

HPLC 法测定新疆贯叶连翘中绿原酸和芦丁的含量

张丽静*, 符继红, 易新萍

(新疆大学理化测试中心, 乌鲁木齐 830046)

摘要: 采用液相色谱法测定贯叶连翘中绿原酸和芦丁含量。用 Hyperil ODS 色谱柱(12.5 cm × 6.0 mm i. d., 5 μm) 进行分离。流动相为甲醇 1% 冰醋酸梯度洗脱, 流速为 0.6 mL/min。检测波长为 343 nm。绿原酸线性范围为 0.0076~0.3040 μg, 相关系数 $R=0.9997$ 。芦丁线性范围为 0.312~3.120 μg, 相关系数 $R=0.9999$ 。样品的平均回收率分别为 101.2%, 99.8%。此方法准确、快速, 适用于绿原酸和芦丁的定量分析。

关键词: 高效液相色谱; 新疆贯叶连翘; 绿原酸; 芦丁

中图分类号: O657.7; Q

文献标识码: A

Determination of Chlorogenic Acid and Rutin of *Hypericum perforatum* in Xinjiang by HPLC

ZHANG Li-jing*, FU Ji-hong, YI Xin-ping

(Physics and Chemistry Detecting Center, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: To develop a HPLC method for the determination of chlorogenic acid and rutin in *Hypericum perforatum* L. in Xinjiang. The chlorogenic acid and rutin were separated on a Hyperil ODS(12.5 cm × 6.0 mm i. d., 5 μm) with a mixture of methanol and 1% acetic acid as mobile phase, at a flow rate of 0.6 mL/min. The detection wavelength was 343 nm. The linearity of chlorogenic acid was found in the range of 0.0076~0.3040 μg, $R=0.9997$, the average recovery was 101.2%, $RSD=0.88\%$. The linearity of rutin was 0.312~3.120 μg, $R=0.9999$, the average recovery was 99.8%, $RSD=1.58\%$. This method is reliable, accurate and suitable for the determination of chlorogenic acid and rutin.

Key words: HPLC; *Hypericum perforatum* L. in Xinjiang; chlorogenic acid; rutin

贯叶连翘是多年生草本植物, 是藤黄科金丝桃属(*Hypericum* L.) 植物贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.) 的全草, 含有多种生物活性成份, 具有抗菌消炎、收敛止血、调经活血、消肿止痛等作用^[1], 贯叶连翘及其提取物是近年来欧美市场最畅销的植物药之一。贯叶连翘在新疆分布较广, 在维吾尔医学中有悠久的药用历史。目前国内对贯叶连翘的研究主要集中在金丝桃素、伪金丝桃素等成份^[2-6], 而对其它活性成份如黄酮化合物芦丁和酚酸化合物绿原酸的测定未见报道。本文以芦丁和绿原酸为质量指标, 建立了用高效液相色谱法同时测定贯叶连翘中绿原酸和芦丁含量的方法, 可用于药材的质量控制。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent HP1100, 包括在线真空脱气机, 四元高压梯度泵, 自动进样器, 恒温柱箱, 二极管阵列检测器; 超声波振荡器(BRANSON SB3200T(20 kHz), 上海)。

1.2 试剂

绿原酸, 芦丁对照品(中国药品生物制品鉴定所), 甲醇为色谱纯, 乙酸为分析纯, 蒸馏水为高纯水。新疆贯叶连翘: 采自新疆阿勒泰, 塔城地区。

2 结果与方法

2.1 色谱条件

Hypersil ODS 色谱柱(12.5 cm × 6.0 mm i. d., 5 μm) 流动相: 甲醇-1% 冰醋酸水溶液, 梯度洗脱: 0~25 min 甲醇由 10~45%, 维持 5 min。流速: 0.6 mL/min; 柱温: (25 ± 1) °C; 检测波长: 343 nm。

2.2 线性关系考察

称取绿原酸 9.5 mg 置于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度。精密移取 1 mL 溶液至 25 mL 容量瓶中定容, 配成浓度为 0.0152 mg/mL 的绿原酸

收稿日期: 2004-11-16 接受日期: 2005-01-28

基金项目: 新疆大学青年教师基金项目(2310801)

* 通讯作者 Tel: 86 991 8583278 805; E-mail: zlj_912@163.com

标准品溶液: 称取芦丁 3.9 mg 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度。精密移取 2 mL 溶液至 5 mL 容量瓶中定容, 配成浓度为 0.1560 mg/mL 的芦丁标准品溶液。以峰面积 Y 为纵坐标, 进样量 $X(\mu\text{g})$ 为横坐标绘制标准曲线, 绿原酸回归方程为 $Y = 7959.30X - 14.24$, $R = 0.9997$, 线性范围为 0.0076~0.3040 μg ; 芦丁回归方程为 $Y = 2287.45X - 59.63$, $R = 0.9999$, 线性范围为 0.312~3.120 μg 。

2.3 样品测定

以新疆阿勒泰, 塔城贯叶连翘为原料, 准确称取经 60℃干燥 3 h 并过 60 目筛的样品 0.20 g, 加入甲醇 20 mL, 超声 30 min, 静置, 用甲醇定容至 25 mL 容量瓶中, 过 0.45 μm 滤膜, 进样。结果见表 1, 色谱图见图 1。

表 1 样品中绿原酸和芦丁含量(mg/g)

Table 1 Content of chlorogenic acid and rutin in samples

地区 District	绿原酸 Chlorogenic acid	芦丁 Rutin
阿勒泰 Aletai	0.3626	23.92
塔城 Tacheng	1.5512	7.124

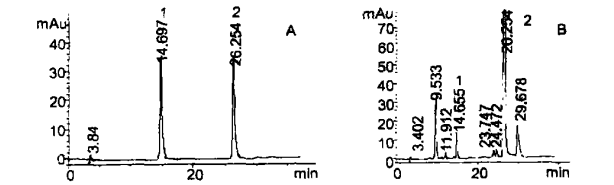


图 1 标准品(A)和样品(B)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of standard(A) and sample(B)
1 绿原酸 Chlorogenic acid; 2 芦丁 Rutin

2.4 精密度实验

将标准品溶液进样 2 μL , 连续重复 5 次, 以峰面积计算, 绿原酸的 RSD 为 0.88%。芦丁的 RSD 为 1.58%。在信噪比 $S/N = 2$ 时, 绿原酸最低检出限为 0.63 ng, 芦丁最低检出限为 1.08 ng。

2.5 重现性实验

称取同一批药材粉末 5 份, 按样品测定项下方法进行操作, 计算含量, 绿原酸和芦丁的平均 RSD (%) 分别为 0.88 和 0.59, 表明方法重现性良好。

2.6 回收率实验

精密称取已知含量的贯叶连翘样品, 分别加入一定量的绿原酸和芦丁标准品, 按样品处理方法制备样品溶液, 每次进样 5 μL , 测定峰面积, 则绿原酸的平均回收率为 101.2%, RSD 为 0.46%, 芦丁的平均回收率为 99.8%, RSD 为 0.18%。

3 讨论

3.1 用二极管阵列检测器分析了芦丁和绿原酸标准品色谱峰的紫外光谱。

芦丁紫外光谱在 210、257、360 nm 处有吸收峰。绿原酸紫外光谱在 220、328 nm 处有吸收峰, 为了精确测定混和物中每个化物的含量, 选择它们光谱曲线中的等吸收点, 故选择检测波长为 343 nm。

3.2 在分析绿原酸和芦丁时, 经过大量试验, 选用甲醇与水为流动相, 甲醇比例过高, 分离效果下降, 比例太低芦丁保留时间太长, 不能用等度分离方法, 所以选用梯度洗脱。但峰形有拖尾现象, 这主要是由于绿原酸、芦丁中羧基和黄酮苷元的酚羟基产生电离, 因而在固定相表面存在着双保留机制。为此, 在流动相中加入少量冰醋酸, 比例在 0.5~2% (pH 为 2.0~3.0 左右) 之间, 使酚羟基及羧基的电离被抑制, 峰形得到改善。结果证明: 流动相选择甲醇-1% 冰醋酸进行梯度洗脱, 样品分离效果最好。

3.3 从分析结果可以看出, 不同产地贯叶连翘样品中绿原酸和芦丁含量不同, 本文为新疆贯叶连翘资源的开发利用提供基础数据。

参考文献

- 1 Jiangsu New Medical College(江苏新医学院). Dictionary of Chinese Materia Medica(中药大词典). Shanghai: Shanghai People's Press, 1977. 1963.
- 2 Jiang ZC. Progress in the Research of Pharmacological of Hypericum per forum. Chinese traditional patent medicine. Chin Tradit Pat Med(中成药), 1999, 21: 328.
- 3 Wang F, Gao TB, Tian JG. Determination of effective compounds hypericin and hyperoside in Hypericum perforatum tablets by RP-HPLC. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2000, 20(1): 101.
- 4 Li J(李俊), Qian ZY(钱之玉), Lin F(林芳). Determination of hypericin in Hypericum perforatum L. by HPLC with fluorescence detection. Chinese J Pharm Anal(药物分析杂志), 2001, 21: 114-116.
- 5 Xu QL(许乾丽), Mao XJ(茅向军), Xiong HL(熊慧林), et al. HPLC 法测定野生及人工栽培贯叶连翘中金丝桃苷的含量. China J Chin Mat Med(中国中药杂志), 2003, 28: 784-785.
- 6 Liu CS(刘朝), Wang DM(王冬梅), Yang DP(杨得坡), et al. Multi indices optimization of the extract conditions of Hypericum perforatum L. (St. John's Wort) using alcohol as solvent. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2004, 16: 149-152.