

多波长HPLC法同时测定黔产泽漆中3个有效成分的含量^Δ

周孟^{1,2*}, 李芮², 邓连力², 张荣红³, 李勇军^{2,4}, 王永林^{2,4}, 巩仔鹏^{2,4#}(1.贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心/省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2.贵州医科大学药学院, 贵州贵安新区 550025; 3.贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心, 贵阳 550004; 4.贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550004)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)21-2958-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.21.18

摘要 目的:建立同时测定黔产泽漆中没食子酸、原儿茶酸和金丝桃苷含量的方法,为泽漆药材及其相关产品质量标准的制定奠定基础。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。色谱柱为X-brige C₁₈;流动相为乙腈-1%乙酸溶液(梯度洗脱);没食子酸、原儿茶酸和金丝桃苷检测波长分别为271、259、256 nm;柱温为30℃;流速为1 mL/min;进样体积为10 μL。结果:没食子酸、原儿茶酸和金丝桃苷的进样量线性范围分别为0.005 6~0.089 6、0.003 6~0.057 3、0.017 2~0.275 5 mg/mL(R^2 分别为0.999 9、0.999 7、1.000 0),检测限分别为31.43、39.64、49.05 ng/mL,定量限分别为78.58、99.10、122.63 ng/mL,精密密度($n=6$)、稳定性($n=6$)、重复性($n=9$)试验的RSD均小于3.0%,回收率为100.24%~101.64%(RSD小于2.0%, $n=9$)。结论:本研究建立的HPLC法简便、准确,适用于黔产泽漆中没食子酸、原儿茶酸和金丝桃苷含量的同时测定。

关键词 黔产泽漆;高效液相色谱法;含量测定;多波长

Simultaneous Determination of 3 Effective Components in *Euphorbia helioscopia* from Guizhou by Multi-wavelength HPLC

ZHOU Meng^{1,2}, LI Rui², DENG Lianli², ZHANG Ronghong³, LI Yongjun^{2,4}, WANG Yonglin^{2,4}, GONG Zipeng^{2,4}
[1.Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM(Ministry of Education)/State Key Laboratory of Functions and Applications of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2.School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guizhou Guian New Area 550025, China; 3.Tissue Engineering and Stem Cell Experiment Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 4.Guizhou Key Lab of Pharmaceutical Preparations/National Engineering Research Center for Miao Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of gallic acid, protocatechuic acid and hyperin in *Euphorbia helioscopia* from Guizhou, and to lay a foundation for the formulation of quality standard of *E. helioscopia* and its related products. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on X-brige C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-1% glacial acetic acid (gradient elution) at a flow rate of 1 mL/min. The detection wavelengths were set at 271 nm, 259 nm and 256 nm for gallic acid, protocatechuic acid and hyperoside, respectively. The column temperature was 30 °C, and sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range of gallic acid, protocatechuic acid and hyperoside were 0.005 6-0.089 6 ($R^2=0.999 9$), 0.003 6-0.057 3 ($R^2=0.999 7$) and 0.017 2-0.275 5 mg/mL ($R^2=1.000 0$), respectively. The detection limits were 31.43, 39.64, 49.05 ng/mL, respectively. The quantitation limits were 78.58, 99.10, 122.63 ng/mL, respectively. RSDs of precision ($n=6$), stability ($n=6$) and reproducibility ($n=9$) tests were all lower than 3.0%. The sample recovery rates were 100.24%-101.64% (RSDs<2.0%, $n=9$). CONCLUSIONS: The developed HPLC method is simple, accurate and suitable for the simultaneous determination of gallic acid, protocatechuic acid and hyperin in *E. helioscopia* from Guizhou.

KEYWORDS *Euphorbia helioscopia* from Guizhou; HPLC; Content determination; Multi-wavelength

^Δ 基金项目:贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2016]5613);贵州省中药材、民族药材质量标准研究项目(No.99);贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项课题(No.GZYY2017-085)

* 副教授,博士。研究方向:中药质量标准控制。电话:0851-86958468。E-mail:gmu Zhoumeng@163.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药质量标准控制。电话:0851-86958468。E-mail:gzp4012597@126.com

泽漆(*Euphorbia helioscopia* L.)为大戟科大戟属植物,又名猫眼草、五朵云及五灯头,为民间常用中草药,分布广泛^[1]。泽漆在临床上可用于结核性瘰管、细菌性痢疾、食道癌、无黄疸型传染性肝炎等疾病的治疗^[2]。此外,大量的实验研究和临床实践证实,泽漆的抗肿瘤作用明显,是一味具有较高研究和开发价值的药材^[3]。泽漆中的许多成分均显示出较强的抗肿瘤活性^[4],泽漆单

用或与其他中药配伍使用治疗肺癌^[5]、食管癌^[6]等多种恶性肿瘤均有效。杨莉等^[7]从泽漆中提取并鉴定出了没食子酸、金丝桃苷等化合物,并证实没食子酸和金丝桃苷在质量浓度为100 μg/mL时,对小鼠肺腺癌细胞LA795的生长活性抑制率分别达到了93.29%和90.34%。然而,目前关于泽漆的质量控制研究较少,只有关于渝产泽漆中酚酸类物质和总黄酮含量的研究^[8-9],可供参考内容较少。因此,本研究拟对黔产泽漆中具有抗肿瘤作用的没食子酸和金丝桃苷以及具有显著抑菌作用的原儿茶酸^[10]这3个活性成分进行含量分析,以期为完善泽漆药材的质量标准研究奠定基础,同时为黔产泽漆资源的开发利用提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY 2998 高效液相色谱(HPLC)仪(包括输液泵、自动进样器、柱温箱、光电二极管阵列检测器)购自沃特世科技(上海)有限公司;AE240 十万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];WP-UP-IV-20 超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司)。

1.2 药品与试剂

所有泽漆药材样品均经贵州医科大学药学院生药学与药用植物学教研室龙庆德副教授鉴定为大戟科草本植物泽漆(*E. helioscopia* L.)的全草,用前粉碎,过60目筛,混合均匀;原儿茶酸对照品(批号:110809-201205,纯度:99.9%)、没食子酸对照品(批号:110831-201605,纯度:90.8%)和金丝桃苷对照品(批号:111521-201507,纯度:94.3%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈和醋酸为色谱纯,水为超纯水。泽漆药材的样品信息详见表1

表1 泽漆样品信息

Tab 1 Information of *E. helioscopia* sample

编号	采集地	采集时间	批号
1	贵州省遵义市播州区枫香镇荷坝村	2016-08	160811-1
2	贵州省安顺市关岭布依族苗族自治县花江镇	2016-08	160816-2
3	贵州省贵阳市花溪区	2016-08	160816-3
4	贵州省黔东南州晴隆县大厂镇	2016-08	160816-4
5	贵州省黔东南州从江县谷坪乡山岗村	2016-09	160906-5
6	贵州省黔东南州兴义市	2016-10	161011-6
7	贵州省六盘水盘州市民主镇	2016-10	161011-7
8	贵州省六盘水盘州市双龙山街道小补泥村	2016-07	160718-8
9	贵州省毕节市大方县大方镇南郊社区	2016-07	160725-9

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 分别精密称取没食子酸对照品3.58 mg、原儿茶酸对照品2.29 mg和金丝桃苷对照品10.02 mg,置于同一5 mL量瓶中,甲醇定容至刻度,作为混合对照品母液。取混合对照品母液0.5 mL,置于2 mL量瓶中,甲醇定容至刻度,制备成没食子酸、原儿茶酸和

金丝桃苷质量浓度分别为0.179 2、0.114 5、0.551 0 mg/mL的混合对照品原液。然后采用2倍稀释法将混合对照品原液稀释,获得5个质量浓度的系列对照品溶液,没食子酸、原儿茶酸与金丝桃苷对照品的最大质量浓度分别为0.089 6、0.057 3、0.275 5 mg/mL。

2.1.2 供试品溶液 取泽漆药材粉末样品(批号:1608-16-3)约1 g,精密称定,置于圆底烧瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,称定质量,加热回流30 min,放冷,再次称定质量,用70%甲醇补足损失的质量,摇匀,滤过。取适量续滤液过0.45 μm微孔滤膜,置于进样瓶中,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱:X-brige C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-1%乙酸溶液(B),梯度洗脱(0~3 min,2%~5%A;3~8 min,5%A;8~9 min,5%~14%A;9~20 min,14%A);检测波长:271 nm(没食子酸)、259 nm(原儿茶酸)、256 nm(金丝桃苷);柱温:30 ℃;流速:1 mL/min;进样体积:10 μL。

2.3 系统适用性试验

取泽漆药材粉末样品(批号:160816-3)1份,按“2.1.2”项下方法制备成供试品溶液;取“2.1.1”项下混合对照品原液,稀释成没食子酸、原儿茶酸、金丝桃苷质量浓度分别为0.022 4、0.014 3、0.068 9 mg/mL的混合对照品溶液。将2种溶液按“2.2”项下色谱条件进样,记录色谱图。结果,混合对照品溶液与供试品溶液中3种检测指标成分均达到基线分离,没食子酸、原儿茶酸和金丝桃苷各色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于2,理论板数以没食子酸计不低于3 000。色谱图见图1。

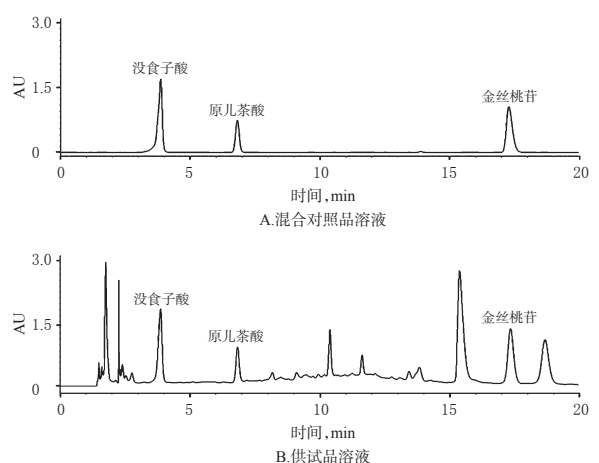


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

取“2.1.1”项下5个质量浓度的混合对照品溶液,分别按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积为纵坐标(y)、质量浓度为横坐标(x)进行线性回归,得到没食子酸、原儿茶酸、金丝桃苷3个化合物的回归方

程及相关系数,结果见表2。

表2 3个待测成分的线性回归方程、相关系数、检测限和定量限

Tab 2 Linear regression equation, correlation coefficient, LODs and LOQs of the 3 kinds of measured components

待测成分	线性回归方程	R ²	线性范围,mg/mL	检测限,ng/mL	定量限,ng/mL
没食子酸	y=75.292x+441.25	0.999 9	0.005 6~0.089 6	31.43	78.58
原儿茶酸	y=656.465x-1 082.1	0.999 7	0.003 6~0.057 3	39.64	99.10
金丝桃苷	y=1×10 ⁴ x-4 611.3	1.000 0	0.017 2~0.275 5	49.05	122.63

2.5 检测限和定量限检测

分别制备没食子酸对照品溶液(0.491 1 mg/mL)、原儿茶酸对照品溶液(0.619 4 mg/mL)和金丝桃苷对照品溶液(0.766 4 mg/mL),分别用甲醇以25倍稀释法不断稀释,当信噪比为10~11得定量限,当信噪比为3~4时得检测限,测定结果见表2。

2.6 精密度的试验

取泽漆药材粉末样品(批号:160816-3)1份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,连续进样6次,记录峰面积。结果,没食子酸、原儿茶酸、金丝桃苷峰面积的RSD分别为1.32%、0.42%、0.77%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取泽漆药材粉末样品(批号:160816-3)1份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,分别放置0、1、2、4、6、8 h后按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、原儿茶酸、金丝桃苷峰面积的RSD分别为0.47%、0.74%、0.99%(n=6),表明供试品溶液在室温条件下8 h内稳定。

2.8 重复性试验

分别取泽漆药材粉末样品(批号:160816-3)0.5、1、1.5 g,各3份,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品中3个成分的含量。结果,没食子酸、原儿茶酸、金丝桃苷的平均含量分别为0.637 1、0.317 5、1.318 9 mg/g,RSD分别为2.03%、0.57%、1.26%(n=9),表明本法重复性良好。

2.9 加样回收试验

取泽漆药材粉末样品(批号:160816-3)约0.5 g,共3份,精密称定,分别加入称量样品中被测定成分的本底含量为50%、100%、150%的对照品,然后按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,每个浓度平行制备3份,合计9份。然后分别按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,没食子酸、原儿茶酸和金丝桃苷的回收率分别为100.24%、101.45%、101.64%,RSD分别为1.24%、1.12%、0.58%(n=9),均小于2.0%,表明本方法的准确度较好,结果见表3。

2.10 样品含量测定

表3 回收率结果

Tab 3 Results of recovery

待测成分	本底含量,mg	加入量,mg	测定量,mg	回收率,%					
				计算值	平均值	RSD			
原儿茶酸	0.320 1	0.120 5	0.443 5	100.66	100.24	1.24			
	0.320 1	0.120 5	0.442 0	100.32					
	0.320 1	0.120 5	0.436 7	99.11					
	0.320 5	0.330 0	0.662 1	101.78					
	0.320 5	0.330 0	0.666 9	102.52					
	0.320 5	0.330 0	0.651 6	100.17					
	0.324 3	0.655 5	0.969 2	98.92					
	0.324 3	0.655 5	0.975 3	99.54					
	0.324 3	0.655 5	0.971 5	99.15					
	没食子酸	0.159 5	0.080 5	0.245 9			102.46	101.45	1.12
		0.159 5	0.080 5	0.245 5			102.29		
		0.159 5	0.080 5	0.247 4			103.08		
		0.159 7	0.161 0	0.323 5			100.87		
		0.159 7	0.161 0	0.320 2			99.84		
		0.159 7	0.161 0	0.321 4			100.22		
0.161 6		0.320 5	0.493 7	102.41					
0.161 6		0.320 5	0.487 4	101.10					
0.161 6		0.320 5	0.486 0	100.81					
金丝桃苷		0.662 7	0.317 5	0.999 5	101.97	101.64	0.58		
		0.662 7	0.317 5	0.986 3	100.62				
		0.662 7	0.317 5	0.993 8	101.39				
		0.663 6	0.645 0	1.332 4	101.82				
		0.663 6	0.645 0	1.327 8	102.23				
		0.663 6	0.645 0	1.342 5	102.59				
	0.671 3	0.970 0	1.662 0	101.26					
	0.671 3	0.970 0	1.662 1	101.27					
	0.671 3	0.970 0	1.665 5	101.60					

取贵州不同产地的9批泽漆药材粉末约1 g,各2份,分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品中3个成分的含量。结果,贵州遵义市播州区枫香镇苟坝村产泽漆(编号1)中没食子酸和原儿茶酸含量最高,分别为0.660 2、0.761 6 mg/g,几乎达到了多数产地含量的2倍;贵州安顺市关岭布依族苗族自治县花江镇产泽漆(编号2)中金丝桃苷含量最高,为6.666 1 mg/g;此外,贵州黔东南州从江县谷坪乡山岗村产泽漆(编号6)中的金丝桃苷也达到了6.438 5 mg/g,结果见表4。

表4 9批黔产泽漆中没食子酸、原儿茶酸和金丝桃苷含量测定结果(mg/g)

Tab 4 Results of content determination of gallic acid, protocatechuic acid and hyperoside in 9 batches of *E. helioscopia* from Guizhou(mg/g)

编号	没食子酸	原儿茶酸	金丝桃苷
1	0.660 2	0.761 6	5.421 2
2	0.356 3	0.361 0	6.666 1
3	0.636 6	0.317 2	1.302 5
4	0.315 9	0.302 9	5.885 1
5	0.610 7	0.398 4	4.468 5
6	0.356 0	0.306 1	6.438 5
7	0.378 6	0.553 7	3.293 9
8	0.629 9	0.366 6	3.241 3
9	0.287 4	0.199 3	5.421 2

3 讨论

3.1 药材提取溶剂的选择

本研究选取泽漆中具有明显药理活性的没食子酸、原儿茶酸和金丝桃苷作为含量测定的指标。其中,没食子酸和原儿茶酸皆为含有酚环的有机酸,没食子酸易溶于热水、甲醇、乙醇^[11],原儿茶酸可溶于甲醇、乙醇等有机溶剂;金丝桃苷又名槲皮素-3-O-β-D-吡喃半乳糖苷,属黄酮醇苷类化合物,易溶于乙醇、甲醇等有机溶剂。可见,这3个成分在甲醇或乙醇等有机溶剂中均溶解度较高。同时,依据2015年版《中国药典》(一部)(后文简称药典)“野马追”中金丝桃苷含量测定方法^[12],本研究分别考察了30%、50%、70%、90%甲醇作为提取溶剂对3个指标成分提取率的影响,以确保3个指标成分提取率最高。试验发现,金丝桃苷的提取率随甲醇浓度的增加而增大,没食子酸和原儿茶酸的提取率在甲醇浓度为70%时最高。因此,本研究最终确定以70%甲醇作为提取溶剂。

3.2 色谱条件的选择

笔者在预试验中分别考察了在不同流动相体系(甲醇-0.1%磷酸、甲醇-1%乙酸、乙腈-0.1%磷酸和乙腈-1%乙酸)、不同流速(0.8、1、1.2 mL/min)和不同柱温(28、30、32℃)下,各指标成分的分度、峰形、保留时间等的变化,最终确定流动相为乙腈-1%乙酸、流速为1 mL/min、柱温为30℃,此时各成分峰形好,分离度较好。另外,笔者在检测过程中进行190~400 nm波长范围内的全扫描,在不考虑有较大干扰的末端吸收下,没食子酸的最大吸收与药典规定一致,为271 nm;原儿茶酸的最大吸收波长与韩煜等^[13]报道的一致,为259 nm;而黄酮类化合物金丝桃苷中由于存在桂皮酰基及苯甲酰基组成的交叉共轭体系,其甲醇溶液在200~400 nm波长区域内存在2个主要的紫外吸收带,即峰带I(300~400 nm)和峰带II(220~280 nm),故本研究在药典基础上通过比较金丝桃苷组分的峰面积,最终确定其最佳检测波长为256 nm。

目前,泽漆在化学结构和生物活性方面的研究已经取得了较为系统和深入的研究,其应用研究方向主要包括杀虫^[15]、抗早期肝癌^[16]等,具有巨大的市场潜力。然而,泽漆的活性物质仍缺乏可控的质量标准。本研究建立了多波长HPLC法同时测定泽漆中具有抗肿瘤活性的没食子酸、金丝桃苷及抗菌作用的原儿茶酸3个活性成分含量的方法,具有精确度高、稳定性强、重复性好以及简便等特点。研究结果表明,来自贵州7个市9个不同产地的泽漆中均含有没食子酸、原儿茶酸和金丝桃苷。

其中,没食子酸含量为0.287 4~0.660 2 mg/g;原儿茶酸含量为0.199 3~0.761 6 mg/g;金丝桃苷含量为1.302 5~6.666 1 mg/g。不同市区间上述指标成分含量差异明显,即使是六盘水市两个来源泽漆中没食子酸和原儿茶酸含量间也有较大的差异,笔者推测这可能与采摘的日期和贵州特殊的气候地貌有关。

参考文献

- [1] 《中华本草》编委会.中华本草:第六卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:5595.
- [2] 南京中医药大学.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2006:234.
- [3] 杨万里,衷宇,丁井永.泽漆抗肿瘤作用机制研究进展[J].现代肿瘤学,2016,24(22):3680-3683.
- [4] YANG L, CHEN H, GAO W. Advances in studies on chemical constituents in *euphorbia helioscopia* and their biological activities[J]. *Chin J Nat Med*, 2007, 38 (10) : 1585-1589.
- [5] 张磊.国医大师周仲瑛治疗肺癌角药藜蒿[J].上海中医药杂志,2013,47(11):1-2.
- [6] 赵智强,吴勉华,周瑛,等.周仲瑛辨治消化系统恶性肿瘤学术思想探讨[J].中医杂志,2013,54(14):1186-1188.
- [7] 杨莉,陈海霞,高文远.泽漆化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J].天然产物研究与开发,2008,20(4):575-577.
- [8] 张丹,郑秀云,曹韩国,等.重庆产泽漆中总酚酸与没食子酸的含量分析[J].中国现代应用药学,2011,28(5):443-445,450.
- [9] 张丹,郑秀云,颜学伟,等.重庆产泽漆中总黄酮与芦丁的含量分析[J].安徽农业科学,2011,39(20):12108-12110.
- [10] ABDULLADZHANOVA NG, MAVLYANOV SM, DALIMOV DN. Polyphenols of certain plants of the Euphorbiaceae family[J]. *Chem Nat Compd*, 2003, 39(4):399-400.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:514.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:313.
- [13] 韩煜,杨沫,谢晓梅,等.不同产地木瓜中绿原酸、原儿茶酸和总酚的含量测定[J].中国药房,2015,26(24):3399-3403.
- [14] 邢小霞,罗兰,任俊达.泽漆农药生物活性研究[J].青岛农业大学学报(自然科学版),2013,30(3):192-194.
- [15] 高志良.大剂量泽漆为主治疗早期肝癌[J].江苏中医,1997,18(2):28.

(收稿日期:2018-05-02 修回日期:2018-08-14)

(编辑:林静)