

HPLC法同时测定火绒草中4种有效成分的含量

赵致臻*(张掖市人民医院,甘肃 张掖 734000)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2554-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.21

摘要 目的:建立同时测定火绒草中4种有效成分咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷和槲皮素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为355 nm,柱温为25 ℃。结果:咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷和槲皮素的质量浓度分别在0.015 2~0.176 0、0.011 0~0.177 0、0.029 6~0.148 0、0.004 0~0.106 0 mg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 7、0.999 7、0.999 6、0.999 9);精密性、重复性、稳定性试验的RSD均<3%;平均加样回收率分别为99.47%、100.77%、99.75%、99.92%,RSD分别为1.04%、1.65%、1.61%、1.02%(n 均为6)。结论:该方法简便、灵敏、准确,可为火绒草药材的质量控制提供参考依据。

关键词 高效液相色谱法;火绒草;咖啡酸;阿魏酸;木犀草苷;槲皮素;含量测定

Simultaneous Determination of 4 Effective Components in *Leontopodium leontopodioides* by HPLC

ZHAO Zhi-zhen (People's Hospital of Zhangye, Gansu Zhangye 734000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for content determination of 4 effective components (caffeic acid, ferulic acid, luteoloside and quercetin) in *Leontopodium leontopodioides*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 355 nm and the column temperature was maintained at 25 ℃. RESULTS: The linear ranges of caffeic acid, ferulic acid, luteoloside and quercetin were 0.015 2-0.176 0 mg/ml ($r=0.999 7$), 0.011 0-0.177 0 mg/ml ($r=0.999 7$), 0.029 6-0.148 0 mg/ml ($r=0.999 6$), 0.004 0-0.106 0 mg/ml ($r=0.999 9$), respectively. RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 3%. The average recoveries were 99.47% (RSD=1.04%), 100.77% (RSD=1.65%), 99.75% (RSD=1.61%) and 99.92% (RSD=1.02%), respectively ($n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and accurate, and it provides reference for quality control of *L. leontopodioides*.

KEY WORDS HPLC; *Leontopodium leontopodioides*; Caffeic acid; Ferulic acid; Luteoloside; Quercetin; Content determination

火绒草 *Leontopodium leontopodioides* (Willd.) Beauv. 又名雪绒花、薄雪草,为菊科火绒草属的多年生草本高山植物,原产于西欧,在我国东北、华北也有广泛分布,是北方民间常用中草药之一。其性寒,味微苦,入肾、膀胱二经,具有清热凉血、益肾利水的功效,临床常用于治疗急慢性肾炎、蛋白尿、血尿、糖尿病等^[1-2]。现代药理学研究发现,火绒草含有多种药理学活性物质,包括挥发油类、黄酮类、萜类、甾体化合物以及微量元素等。其中,黄酮类化合物木犀草苷和槲皮素具有多方面的生物活性,如抗脂质过氧化、抗衰老、清除自由基、降低血脂及胆固醇、抗菌消炎、抗病毒、增强免疫功能等;有机酸如阿魏酸和咖啡酸则具有增加冠脉血流量、保护缺血心肌、抗氧化、抗炎等作用^[3-5]。尽管火绒草的活性成分已经比较明确,但其含量测定方法鲜见报道。因此,笔者建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定火绒草中4种有效成分——咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷和槲皮素含量的方法,为有效控制该药材质量及合理利用该植物资源提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括G1379A型真空脱气机、G1311A型四元梯度泵、G1313A型自动进样器、G1315A型柱恒温箱、

G1315B型二极管阵列检测器、B04.03化学工作站(美国Agilent公司);BP211D型电子天平(德国Sartorius公司);HN101-3A型电热鼓风干燥箱(南通沪南科学仪器有限公司);DK-98-1型电热恒温水浴箱(天津市泰斯特仪器有限公司);KQ-3200型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);SHB-III A型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.2 试剂

木犀草苷、咖啡酸、阿魏酸、槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111720-200603、110885-200102、111581-200302、100081-200406);乙腈为色谱纯,水为纯净水,其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

火绒草药材为沈阳、鞍山、本溪、丹东等地市售品,均经成都中医药大学魏德荣教授鉴定为菊科火绒草属火绒草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:355 nm;柱温:25 ℃。色谱见图1。

2.2 对照品贮备液的制备

分别精密称取适量咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷、槲皮素对照品,置于50 ml棕色量瓶中,加一定量的甲醇超声(功率:200

* 副主任药师。研究方向:中药研制与开发、药学管理。电话:0936-8215023。E-mail: zhaozhizhen1212@163.com

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process of mobile phase

| 时间,min | 流动相A,% | 流动相B,% |
|--------|--------|--------|
| 0~20 | 12→15 | 88→85 |
| >20~30 | 15→25 | 85→75 |
| >30~35 | 25→40 | 75→60 |
| >35~41 | 40 | 60 |
| >41~43 | 40→12 | 60→88 |

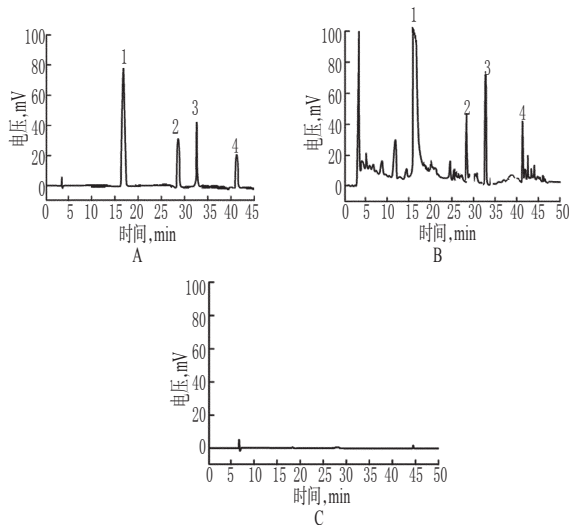


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.咖啡酸;2.阿魏酸;3.木犀草苷;4.槲皮素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1. caffeic acid; 2. ferulic acid; 3. luteoloside; 4. quercetin

W, 频率: 40 kHz) 溶解, 冷却至室温, 再用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得4个待测组分的对照品贮备液, 质量浓度依次为0.201 7、0.194 8、0.183 4、0.200 3 mg/ml。

2.3 供试品溶液的制备

将药材样品粉碎成细粉后过四号筛, 精密称取10.0 g, 以8倍量的95%乙醇回流提取1 h, 放冷, 滤过, 滤液挥干, 用甲醇溶解并定容于25 ml量瓶中, 过0.45 μm微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系考察

精密吸取上述咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷、槲皮素对照品贮备液适量, 稀释成梯度质量浓度的混合对照品溶液, 精密吸取10 μl注入HPLC仪, 照上述色谱条件测定, 记录峰面积。以对照品质量浓度(x)为横坐标, 峰面积积分值(y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得咖啡酸的回归方程为 $y=5\ 230.132x+112.57$ ($r=0.999\ 7, n=5$), 线性范围为0.015 2~0.176 0 mg/ml; 阿魏酸的回归方程为 $y=8\ 334.175x+206.281$ ($r=0.999\ 7, n=5$), 线性范围为0.011 0~0.177 0 mg/ml; 木犀草苷的回归方程为 $y=2\ 070.541x+219.04$ ($r=0.999\ 6, n=5$), 线性范围为0.029 6~0.148 0 mg/ml; 槲皮素的回归方程为 $y=8\ 421.545x-36.188$ ($r=0.999\ 9, n=5$), 线性范围为0.004 0~0.106 0 mg/ml。

2.5 精密度试验

分别精密吸取4种待测组分的对照品贮备液各10 μl, 照上述色谱条件重复6次进样测定, 记录峰面积。结果, 咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷、槲皮素的RSD分别为1.88%、0.27%、0.52%、0.08% (n 均为6), 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一供试品溶液于室温条件放置, 分别于0、2、4、6、8、12、24 h精密吸取10 μl进样测定, 记录峰面积。结果, 咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷、槲皮素的RSD分别为1.67%、0.35%、1.03%、0.07% (n 均为7), 表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.7 重复性试验

取同一份药材样品粉末适量, 按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算样品含量。结果, 咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷、槲皮素的RSD分别为1.91%、2.28%、1.38%、0.88%, 表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取同一批已知含量的样品适量, 共6份, 精密称定, 分别精密加入适量咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷、槲皮素对照品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果分别见表2~表5。

表2 咖啡酸的加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 2 Results of recovery test of caffeic acid ($n=6$)

| 样品含量,mg | 加入量,mg | 测得量,mg | 回收率,% | \bar{x} ,% | RSD,% |
|---------|---------|--------|--------|--------------|-------|
| 1.275 1 | 1.226 8 | 2.4966 | 99.57 | | |
| 1.272 6 | 1.226 8 | 2.5061 | 100.55 | | |
| 1.265 4 | 1.226 8 | 2.4815 | 99.13 | 99.47 | 1.04 |
| 1.278 9 | 1.226 8 | 2.4767 | 97.64 | | |
| 1.276 4 | 1.226 8 | 2.4988 | 99.64 | | |
| 1.263 5 | 1.226 8 | 2.4940 | 100.30 | | |

表3 阿魏酸的加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 3 Results of recovery test of ferulic acid ($n=6$)

| 样品含量,mg | 加入量,mg | 测得量,mg | 回收率,% | \bar{x} ,% | RSD,% |
|---------|---------|---------|--------|--------------|-------|
| 0.857 7 | 0.690 0 | 1.554 4 | 100.97 | | |
| 0.865 8 | 0.690 0 | 1.545 2 | 98.46 | | |
| 0.860 2 | 0.690 0 | 1.570 3 | 102.91 | 100.77 | 1.65 |
| 0.863 6 | 0.690 0 | 1.566 0 | 101.80 | | |
| 0.858 9 | 0.690 0 | 1.562 5 | 101.97 | | |
| 0.860 6 | 0.690 0 | 1.569 8 | 101.48 | | |

表4 木犀草苷的加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 4 Results of recovery test of luteoloside ($n=6$)

| 样品含量,mg | 加入量,mg | 测得量,mg | 回收率,% | \bar{x} ,% | RSD,% |
|---------|---------|---------|--------|--------------|-------|
| 1.767 7 | 1.440 0 | 3.194 2 | 99.06 | | |
| 1.784 4 | 1.440 0 | 3.182 5 | 97.09 | | |
| 1.772 9 | 1.440 0 | 3.240 0 | 101.88 | 99.75 | 1.61 |
| 1.779 8 | 1.440 0 | 3.214 5 | 99.63 | | |
| 1.770 1 | 1.440 0 | 3.217 2 | 100.49 | | |
| 1.773 6 | 1.440 0 | 3.218 9 | 100.37 | | |

表5 槲皮素的加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 5 Results of recovery test of quercetin ($n=6$)

| 样品含量,mg | 加入量,mg | 测得量,mg | 回收率,% | \bar{x} ,% | RSD,% |
|---------|---------|---------|--------|--------------|-------|
| 1.425 7 | 1.378 6 | 2.806 9 | 100.19 | | |
| 1.422 9 | 1.378 6 | 2.816 9 | 101.12 | | |
| 1.414 8 | 1.378 6 | 2.798 4 | 100.36 | 99.92 | 1.02 |
| 1.429 9 | 1.378 6 | 2.815 7 | 100.52 | | |
| 1.427 2 | 1.378 6 | 2.787 5 | 98.67 | | |
| 1.412 7 | 1.378 6 | 2.773 1 | 98.68 | | |

2.9 样品含量测定

取不同来源的火绒草样品适量, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照上述色谱条件进样测定, 记录峰面积, 按拟定方法计算样品中咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷、槲皮素的含量, 结果见表6。

明丹颗粒的质量标准研究[△]

张 昀*, 刘 路, 李 钦(河南大学药学院, 河南 开封 475001)

中图分类号 R283.627;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)27-2556-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.27.22

摘要 目的:建立明丹颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的柴胡、苍术、地黄、丹参、甘草进行定性鉴别;用高效液相色谱法测定丹酚酸B和丹参酮Ⅱ_A的含量。结果:柴胡、苍术、地黄、丹参、甘草的TLC鉴别特征专属性强,阴性对照无干扰。丹酚酸B、丹参酮Ⅱ_A的进样量分别在0.288 0~2.880 0、0.035 2~0.352 0 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 均为0.999 9);二者精密性、稳定性、重复性试验的RSD均<2%;平均加样回收率分别为94.44%、94.85%,RSD分别为1.87%、1.37%(n 均为6)。结论:所建标准可用于明丹颗粒的质量控制。

关键词 明丹颗粒;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准;柴胡;苍术;地黄;丹参;甘草;丹酚酸B;丹参酮Ⅱ_A

Study on Quality Standard of Mingdan Granule

ZHANG Yun, LIU Lu, LI Qin(Pharmacy College of Henan University, Henan Kaifeng 475001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standards of Mingdan granule. METHODS: The identification of Bupleuri Radix, Atractylodis Rhizoma, *Rehmannia glutinosa*, *Salvia miltiorrhiza* and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma were carried out by TLC. The content of salvianolic acid B and tanshinone II_A were determined by HPLC. RESULTS: TLC spots of Bupleuri Radix, Atractylodis Rhizoma, *R. glutinosa*, *S. miltiorrhiza* and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma were specific without interference from negative control. The linear range of salvianolic acid B and tanshinone II_A were 0.288 0-2.880 0 μg and 0.035 2-0.352 0 μg (both $r=0.999 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility were all lower than 2%; average recovery rates were 94.44% (RSD=1.87%, $n=6$) and 94.85% (RSD=1.37%, $n=6$). CONCLUSIONS: Established standard can be used for the quality control of Mingdan granule.

KEY WORDS Mingdan granule; TLC; HPLC; Quality standard; Bupleuri Radix; Atractylodis Rhizoma; *Rehmannia glutinosa*; *Salvia miltiorrhiza*; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; Salvianolic acid B; Tanshinone II_A

表6 样品含量测定结果(mg/g)

| 样品产地 | 咖啡酸 | 阿魏酸 | 木犀草苷 | 槲皮素 |
|------|------|------|------|------|
| 沈阳 | 0.36 | 0.02 | 0.41 | 0.12 |
| 鞍山 | 0.24 | 0.09 | 0.55 | 0.03 |
| 本溪 | 0.44 | 0.03 | 0.85 | 0.15 |
| 丹东 | 0.27 | 0.01 | 0.64 | 0.09 |

3 讨论

在样品提取方法筛选中,笔者比较了超声提取法、回流提取法和索氏提取法。结果发现,回流提取法较超声提取法的提取率高,操作比索氏提取法简便,故最终选定回流提取法提取样品。此外,笔者分别进行了回流1、2、4 h的比较试验,结果差别不大,为了节约能源、提高效率,以回流1 h制备供试品溶液。

笔者分别考察了以甲醇-乙腈、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液等系统作为流动相的试验结果,发现以甲醇-乙腈为流动相时,分离度差且保留时间过长;以乙腈-水作流动相时,色谱峰拖尾较严重;以乙腈-0.1%磷酸水溶液作流动相能将4种组分完全分离,且峰形好、保留时间较短,故选其作为流动相并进行梯度洗脱。

笔者采用二极管阵列检测器对4种组分在200~600 nm

波长范围内进行了全波长扫描,发现咖啡酸的特征吸收波长为255、368 nm,阿魏酸的特征吸收波长为220、225、334 nm,木犀草苷的特征吸收波长为255、350 nm,槲皮素的特征吸收波长为255、369 nm。综合考虑,选择355 nm作为本试验检测波长。

本试验首次采用HPLC法同时测定火绒草中咖啡酸、阿魏酸、木犀草苷、槲皮素的含量,对进一步确定火绒草的最佳产地、扩大其药用资源具有一定的参考意义。本方法简便、灵敏、准确,可为火绒草药材的质量控制提供参考依据。

参考文献

- [1] 《全国中草药汇编》编写组.全国中草药汇编:上册[M].2版.北京:人民卫生出版社,1996:14.
- [2] 刘轩,邱子真,初正云,等.火绒草的生药学鉴定研究[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(8):217.
- [3] 李礼.火绒草的化学成分研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2008.
- [4] 董玉,马强,那生桑,等.高效液相色谱法测定蒙药冬葵果中咖啡酸的含量[J].北京中医药大学学报,2010,33(2):117.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:997.

(收稿日期:2013-04-10 修回日期:2013-05-29)

* 讲师,硕士。研究方向:中药质量标准。电话:0378-3880680。

E-mail: zhangyun@henu.edu.cn