

### 3.5 色谱柱对手性拆分的影响

选用 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 100A 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)和依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)时, 爱维莫潘与 3 个异构体的分离度良好, 柱效好, 主峰峰对称性好, 故选择十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂。

### 4 结论

本研究以 β-环糊精为手性流动相添加剂拆分爱维莫潘与其异构体, 通过优化色谱条件, 建立爱维莫潘的 HPLC 手性拆分分析法。经过方法学验证, 该法专属性强, 灵敏度高, 重复性良好, 耐用性好, 且方法简便快捷, 使用成本低廉, 与

使用手性色谱柱分析方法相比具有明显优势。

### REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 5, 19-22, 29, 194, 204.
- [2] Manual of National Drug Standard Operating(国家药品标准工作手册)[S]. 2013: 157-161.
- [3] 〈ICH〉 Quality Management Compilation(《ICH》质量管理文件汇编) [S]. 2010: 50-59.
- [4] LU T G, YANG M J. Separation of paroxetine and its intermediate enantiomers by High Performance Liquid Chromatography using carboxymethyl-β-cyclodextrin as chiral mobile phase additive [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2007(6): 830-833.

收稿日期: 2014-02-12

## HPLC 同时测定雪松松针中没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的含量

邓毅<sup>1</sup>, 宁红霞<sup>1</sup>, 沈薇<sup>2</sup>, 石晓峰<sup>1,2\*</sup>, 李师<sup>1</sup>, 雷艳萍<sup>1</sup>(1.甘肃中医学院药学院, 兰州 730030; 2.甘肃省医学科学研究院药物研究所, 兰州 730050)

**摘要:**目的 建立同时测定雪松松针中没食子酸、原儿茶酸和儿茶素含量的高效液相色谱法。方法 采用 TC-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~8 min, 10%A, 8~45 min, 10%→30%A), 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长: 280 nm, 柱温: 25 °C。结果 雪松松针中没食子酸、原儿茶酸和儿茶素依次在 0.4~4.0, 4~40 和 2~20 μg·mL<sup>-1</sup> 内呈良好线性关系, 相关系数 *r* 分别为 0.999 8, 0.999 9, 0.999 9, 加样回收率(*n*=9)分别为 104.7%, 99.5% 和 105.8%。结论 该方法适用于雪松松针中没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的含量测定, 方法简单、快速、高效。

**关键词:** 雪松松针; 没食子酸; 原儿茶酸; 儿茶素; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)09-1104-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.09.018

### Simultaneous Determination of Gallic Acid, Protocatechuic Acid and Catechin in Pine Needles of *Cedrus Deodara* by HPLC

DENG Yi<sup>1</sup>, NING Hongxia<sup>1</sup>, SHEN Wei<sup>2</sup>, SHI Xiaofeng<sup>1,2\*</sup>, LI Shi<sup>1</sup>, LEI Yanping<sup>1</sup>(1. Pharmacy School of Gansu University of TCM, Lanzhou 730030, China; 2. Institute of Materia Medica, Gansu Academy of Medical Science, Lanzhou 730050, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To develop an HPLC method for simultaneous determination of gallic acid, protocatechuic acid and catechin components in pine needles of *Cedrus deodara*. **METHODS** Agilent TC-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted. The mobile phase was methanol (A)-0.2% phosphoric acid (B) with gradient elution (0~8 min, 10%A; 8~45 min, 10%→30%A) at the flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 25 °C and the detection wavelength was 280 nm. **RESULTS** Calibration curves were found to be linear in the ranges of 0.4~4.0 μg·mL<sup>-1</sup> for gallic acid, 4~40 μg·mL<sup>-1</sup> for protocatechuic acid and 2~20 μg·mL<sup>-1</sup> for catechin. The correlation coefficients were 0.999 8, 0.999 9, 0.999 9. The average recoveries(*n*=9) of gallic acid, protocatechuic acid and catechin were 104.7%, 99.5% and 105.8%. **CONCLUSION** The

**基金项目:** 甘肃省科技支撑计划项目(1204FKCA152); 甘肃省高校中(藏)药化学与质量研究省级重点实验室开放基金项目(zzy-2011-05); 甘肃省卫生厅中医药科研项目(GZK-2012-29)

**作者简介:** 邓毅, 男, 硕士, 教授, 博导 Tel: (0931)8765350 E-mail: dengyi@gszy.edu.cn \*通信作者: 石晓峰, 男, 主任药师 Tel: (0931)2615440 E-mail: shixiaofeng2005@sina.com

method is simple, rapid and efficient, which is suitable for the determination of gallic acid, protocatechuic acid and catechin components in pine needles of *Cedrus deodara*.

**KEY WORDS:** pine needles of *Cedrus deodara*; gallic acid; protocatechuic acid; catechin; contents determination; HPLC

雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don 是松科 *Pianaceae* 植物雪松属 *Cedrus Trew* 树种的泛称, 又称喜马拉雅雪松、喜马拉雅杉、香柏, 资源丰富, 分布广泛。传统中医认为雪松具有祛风活络、消肿生肌、止血活血功效。现代药理研究表明, 雪松具有抗肿瘤、抗氧化、抗褐变、抗菌、抗病毒等多种药理活性<sup>[1]</sup>。本实验室曾对雪松松针的化学成分进行了系统研究, 发现雪松松针中的主要化学成分为萜类、黄酮类、苯丙素类、酚酸类以及甾体类化合物等<sup>[2-5]</sup>, 其中分离得到的酚酸类化合物有没食子酸和原儿茶酸等。有关雪松松针中酚酸类化合物的含量测定方法目前尚无文献报道, 为此, 本实验参考文献<sup>[6-8]</sup>, 采用高效液相色谱法, 建立同时测定雪松松针中 3 种酚酸类化合物没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的含量测定方法, 为雪松松针的进一步开发利用提供参考。

## 1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配置四元梯度泵, 可变波长扫描紫外检测器, Agilent 1100 化学工作站, 标准手动进样器(美国 Agilent 公司); AE260 万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); CP225D 型十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司); KQ2200B 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

没食子酸对照品(批号: 110831-200803, 纯度: 90.1%)、原儿茶酸对照品(批号: 110809-201205, 纯度: 99.9%)、儿茶素对照品(批号: 110877-质 201203, 纯度: 97.2%)均由中国食品药品检定研究院提供; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为纯净水。

雪松松针于 2008 年 6 月采自甘肃省兰州市, 经甘肃省医学科学研究院何福江研究员、石长栓副研究员鉴定为松科雪松属植物雪松 *Cedrus deodara* (Roxb.) G. Don 的针叶。

## 2 方法和结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 对照品溶液** 精密称取对照品没食子酸、原儿茶酸和儿茶素各 5.0 mg, 分别用 50%甲醇溶液溶解并稀释成没食子酸、原儿茶酸和儿茶素浓度均为  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品储备液。分别精密吸

取上述对照品储备液 0.4, 4, 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 50%甲醇定容, 摇匀, 制成没食子酸、原儿茶酸和儿茶素浓度分别为 8, 80,  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液。

**2.1.2 供试品溶液** 精密称取雪松松针干燥粉末(20 目)1.0 g, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 50%甲醇溶液 40 mL,  $60^\circ\text{C}$  条件下超声(消耗功率: 160 W, 加热功率: 260 W, 频率: 59 kHz)处理 60 min, 放置至室温, 用 50%甲醇溶液定容, 摇匀,  $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 25 min, 取上清液用  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent TC- $\text{C}_{18}$ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~8 min, 10%A; 8~45 min, 10% $\rightarrow$ 30%A); 流速:  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 检测波长: 280 nm; 柱温:  $25^\circ\text{C}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

### 2.3 系统适用性试验

分别精密吸取混合对照品溶液 1.5 mL, 稀释定容至 5 mL 量瓶中得没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的浓度分别为 2.4, 24,  $12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。精密吸取上述溶液和“2.1.2”项下供试品溶液各 20  $\mu\text{L}$ , 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 结果样品中没食子酸、原儿茶酸和儿茶素色谱峰的保留时间分别为 7.6, 15.6 和 26.9 min。这 3 个峰与其相邻色谱峰的分度度 $>1.5$ , 理论板数以没食子酸计 $\geq 4\ 000$ , 色谱图见图 1。

### 2.4 方法学验证

**2.4.1 线性关系考察** 依次精密吸取混合对照品溶液 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mL 至 5 mL 量瓶中, 甲醇定容, 摇匀, 配制成系列浓度对照品溶液; 按“2.2”项下色谱条件分别进样 20  $\mu\text{L}$  测定峰面积。以浓度( $X, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )为横坐标, 峰面积( $Y$ )为纵坐标, 绘制标准曲线。得到没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的回归方程分别为:  $Y=49.480X+2.289, r=0.999\ 8$ ;  $Y=34.566X+3.866, r=0.999\ 9$ ;  $Y=12.294X+0.681, r=0.999\ 9$ 。

结果表明, 没食子酸、原儿茶酸和儿茶素浓度分别在 0.4~4.0, 4~40 和 2~20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内呈良好的线性关系。

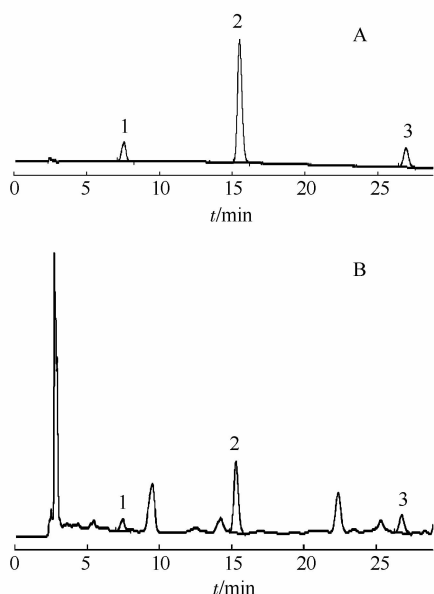


图1 高效液相色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-没食子酸; 2-原儿茶酸; 3-儿茶素。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference standard; B-sample; 1-gallic acid; 2-protocatechuic acid; 3-catechin.

**2.4.2 仪器精密度试验** 精密吸取新配制的没食子酸、原儿茶酸和儿茶素浓度分别为 2.4, 24, 12  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样 20  $\mu\text{L}$ , 重复试验 6 次, 测得没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的 RSD 分别为 1.95%, 0.63% 和 0.71%, 保留时间的 RSD 分别为 1.41%, 1.44% 和 1.03%, 表明该仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性试验** 精密称取雪松松针粉末(20 目), 按“2.1.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 于 0, 2, 4, 6, 8, 16, 20, 24 h 分别进样 20  $\mu\text{L}$ , 测定峰面积, 结果没食子酸、原儿茶酸和儿茶素峰面积的 RSD 分别为 2.78%, 0.70% 和 1.99%( $n=9$ )。表明雪松松针供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.4.4 重复性试验** 精密称取同一批雪松松针粉末(20 目)6 份, 按“2.1.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件分别进样 20  $\mu\text{L}$ , 测得没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的平均含量分别为 0.049, 0.473 和 0.374  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , RSD 分别为 2.00%, 1.97% 和 2.21%, 表明本方法重复性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 精密称取已知含量的雪松松针粉末(20~40 目)约 0.5 g, 共 9 份, 置 50 mL 量瓶中, 分别以低、中、高浓度加入没食子酸、原儿茶酸和儿茶素的对照品储备液适量, 按

“2.1.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件下分别进样 20  $\mu\text{L}$  测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 回收率试验结果( $n=9$ )

Tab. 1 Results of the recovery experiments( $n=9$ )

| 成分   | 样品含量/ $\mu\text{g}$ | 加入量/ $\mu\text{g}$ | 测得量/ $\mu\text{g}$ | 回收率/%  | 平均回收率/% | RSD% |
|------|---------------------|--------------------|--------------------|--------|---------|------|
| 没食子酸 | 24.61               | 20.19              | 45.50              | 103.47 | 104.7   | 2.45 |
|      | 24.61               | 20.19              | 46.70              | 109.41 |         |      |
|      | 24.61               | 20.19              | 45.50              | 103.47 |         |      |
|      | 24.61               | 25.24              | 50.00              | 100.61 |         |      |
|      | 24.61               | 25.24              | 51.50              | 106.55 |         |      |
|      | 24.61               | 25.24              | 51.00              | 104.57 |         |      |
|      | 24.61               | 30.28              | 57.00              | 106.95 |         |      |
|      | 24.61               | 30.28              | 56.00              | 103.65 |         |      |
|      | 24.61               | 30.28              | 56.00              | 103.65 |         |      |
|      | 24.61               | 30.28              | 56.00              | 103.65 |         |      |
| 原儿茶酸 | 236.74              | 181.08             | 418.00             | 100.10 | 99.5    | 2.02 |
|      | 236.74              | 181.08             | 422.00             | 102.31 |         |      |
|      | 236.74              | 181.08             | 419.50             | 100.93 |         |      |
|      | 236.74              | 226.35             | 459.50             | 98.41  |         |      |
|      | 236.74              | 226.35             | 460.50             | 98.86  |         |      |
|      | 236.74              | 226.35             | 461.50             | 99.30  |         |      |
|      | 236.74              | 271.62             | 501.50             | 97.47  |         |      |
|      | 236.74              | 271.62             | 498.50             | 96.37  |         |      |
|      | 236.74              | 271.62             | 514.00             | 102.08 |         |      |
|      | 236.74              | 271.62             | 514.00             | 102.08 |         |      |
| 儿茶素  | 186.99              | 161.60             | 357.50             | 105.51 | 105.8   | 2.55 |
|      | 186.99              | 161.60             | 363.50             | 109.23 |         |      |
|      | 186.99              | 161.60             | 358.00             | 105.82 |         |      |
|      | 186.99              | 202.00             | 403.00             | 106.94 |         |      |
|      | 186.99              | 202.00             | 395.00             | 102.98 |         |      |
|      | 186.99              | 202.00             | 403.00             | 106.94 |         |      |
|      | 186.99              | 242.40             | 450.00             | 108.50 |         |      |
|      | 186.99              | 242.40             | 444.50             | 106.23 |         |      |
|      | 186.99              | 242.40             | 430.50             | 100.46 |         |      |
|      | 186.99              | 242.40             | 430.50             | 100.46 |         |      |

## 2.5 样品含量的测定

精密称取不同批的雪松松针粉末(20 目筛)3 份, 按“2.1.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件分别进样 20  $\mu\text{L}$  进行测定, 计算雪松松针中 3 个分析物的含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果( $n=3$ )

Tab. 2 Results of content determination of samples( $n=3$ )

| 样品批号     | 含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ |         |         |
|----------|-----------------------------------|---------|---------|
|          | 没食子酸                              | 原儿茶     | 儿茶素     |
| 20131202 | 0.046 0                           | 0.466 0 | 0.396 2 |
| 20131204 | 0.046 6                           | 0.463 4 | 0.399 3 |
| 20131206 | 0.046 3                           | 0.474 1 | 0.380 6 |

### 3 讨论

采用紫外分光光度法分别对酚酸类化合物没食子酸、原儿茶酸和儿茶素在 200~400 nm 内进行全波长扫描, 得到 3 种成分的最大吸收波长均为 280 nm, 故本实验采用 280 nm 波长对雪松松针成分进行检测。

分别考察流动相系统、柱温、流速等色谱条件, 对甲醇-磷酸水溶液和甲醇-冰醋酸水溶液系统的分离效果考察发现, 甲醇-磷酸的分离效果较好, 并优选确定甲醇-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱时分离效果最佳。按照优化后的色谱条件, 3 种酚酸类成分色谱峰的分离度较好, 可满足同时测定的要求。

雪松松针是一种再生速度快, 可一年四季采收, 可持续利用的再生资源, 极易获取, 除少量药用外大多任其自生自灭。Zeng 等<sup>[9]</sup>研究表明, 雪松松针水溶性提取物中总酚含量每克相当于(31.4±0.53)mg 没食子酸, 总黄酮含量每克相当于(23.1±0.79)mg 芦丁, 雪松松针水溶性提取物显示出强大的抗氧化活性。而植物多酚具有抗肿瘤、抗病毒、抗衰老等方面的生理活性, 这些生理活性与其具有的清除自由基和抗氧化性能密切相关<sup>[10]</sup>。雪松松针酚酸类化合物作为植物多酚的一种, 同样具有多种生理功能, 但是目前国内外对其研究尚少。因此, 对雪松松针多酚进行深入研究具有极其重要的意义。

### REFERENCES

- [1] BAI Z H, SHI X F, LIU D Y, et al. Study on the chemical constituents and pharmacological activities from pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *China Pharm*(中国药师), 2012, 15(12): 1791-1793.
- [2] LIU D Y, SHI X F, LI C, et al. Chemical constituents of flavonoids in pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2011, 42(4): 631-633.
- [3] ZHANG J M, SHI X F, LI C, et al. Study on the chemical constituents from pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2010, 33(2): 215-218.
- [4] ZHANG J M, SHI X F, LI C, et al. Study on the chemical constituents from pine needles of *Cedrus deodara* (II) [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2010, 33(7): 1084-1086.
- [5] SHI X F, BAI Z H, LIU D Y, et al. Study on the chemical constituent from the dichloromethane extract of the pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2012, 35(2): 404-406.
- [6] TAN L, DONG Q, XIAO Y C, et al. Application of RP-HPLC method for simultaneous determination of five phenolic acids components in *Lycii Fructus* [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2013, 33(3): 376-381, 394.
- [7] ZHAO X Y, YIN H B. Simultaneous determination of four acids active compounds in *Erodium stephanianum* by RP-HPLC [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2011, 36(22): 3137-3140.
- [8] XUE G P, XING J G, ZHAO Y, et al. Study on extraction process of Compound Xuelian Cataplastm [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2012, 29(2): 129-133.
- [9] ZENG W C, JIA L R, ZHANG Y, et al. Antibrowning and antimicrobial activities of water-soluble extract from pine needles of *Cedrus deodara* [J]. *J Food Sci*, 2011, 76(2): C318-323.
- [10] SONG L J, DI Y. The significance and development trend in research of plant polyphenols [J]. *Prog Chem*(化学进展), 2004, 5(2): 162-164.

收稿日期: 2014-02-20

## 原子吸收光谱法测定不同批次、不同产地金银花中镉的含量

孟建荣<sup>1</sup>, 徐强<sup>1,2\*</sup>, 王溶溶<sup>2</sup>(1.杭州华东中药饮片有限公司, 杭州 311301; 2.浙江省中药研究所有限公司, 杭州 310023)

**摘要:** 目的 采用石墨炉原子吸收法(GFAAS)检测中药材金银花中微量重金属镉的含量。方法 考察灰化/原子化温度等因素对测定的影响, 建立石墨炉原子吸收光谱法测定金银花中微量镉的方法。结果 发现金银花中均检出镉(Cd), 其中有 3 批超出中国药典 2010 版一部所规定的限度。结论 方法简便快速, 重复性好, 灵敏度、准确度高。

**关键词:** 石墨炉原子吸收光谱法; 镉; 金银花

中图分类号: R917.102

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)09-1107-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.09.019

### Determination of Cd in Honeysuckles by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry

MENG Jianrong<sup>1</sup>, XU Qiang<sup>1,2\*</sup>, WANG Rongrong<sup>2</sup>(1. *Huadong Traditional Chinese Medicine Decoction Pieces Co.*,

作者简介: 孟建荣, 男, 主管中药师 Tel: (0571)61071586  
(0571)85229644 E-mail: xuqer@163.com

E-mail: hzhdy@126.com \*通信作者: 徐强, 男, 高工 Tel: