

RP- HPLC 测定海金沙藤中咖啡酸的含量

徐世霞, 晁若冰*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 建立海金沙藤中咖啡酸的含量测定方法。方法 采用反相高效液相色谱法测定, Kromasil 100- 5 C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm), 以甲醇- 水- 冰醋酸- 三乙胺(11: 89: 1.5: 0.3)为流动相, 检测波长 320 nm, 流速 1.0 ml·min⁻¹, 柱温 35℃。结果 咖啡酸与其他成分达到基线分离, 线性范围为进样量 0.005~ 0.500 μg($r = 0.9999$), 平均回收率为 97.7%, $RSD = 1.7\%$ 。结论 所建方法准确、简便, 可用于海金沙藤的质量控制。
关键词: 海金沙藤; 咖啡酸; 含量测定; 反相高效液相色谱法
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006- 0103(2005)06- 0552- 02

Determination of caffeic acid content in *Lygodium japonicum* by RP- HPLC

XU Shi- xia, CHAO Ruo- bing*

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To determine caffeic acid in *Lygodium japonicum*. **METHODS** An RP- HPLC was performed on a Kromasil 100- 5 C₁₈ column (150 mm×4.6 mm), with a mixture of methanol- water- acetic acid- triethylamine (11: 89: 1.5: 0.3) as mobile phase. The detective wavelength was set at 320 nm and the flow rate was 1.0 ml·min⁻¹. Column temperature was 35℃. **RESULTS** Caffeic acid could be separated from other components completely. The linear range of caffeic acid was 0.005- 0.500 μg($r = 0.9999$) and the average recovery of caffeic acid was 97.7% with RSD of 1.7%. **CONCLUSION** This method is accurate, simple and can be used for the quality control of *Lygodium japonicum*.

Key words: *Lygodium japonicum*; Caffeic acid; Assay; RP- HPLC

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006- 0103(2005)06- 0552- 02

海金沙藤为海金沙科植物海金沙的干燥带叶藤茎, 是民间常用药材。其性甘、寒, 具有清热解毒、利水通淋之功效, 主治尿路感染、尿路结石等症。海金沙藤中含氨基酸、黄酮、咖啡酸及对香豆酸; 其中咖啡酸具有广泛的抑菌作用和抗病毒作用, 为海金沙藤的有效成分^[1]。其含量测定方法仅有薄层色谱扫描法^[2]。为此, 我们建立了 HPLC 法测定海金沙藤中咖啡酸的含量, 并未见报道, 所建方法准确、简便, 适用于常规分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪包括 LC- 6AD 泵, SPD- 10A_{vp} 紫外检测器, C- R7Ae 色谱数据处理机(日本岛津)。甲醇和乙腈为色谱纯(Fisher); 水为纯净水(乐百氏); 其他试剂为分析纯。咖啡酸对照品(中国药品生物制品检定所); 海金沙藤(市售)产地为四川, 经四川大学华西药学院王曙教授鉴定为海金沙科植物海金沙 *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. 的干燥带叶藤茎。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 采用 Kromasil 100- 5 C₁₈色谱柱(150 mm×4.6 mm); 流动相为甲醇- 水- 冰醋酸- 三乙胺(11: 89: 1.5: 0.3), 检测波长 320 nm; 流速 1.0 ml·min⁻¹; 柱温 35℃。在以上条件下, 咖啡酸对照品溶液和海金沙藤供试品溶液的色谱图见图 1。

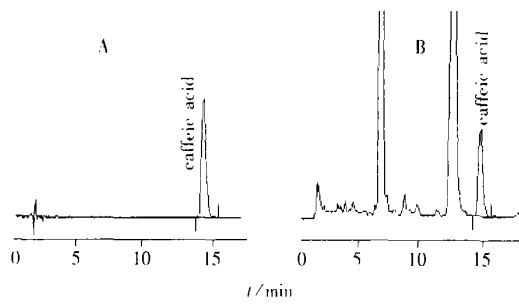


图 1 对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference solution (A) and sample solution (B)

1.2.2 溶液的制备 精密称取咖啡酸对照品适量, 加流动相溶解并定量稀释制成 0.02 mg·ml⁻¹的对照品溶液。取药材粉末(过二号筛)约 2 g, 精密称定, 精密加入流动相 25 ml, 称定重量, 密塞, 浸泡过夜

作者简介: 徐世霞(1976-), 女, 正攻读药物分析专业的硕士学位。

* 通讯联系人(Correspondent author), E-mail: chaoruo@163.com

(16 h), 超声处理 15 min, 放冷, 再称定重量, 用流动相补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

1.2.3 线性范围 分别精密吸取咖啡酸对照品溶液(1) ($0.005 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) 1、5、10 μl , 咖啡酸对照品溶液(2) ($0.050 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) 2、4、6、8、10 μl , 注入液相色谱仪, 测定峰面积值, 以峰面积对进样量(μg) 进行线性回归, 得回归方程为: $Y = 4.667 \times 10^6 X - 4.591 \times 10^3$ ($r = 0.9999$), 进样量在 $0.005 \sim 0.500 \mu\text{g}$ 范围内, 咖啡酸峰面积与进样量的线性关系良好。

1.2.4 精密度试验 取对照品溶液和供试品溶液, 于同日 0、2、4、6、8 h 各进样 1 次, 记录峰面积, 测得对照品溶液和供试品溶液日内的平均峰面积分别为 1.7233×10^6 和 2.2300×10^6 , RSD 分别为 0.73% 和 0.67%。取对照品溶液和供试品溶液, 于 0、1、2、3 d 各进样 1 次, 记录峰面积, 测得两溶液的日间平均峰面积分别为 1.7303×10^6 和 2.2313×10^6 , RSD 分别为 0.73% 和 0.72%。结果表明: 日内精密度、日间精密度均好, 两溶液在 3 d 内稳定。

1.2.5 重复性试验 取同一批海金沙藤药材, 按“1.2.2”项下方法配制 6 份供试品溶液。取此溶液和对照品溶液各 20 μl 进样, 测定咖啡酸的峰面积, 以外标法计算含量。咖啡酸的平均含量为 $0.287 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $RSD = 1.8\%$ 。

1.2.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的同一批药材粉末(过二号筛) 0.8 g, 分别精密加入咖啡酸对照品 100.4、200.8、301.2 μg , 按“1.2.5”项下方法测定, 计算回收率, 测得平均回收率为 97.7%, $RSD = 1.7\%$ ($n = 9$)。

1.2.7 耐用性试验 按“1.2.1”项下条件, 使用 4 种色谱柱[Kromasil 100-5 C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm), Hypersil ODS2 5 μm 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm), Luna 5 μC_{18} (2) 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm), Shim-pack VP-ODS 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm)] 分别对海金沙藤供试品溶液进行分离。在 4 种色谱柱上咖啡酸都可以与相邻的组分分离, 说明方法的耐用性好。在 Kromasil 100-5 C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm) 和 Hypersil ODS2 5 μm 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm) 上咖啡酸的分离效果及峰形最好。

1.2.8 样品的测定 按“1.2.5”项下方法测定样品含量, 4 批海金沙藤中咖啡酸的含量分别为 0.101、0.284、0.383、0.018 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.89%、1.78%、0.93%、0.91%。

2 讨论

曾试验了乙腈-水、乙腈-水-冰醋酸-三乙胺、乙腈-水-四丁基铵硫酸氢盐、甲醇-水-冰醋酸-三乙胺 4 个系统, 结果以甲醇-水-冰醋酸-三乙胺系统的分离效果较好, 当甲醇和水的配比为 11:89 时, 咖啡酸的保留时间适中, 与其他成分基本达到基线分离, 峰形也较好。因此, 选其为流动相。

在流动相中加入少量冰醋酸可以抑制酸性物质的离解, 有利于咖啡酸的分离。所以, 分别往甲醇-水-三乙胺(11:89:0.3) 溶液中加入比例为 0.5、1.0、1.5、2.0 的冰醋酸。当流动相中冰醋酸的比例为 1.5% 时, 咖啡酸峰与相邻的其他组分峰可以完全分离。所以, 流动相中冰醋酸的比例定为 1.5%。

在对流动相中三乙胺的量进行考察时发现, 在流动相中加入三乙胺可以改善峰形, 使咖啡酸峰更锐。所以, 分别往甲醇-水-冰醋酸(11:89:1.5) 溶液中加入比例为 0.2%、0.3%、0.4% 的三乙胺。当三乙胺的比例为 0.3% 时, 咖啡酸的峰形最好。因此, 流动相中三乙胺的比例定为 0.3%。

取咖啡酸对照品溶液, 在 200~400 nm 范围扫描, 结果咖啡酸在 320 nm 处有最大吸收, 所以采用 320 nm 为测定波长。

根据咖啡酸易溶于水和醇的性质, 分别以甲醇-水-冰醋酸(50:50:1)、甲醇-水(50:50) 和流动相为溶剂进行提取。结果表明, 用流动相为提取溶剂时, 咖啡酸的提取率最高。以流动相为溶剂, 将样品分别浸泡 1、4、16 h 后, 超声处理 15 min, 进样分析。结果表明, 浸泡 16 h 样品的含量最高。因此, 将浸泡时间定为 16 h。将浸泡过夜的样品分别超声处理 10、20、30 min, 测定结果显示, 在浸泡 16 h 后, 超声处理的时间对咖啡酸的提出量无明显影响, 所以将超声处理的时间定为 15 min。

4 批海金沙藤药材中咖啡酸的含量相差很大, 可能是采收年限、采收季节和生长环境不同的原因。因此, 采用 HPLC 法测定咖啡酸的含量对海金沙藤药材的质量评价具有重要意义。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 下册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 1948
- [2] 王春根, 刘训红, 常亚萍, 等. 海金沙根及草的鉴定研究[J]. 中药材, 1989, 12(1): 25

收稿日期: 2005-09