

高效液相梯度洗脱法测定杏香兔耳风中绿原酸和芦丁

邹盛勤^{*1,2}, 徐光辉³, 林 惠³, 郑昭宇³, 陈 武^{1,2}

(1. 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 宜春 336000; 2. 宜春学院生物工程研究所, 宜春 336000;
3. 宜春市林业科学研究所, 宜春 336000)

摘 要: 建立了反相高效液相色谱法同时测定不同来源的杏香兔耳风中的绿原酸和芦丁。采用 Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm i. d. × 250 mm, 5 μm), 以甲醇 - 0.5 % H₃PO₄ 的水溶液为流动相, 梯度洗脱程序为 0 min (30 70) - 15 min (30 70) - 20 min (50 50) - 40 min (50 50); 流速 0.8 mL/min; 检测波长 350 nm; 柱温 25 °C; 光电二极管阵列检测器 (PAD)。绿原酸线性范围为 0.654 ~ 5.886 μg, $r = 0.9997$, 样品的平均加标回收率为 98.6 %, RSD 1.7 %; 芦丁线性范围为 0.218 ~ 1.962 μg, $r = 0.9993$, 样品的平均加标回收率为 97.1 %, RSD 2.3 %。本法可作为杏香兔耳风中绿原酸和芦丁的定量分析方法。

关键词: 杏香兔耳风; 高效液相色谱; 光电二极管阵列检测器; 梯度洗脱; 绿原酸; 芦丁

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-0720(2008)05-105-04

杏香兔耳风 (*Ainsliaea fragrans* Champ.) 是菊科兔耳风属植物, 别名白走马胎, 金边兔耳草, 一枝香等, 天然分布于长江以南各省区, 《江西省中药材标准》和《卫生部药品标准》均有收载, 民间全草入药, 具有清热补虚、凉血止血、利湿解毒等功效, 用于治疗肺结核咳血、跌打损伤、无名肿毒、慢性宫颈炎等^[1]。药理实验证明对金黄色葡萄球菌、乙型链球菌等有抑制作用, 其药用价值较高, 属抗广谱菌中草药^[2]。主要含有倍半萜内酯、倍半萜苷、甾体、黄酮、苯丙素类和三萜类等化学成分^[3], 其中绿原酸和芦丁均为其主要成分, 绿原酸具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、免疫调节、降糖等多种作用^[4], 芦丁具有降低毛细血管通透性、抗炎、抗病毒、镇痛、抗氧化及抑制醛糖还原酶等药理活性^[5]。宋友昕^[6]等采用高效液相色谱法测定了杏香兔耳风中的绿原酸, 张锐^[7]等采用高效液相色谱法测定了杏香兔耳风中原儿茶酸、原儿茶醛和绿原酸, 同时测定杏香兔耳风中绿原

酸和芦丁含量的方法未见报道。杏香兔耳风人工培育极少, 资源储量已近枯竭^[8]。目前, 宜春市林业科学研究所研究的杏香兔耳风 GAP 种植技术已获成功, 为了评价和比较种植和野生植物资源的药材质量, 本实验建立了高效液相色谱法同时测定杏香兔耳风主要活性成分绿原酸和芦丁, 旨在为药材的 GAP 种植和资源开发提供实验依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (515 泵, 2996 光电二极管阵列检测器, 7725I 进样阀, Empower 中文色谱工作站), RO-MB-10D 高纯水机 (杭州永洁达膜分离设备厂), CP225D 分析天平 (德国 Sartorius 公司), KS-1500 超声提取仪器 (宁波科盛仪器厂)。

甲醇 (色谱纯); H₃PO₄、乙醇 (分析纯); 绿原酸和芦丁对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110753-200212、100081-200406)。杏香兔耳风 2006 年 12 月采自江西宜春市 (宜春市林业科学研

* 收稿日期: 2007-03-14; 修订日期: 2007-05-26

基金项目: 江西宜春市科技重点计划 (JXYC2005KSA021) 项目资助

作者简介: 邹盛勤 (1970 -), 男, 副教授; E-mail: zsqcxy@sohu.com

究所), 经鉴定为杏香兔耳风 *Ainsliaea fragrans* Champ. 的全草。

1.2 对照品溶液的制备

精密称取减压干燥至恒重的绿原酸对照品 3.27 mg 和芦丁对照品 1.09 mg, 用甲醇溶解后定容于 10 mL 容量瓶中, 配制成含绿原酸 0.327 mg/mL 和芦丁 0.109 mg/mL 的对照品混合溶液, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 即得。

1.3 样品溶液的制备

杏香兔耳风干燥后粉碎, 过孔径为 0.83 mm 筛, 称取约 2 g, 置具塞三角烧瓶中, 加乙醇 40 mL, 超声提取 60 min, 滤过, 滤渣用乙醇洗涤 2

次, 合并滤液, 转移至 50 mL 量瓶中, 用乙醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 滤膜过滤, 即得。

1.4 色谱条件

流动相为甲醇-0.5 % H_3PO_4 的水溶液, 梯度洗脱程序为 0 min (30 70) - 15 min (30 70) - 20 min (50 50) - 40 min (50 50); 流速 0.8 mL/min; 检测波长 350 nm; 柱温 25 $^{\circ}C$; 光电二极管阵列检测器 (PAD)。绿原酸和芦丁分离度均大于 2.0, 对称因子分别为 1.05 和 1.03, 以绿原酸和芦丁计理论塔板数分别为 4829 和 14528。绿原酸和芦丁对照品及杏香兔耳风样品的色谱见图 1。

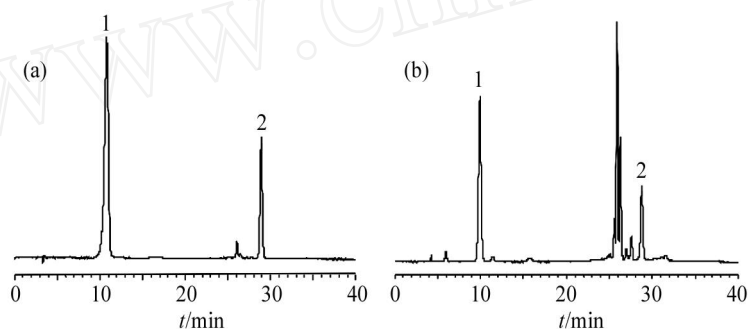


图 1 对照品和样品 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of the standard and the sample

(a) 绿原酸和芦丁对照品; (b) 杏香兔耳风样品; 1 - 绿原酸; 2 - 芦丁

2 结果与讨论

2.1 测定波长的选择

采用 PAD 检测器进行三维扫描, 提取绿原酸和芦丁对照品在流动相中的紫外光谱图 (图 2), 流动相中芦丁最大吸收波长分别为 204.5、256.3 nm 和 356.2 nm, 绿原酸最大吸收波长分别为 218.6 nm 和 328.7 nm。提取各波长下色谱进行比较, 选择 350 nm 作为检测波长, 保证了低含量组分芦丁有较高的信噪比, 且基线平稳, 峰形对称。

2.2 线性关系

分别精密吸取对照品混合溶液 2.0、6.0、10.0、14.0、18.0 μ L 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以对照品的进样量 (μ g) 为横坐标, 以峰面积 (μ V s) 为纵坐标, 进行线性拟合, 绿原酸的回归方程为: $Y = 4.81 \times 10^5 m - 3.42 \times 10^3$ ($r = 0.9997$), 芦丁的回归方程为: $Y = 3.52 \times 10^5 m - 3.10 \times 10^4$ ($r = 0.9993$)。表明当绿原酸进样量在 0.654 ~ 5.886 μ g, 芦丁进样量在 0.218 ~ 1.962 μ g 范围内

线性关系良好。

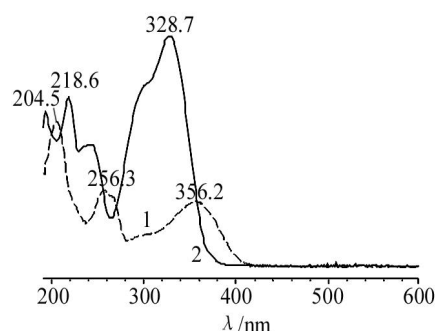


图 2 绿原酸和芦丁紫外光谱

Fig. 2 UC spectra of chlorogenic acid and rutin

1 - 芦丁; 2 - 绿原酸

2.3 精密度

取对照品混合溶液重复进样 5 次, 进样量 10 μ L, 以峰面积积分值计算, 绿原酸峰面积 RSD 为 0.3 %, 芦丁峰面积 RSD 为 0.2 %。表明仪器精密度良好。

2.4 重复性实验

取同一批杏香兔耳风样品,准确称取 5 份,制备样品溶液,进样 10 μL ,按外标法计算。绿原酸测定结果的 RSD 为 1.2 %, 芦丁 RSD 为 2.3 %。

2.5 回收率测定

准确称定已知芦丁和绿原酸含量的同一批杏香兔耳风样品 6 份,每份约 2 g,按高、中、低 3 种浓度加入适量对照品,制备样品溶液,测定加标样品中两组分量。芦丁和绿原酸的平均加标回收率分别为 97.1 % (RSD 2.3 %) 和 98.6 % (RSD 1.7 %)。

2.6 样品测定

按“1.3”所述方法制备样品溶液,注入高效液相色谱仪,平行 3 次,测定杏香兔耳风样品中绿原酸和芦丁的峰面积,按外标法计算,测定结果见表 1。

表 1 野生和种植杏香兔耳风样品中绿原酸和芦丁测定结果 ($n=3$)

Tab.1 Content of chlorogenic acid and rutin in *Ainsliaea fragrans*

编号	样品来源	绿原酸 w/ %	芦丁 w/ %
1	1 年生野生	0.998	0.0606
2	2 年生野生	0.747	0.0387
3	3 年生野生	0.477	0.0325
4	1 年生种植	1.583	0.0967
5	2 年生种植	0.830	0.0542
6	3 年生种植	0.589	0.0415

2.7 讨论

(1) 结果表明,经人工规范化种植后的杏香兔耳风,在不同采收年限(1~3 年),其样品中绿原酸和芦丁含量均高于同期的野生样品,1 年生样

本中绿原酸和芦丁量最高,其次为 2 年生样品,3 年生中 2 组分量最低。由于样本采于 12 月,样本均抽穗开花,随生长年限的增长,样本中茎所占的质量比逐年增加,这是否为杏香兔耳风中绿原酸和芦丁含量随生长年限逐年增加而降低的原因^[9],有待进一步研究。

(2) 选取相同积分参数,采用 Empower 软件系统适应性模块对芦丁和绿原酸色谱峰积分,分析纯度,峰纯度图中纯度线均位于自动阈值线下方,且色谱峰纯度角值小于阈值,证实 2 组分色谱峰为单一组分吸收峰,与光谱归一化结果一致。

(3) 采用高效液相色谱-光电二极管检测器法定量分析时可同步检测组分的紫外光谱和分析组分峰的纯度,增强了色谱方法的定性能力^[10],保证了定量方法的准确性和可靠性。

参考文献

- [1] 《中华本草》编委会. 中华本草. 上海: 科学技术出版社, 1999. 668
- [2] 胡昌奇, 王 朴, 姚辉农. 中草药, 1983, 14(11): 6
- [3] 张 锐, 曾宪仪, 张正行. 中草药, 2006, 37(3): 347
- [4] 吴卫华, 康 桢, 欧阳冬生等. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 691
- [5] 韩英华, 秦元璋. 山东中医杂志, 2003, 22(10): 635
- [6] 宋友昕, 吕 武. 江西中医学院学报, 2005, 17(2): 36
- [7] 张 锐, 张爱华, 张正行. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1209
- [8] 江香梅, 刘传林, 胡小红等. 江西林业科技, 2006, (4): 10
- [9] 范之枫, 张瑞欣, 黄 毅. 新疆中医药, 2005, 23(4): 4
- [10] 邹盛勤, 陈 武. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(4): 77

Determination of chlorogenic acid and rutin in *Ainsliaea fragrans* by RP-HPLC with gradient elution

ZOU Sheng-qin^{*1,2}, XU Guang-hui³, LIN Hui³, ZHENG Zhao-yu³ and CHEN Wu^{1,2} (1. Key Laboratory of Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, Yichun 336000; 2. Bioengineering Research Institute of Yichun University, Yichun 336000; 3. Yichun Forestry Research Institute, Yichun 336000), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(5): 105~108

Abstract: A method for simultaneous determination of chlorogenic acid and rutin in *Ainsliaea fragrans* from different resources was established. A $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) column was used with a mobile phase consisted of phase A (methanol)-phase B (0.5 % phosphoric acid water solution) in gradient elution 0 min (30 70) - 15 min

(30 70) - 20 min (50 50) - 40 min (50 50) at a flow rate of 0.8 mL/min in this method, the detection wavelength was set at 350 nm and the column temperature was 25 . Photodiode array detector was used. The calibration curve was linear in a range of 0.654 ~ 5.886 μg for chlorogenic acid ($r = 0.9997$). The average recovery was 98.6 % and RSD was 1.7 % ($n = 6$). The calibration curve was linear in a range of 0.109 ~ 0.981 μg for rutin ($r = 0.9993$). The average recovery was 97.1 % and RSD was 2.3 % ($n = 6$). This method is rapid, simple and reproducible. It can be used as a quality control method for rutin and chlorogenic acid in *Ainsliaea fragrans*.

Keywords: *Ainsliaea fragrans*; HPLC; PAD; Gradient elution; Chlorogenic acid; Rutin

www.cnki.net