

HPLC法测定不同来源红花中对香豆酸的含量

汪江¹, 盛杰曹², 谢二磊², 周国平^{2*}

(1. 南昌大学医学院, 南昌 330029; 2 江西省食品药品检验所, 南昌 330046)

摘要 目的: 采用高效液相色谱法测定不同来源红花中对香豆酸含量。方法: 采用 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 - 0.5% 磷酸溶液 (18: 82) 为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 308 nm, 柱温 30℃。结果: 对香豆酸线性范围为 0.0211 ~ 0.422 μg · mL⁻¹; 平均回收率 (n = 6) 为 99.98%, RSD 为 1.2%。结论: 该方法简便、准确, 重复性好, 可作为红花的质量控制方法。

关键词: 红花; 对香豆酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)05-0938-03

HPLC determination of *p* - coumaric acid in *Carthamus tinctorius* L. of various sources

WANG Jiang¹, SHENG Jie-cai², XIE Er-lei², ZHOU Guo-ping^{2*}

(1. The Medical College of Nanchang University, Nanchang 330029, China

2. Jiangxi Provincial Institute for Food and Drug Control, Nanchang 330046, China)

Abstract Objective To determine *p* - coumaric acid in *Carthamus tinctorius* L. of various sources by HPLC. **Methods** The determination of *p* - coumaric acid was performed on a Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase was acetonitrile - 0.5% phosphoric acid (18: 82) at the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹; The detecting wavelength was 308 nm and the column temperature was set at 30℃. **Results** The linear range of *p* - coumaric acid was 0.0211 - 0.422 μg · mL⁻¹; The average recovery (n = 6) was 99.98% with RSD of 1.2%. **Conclusion** The method is simple and accurate with good reproducibility and can be used to control the quality of *Carthamus tinctorius*.

Key words *Carthamus tinctorius* L.; *p* - coumaric acid; HPLC

红花为菊科红花属红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 的干燥花, 别名有草红花、刺红花、红花纓子、红花草、红花菜等, 主产于新疆、河南、浙江、四川、云南等地。红花作为我国的传统草药, 具有活血通经、散瘀止痛的功效。现代药理学表明红花还有降血脂、抗炎及抗肿瘤的作用^[1]。其主要含色素、黄酮类化合物、酚酸、脂肪酸、挥发油、多炔及其他成分^[1~3]。本实验室从红花中分离得到活性化合物对香豆酸。实验表明, 对香豆酸对金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌、大肠杆菌及绿脓杆菌均有不同程度的抑制作用, 可以减少癌症药物的副作用^[4], 并且还有降血脂的作用^[5]。有关红花中化学成分的测定主要是针对羟基红花黄色素 A, 而未见对对香豆酸含量分析的报

道。因此, 为了更全面地评价红花药材及其相关制剂的质量, 本文采用高效液相色谱法测定不同来源红花中对香豆酸的含量, 为红花药材及其相关制剂的质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 系列高效液相色谱仪: Waters 600 Controller 低压混合四元泵、Waters 717 自动进样器、Waters 2996 PAD 检测器、Empower 色谱工作站; 电子天平: 赛多利斯 (Sartorius) BP211D 十万分之一天平。乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

对香豆酸为江西省食品药品检验所自制, 经 ¹H - NMR、¹³C - NMR、MS 鉴定结构, 以 HPLC 峰面积归一化法测定纯度 > 98%。采集的 10 批红花药

* 通讯作者 Tel: (0791) 6217386; E-mail: 13870868633@139.com

材样品均由江西省食品药品检验所袁桂平副主任中药师鉴定。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥 24 h 的对香豆酸 13.19 mg 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取此溶液 2 mL 置 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 即得。

2.2 供试品溶液的制备 取红花药材粉末(过 3 号筛)约 1.5 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加水 50 mL, 称定重量, 超声(功率 250 W, 频率 25 kHz)提取 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用水补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 - 0.5% 磷酸溶液 (18:82); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 308 nm; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μL; 在此条件下, 对香豆酸与相邻色谱峰分离度大于 2.0 理论塔板数大于 3000。对照品与样品色谱图见图 1。

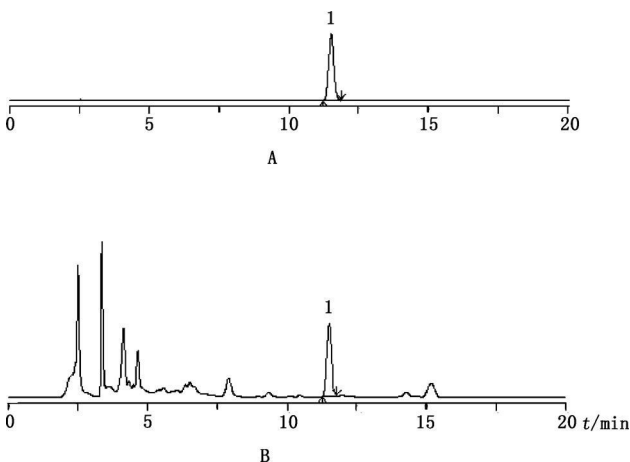


图 1 对照品 (A) 及新疆样品 1 (B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample from Xinjiang 1 (B)

1 对香豆酸 (*p*-coumaric acid)

2.4 线性关系考察 取对香豆酸对照品适量, 加水配成对香豆酸浓度分别为 0.0211, 0.0633, 0.106, 0.211, 0.422 μg · mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 按上述色谱条件进样测定峰面积。以峰面积 *Y* 对进样浓度 *X* (μg · mL⁻¹) 绘制标准曲线, 得对香豆酸回归方程为:

$$Y = 8.3409 \times 10^6 X + 2.7834 \times 10^3 \quad r = 0.99994$$

结果表明对香豆酸进样浓度在 0.0211 ~ 0.422 μg · mL⁻¹ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 检测限及定量限测定 将对香豆酸色谱峰的信号与基线信号进行比较, 以信噪比约为 3:1 时注

入仪器的量确定为检测限, 以信噪比约为 10:1 时注入仪器的量确定为定量限。结果对香豆酸的检测限为 10.68 ng 定量限为 20.05 ng

2.6 精密度试验 精密吸取按“2.1”项下方法制备的对照品溶液 10 μL, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 测定峰面积。结果对香豆酸峰面积的 RSD (*n* = 6) 为 0.2%。

2.7 重复性试验 精密称取同一批次样品 (产地: 新疆乌鲁木齐) 粉末约 1.5 g 共 6 份, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样测定。结果对香豆酸含量平均值 (*n* = 6) 为 0.024%, RSD 为 0.9%, 表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取供试品溶液 (产地: 新疆乌鲁木齐) 分别在 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 24 h 进样测定, 对香豆酸峰面积的 RSD (*n* = 8) 为 0.3%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的样品 (产地: 新疆乌鲁木齐, 对香豆酸含量为 0.024%) 粉末 6 份, 每份约 0.75 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入含对香豆酸对照品 (3.674 μg · mL⁻¹) 的水溶液 50 mL, 称定重量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 25 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用水补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 在上述色谱条件下进行分析测定, 计算回收率。结果对香豆酸平均回收率 (*n* = 6) 为 99.98%, RSD 为 1.2%。

2.10 样品测定 取不同来源的红花 10 批, 分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液各 1 份, 每份溶液在上述色谱条件下分别进样 2 次, 以外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 不同来源样品中对香豆酸含量测定结果 (*n* = 2)

Tab 1 Determination results of *p*-coumaric acid in *Carthamus tinctorius* L. from various sources

来源 (sources)	含量 (content) %	相对平均偏差 (relative average deviation) %
新疆乌鲁木齐 (Wulumuqi Xinjiang)	0.024	0.9
新疆克州 (Keshu Xinjiang)	0.012	1.1
四川绵阳 (Mianyang Sichuan)	0.015	0.7
四川乐山 (Leshan Sichuan)	0.010	2.0
云南玉溪 (Yuxi Yunnan)	0.020	0.8
云南保山 (Baoshan Yunnan)	0.018	0.9
河南安阳 (Anyang Henan)	0.010	1.9
河南信阳 (Xinyang Henan)	0.010	0.9
浙江丽水 (Lishui Zhejiang)	0.003	0.4
浙江金华 (Jinhua Zhejiang)	0.004	1.3

3 讨论

3.1 提取方式的选择 考察了加热回流法、超声提取法 2 种方法对对香豆酸含量测定的影响, 结果表明 2 种方法提取效果相差不大, 为操作方便, 故选择超声提取法; 提取溶剂考察了水、30% 甲醇溶液、50% 甲醇溶液、70% 甲醇溶液及甲醇溶液, 结果表明水提取效率较高, 故确定水为提取溶剂; 提取时间考察了 20 30 40 60 min, 结果表明 30 min 即可提取完全, 故提取时间定为 30 min; 提取溶剂体积考察了 25, 50, 100 mL, 结果表明 50 mL 水可提取完全, 故提取溶剂体积定为 50 mL。

3.2 检测波长的选择 取对香豆酸对照品适量, 加水使溶解, 以水为空白, 在 400~ 210 nm 波长范围内进行光谱扫描, 结果在 308 nm 波长附近有最大吸收, 故确定检测波长为 308 nm。

3.3 流动相的选择 在对流动相进行选择时考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.5% 磷酸水溶液和乙腈-0.5% 磷酸水溶液 4 个溶剂系统。结果表明流动相为乙腈-0.5% 磷酸水溶液时, 所得色谱峰峰形较好, 分离效果最佳。

3.4 小结 本文对来自不同产地的 10 批红花药材中对香豆酸的含量进行了测定。从测定结果可知, 由于生态环境因素的不同, 不同产地所产的红花中

所含的对香豆酸的含量存在一定的差异, 为进一步完善红花药材的质量控制提供了参考依据。

参考文献

- 1 SAREN - Gaowa(萨仁高娃), CHEN Hong - mei(陈红梅), QUAN Shan(泉山). Summary of the research on chemical constituents and pharmacological activities of Mongolian drug *Carthamus tinctorius* L. (蒙药红花化学成分及药理活性研究概况). *J Inner Mongolia Univ Natl* (内蒙古民族大学学报), 2009, 24(3): 333
- 2 JIANG Jian - shuang(姜建双), XIA Peng - fei(夏鹏飞), FENG Zi - ming(冯子明), et al. Chemical constituents of *Carthamus tinctorius* L. (红花化学成分研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33(24): 2911
- 3 WANG - Ruo - jing(王若菁), YANG Bin(杨滨). Survey of study on the chemical constituents and quality control of *Carthamus tinctorius* L. (红花的化学成分及质量标准研究进展). *China J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2007, 13(5): 65
- 4 Abdel - Wahab MH, El - Mahdy MA, Abd - Ellah MF, et al. Influence of p - coumaric acid on doxorubicin - induced oxidative stress in rat's heart *Pharmacol Res* 2003; 48(5): 461
- 5 Vieira O, Laranjinha J, Madeira V, et al. Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin - catalyzed low density lipoprotein oxidation: concerted antioxidant activity of caffeic and p - coumaric acid *J Biochem Pharmacol* 1998, 55(3): 333

(本文于 2010 年 8 月 18 日收到)