

HPLC 法测定不同产地蜂房中没食子酸、对羟基苯甲酸和原儿茶酸

刘东洋^{1,2}, 史国兵^{1*}, 赵庆春¹

(1. 沈阳军区总医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要:目的 建立同时测定蜂房药材中没食子酸、对羟基苯甲酸和原儿茶酸的方法。方法 采用 HPLC 法, 梯度洗脱。色谱柱为 Kromasil ODS-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (三氟乙酸调 pH 至 5), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm。结果 没食子酸、对羟基苯甲酸和原儿茶酸质量浓度与峰面积均呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 98.9 % (RSD 为 1.01 %), 98.4 % (RSD 为 1.18 %), 97.3 % (RSD 为 1.18 %)。结论 该方法准确、重现性好、专属性强, 可为蜂房质量标准的控制提供依据。

关键词: HPLC; 蜂房; 没食子酸; 对羟基苯甲酸; 原儿茶酸

中图分类号: R282.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)06-0977-02

蜂房为胡蜂科昆虫果马蜂 *Polistes olivaceus* (De Geer)、日本长脚胡蜂 *P. japonicus* Saussure 或异腹胡蜂 *Parapolybia varia* Fabricius 的巢。《中国药典》2005 年版中记载蜂房具有祛风, 攻毒, 杀虫, 止痛的作用。《中药大辞典》中记载蜂房药液具有“去腐、生肌、消炎、止痛等作用, 并能促进创口早期愈合”。近年来国内多篇文献报道蜂房临床疗效显著, 大多数集中于抗肿瘤与抗炎两个方面, 已有文献明确指出抗肿瘤物质基础在于它所含有的极性低的脂肪酸类^[1], 而关于抗炎作用的物质基础研究报道甚少。在前期工作中, 发现蜂房的正丁醇提取物具有明显的抗炎活性, 从中分离并鉴定了部分酚酸、含氮类化合物^[2]。为了进一步对阐明蜂房抗炎活性的物质基础, 本实验对 16 批不同产地蜂房药材进行了 HPLC 比较分析, 建立了同时测定蜂房药材中主要成分没食子酸、对羟基苯甲酸和原儿茶酸量的方法, 为蜂房药材质量控制提供了借鉴。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: Waters 600E 泵, Waters PAD996 二极管阵列检测器; 紫外分光光度计 (UV-2501PC, 日本岛津); 电子分析天平 (UV120D, 日本岛津); 高效液相色谱用试剂: 甲醇 (色谱纯), 三氟乙酸 (分析纯), 没食子酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸对照品购自中国药品生物制品检定所; 实验室用药材来自不同产地均由沈阳药科大学中药教研室孙启时教授鉴定为 *P. olivaceus* (De Geer)。

2 试验方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Kromasil ODS-C₁₈ (250

mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇 (A)-水 (三氟乙酸调 pH 至 5) (B); 梯度洗脱程序: 0 min (0 % A), 15 min (8 % A), 18 min (12 % A), 30 min (15 % A), 45 min (18 % A); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温 25 °C。色谱图见图 1。

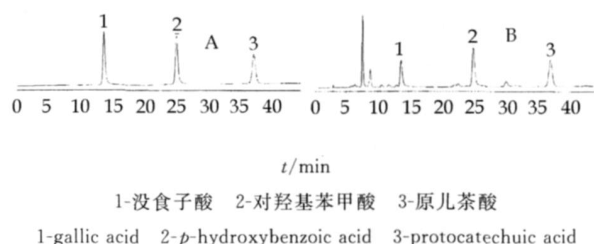


图 1 对照品 (A) 和蜂房 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A) and *Nidus Vespa* (B)

2.2 供试品溶液的制备: 称取剪碎的蜂房药材 (辽宁沈阳) 2 g, 用 20 倍水煎煮 3 次, 水煎液用滤纸滤过, 所得滤液浓缩至约 10 mL; 将浓缩液醇沉 12 h, 滤过得醇沉液; 醇沉液减压浓缩至无醇味, 用水 25 mL 分次定量转移至分液漏斗中, 正丁醇等体积萃取 3 次, 萃取液合并, 旋转蒸发至干, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称没食子酸对照品 8.0 mg、对羟基苯甲酸对照品 7.6 mg 和原儿茶酸对照品 11.1 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶液稀释到刻度, 摇匀即得, 作为对照品储备液。分别精密吸取上述贮备液 1.0 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶液稀释到刻度, 摇匀即得, 作为对照品溶液。

* 收稿日期: 2008-08-17

作者简介: 刘东洋 (1981—), 男, 辽宁铁岭人, 硕士研究生, 主要从事生药学研究。

* 通讯作者 史国兵 Tel: (024) 23056262 E-mail: sysgb@126.com

2.4 线性关系的考察:精密吸取对照品溶液 0.04、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、1.8 mL,分别置于 2 mL 量瓶中,用甲醇溶液稀释到刻度,摇匀,分别进样 5 μ L。以各成分峰面积为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X),绘制标准曲线,计算回归方程: $Y_{\text{没食子酸}} = 8.97 \times 10^6 X + 7317.1$, $r = 0.9996$,线性范围 1.6~72.0 μ g/mL; $Y_{\text{对羟基苯甲酸}} = 1.95 \times 10^7 X - 73247$, $r = 0.9995$,线性范围 1.52~68.4 μ g/mL; $Y_{\text{原儿茶酸}} = 5.01 \times 10^7 X - 169012$, $r = 0.9998$,线性范围 2.22~99.9 μ g/mL。

2.5 精密度试验:取同一供试品溶液,分别连续进样 6 次,测定没食子酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸峰面积,结果 RSD 分别为 0.41%、0.56%、0.72%,均小于 2%,表明仪器精密度良好。

2.6 重现性试验:取同一批蜂房样品 6 份(辽宁沈阳),按供试品溶液的制备方法制备成 6 份,分别进样 5 μ L,测定峰面积,结果没食子酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸质量分数的 RSD 分别为 0.83%、0.74%、0.95%,均小于 2%,表明方法重现性良好。

2.7 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、24 h 进样 5 μ L。结果,没食子酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸的峰面积的 RSD 分别为 1.72%、1.61%、2.19%,均小于 5%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验:精密称取 6 份已测定的蜂房(辽宁沈阳)1 g,分别加入没食子酸、对羟基苯甲酸和原儿茶酸对照品溶液适量,按 2.2 项下操作,计算回收率。结果没食子酸平均回收率 98.9%,RSD 为 1.01%;对羟基苯甲酸平均回收率 98.4%,RSD 为 1.18%;原儿茶酸平均回收率 97.3%,RSD 为 1.18%。

2.9 样品测定:分别取不同产地的蜂房 1 g,按照上述方法制备供试品溶液,分别进样 5 μ L,测定峰面积,根据标准曲线计算样品中没食子酸、对羟基苯甲酸和原儿茶酸的量,结果见表 1。

3 讨论

3.1 检测波长的选择:采用 Waters 二级管阵列检测器对检测波长进行了选择,首先从中选出 243、254、261 nm 3 个分离度较好的波长,然后进一步通过分析比较这 3 个波长下的图谱,发现检测波长为 254 nm 时,3 种酚酸均有最大吸收,且基线较平稳,色谱峰分离较好。

3.2 流动相的选择:化合物在色谱柱上的保留行为与其化学结构有关,没食子酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸化学结构有着一定差别,对羟基苯甲酸、原儿茶酸保留时间远大于没食子酸,等度洗脱不适宜同时

表 1 样品来源及其测定结果(n=5)

Table 1 Origin of samples and their determinations (n=5)

编号	来源	没食子酸		对羟基苯甲酸		原儿茶酸	
		质量分数/ (mg·g ⁻¹)	RSD / %	质量分数/ (mg·g ⁻¹)	RSD / %	质量分数/ (mg·g ⁻¹)	RSD / %
1	锦州	0.225	1.69	0.315	1.94	0.334	1.02
2	铁岭	0.212	1.87	0.326	1.08	0.354	0.94
3	沈阳	0.256	1.42	0.365	0.95	0.327	0.80
4	丹东	0.265	1.28	0.385	0.98	0.404	0.79
5	吉林	0.213	1.89	0.336	0.82	0.309	1.02
6	佳木斯	0.231	1.43	0.357	0.84	0.322	0.99
7	石家庄	0.244	0.91	0.343	0.74	0.298	0.94
8	天津	0.217	1.20	0.328	0.58	0.406	0.87
9	开封	0.195	1.63	0.295	0.87	0.284	1.36
10	郑州	0.206	1.49	0.294	0.63	0.313	0.92
11	淄博	0.224	1.56	0.364	0.68	0.277	1.09
12	东海	0.176	1.92	0.315	1.04	0.345	1.16
13	武汉	0.190	1.75	0.287	1.13	0.341	1.05
14	常德	0.255	1.06	0.373	0.57	0.397	0.57
15	亳州	0.230	1.27	0.353	0.48	0.376	0.58
16	中山	0.249	1.10	0.368	0.70	0.393	0.80

测定这 3 种成分,故采用梯度洗脱,可缩短分析时间,同时定量 3 个成分;分别用甲醇-水(加三氟乙酸)、乙腈-水、乙腈-磷酸盐缓冲体系为流动相,以不同梯度进行试验,结果表明用甲醇-水(三氟乙酸调 pH 值至 5)线性梯度洗脱效果最好。

3.3 提取条件的条件:蜂房提取选用传统的水煎醇沉工艺,但要考虑选加水量、煎煮时间、煎煮次数和醇沉浓度的因素,选用 L₉(3⁴) 正交方案,系统考察了 4 个因素对蜂房提取工艺的影响,选定蜂房最优提取工艺,即每次用 20 倍量的水煎煮 3 次,总提取时间为 4 h,醇沉体积分数为 60%。

3.4 提取溶媒的选择:通过对提取溶媒的考察,蜂房水煎液的正丁醇提取物抗炎活性明显;此外,通过对蜂房水煎液正丁醇提取物与水层图谱比较,没食子酸、对羟基苯甲酸和原儿茶酸的峰面积显著提高,杂质明显减少。蜂房水煎液的正丁醇层提取物,不仅有利于 3 种酚酸类化合物的定量测定,更有利于不同产地蜂房抗炎活性的比较。

本实验建立了蜂房药材中没食子酸、对羟基苯甲酸和原儿茶酸的定量测定方法,该方法方便、快捷、可靠;结果表明不同产地蜂房中 3 种酚酸的量存在一定差异,以辽宁丹东、湖南和广东中山蜂房药材中 3 种酚酸的量较高,考虑的可能因素有产地、加工、采用季节、储存时间和方式等有关。

参考文献:

- [1] 赵维成,肖伟,于德泉,等.蜂房抗肿瘤成分的提取及分析检测[J].实用肿瘤学杂志,2000,14(1):14.
- [2] 王伟,赵庆春,安晔,等.中药蜂房化学成分的研究[J].中国药物化学杂志,2007,15(1):16.