD 为 0.488%, 供试品在配制后 24 h 内稳定。

3.5 加样回收率 称取已知含量的五灵脂粉末 5 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 分别置 500 mL 具塞三角瓶中, 各精确加入原儿茶酸适量, 按供试品制备方法制备样品, HPLC 测定, 计算回收率, 见表 1。

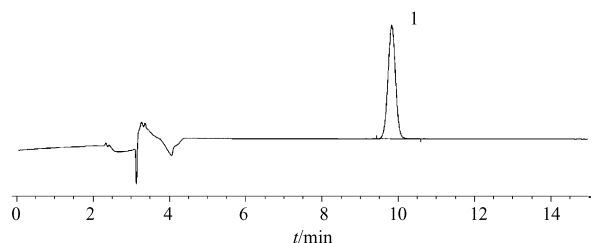
表 1 原儿茶醛加样回收率

No.	称样量/g	样品中含量/mg	加入量/mg	检出量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	0.498 1	0.039 7	0.039 8	0.078 2	96.7		
2	0.517 5	0.041 3	0.041 02	0.081 5	98.0		
3	0.498 0	0.039 7	0.041 02	0.079 4	96.8	96.46	1.16
4	0.497 8	0.039 7	0.041 02	0.078 95	95.7		
5	0.497 9	0.039 7	0.041 02	0.078 76	95.1		

3.6 样品的质量分数 分别精密称取 12 个不同来源的五灵脂药材粉末, 按上述供试品溶液的制备方法和色谱测定条件, 测定五灵脂中原儿茶酸, 结果见表 2, 色谱图见图 1。

4 讨论与小结

本实验考察了甲醇、60% 甲醇两种溶剂对五灵脂药材中原儿茶酸的提取效果, 结果发现 2 种溶剂提取效果相当, 但 60% 甲醇做溶剂样品更干净, 故



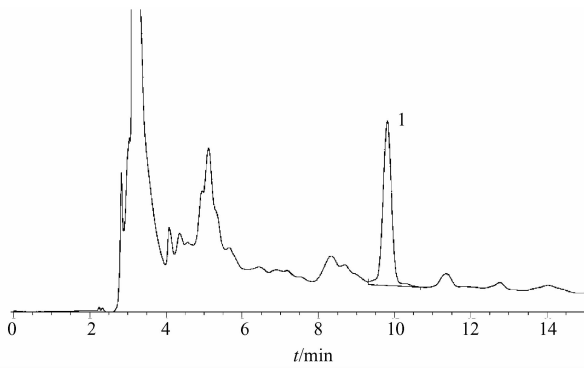


图 1 五灵脂样品的 HPLC 图

A. 对照品; B. 样品; 1. 原儿茶醛。

表 2 五灵脂中原儿茶醛质量分数

No.	来源	样品重/g	峰面积	稀释倍数	质量分数 /mg·g ⁻¹
S1	北京同仁堂	1.507 5	244.54	0	0.068 0
S2	陕西	1.507 6	71.8	0	0.020 0
S3	陕西华阳	1.501 8	112.2	0	0.031 4
S4	河北	1.502 1	285.55	0	0.079 7
S5	安徽亳州	1.503 8	120.85	0	0.033 7
S6	安徽亳州	1.505 6	172.6	0	0.048 1
S7	河北安国	1.505 0	95.15	0	0.026 5
S8	河北安国	1.508 4	184.44	10	0.512 8
S9	河北安国	1.504 7	192.54	0	0.051 4
S10	辽宁凤城	1.503 3	352.3	0	0.098 2
S11	辽宁西凤	1.506 9	112.45	0	0.031 3
S12	内蒙古牙克石	1.508 1	290.5	0	0.080 8

注:进样量均为 10 μL。

选用 60% 甲醇为提取溶剂。又以 60% 甲醇为提取溶剂,考察了不同溶剂量的提取效果,结果表明 100 倍溶剂量提取时,原儿茶酸可提取完全。参考相关文献,考察了乙腈-水-冰醋酸系统和甲醇-水-冰醋酸系统为流动相时五灵脂中原儿茶酸的分离效果,结果以甲醇-水-冰醋酸系统分离效果好。

该实验首次建立了五灵脂药材中原儿茶酸的 HPLC 含量测定方法,且检测方法简便、快速、准确、重现性好,这将为五灵脂药材的质量控制提供依据。

[参考文献]

- [1] 杨东明,苏世文,李铤,等.五灵脂活性成分的研究[J].药学报,1987,22(10):756.
- [2] 潘金火,魏国林.野生与家养复齿鼯鼠所产五灵脂中化学成分比较研究[J].中草药,1996,27(11):650.
- [3] 刘厚佳,胡晋红,孙莲娜,等.原儿茶酸等化合物对 HBV-DNA 转染人肝癌细胞株的作用[J].第二军医大学学报,2001,22(7):661.
- [4] 谢培德,桑彤,龚秀珍.反相高效液相色谱法测定滇桂艾纳香中原儿茶酸的含量[J].中国中药杂志,2000,25(4):227.
- [5] 刘兴超,杨丽,徐海燕,等.HPLC 法同时测定茵山莲颗粒中绿原酸和原儿茶酸的含量[J].沈阳药科大学学报,2008,25(2):122.

[责任编辑 顾雪竹]