

RP-HPLC 梯度洗脱法测定杏香兔耳风 不同部位中绿原酸和芦丁的含量

邹盛勤

(江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 宜春学院化学与生物工程学院, 江西宜春, 336000)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法同时测定杏香兔耳风不同部位中绿原酸和芦丁的含量。方法: 采用 Kromasil C18 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-水为流动相, 梯度洗脱程序为 0 min (25:75)-13 min (25:75)-14 min (45:55)-30 min (45:55)-40 min (75:25); 流速 0.8 ml · min⁻¹; 检测波长 350 nm; 柱温 25 °C; 光电二极管阵列检测器 (PAD)。结果: 绿原酸线性范围为 0.430~3.870 μg, r=0.9996, 样品的平均加样回收率为 98.9 % (RSD=1.7 %); 芦丁线性范围为 0.252~2.268 μg, r=0.9995, 样品的平均加样回收率为 97.6 % (RSD=2.3 %)。结论: 方法快速简便, 专属性强, 重复性好, 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

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,具有清热补虚、凉血止血、利湿解毒等功效,民间全草入药,用于治疗肺结核咳血、跌打损伤、无名肿毒、慢性宫颈炎等^[1],主要含有倍半萜内酯、倍半萜苷、甾体、黄酮、三萜类等化学成分^[2]。张锐等从杏香兔耳风中首次分离并鉴定了绿原酸^[3],刘戈等从杏香兔耳风的全草中分离并鉴定了槲皮素、木犀草素、芹菜素、小麦黄素、木犀草素 7-O-β-D-葡萄糖苷、槲皮素-5-O-β-D-葡萄糖苷等黄酮类化合物^[4]。文献也报道了杏香兔耳风及其制剂中绿原酸和总黄酮含量的测定方法^[5-7]。药理实验证明杏香兔耳风对金黄色葡萄球菌、乙型链球菌等有抑制作用,能明显促进受损宫颈上皮组织的修复,对创面有较强的收敛作用^[8],具有杀菌、抗炎、止痛作用,其药用价值较高,属广谱抗菌中草药^[9]。临床上可治疗慢性宫颈炎、慢性盆腔炎、阴道炎等妇科炎症疾病,能快速消除带下病的各种症状^[10,11]。杏香兔耳风虽分布广泛,天然资源丰富,但随着其药用价值被广泛认识,原料药材使用量大量增加,致使野生资源锐减^[12]。目前,杏香兔耳风人工种植技术已成功。为了评价和比较两种不同来源杏香兔耳风药材的质量,本实验建立高效液相色谱法同时测定了种植及野生杏香兔耳风不同部位中绿原酸和芦丁的含量,旨在为药材的 GAP 种植和资源开发利用提供实验依

据。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(515 泵, 2996 光电二极管矩阵检测器, 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, 上海陆忠试剂厂); 乙醇(分析纯, 南昌洪都试剂化工厂); 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, 供含量测定用)。杏香兔耳风 2007 年 9 月采自江西宜春市, 经鉴定为杏香兔耳风 *Ainsliaea fragrans* Champ. 的全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

流动相为甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱程序见表 1; 流速 0.8 ml · min⁻¹; 检测波长 350 nm; 柱温 25 °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。

2.2 对照品溶液的制备

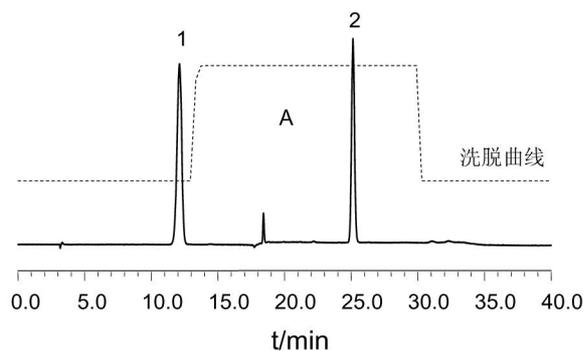
精密称取减压干燥至恒重的绿原酸对照品 2.15 mg

作者简介: 邹盛勤(1970-), 男(汉族), 江西奉新人, 副教授, 主要从事天然药物成分提取与分析研究。

和芦丁对照品 1.26 mg, 精密量取 10 ml 甲醇溶解于小型针剂瓶中, 配制含绿原酸 $0.215 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和芦丁 $0.126 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的对照品混合溶液, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 即得。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)	流量 (ml/min)
0	25	75	0.8
13	25	75	0.8
14	45	55	0.8
30	45	55	0.8
40	25	75	0.8



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

图 1 对照品和样品 HPLC 色谱

2.3 杏香兔耳风样品溶液的制备

将各样品的根、叶、柄分离, 于 80°C 干燥 10h 后分别粉碎。过 20 目筛, 精密称取约 4g, 置具塞三角烧瓶中, 加 95% 乙醇 40 ml, 放置 30min, 加 H_2O 10ml, 35°C 超声提取 90min, 滤过, 滤液置于 50 ml 量瓶中, 用 95% 乙醇冲洗残渣, 合并滤液至刻度,

摇匀, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 即得。

2.4 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), 流动相中绿原酸最大吸收波长分别为 218.6 nm 和 328.7 nm , 芦丁最大吸收波长分别为 204.5 nm 、 256.3 nm 和 356.2 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。

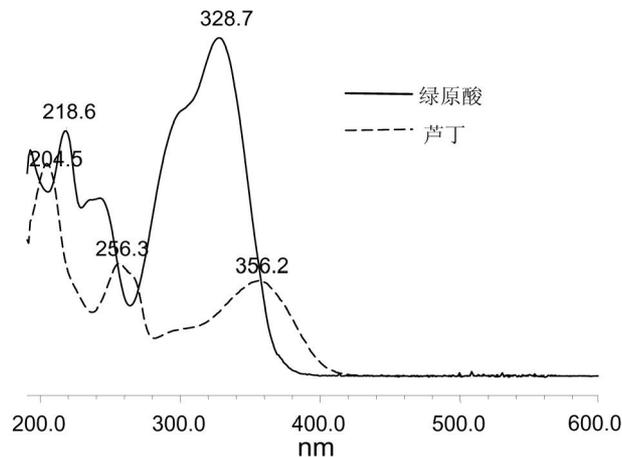


图 2 绿原酸和芦丁紫外光谱

2.5 线性关系

分别精密吸取对照品混合溶液 $2.0 \mu\text{l}$ 、 $6.0 \mu\text{l}$ 、 $10.0 \mu\text{l}$ 、 $14.0 \mu\text{l}$ 、 $18.0 \mu\text{l}$ 进样, 按上述色谱条件测定峰面积, 以对照品的进样量 (μg) 为横坐标, 以峰面积 ($\mu\text{v} \cdot \text{s}$) 为纵坐标, 进行线性拟合, 绿原酸的回归方程为: $Y = 1.69 \times 10^6 X + 2.00 \times 10^4$ ($r = 0.9996$), 芦丁的回归方程为: $Y = 2.16 \times 10^6 X - 3.07 \times 10^4$ ($r = 0.9995$)。表明当绿原酸进样量在 $0.43 \sim 3.87 \mu\text{g}$, 芦丁进样量在 $0.252 \sim 2.268 \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

2.6 精密度实验

取对照品混合溶液重复进样 5 次, 进样量 $10 \mu\text{l}$, 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。

2.7 重复性实验

取同一批杏香兔耳风样品, 精密称取 5 份, 制备样品溶液, 进样 $10 \mu\text{l}$, 按外标法计算含量。绿原酸含量 RSD 为 1.2%, 芦丁含量 RSD 为 2.3%。

2.8 回收率实验

精密称定已知绿原酸和芦丁含量的同一批杏香兔耳风样品 6 份, 每份约 2 g, 按高、中、低三种浓度加入适量对照品, 制备样品溶液, 测定加样样品

中两组分含量。绿原酸和芦丁的平均加样回收率分别为 98.9 % (RSD 1.7 %) 和 97.6 % (RSD 2.3 %)。

2.9 样品测定

按“2.3”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，按外标法计算含量。样品测定结果见表2。

表2 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)

编号	来源	部位	绿原酸 (%)	芦丁 (%)
1	野生	根	0.370	0.016
2		含柄叶	1.192	0.246
3		无柄叶	0.164	0.032
4	种植	根	0.210	0.014
5		含柄叶	0.180	0.038
6		无柄叶	0.415	0.047

3 讨论

3.1 测定结果表明，野生杏香兔耳风中绿原酸的含量含柄叶>根>无柄叶，芦丁的含量含柄叶>无柄叶>根；种植杏香兔耳风中绿原酸的含量无柄叶>根>含柄叶，芦丁的含量无柄叶>含柄叶>根。不同来源的杏香兔耳风中，野生样本根、含柄叶中绿原酸和芦丁的含量均高于种植样本，但野生无柄叶中2种成分的含量均低于种植无柄叶。这可能是由于野生杏香兔耳风叶柄中绿原酸和芦丁的含量要大大高于种植杏香兔耳风样本，其原因有待进一步研究证实。

3.2 采用高效液相色谱-光电二极管检测器法定量分

析时可在以色谱峰保留时间定性的基础上，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，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[M]. 上海: 科学技术出版社, 1999, 6682.
- [2] 毛晓敏, 沈静琳, 陈玲, 等. 杏香兔耳风质量标准研究[J]. 江西中医药, 2007, 38(7): 74-75.
- [3] 张锐, 曾宪仪, 张正行. 杏香兔耳风的化学成分研究[J]. 中草药, 2006, 37(3): 347-348.
- [4] 刘戈, 汪豪, 吴婷, 等. 菊科植物杏香兔耳风的化学成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(4): 266-268.
- [5] 宋友昕, 吕武清. 高效液相色谱法测定杏香兔耳风药材中绿原酸含量[J]. 江西中医学院学报, 2005, 17(2): 36-37.
- [6] 梁兆昌, 杨建平, 郭艳萍. HPLC测定复方杏香兔耳风颗粒中绿原酸的含量[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(16): 1530-1531.
- [7] 伍晓春, 邹盛勤. 野生与种植杏香兔耳风总黄酮含量比较[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(23): 7093-7094.
- [8] 易剑峰. 杏香兔耳风对宫颈炎大鼠宫颈黏膜PGE₂及外周血T淋巴细胞亚群表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(11): 806-808.
- [9] 胡昌奇, 王朴, 姚辉农. 杏香兔耳风的化学成分研究(I)[J]. 中草药, 1983, 14(11): 6-7.
- [10] 武俊. 杏香兔耳风片治疗慢性宫颈炎 400 例疗效观察[J]. 中国医药导报, 2006, 3(27): 125.
- [11] 周嵘. 复方杏香兔耳风颗粒治疗慢性子宫内膜炎 54 例疗效观察[J]. 中国中医药科技, 2000, 7(6): 411.
- [12] 江香梅, 刘传林, 胡小红, 等. 中药杏香兔耳风生态学特性及驯化栽培[J]. 江西林业科技, 2006, (4): 10-12.

Determination of Rutin and Chlorogenic Acid in Different Parts of *Ainsliaea Fragrans* by HPLC with Gradient Elution

Shengqin Zou

(Key Laboratory of Jiangxi Province for Research on Active Ingredients in Natural Medicines, College of Chemistry and Bioengineering, Yichun University, Yichun, 336000, China)

Abstract Objective: To establish a method for simultaneous determination of chlorogenic acid and rutin in different parts of *Ainsliaea fragrans*. Method: A Kromasil C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used with a mobile phase consisted of phase A (methanol)-phase B (water) in gradient elution 0 min (25:75)-13min (25:75)-14min (45:55)-30 min (45:55)-40 min (25:75) by flow rate of 0.8 ml/min-1 in this method, the detection wavelength was set at 350 nm and the column temperature was 25 °C. Photodiode array detector was used. Result: The calibration curve was linear at a range of 0.430~3.870 μg for chlorogenic acid (r=0.9996). The average recovery was 98.9 % and RSD was 1.7 % (n=6). The calibration curve was linear at a range of 0.252~2.268 μg for rutin (r=0.9995). The average recovery was 97.6 % and RSD was 2.3 % (n=6). Conclusions: This method is rapid, simple and reproducible. It can be used as a quality control method for rutin and chlorogenic acid in *Ainsliaea fragrans*.

Key words *Ainsliaea fragrans*; HPLC; PAD; Gradient elution; Chlorogenic acid; Rutin