

文章编号: 1674-8085 (2021) 03-0020-05

HPLC 法测定紫地榆中六种化学成分含量

庞 博¹, *周 萍¹, 王永宽¹, 耿 玲², 陈俊雅¹, 蓝 海¹

(1. 大理大学药学院, 云南, 大理 671000; 2. 大理大学基础医学院, 云南, 大理 671000)

摘 要: 对紫地榆药材中没食子酸、没食子酸甲酯、鞣料云实素、老鹳草素、鞣花酸、五没食子酰葡萄糖进行含量测定, 采用高效液相色谱法, Agilent ZORBAX SBAq-C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃。研究结果表明六个化学成分均线性关系良好, 平均回收率在 98.44%~102.03%之间, RSD在 0.96%~2.96%之间。该方法结果准确、重现性好, 为紫地榆药材质量控制提供了依据。

关键词: 紫地榆; HPLC; 含量测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI:10.3669/j.issn.1674-8085.2021.03.005

DETERMINATION OF SIX CHEMICAL COMPONENTS IN *GERANIUM STRICTIPES* R. KNUTH BY HPLC

PANG Bo¹, *ZHOU Ping¹, WANG Yong-kuan¹, GENG Ling², CHEN Jun-ya¹, LAN Hai¹

(1. School of Pharmacy, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China;

2. Pre-clinical College, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: The content of gallic acid, methyl gallate, tannin, geranium, ellagic acid, and pentagalloyl glucose in the medicinal materials of *Geranium strictipes* R. Knuth were determined by high performance liquid chromatography. The column is Agilent ZORBAX SBAq-C18 chromatography Column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), mobile phase is acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution (gradient elution), detection wavelength is 254 nm, flow rate is 1.0 mL/min, column temperature is 30 ℃. The results show that six chemical components all have good linear relationship, their average recovery rates and RSD are from 98.44% to 102.03%, and from 0.96% to 2.96%, respectively. The results of this method are accurate and reproducible, which provides a basis for the quality control of *G. strictipes*.

Key words: *Geranium strictipes* R. Knuth; HPLC; assay

紫地榆 (*Geranium strictipes* R. Knuth) 是牻牛儿苗科老鹳草属植物的根, 民间称隔山消^[1]。其主要分布于云南大理、永宁、中甸、永胜等地区, 药源丰富, 在云南的白族、彝族等少数民族地区中有广泛使用^[2]。现代药理研究发现其具有促消化、抗炎抗菌、抗病毒、抗艾滋病、止血凝血、抗氧化、

抗癌、防龋等多种药理作用^[3-10]。吕兴等^[11]发现紫地榆发挥体内抗炎药效作用是由于其多个成分共同作用的结果, 但未阐明抗炎活性物质。关于紫地榆化学成分, 蓝海等^[12]鉴定了其中没食子酸、原儿茶酸、鞣花酸, 杨国红等^[3]鉴定了β-1,4,6-三-O-没食子酰基-葡萄糖、β-1,6-二-O-没食子酰基葡萄糖、五

收稿日期: 2020-11-06; 修改日期: 2021-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81260512)

作者简介: 庞 博(1996-), 男, 重庆江津人, 硕士生, 主要从事药物分析研究, (E-mail: 18883373072@163.com);

*周 萍(1972-), 女, 云南大理人, 教授, 硕士, 硕士生导师, 主要从事药物化学分析研究, (E-mail: zhouping725@126.com);

王永宽(1995-), 男, 云南曲靖人, 硕士生, 主要从事药物化学分析研究, (E-mail: 2992136747@qq.com);

耿 玲(1984-), 女, 云南曲靖人, 实验师, 硕士, 主要从事中药抗炎免疫药理学研究, (E-mail: 402307026@qq.com);

陈俊雅(1986-), 男, 河南周口人, 实验师, 硕士, 主要从事药理学研究, (E-mail: 282950927@qq.com);

蓝 海(1964-), 女, 云南大理人, 教授, 硕士生导师, 主要从事药剂学研究, (E-mail: lanhai8696@126.com)。

倍子酸甲酯和(+)-儿茶素等 7 个成分，曹雨等^[13]利用UPLC-高分辨质谱鉴定了紫地榆醋酸乙酯提取部位的 21 个化学成分，首次报道了鞣料云实素、老鹳草素、五没食子酰葡萄糖等 13 个化合物，并利用分子对接与药理学实验结合证明鞣花酸和五没食子酰葡萄糖为紫地榆抑制神经酰胺酶（NA）的主要活性成分。

紫地榆化学成分的含量，骆婷婷^[14]等测定了其中总鞣质的含量，邹绒弟等^[15]测定了没食子酸和鞣花酸的含量，谢苗等^[16]测定了紫地榆乙酸乙酯、正丁醇和水三种提取物中没食子酸、鞣花酸、儿茶素、没食子酸甲酯的含量。杨晓珍等^[17]建立了紫地榆药材的HPLC指纹图谱，宏观地反映了紫地榆药材所含化学成分的种类与数量，但未能明确紫地榆药材的活性成分，不能全面反映药材质量。然而指纹图谱结果显示不同产地药材的主要活性成分含量相差较大，紫地榆药理作用是多个成分共同作用的结果^[18-21]，鞣料云实素、老鹳草素、五没食子酰葡萄糖等均具有抗炎等药理作用。为深入研究紫地榆的药效成分，全面评价紫地榆药材质量，本研究采用高效液相色谱法^[22-23]，对紫地榆药材中的没食子酸、没食子酸甲酯、鞣料云实素、老鹳草素、鞣花酸、五没食子酰葡萄糖六种成分的含量进行测定。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent1260 高效液相色谱仪（DAD检测器，美国安捷伦科技有限公司），色谱柱（Agilent ZORBAX SBAq-C₁₈，美国安捷伦科技有限公司），红外线灯泡（浙江七一照明公司 275 W），FA2004N电子分析天平（上海精密科学仪器有限公司），真空泵（巩义市平华仪器有限责任公司）。

1.2 试剂

对照品老鹳草素（批号wkq20041709，纯度≥98%）、1,2,3,4,6-O- 五没食子酰葡萄糖（批号wkq19011402，纯度≥98%）、鞣料云实素（批号wkq19051508，纯度≥98%）、没食子酸（批号wkq20010905，纯度≥98%）购自四川维克奇生物科技有限公司，鞣花酸（批号MUST-12110903，纯度≥98%）、没食子酸甲酯（批号B6761，纯度≥98%）购自成都曼思特生物科技有限公司。实验用水为哇

哈哈饮用纯净水（杭州娃哈哈集团有限公司）；乙腈、甲醇（色谱纯，北京百灵威科技有限公司）；其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

紫地榆 1 号样品购买自大理集盛堂药房，2 号~8 号样品购买自大理金宇药材市场，由大理大学药学院杨月娥老师鉴定为牻牛儿苗科老鹳草属植物紫地榆（*Geranium strictipes*R. Knuth）的根，药材自然干燥后粉碎，过 60 目筛备用。

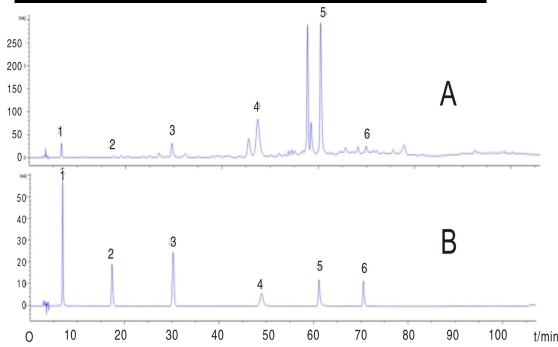
2 方法与结果

2.1 色谱条件

Aglient ZORBAX SBAq - C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相：乙腈-0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱，洗脱程序参考文献^[11]，做适当调整，结果见表 1。流速 1.0 mL/min，检测波长 254 nm，柱温 30 ℃，进样量 10 μL，色谱图见图 1。

表 1 HPLC图谱洗脱条件
Table 1 HPLC profile elution conditions

时间（min）	乙腈（%）	0.1%甲酸-水（%）
0	5	95
15	8	92
20	11	89
35	11	89
45	12	88
50	16	84
70	20	80
80	20	80
100	30	70



1. 没食子酸；2.没食子酸甲酯；3.鞣料云实素；
4.老鹳草素；5.鞣花酸；6.五没食子酰葡萄糖
A：紫地榆药材；B：对照品；

图 1 紫地榆药材及对照品HPLC图

Fig. 1 HPLC diagram of the medicinal material and the reference substance

2.2 供试品溶液的制备

精密称取紫地榆粉末 0.2 g于圆底烧瓶中，加入

50%乙醇溶液 30 mL，红外辅助提取法提取 15 min，提取液冷却至室温，过滤，定容至 50 mL，得供试品溶液，4℃保存。

2.3 对照品储备液的制备

精密称取没食子酸、没食子酸甲酯、鞣料云实素、老鹳草素、鞣花酸、五没食子酰葡萄糖各对照品适量，50%乙醇溶液溶解制成质量浓度为 1.045、1.035、0.995、2.000、2.005、1.960 mg/ mL 的对照品储备液，分别精密吸取各储备液 2.0、0.4、5.0、5.0、10.0、2.5 mL，加 50%乙醇溶液定容至 25 mL，得到混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系的考察

分别精密量取“2.3”项下混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中，加 50%乙醇溶液定容，摇匀，得到系列浓度的对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，以峰面积（Y）为纵坐标，对照品质量浓度（X）为横坐标进行线性回归，结果见表 2。结果表明，6 种成分线性关系良好。

表 2 6 种成分标准曲线

Table 2 Standard curve of 6 components

成分	标准曲线	r	线性范围 μg/mL
没食子酸	$Y=14.949 X-9.408 5$	0.999 4	4.18~41.8
没食子酸甲酯	$Y=17.06 X-0.481 6$	0.999 4	0.83~8.3
鞣料云实素	$Y=16.042 X-2.986$	0.999 5	9.95~99.5
老鹳草素	$Y=12.497 X-42.305$	0.999 2	20.05~200.5
鞣花酸	$Y=19.087 X-43.688$	0.999 5	40.1~401
五没食子酰葡萄糖	$Y=5.664 7 X-12.658$	0.999 6	9.8~98

2.4.2 仪器精密度试验

按“2.1”色谱条件，取混合对照品溶液重复进样 6 次，计算没食子酸、没食子酸甲酯、鞣料云实素、老鹳草素、鞣花酸、五没食子酰葡萄糖等 6 种成分的峰面积RSD值，分别为 0.62%、1.00%、0.43%、0.78%、1.86%、0.85%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验

取 1 号样品，按照“2.2”项下制备供试品溶液，在室温下放置 2、4、6、8、10、12、16、20、24、48 h 后，按“2.1”项下色谱条件检测，计算没食子酸、没食子酸甲酯、鞣料云实素、老鹳草素、鞣花酸、五没食子酰葡萄糖等 6 种成分峰面积的 RSD 值，分别为 1.09%、0.94%、0.53%、1.02%、1.85%、0.64%，表明供试品在 48 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验

精密称取 1 号样品约 0.2 g，平行 6 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，并按“2.1”项下色谱条件检测，计算没食子酸、没食子酸甲酯、鞣料云实素、老鹳草素、鞣花酸、五没食子酰葡萄糖等 6 种成分含量，分别为 2.85、0.33、4.64、30.42、34.26、6.03 mg/g，RSD 值为别为 1.37%、2.67%、1.68%、1.29%、1.14%、2.32%，表明方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验

精密称定已知含量的 1 号样品 5 份，每份约 0.1 g，分别加入没食子酸，没食子酸甲酯，鞣料云实素，老鹳草素，鞣花酸，五没食子酰葡萄糖对照品适量，按“2.2”项下方法制备，按“2.1”项下色谱条件测定。结果见表 3。

表 3 加样回收率结果（n=5）

Table 3 Sample recovery results

成分	称样量/g	样品中量/μg	加入量/μg	测得量/μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
没食子酸	0.1000	285.0	280.0	561.4	98.7	98.4	1.88
	0.1001	285.3	280.0	563.0	99.2		
	0.1004	286.1	280.0	564.4	99.4		
	0.1005	286.4	280.0	565.7	99.7		
	0.0998	284.4	280.0	551.0	95.2		
没食子酸甲酯	0.1000	33.00	30.00	63.8	102.8	102.0	2.96
	0.1001	33.03	30.00	64.4	104.6		
	0.1004	33.13	30.00	63.0	99.4		
	0.1005	33.17	30.00	62.7	98.3		
柯里拉京	0.0998	32.93	30.00	64.4	105.0	100.0	2.06
	0.1000	464.0	460.0	920.7	99.3		
	0.1001	464.5	460.0	931.3	101.5		
	0.1004	465.9	460.0	936.6	102.3		

续表 3 加样回收率结果 (n=5)

Table 3 Sample recovery results

成分	称样量/g	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
老鹳 草素	0.1005	466.3	460.0	910.7	97.0	99.4	1.53
	0.0998	463.1	460.0	923.5	100.1		
	0.1000	3042	3040	6033	98.4		
	0.1001	3045	3040	6071	99.5		
	0.1004	3054	3040	6088	99.8		
	0.1005	3057	3040	6023	97.6		
	0.0998	3031	3040	6123	101.6		
	0.1000	3426	3430	6915	101.7		
鞣花 酸	0.1001	3429	3430	6866	100.2	101.2	0.96
	0.1004	3440	3430	6928	101.7		
	0.1005	3443	3430	6954	102.4		
	0.0998	3419	3430	6857	100.2		
五没食 子酰葡 萄糖	0.1000	603.0	600.0	1204	100.2	99.8	2.64
	0.1001	603.6	600.0	1211	101.2		
	0.1004	605.4	600.0	1225	103.2		
	0.1005	606.0	600.0	1189	97.1		
	0.0998	601.8	600.0	1185	97.2		

2.5 样品的含量测定

法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，精密称取 1~8 号紫地榆样品，按“2.2”项下方平行 3 份，计算 6 种成分的含量，结果见表 4。

表 4 样品含量测定 (n=3)

Table 4 Determination of sample content

编号	没食子酸 (mg/g)	没食子酸甲酯 (mg/g)	鞣料云实素 (mg/g)	老鹳草素 (mg/g)	鞣花酸(mg/g)	五没食子酰葡萄糖 (mg/g)
1	2.85	0.33	4.64	30.42	34.26	6.03
2	1.50	0.28	5.62	32.05	30.79	6.67
3	1.94	0.17	6.39	24.67	32.49	5.88
4	1.72	0.17	2.92	44.02	26.89	5.32
5	1.60	0.22	5.44	36.28	23.87	11.74
6	1.99	0.16	4.91	42.70	33.15	8.65
7	2.26	0.15	4.71	26.52	20.42	5.96
8	2.09	0.26	4.58	28.27	52.89	4.45

3 讨论

本实验采用红外辅助提取法提取紫地榆药材，与超声法、加热回流法、冷浸法相比，提取效率更高，提取效果更好，红外辅助提取法另有文章发表。

在预实验中考察了提取溶剂（水、甲醇、乙醇、50%甲醇、50%乙醇），结果显示，50%甲醇、50%乙醇提取效果相近，提取率较高，综合考虑选择用50%乙醇进行提取。检测波长的选择，进行各单体化合物紫外光谱扫描，得各物质最大吸收波长，没食子酸的最大吸收波长为 217 nm，没食子酸甲酯波

长为 202 nm，鞣料云实素波长为 221 nm，老鹳草素波长为 263 nm，鞣花酸波长为 254 nm，五没食子酰葡萄糖波长为 270 nm，考察不同检测波长，结果在波长 254 nm时，紫地榆所得色谱信息丰富，各峰峰形和分离度较好，6 个目标成分的峰面积也较高，因此，选择 254 nm作为检测波长。

本实验色谱条件在文献[11]基础上做适当调整，同时测定了紫地榆药材中六种成分的含量，已报道的儿茶素在本实验的色谱图上无法积分，故没进行测定。含量测定结果显示，老鹳草素、鞣花酸在药材中含量较高，没食子酸甲酯含量偏低，与紫地榆已报道的化学成分含量相比，鞣花酸含量显著

提高。不同批次药材中各成分含量差异较大,说明市售紫地榆药材质量参差不齐,这可能与紫地榆的种植环境、采收时间等因素有关,药材资源的研究有待进一步深入。本实验建立同时测定紫地榆中六种成分的方法,经方法学验证,方法结果准确,重现性好,为紫地榆药材的质量的评价及药效物质的阐明提供参考依据。

参考文献:

- [1] 云南省卫生局革命委员会. 云南中草药[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1971:796-797.
- [2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983:624.
- [3] 杨国红,陈道峰.紫地榆的化学成分及其抗艾滋病病毒活性[J]. 中草药, 2007, 38(3):352-354.
- [4] 孙闪闪,耿树琼,李银蕊,等.白族药紫地榆体内镇痛抗炎作用初步研究[J].中国医院药学杂志, 2019, 39(12):1223-1226.
- [5] 封烨,王金燕,南彦东,等.紫地榆提取物的止血作用[J].中成药,2017,39(10):2153-2155.
- [6] 罗胤珠,蓝海.防龋药物的研究进展[J].中医药导报, 2017, 23(16):115-117.
- [7] 耿玲,李洪文,陈俊雅,等.隔山消对小鼠小肠推进作用的研究[J].大理学院学报,2015,14(04):5-7.
- [8] 耿玲,陈俊雅,李洪文,等.紫地榆提取物体外抗菌活性研究[J].大理学院学报,2014,13(10):14-17.
- [9] 杨晓珍,蓝海.民族药紫地榆化学成分及其抗菌作用的研究进展[J].抗感染药学,2016,13(01):1-3.
- [10] 罗胤珠,蓝海.防龋药物的研究进展[J].中医药导报, 2017,23(16):115-117.
- [11] 吕兴,卢建升,耿树琼,等.紫地榆不同极性部位抗炎活性与HPLC图谱相关性研究[J].大理大学学报,2020,5(2):31-37.
- [12] 蓝海,李龙星,杨永寿.隔山消的化学成分研究[J].大理医学院学报, 2001,10(4):13-14.
- [13] 曹雨,李金花,刘海波,等.隔山消抗神经氨酸酶活性及化学成分研究[J].中草药, 2017, 48 (21) :4485-4492.
- [14] 骆婷婷,蓝海,张海珠,等.紫地榆中总鞣质的含量测定[J].大理学院学报,2014,13(2):12-14.
- [15] 邹绒弟,骆婷婷,苏敏,等.紫地榆中鞣花酸和没食子酸含量测定[J].大理大学学报, 2016, 1(6):47-49.
- [16] 谢苗,杨淋,杨晓珍,等.HPLC法同时测定紫地榆3种提取物中4种成分[J].中成药, 2016, 38 (5):1066-1070.
- [17] 杨晓珍,谢苗,王燕,等.紫地榆HPLC指纹图谱建立及模式识别[J].中成药,2018,40(2):383-387.
- [18] 裴玲,张海霞,张岩.没食子酸及其衍生物抗氧化活性的理论研究[J].井冈山大学学报:自然科学版, 2015, 36(4):27-33.
- [19] 李倩,买吾拉江·阿不都热衣木.老鹳草素药理研究进展[J].中国中医药信息杂志,2016,23(8):125-128.
- [20] 李惠晨,胡伟,丁井永.五没食子酰基葡萄糖抗肿瘤的作用研究进展[J].现代肿瘤医学,2014,22(9):2255-2258.
- [21] 陈一燕,陈崇宏.鞣料云实素药理活性研究进展[J].中国现代应用药学,2010,27(5):390-394.
- [22] 董晶,梁兆昌,陈海芳,等.HPLC法同时测定不同采收期江枳壳中辛弗林和N-甲基酪胺的含量[J].井冈山大学学报:自然科学版,2016,37(2):92-96.
- [23] 毛玲,张秀秀,韦国兵.HPLC法测定吴茱萸中吴茱萸碱和吴茱萸次碱的含量[J].井冈山大学学报:自然科学版, 2016,37(2):97-101.