

HPLC 法同时测定连钱草中 4 个酚酸类成分的含量 *

邓渝^{1,2}, 陈友生^{3***}, 王茜², 曾顺^{1,2}, 吴西², 陈露^{1,2}, 周国平^{1,2**}

(1. 南昌大学, 南昌 330006; 2. 江西省药品检验检测研究院, 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029; 3. 解放军第九四医院, 南昌 330002)

摘要 目的: 建立同时测定连钱草中咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 4 个酚酸类成分含量的高效液相色谱法。方法: 采用 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)–0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 330 nm, 柱温 30 °C。结果: 咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 进样量分别在 0.034~0.85 μg ($r=0.999\ 8$)、0.014~0.35 μg ($r=0.999\ 8$)、0.524 5~13.112 5 μg ($r=0.999\ 8$) 和 0.008 4~0.21 μg ($r=0.999\ 9$) 范围内与峰面积呈现良好的线性关系; 平均回收率 ($n=3$) 分别为 98.2%~99.6% (RSD<0.8%)、97.6%~99.4% (RSD<1.3%)、100.2%~100.5% (RSD<1.0%) 和 98.1%~99.2% (RSD<1.1%); 8 批样品中咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 含量范围分别为 0.238~1.121、0.036~0.180、1.461~11.011 和 0.042~0.124 mg·g⁻¹。结论: 该方法可用于连钱草的质量控制。

关键词: 连钱草; 酚酸类化合物; 咖啡酸; 咖啡酰羟基乙酸; 迷迭香酸; 丹酚酸 A; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2018) 04-0643-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.04.12

HPLC simultaneous determination of four phenolic acids in Herba Glechomae *

DENG Yu^{1,2}, CHEN You-sheng^{3***}, WANG Xi², ZENG Shun^{1,2},
WU Xi², CHEN Lu^{1,2}, ZHOU Guo-ping^{1,2**}

(1. Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi Institute for Drug Control, Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China; 3. The 94th Hospital of PLA, Nanchang 330002, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for the simultaneous determination of four phenolic acids in Herba Glechomae including caffeic acid, caffeoyleglycolic acid, rosmarinic acid and salvianolic acid A. **Methods:** The CAPCELL PAK C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for separation. And the mobile phase consisted of acetonitrile (A)–0.1% formic acid (B) with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 330 nm and the column temperature was at 30 °C. **Results:** The linear range of caffeic acid, caffeoyleglycolic acid, rosmarinic acid and salvianolic acid A were 0.034–0.85 μg

* 南昌大学研究生创新专项(cx2016293); 江西省重点研发计划项目(20171BBG70104)

** 通信作者 陈友生 Tel: 18979165853; E-mail: cyspal@sina.com

周国平 Tel: 13870868633; E-mail: 13870868633@139.com

第一作者 Tel: 18270705969; E-mail: 869240248@qq.com

($r=0.999\ 8$), 0.014–0.35 μg ($r=0.999\ 8$), 0.524 5–13.112 5 μg ($r=0.999\ 8$) and 0.008 4–0.21 μg ($r=0.999\ 9$), respectively. The average recoveries ($n=3$) were 98.2%–99.6% ($\text{RSD}<0.8\%$), 97.6%–99.4% ($\text{RSD}<1.3\%$), 100.2%–100.5% ($\text{RSD}<1.0\%$) and 98.1%–99.2% ($\text{RSD}<1.1\%$), respectively. The contents of caffeic acid, caffeoxyglycolic acid, rosmarinic acid and salvianolic acid A in eight batches of samples were 0.238–1.121, 0.036–0.180, 1.461–11.011 and 0.042–0.124 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The method can be used to control the quality of the Herba Glechomae.

Keywords: Herba Glechomae; phenolic acids; caffeic acid; caffeoxyglycolic acid; rosmarinic acid; salvianolic acid A; assay; HPLC

连钱草为唇形科植物活血丹 *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. 的地上部分; 春至秋季采收, 除去杂质, 晒干; 质量标准收载于《中华人民共和国药典》2015年版一部, 味辛、微苦, 性微寒, 归肝、肾、膀胱经; 具有清热解毒, 利尿排石, 散瘀消肿的功效^[1], 临床用于热淋、石淋、湿热黄疸、疮痈肿痛、跌打损伤^[2-4]。因质量标准中无含量测定项, 本课题组从连钱草中分离得到化合物咖啡酰羟基乙酸和丹酚酸A。丹酚酸A是一种水溶性酚酸类化合物, 最早是由黎莲娘于丹参中分离得到^[5], 其具有显著的抗氧化、心肌缺血保护、抗血栓、神经保护、抗肝纤维化和防治糖尿病及并发症等药理活性^[6-8]; 咖啡酰羟基乙酸为一种天然的水溶性酚类化合物, 具有抗炎活性^[9-10]; 咖啡酸具有收缩增固微血管, 促进凝血因子功能, 升高白血球及血小板之功效, 用于白细胞、血小板减少症的治疗^[11-13]; 迷迭香酸有着广泛的生物学活性, 如抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、免疫调节、抗血栓和抗血小板凝聚以及对细胞的保护作用^[14-15]。目前尚未有文献报道采用HPLC法同时测定连钱草中上述4个成分的含量。因此, 本实验建立了采用反相高效液相色谱法同时测定连钱草中咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸A 4个酚酸类化合物含量的测定方法, 考察了8批连钱草药材中4个成分的含量差异, 为进一步完善连钱草药材的质量评价方法提供参考依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 安捷伦公司 Agilent 1260型高效液相色谱仪, 包括 G1311C 四元泵、在线脱气机、G1315D DAD、G1329B 自动进样器、LC1260 色谱工作站、G1316A 柱温箱; 赛多利斯公司 Sartorius BT25S 电子天平(十万分之一), Sartorius BSA124S-CW 电子天平(万分之一)。

1.2 试药 对照品咖啡酰羟基乙酸和丹酚酸A为本课题组自制, 通过¹H-NMR、¹³C-NMR、MS等手段确证了其结构, HPLC法检测纯度>98%(面积归一法); 对照品咖啡酸(批号 110885-200102)和迷迭香酸(批号 111871-201414)购自中国食品药品检定研究院, 纯度均>98%。水为娃哈哈饮用纯净水, 乙腈(Sigma公司)为色谱纯, 甲醇及乙醇(上海振兴化工一厂)、甲酸(西陇科学股份有限公司)为分析纯。8批连钱草药材样品均由江西济生制药厂提供。

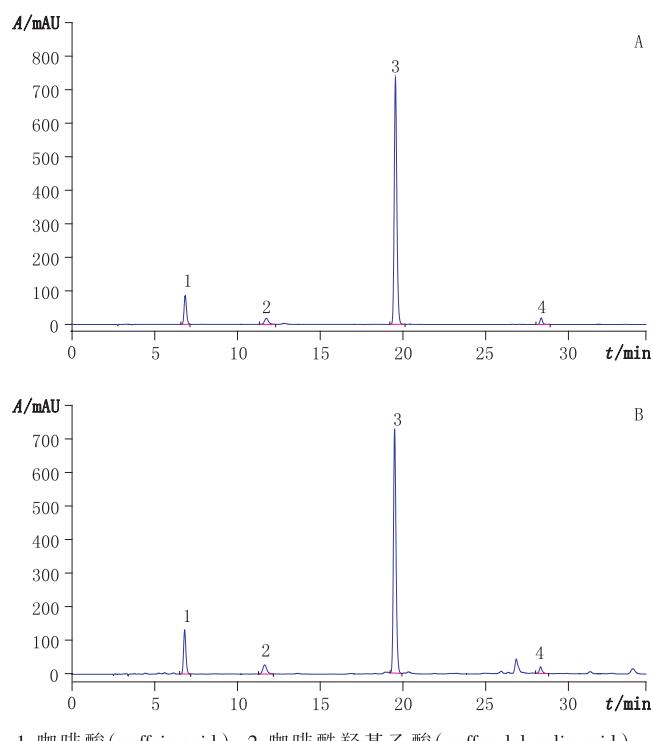
2 溶液的制备

2.1 混合对照品溶液 精密称取咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸A的对照品适量, 加甲醇制得质量浓度分别为0.034、0.014、0.524 5和0.008 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 即得。

2.2 供试品溶液 取连钱草粉末(过2号筛)约1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入70%乙醇水溶液50 mL, 密塞, 称量, 加热回流1 h, 放冷, 称量, 用70%乙醇水溶液补足减失的量, 摆匀, 滤过; 精密量取续滤液25 mL, 蒸干, 残渣加30 mL水使溶解, 置于分液漏斗中, 用乙酸乙酯萃取3次, 每次40 mL, 收集乙酸乙酯部分, 蒸干, 残渣加甲醇适量使溶解并转移至10 mL量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摆匀, 过0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

3 色谱条件

采用资生堂 CAPCELL PAK C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温30 °C, 以乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱(0~14 min, 19%A; 14~25 min, 19%A→34%A; 25~35 min, 34%A), 流速1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长330 nm, 进样量10 μL ; 在上述色谱条件下, 样品色谱中与各对照品峰对应的吸收峰的理论板数均不低于3 000, 色谱图见图1。



1. 咖啡酸 (caffeic acid) 2. 咖啡酰羟基乙酸 (caffeylglycolic acid)
3. 迷迭香酸 (rosmarinic acid) 4. 丹酚酸 A (salvianolic acid A)

图 1 混合对照品 (A)、S3 号连钱草药材 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and Glechomae Herba sample No. S3 (B)

4 方法学考察

4.1 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 1、2、5、10、15、25, 分别按“3”项下色谱条件进样分析, 以进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算, 得 4 个成分的回归方程, 结果见表 1。

4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 按“3”项下色谱条件连续进样 6 次, 依次测定峰面积, 结果咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.29%、0.60%、0.19%、1.1%, 表明仪器精密度良好。

4.3 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL , 按“3”项下色谱条件, 在 24 h 内于 0、1、2、4、8、12、24 h 分别进样测定, 结果咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 峰面积的 RSD ($n=7$) 分别为 0.38%、1.0%、0.60%、1.6%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.4 重复性试验 取同一批连钱草药材粉末(过 2 号筛)6 份, 各约 1 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“3”项下色谱条件进样测定, 测得咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 平均含量 ($n=6$) 分别为 0.326、0.145、4.553、0.084 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.53%、0.81%、0.48%、1.1%。

表 1 4 个成分的线性关系

Tab. 1 Linearity of 4 components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / μg
咖啡酸 (caffeic acid)	$Y=5043.1170X+22.9955$	0.9998	0.034~0.85
咖啡酰羟基乙酸 (caffeylglycolic acid)	$Y=4462.1678X+3.1200$	0.9998	0.014~0.35
迷迭香酸 (rosmarinic acid)	$Y=2940.7586X+266.8303$	0.9998	0.5245~13.1125
丹酚酸 A (salvianolic acid A)	$Y=4703.1853X-0.2486$	0.9999	0.0084~0.21

4.5 回收率试验 精密称取“4.4”项下已测知含量的连钱草药材粉末(过 2 号筛)9 份, 每份约 0.5 g, 3 份为一组, 精密称定; 分别精密加入对照品溶液适

量, 按“2.2”项下方法制成低、中、高 3 个浓度的供试溶液, 并按“3”项下色谱条件进样测定, 计算平均回收率, 结果见表 2。

表 2 回收率试验结果

Tab. 2 Results of recovery

成分 (component)	原重量 (original) / mg	加入量 (added) / mg	测得量 (measured) / mg	回收率 (recovery) / %	平均回收率 (average recovery) / %	RSD / %
咖啡酸 (caffeic acid)	0.1634	0.1304	0.2941	100.2	99.6	0.62
	0.1658	0.1304	0.2949	99.0		
	0.1654	0.1304	0.2951	99.5		
	0.1639	0.1630	0.3229	97.6	98.2	0.72
	0.1651	0.1630	0.3250	98.1		
	0.1641	0.1630	0.3254	99.0		
	0.1647	0.1957	0.3585	99.0	99.4	0.51
	0.1650	0.1957	0.3607	100.0		
	0.1643	0.1957	0.3583	99.1		

表 2(续)

成分 (component)	原有量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (measured)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD /%
咖啡酰羟基乙酸(caffeoyleglycolic acid)	0.072 7	0.058 0	0.130 7	99.7	99.4	0.66
	0.073 7	0.058 0	0.131 6	99.8		
	0.073 6	0.058 0	0.130 8	98.6		
	0.072 9	0.072 5	0.143 1	96.8	97.8	1.3
	0.073 4	0.072 5	0.143 9	97.2		
	0.073 0	0.072 5	0.144 9	99.2		
	0.073 2	0.087 0	0.157 2	96.6	97.6	1.0
	0.073 4	0.087 0	0.159 1	98.5		
	0.073 1	0.087 0	0.158 2	97.8		
	2.282 4	1.820 9	4.125 7	101.2	100.2	0.91
迷迭香酸(rosmarinic acid)	2.315 7	1.820 9	4.133 5	99.8		
	2.309 7	1.820 9	4.122 0	99.5		
	2.289 2	2.276 2	4.580 0	100.6	100.5	0.79
	2.305 6	2.276 2	4.573 9	99.6		
	2.291 5	2.276 2	4.595 3	101.2		
	2.299 7	2.731 4	5.031 3	100.0	100.5	0.40
	2.304 3	2.731 4	5.054 9	100.7		
	2.294 3	2.731 4	5.045 4	100.7		
	0.042 1	0.033 6	0.074 9	97.6	98.2	0.80
	0.042 7	0.033 6	0.075 6	97.9		
丹酚酸 A (salvianolic acid A)	0.042 6	0.033 6	0.075 9	99.1		
	0.042 2	0.042 0	0.083 5	98.3	99.2	0.97
	0.042 5	0.042 0	0.084 1	99.0		
	0.042 3	0.042 0	0.084 4	100.2		
	0.042 4	0.050 4	0.091 3	97.0	98.1	1.0
	0.042 5	0.050 4	0.092 4	99.0		
	0.042 3	0.050 4	0.091 8	98.2		

4.6 色谱柱耐用性试验 取同一批连钱草药材粉末(过2号筛)约1 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别采用资生堂 CAPCELL PAK C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、岛津 Inertsil ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、费罗门 Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)3种品牌的色谱柱,按“3”项下色谱条件进行测定,结果无明显差别。

5 样品含量测定

分别取不同产地的连钱草药材粉末(过2号筛),每批取2份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“3”项下色谱条件进行分析,测定峰面积,用外标法计算出咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 的含量,结果见表3。

表 3 样品含量测定结果(n=2)

Tab. 3 Results of content determination of samples

样品编号 (sample No.)	来源 (origin)	含量(content)/(mg·g ⁻¹)			
		咖啡酸 (caffeic acid)	咖啡酰羟基乙酸 (caffeoyleglycolic acid)	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	丹酚酸 A (salvianolic acid A)
S1	湖北麻城(Macheng, Hubei)	0.249	0.064	7.190	0.087
S2	安徽宜城(Yicheng, Anhui)	0.238	0.082	3.431	0.062
S3	安徽六安(Liuan, Anhui)	0.326	0.145	4.553	0.084
S4	安徽六安(Liuan, Anhui)	0.439	0.180	4.543	0.087
S5	安徽六安(Liuan, Anhui)	0.445	0.070	2.045	0.054
S6	安徽六安(Liuan, Anhui)	0.442	0.036	1.463	0.047
S7	河南信阳(Xinyang, Henan)	1.121	0.096	11.011	0.124
S8	江西南昌(Nanchang, Jiangxi)	0.265	0.140	2.226	0.042

6 讨论

6.1 检测波长的选择 应用DAD检测器在190~400 nm范围内对咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸A进行光谱扫描;结果表明,在330 nm波长附近4个成分吸收系数均最大,干扰少且稳定,故选择330 nm作为检测波长。

6.2 供试品溶液制备方法的考察 考察了回流提取法和超声提取法对咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸A含量测定的影响;结果显示,回流提取法提取更完全,故选择回流提取法。提取溶剂考察了水、甲醇溶液(30%甲醇水溶液、50%甲醇水溶液、70%甲醇水溶液、甲醇)、乙醇溶液(30%乙醇水溶液、50%乙醇水溶液、70%乙醇水溶液、乙醇);结果显示,采用70%乙醇水溶液提取时咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸A含量均较高。提取时间考察了0.5、1、1.5 h;结果显示1 h可提取完全。提取体积考察了50、100 mL;结果显示无明显差别,故将提取体积定为50 mL。

6.3 流动相的确定 考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液4个溶剂系统;结果显示,以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相,所得色谱峰峰形较好,分离效果最佳。

6.4 小结 本实验对8批不同产地连钱草药材中咖啡酸、咖啡酰羟基乙酸、迷迭香酸和丹酚酸A成分的含量进行测定;结果显示,各个产地含量差异较大,河南信阳的含量最高,相同产地的含量同样存在差异,由于收集的批次较少,对于哪个产地适合连钱草的种植,需要收集更多的产地及批次进一步研究,为种植连钱草药材选择出合适的种植产地。本实验所建立的定量方法色谱峰分离效果较好,基线较平,重现性较好。对进一步完善连钱草药材的质量评价方法提供参考依据。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2015年版.一部 [S]. 2015: 170
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 170
- [2] 田凤鸣,黄兆辉,王瀚,等.连钱草醇提取物体外抑菌活性的研究 [J].甘肃高师学报,2016,21(3):42
TIAN FM, HUANG ZH, WANG H, et al. The study of antibacterial activity of *Glechoma* alcohol extraction *in vitro* [J]. J Gansu Norm Coll, 21(3): 42
- [3] 陈利华,李欣.连钱草化学成分及药理作用研究 [J].亚太传统医药,2014,10(15):33
CHEN LH, LI X. Research of chemical constituents and pharmacological activities of Herba Glechomae [J]. Asia Pac Tradit Med, 2014, 10(15): 33
- [4] 贤景春,谢婷婷.连钱草总多酚提取及其抗氧化性分析 [J].湖北农业科学,2014,53(17):4139
XIAN JC, XIE TT. Extraction of total polyphenol in *Glechoma longituba* and its anti-oxidation [J]. Hubei Agric Sci, 2014, 53(17): 4139
- [5] LI LN, TAN R, CHEN WM. Salvianolic acid A, a new depside from roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Planta Med, 1984, 50(3): 227
- [6] WANG SB, TIAN S, YANG F, et al. Cardioprotective effect of salvianolic acid A on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 615(1-3): 125
- [7] 李磊,任建勋,林治荣,等.丹酚酸A不同给药途径对犬急性心肌缺血影响 [J].中国中药杂志,2016,41(5):910
LI L, REN JX, LIN ZR, et al. Effect of salvianolic acid A on anesthetized canine experimental myocardial infarction [J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(5): 910
- [8] 王木兰,潘永明,金敏,等.丹酚酸A对心肌缺血再灌注损伤大鼠心率变异性与心肌损伤的影响 [J].中国比较医学杂志,2016,26(11):24
WANG ML, PAN YM, JIN M, et al. Effects of salvianolic acid A on heart rate variability and myocardial injury in myocardial ischemia reperfusion injured rats [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(11): 24
- [9] CHOO YY, LEE S, NGUYEN PH, et al. Caffeoylglycolic acid methyl ester, a major constituent of sorghum, exhibits anti-inflammatory activity via the Nrf2/heme oxygenase pathway [J]. Rsc Adv, 2015, 5(23): 17786
- [10] NGUYEN PH, ZHAO BT, LEE JH, et al. Isolation of benzoic and cinnamic acid derivatives from the grains of *Sorghum bicolor* and their inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells [J]. Food Chem, 2015, 168: 512
- [11] 孙皓熠,郝宝燕,张浩超,等.咖啡酸研究概况 [J].食品与药品,2017,19(2):151
SUN HY, HAO BY, ZHANG HC, et al. Research situation of caffeic acid [J]. Food Drug, 2017, 19(2): 151
- [12] 范金波,蔡茜彤,冯叙桥,等.咖啡酸体外抗氧化活性的研究 [J].中国食品学报,2015,15(3):65
FAN JB, CAI XT, FENG XQ, et al. The study of antioxidant activity of caffeic acid *in vitro* [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2015, 15(3): 65
- [13] 王琦,蒋英蓝,刘婷,等.咖啡酸临床疗效研究进展 [J].世界最新医学信息文摘,2016,16(42):83
WANG Q, JIANG YL, LIU T, et al. Advances in clinical efficacy of caffeic acid [J]. World Latest Med Inf, 2016, 16(42): 83
- [14] 张玉杰,徐文清,沈秀.迷迭香酸的提取分离及药理学新发现 [J].中国新药杂志,2013,22(4):433
ZHANG YJ, XU WQ, SHEN X. New progress in the research of rosmarinic acid separation, purification and pharmacological actions [J]. Chin J New Drugs, 2013, 22(4): 433
- [15] 黄幼霞,黄荣桂,郑兴中.迷迭香酸药理作用的研究进展 [J].海峡药学,2010,22(5):17
HUANG YX, HUANG RG, ZHENG XZ. Progress in the research on the pharmacological act ions of rosmarinic acid [J]. Strait Pharm J, 2010, 22(5): 17

(本文于2017年9月4日收到)