

HPLC法测定杏香兔耳风中绿原酸和 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的含量

王英锋, 谢亮亮, 刘锁兰, 宴利芝

(首都师范大学分析测试中心, 北京 100037)

摘要 目的: 建立杏香兔耳风药材中绿原酸和 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的含量测定方法。方法: 采用 HPLC 法, 使用 Discovery C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05% 甲酸水溶液为流动相, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 梯度洗脱, 检测波长为 328 nm。结果: 绿原酸进样量在 0.60~3.00 μg 范围内呈线性关系 ($r=0.9996$, $n=5$), 平均回收率为 100.8%; 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸进样量在 1.30~6.52 μg 范围内呈线性关系 ($r=0.9997$, $n=5$), 平均回收率为 99.4%。结论: 本方法操作简便、可靠, 重复性好, 专属性强, 可作为杏香兔耳风药材质量控制方法。

关键词: 杏香兔耳风; 绿原酸; 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸; HPLC

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0245-1793(2009)03-0430-03

HPLC determination of chlorogenic acid and 3, 5-*O*-dicafeoylquinic acid in *Ainsliaea fragrans* Champ

WANG Ying-feng XIE Liang-liang LIU Suo-lan, YAN Li-zhi

(Analysis and Testing Center, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for determination chlorogenic acid and 3, 5-*O*-dicafeoylquinic acid in *Ainsliaea fragrans* Champ. **Method** The chromatographic column was Discovery C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), UV detection wavelength was 328 nm, a mixture of 0.05% formic acid-water and acetonitrile was used as mobile phase with gradient elution and flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Results** Chlorogenic acid at the quality of 0.60~3.00 μg showed good linearity, the average recovery ($n=5$) was 100.8%; 3, 5-*O*-dicafeoylquinic acid at the quality of 1.30~6.52 μg showed good linearity, the average recovery ($n=5$) was 99.4%. **Conclusion** This methods is fast, reliable and accurate, and may be as one of index used to judge the quality of *Ainsliaea fragrans* Champ.

Key words *Ainsliaea fragrans* Champ; chlorogenic acid; 3, 5-*O*-dicafeoylquinic acid; HPLC

杏香兔耳风 (*Ainsliaea fragrans* Champ) 为菊科兔耳风属植物的干燥全草, 具有清热、利湿、凉血、解毒的功效^[1], 化学成分研究表明杏香兔耳风中含有单咖啡酰基奎宁酸和双咖啡酰基奎宁酸等多个酚酸类成分, 药理研究表明此类成分具有抗氧化^[2]、抗炎^[3]、抑制微生物和病毒^[4]、酶抑制^[5]、保肝^[6]、抗凝血^[7]等多种生物活性, 本文选择单咖啡酰基中的绿原酸和双咖啡酰基中的 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸作为指标成分, 采用高效液相色谱法同时测定其含量, 为控制药材质量提供可靠方法。

1 仪器与试剂

LC (Waters Alliance Waters 2695 separations

module Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector), 电子天平 (Sartorius 精度 0.01 mg), 超声波清洗器 (KQ-250型, 昆山超声仪器有限公司)。

绿原酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 供含量测定用, 批号: 110753-200212), 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照品 (自制, 经 UV、MS、NMR、IR 鉴定结构, 纯度 98% 以上), 甲酸 (A.R, 北京化工厂), 甲醇 (Dikma Pure D in A USA), 乙腈 (Dikma Pure D in A USA), 水为超纯水。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 分别精密称取对照品绿原酸 1.20 mg 及 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 2.61 mg

置于同一 10 mL 的量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得浓度分别为 $0.120 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.261 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品混合溶液。

2.2 供试品溶液 取一定量的杏香兔耳风药材, 粉碎, 过 20 目筛, 精密称取约 1.0 g 于具塞平底烧瓶中, 加入 50% 甲醇 25 mL, 称重, 加热回流 30 min, 冷却, 再次称重, 用 50% 甲醇补足减失的重量, 过滤, 取续滤液, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜后, 即得供试品溶液。

3 色谱条件

色谱柱: Discovery C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 流动相 A 为 0.05% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 梯度洗脱 (以流动相 A 比例表示: 0 → 15 min 93% → 75%; 15 → 20 min 75% → 85%; 20 → 25 min 85% → 93%); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 328 nm; 柱温: 30 °C; 进样体积: 10 μL 。在此色谱条件下的色谱图见图 1。

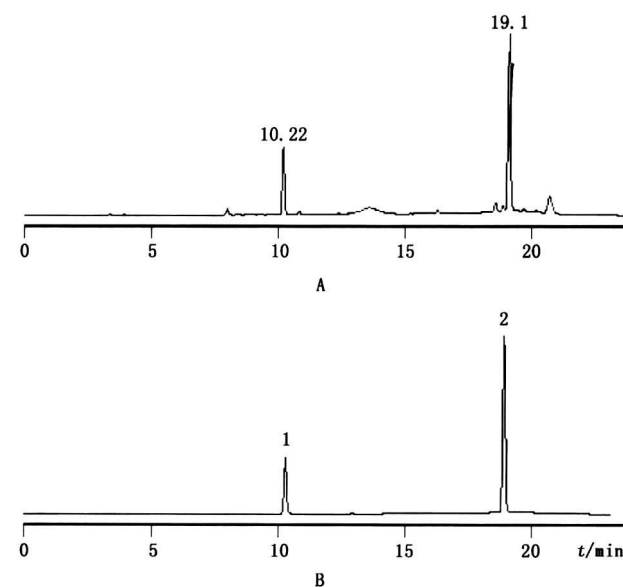


图 1 杏香兔耳风药材含量测定色谱图

Fig 1 The HPLC chromatograms of *Ainslia fragrans* Champ

A. 样品 (sample) B 对照品 (reference substances)

1 绿原酸 (chlorogenic acid) 2 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 (3, 5-*O*-dicafeoylquinic acid)

4 线性关系考察

分别精密吸取对照品溶液 5 10 15 20 25 μL , 按上述色谱条件进行 HPLC 分析, 记录峰面积; 以绿原酸及 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸峰面积 (Y) 对进样量 (X , μg) 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 计算其回归方程分别为:

$$Y = 5.101 \times 10^4 X + 1 \times 10^3 \quad r = 0.9996$$

$$Y = 7.037 \times 10^4 X - 1 \times 10^3 \quad r = 0.9997$$

结果表明, 绿原酸及 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸进

样量分别在 0.60~3.00 μg 及 1.30~6.52 μg 范围内呈线性关系。

5 稳定性试验

取同一份样品, 按“2.2”项下方法制备溶液, 分别在 0, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 h 进行 HPLC 测定, 记录峰面积, 计算绿原酸及 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的 RSD 值分别为 1.4% 及 1.6%, 表明 10 h 内供试品溶液基本稳定。

6 精密度试验

取同一份供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算绿原酸 RSD 为 0.40%, 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 RSD 为 1.07%, 表明精密度良好。

7 重复性试验

分别精密称取同一批杏香兔耳风药材 5 份, 每份约 1.0 g 按“2.2”项下方法制得供试品溶液, 进样 10 μL , 记录峰面积, 外标法计算含量。结果绿原酸含量平均值 ($n=5$) 为 0.50%, RSD 为 1.0%; 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸含量平均值 ($n=5$) 为 1.0%, RSD 为 2.8%。结果表明, 本试验重复性良好。

8 回收率试验

精密称定已知含量 (0.50%) 的杏香兔耳风药材粉末 5 份, 每份 0.5 g 各加入对照品溶液 (绿原酸浓度为 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸浓度为 $2.75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 2.0 mL, 按“2.2”项下方法制得供试溶液, 进行 HPLC 测定, 进样 10 μL , 记录峰面积, 外标法计算含量。求得绿原酸平均回收率为 100.8%, RSD 为 2.8%; 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸平均回收率为 99.4%, RSD 为 1.9%。

9 样品测定

取江西婺源产杏香兔耳风药材 3 批及江西、贵州、云南产杏香兔耳风各 1 批, 按“2.2”项下方法制得供试品溶液, 进样 10 μL , 记录峰面积, 外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 含量测定结果 (%)

Tab 1 Results of samples

产地 (source)	绿原酸 (chlorogenic acid)	3, 5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸 (3, 5- <i>O</i> -dicafeoylquinic acid)
江西婺源 (Wuyuan Jiangxi)	0.53	1.12
	0.53	1.07
	0.52	1.10
	0.54	1.12
贵州 (Guizhou)	0.11	0.30
云南 (Yunnan)	0.01	0.04

10 讨论

本实验分别考察了甲醇、水、50% 甲醇、50% 乙醇等提取溶剂对提取效率的影响, 结果表明 50% 甲醇对目标成分的提取较完全, 50% 甲醇和 50% 乙醇的提取效率相当。

为确定最佳的提取效率, 本实验对提取方法进行了考察, 比较了超声提取和回流提取的效果率, 结果证明, 采用回流方法, 提取效率较好, 同等条件下目标峰的峰面积较大, 提取较完全。分别考察了回流 20 30 40 min 对提取效率的影响, 结果表明提取 30 min 较 20 min 有明显差别, 而提取 40 min 与 30 min 无显著差异, 因此确定提取时间为 30 min。提取溶剂用量的考察结果表明, 溶剂用量 25 mL 与 50 mL 的提取效率无差异。故确定以 25 mL 50% 甲醇加热回流 30 min 为供试品溶液制备方法, 回收率高, 方法稳定。

样品的测定结果表明, 江西婺源产杏香兔耳风药材中绿原酸和 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的平均含量分别为 0.53% 和 1.1%, 而贵州产杏香兔耳风药材中两者平均含量分别为 0.11% 和 0.30%, 云南产杏香兔耳风药材中的含绿原酸和 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸较少, 将提取液浓缩后测得其平均含量分别为 0.01% 和 0.04%, 以江西产药材含量为最高, 且各批次含量较稳定。

参考文献

- 1 Jiangsu New Medicinal College(江苏新医学院). Dictionary of Chinese Materia Medica(中药大辞典). Shanghai(上海): Shanghai People's Publishing House(上海人民出版社), 1977
- 2 Iwai K, Kishimoto N, Kakino Y, *et al*. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans *J Agric Food Chem*, 2004, 52(15): 4893
- 3 Gbongora L, Giner RM. Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl- hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function *Life Sci* 2002, 71(25): 2995
- 4 Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke(*Cynara scolymus* L) and their antimicrobial activities *J Agric Food Chem*, 2004, 52(24): 7272
- 5 Nguyen M T T, Awale S, Tezuka Y, *et al*. Xanthine oxidase inhibitory activity of vietnamese medicinal plants *Biol Pharm Bull* 2004, 27(9): 1414
- 6 Xiang T, Xiong Q, Bai AK, et al. Studies on the hepatocyte protective activity and the structure activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera boumei* *Planta Med*, 2001, 67(4): 322
- 7 Chang WC, Hsu F L. Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by polyphenolic compounds isolated from *Lonicera japonica* Thunb. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 1992, 45(4): 307

(本文于 2008 年 10 月 15 日修改回)

赛默飞世尔科技可检测合成雄性类固醇

2009 年 3 月 4 日, 赛默飞世尔科技宣布在 Kenneth L Maddy 分析化学实验室用液相色谱串联质谱成协检测合成雄性类固醇。该系统由 Thermo Scientific Aria TLX-2 涡流色谱系统和三重四级杆质谱仪组成, 可以对来源于有关动物的尿液和血浆中的同化雄性类固醇实现高准确度和高灵敏的检测。

若需了解更多关于 Aria TLC-2 涡流色谱系统和三重四级杆质谱, 请邮件 analyze.cn@thermo-fisher.com, 也可以访问: www.thermo.com/turboflow 或 www.thermo.com/tsqvantage