

不同产地叶下珠中4种酚酸类成分的测定

林琛¹, 袁永兵², 张兰珍^{1*}, 石任兵^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 建立 RP-HPLC 同时测定不同产地叶下珠中没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和短叶苏木酚酸的方法。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%醋酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为 270 nm, 体积流量 1 mL/min, 柱温 35 °C。结果 没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和短叶苏木酚酸的线性范围分别为 0.062 2~0.622 0 μg ($r=0.999 7$)、0.130 4~1.304 0 μg ($r=0.999 4$)、0.246 4~2.464 0 μg ($r=0.999 2$)、0.081 2~0.488 0 μg ($r=0.999 3$); 平均回收率分别为 103.62%、101.20%、100.09%、100.27%, RSD 分别为 1.29%、2.08%、1.40%、2.98%。结论 本测定方法简便、准确、重复性好, 可用于叶下珠中没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和短叶苏木酚酸的测定。

关键词: 叶下珠; 没食子酸; 柯里拉京; 老鹳草素; 短叶苏木酚酸; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-2055-03

Determination of four phenolic acids in *Phyllanthus urinaria* from different habitats

LIN Chen¹, YUAN Yong-bing², ZHANG Lan-zhen¹, SHI Ren-bing¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Key words: *Phyllanthus urinaria* L.; gallic acid; corilagin; geraniin; brevifolin carboxylic acid; HPLC

叶下珠为大戟科叶下珠属植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 的干燥全草, 主要用来治疗小儿疳积、黄疸、肝炎、肠炎、痢疾、肾炎水肿、蛇咬伤等症^[1], 现在主要用于治疗肝炎。叶下珠主要分布于长江以南, 其抗病毒作用的强弱与其产地有关^[2-3], 产地不同会使叶下珠有效成分不同, 因此测定不同产地叶下珠有效成分量, 能为不同产地叶下珠抗病毒作用差异和不同产地叶下珠质量优劣研究提供依据。叶下珠质量研究目前主要是没食子酸或柯里拉京单一成分的测定^[4-6]。由于叶下珠中没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和短叶苏木酚酸等都是叶下珠抗病毒、抗肿瘤、抗 HIV 作用的药效物质基础且其量均较高, 因此本实验建立了 RP-HPLC 法同时测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京、老鹳草素、短叶苏木酚酸 4 种酚酸类成分, 并测定了 10 个产地 11 批次

叶下珠中 4 种成分的量, 结果准确, 方法简便。

1 仪器与材料

Waters 1525 型高效液相色谱仪; PAD 检测器; Empower 软件; 25 μL 可调进样器; KQ—500DE 超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。

产地为陕西安康、商洛的叶下珠药材购自陕西商洛, 经陕西中医研究院郭五保副研究员鉴定为大戟科植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 的干燥全草; 其他叶下珠药材产自安徽、福建、河南、广东、广西等地, 由北京中医药大学刘春生教授鉴定为大戟科植物叶下珠, 样品保存于北京中医药大学中药化学系。没食子酸、柯里拉京、老鹳草素、短叶苏木酚酸对照品自制, 经 HPLC 检测质量分数均大于 98.5%。色谱纯乙腈 (Sigma-aldrich 公司); 屈臣氏纯净水; 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2012-02-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171197); 北京市自然科学基金资助项目 (7073093); 北京中医药大学科研创新团队 (2011-CXTD-12)

作者简介: 林琛, 女, 在读硕士。

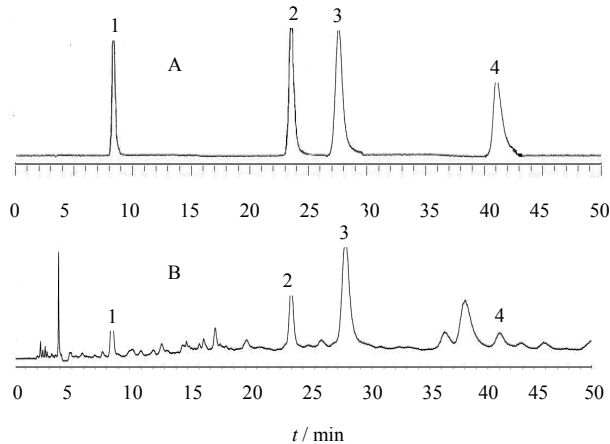
*通讯作者 张兰珍 Tel: (010)84738629 E-mail: zhanglanzhen01@126.com

石任兵 Tel: (010)84738601 E-mail: shirb@126.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.2%冰醋酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 5% A, 5~10 min, 5%~10% A, 10~11 min, 10%~13% A, 11~35 min, 13% A, 35~36 min, 13%~14% A; 检测波长 270 nm; 体积流量 1 mL/min; 柱温 35 °C。对照品及样品色谱图见图 1。



1-没食子酸 2-柯里拉京 3-老鹳草素 4-短叶苏木酚酸
1-gallic acid 2-corilagin 3-geraniin 4-brevifolin carboxylic acid

图 1 对照品 (A) 和供试品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and samples (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取没食子酸、柯里拉京、老鹳草素、短叶苏木酚酸各适量, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 50%乙醇溶解并稀释至刻度。摇匀, 各溶液再精密移取 1 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 50%乙醇溶解并稀释到刻度。得到没食子酸、柯里拉京、老鹳草素、短叶苏木酚酸的质量浓度分别为 31.1、65.2、123.2、32.5 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取叶下珠 (陕西商洛) 药材粉末 (过 60 目筛) 约 0.3 g, 精密称定, 加 50 mL 50%乙醇, 称其质量, 超声提取 40 min, 用 50%乙醇补足原质量, 滤过, 取续滤液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 备用。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取各混合对照品溶液 2.5、5、10、15、20 μL, 注入液相色谱仪, 测定色谱峰面积, 以对照品量为横坐标 (X), 色谱峰峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。计算回归方程, 结果见表 1。

2.5 精密度试验

分别精密吸取供试品溶液 (陕西商洛) 10 μL, 连续进样 6 次, 测定没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和短叶苏木酚酸色谱峰峰面积, 计算 RSD 分别为 1.94%、1.13%、1.57%、1.98%, 表明精密度良好。

表 1 线性关系考察

Table 1 Linear relationship

| 对照品 | 回归方程 | r | 线性范围 / μg |
|--------|---------------------------|---------|-----------------|
| 没食子酸 | $Y=3\ 000\ 000 X-1\ 415$ | 0.999 7 | 0.062 2~0.622 0 |
| 柯里拉京 | $Y=1\ 000\ 000 X-32\ 687$ | 0.999 4 | 0.130 4~1.304 0 |
| 老鹳草素 | $Y=830\ 651 X-45\ 087$ | 0.999 2 | 0.246 4~2.464 0 |
| 短叶苏木酚酸 | $Y=908\ 617 X-9\ 189.6$ | 0.999 3 | 0.081 2~0.488 0 |

2.6 稳定性试验

精密吸取“2.3”项下供试品溶液 10 μL, 分别于制备后 0、2、4、6、8、12、24 h 进样, 测定没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和短叶苏木酚酸色谱峰峰面积, 计算其 RSD 分别为 2.51%、2.49%、2.09%、2.36%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

取同一批叶下珠药材粉末, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 测定。计算没食子酸平均质量分数为 0.130% (RSD=2.19%); 柯里拉京平均质量分数为 0.789% (RSD=0.74%); 老鹳

草素平均质量分数为 3.250% (RSD=2.20%); 短叶苏木酚酸平均质量分数为 0.231% (RSD=2.14%)。表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

分别精密称取没食子酸、柯里拉京、老鹳草素、短叶苏木酚酸对照品 2.0、12.55、49.0、3.5 mg 于 10 mL 量瓶中, 加 50%溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用。精密称取已测定的叶下珠粉末 (60 目) 6 份, 每份约 150 mg, 精密加入上述混合对照品溶液各 1 mL, 加 50%乙醇 46 mL, 制备供试品溶液。精密吸取上述供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定

各色谱峰峰面积, 计算没食子酸、柯里拉京、老鹳草素、短叶苏木酚酸的平均回收率分别为 103.62%、101.20%、100.09%、100.27%, RSD 分别为 1.29%、2.08%、1.40%, 2.98%。

2.9 叶下珠中 4 种酚酸类成分的测定

精密称取 10 个产地 11 批叶下珠药材粉末 (过 60 目筛) 各 3 份, 每份叶下珠药材粉末约 0.3 g, 精密称定。按“2.3”项下制备供试品溶液, 分别精密吸取供试品溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定各色谱峰峰面积, 计算没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和短叶苏木酚酸的质量分数。结果见表 2。

表 2 10 个产地 11 批叶下珠药材 4 种成分测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of four components in 11 samples from ten habitats (n=3)

| 产地 | 质量分数 / % | | | |
|---------|----------|-------|-------|--------|
| | 没食子酸 | 柯里拉京 | 老鹳草素 | 短叶苏木酚酸 |
| 福建 | 0.031 | 0.236 | 4.630 | 0.064 |
| 河南 | 0.168 | 0.280 | 1.940 | 0.130 |
| 四川 | 0.033 | 0.374 | 2.630 | 0.204 |
| 广东 | 0.035 | 0.474 | 2.460 | 0.251 |
| 湖南 | 0.100 | 0.165 | 1.770 | 0.070 |
| 云南 | 0.086 | 0.487 | 0.840 | 0.132 |
| 陕西安康 | 0.024 | 0.204 | 3.660 | 0.053 |
| 陕西商洛 | 0.130 | 0.789 | 3.250 | 0.231 |
| 广西 | 0.026 | 0.175 | 1.930 | 0.043 |
| 安徽 | 0.063 | 0.196 | 2.910 | 0.056 |
| 安徽(同仁堂) | 0.035 | 0.242 | 3.840 | 0.090 |

3 讨论

叶下珠主要成分为柯里拉京、老鹳草素、没食子酸和短叶苏木酚酸, 老鹳草素和柯里拉京为可水解鞣质, 用加热回流的方法提取容易使两种成分分解, 有文献报道用冷浸法提取, 但是冷浸法所需提取时间长, 故本实验采用超声提取法。同时分别考察了提取溶剂 (30%、50%、70%乙醇, 30%、50%、70%甲醇) 提取时间 (超声 30、40、50、60 min)

等对 4 种成分提取的影响, 最终优选出 50%乙醇超声提取 40 min 的方法。

11 批叶下珠药材中没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和短叶苏木酚酸 4 种成分测定的结果表明, 不同产地叶下珠药材中上述 4 种成分的质量分数变化较大, 没食子酸质量分数为 0.024%~0.168%, 柯里拉京质量分数为 0.165%~0.789%, 老鹳草素质量分数为 0.843%~4.630%, 短叶苏木酚酸质量分数为 0.043%~0.251%, 4 种成分质量分数高低大致规律为老鹳草素>柯里拉京>短叶苏木酚酸>没食子酸。

实验结果显示四川、广东、云南、陕西商洛 4 产地的叶下珠柯里拉京量较高, 福建、陕西安康、陕西商洛、安徽 4 产地的老鹳草素量较高, 河南、湖南、陕西商洛产地的没食子酸量较高, 四川、广东、陕西商洛产地的短叶苏木酚量较高。因此需要建立叶下珠药材质量控制和评价标准, 以保证叶下珠的安全与有效。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978.
- [2] 陈征途, 李凤仙, 邓文娣, 等. 不同品种、不同产地叶下珠属植物在体外细胞培养中抗 HBV 作用的研究 [J]. 中草药, 1997, 28(10): 616-618.
- [3] 陈压西, 郭树华, 张定凤, 等. 不同产地叶下珠及其联合用药抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(4): 225-227.
- [4] 范适, 左家哺, 易诚, 等. HPLC 法同时测定叶下珠胶囊中没食子酸和柯里拉京的含量 [J]. 湖南农业大学学报, 2007, 33(5): 636-638.
- [5] 张岚, 任丽娟, 李克明. 不同产地和采集季节叶下珠中鞣料云实精含量的比较 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 157-159.
- [6] 袁永兵, 张兰珍, 郭亚健, 等. RP-HPLC 法测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的含量 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(1): 56-58.