

HPLC 法测定还阳参药材中绿原酸

李小贝, 贺石麟, 彭照琪, 倪艳*

山西省中医药研究院, 山西 太原 030012

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定还阳参药材中绿原酸的方法。方法 采用 Sino Chrom DDS-BP 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液 (13:87), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 327 nm, 柱温 25 °C。结果 绿原酸进样量在 0.046~0.644 μg 与峰面积呈良好的线性关系 ($r=1$), 样品平均加样回收率为 101.9%, RSD 值为 1.22% ($n=6$); 检出限和定量限分别为 0.01 ng 和 0.04 ng。结论 此方法简便、准确、重复性好, 可用于还阳参药材的质量控制。

关键词: 还阳参; 绿原酸; 高效液相色谱法; 定量测定

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)03-0194-03

Determination of chlorogenic acid in *Crepis turczaninowii* by HPLC

LI Xiao-bei, HE Shi-lin, PENG Zhao-qi, NI Yan

Shanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China

Abstract: Objective To establish a method of HPLC for the determination of chlorogenic acid in the herbs of *Crepis turczaninowii*.

Methods The samples were separated on a Sino Chrom DDS-BP column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid (13:87). The flow rate was 1.0 mL/min; The detection wavelength was set at 327 nm; And column temperature was 25 °C. **Results** There was a good linear relationship between the chlorogenic acid and peak area in the range of 0.046—0.644 μg ($r = 1$). The average recovery rate was 101.9%, and RSD was 1.22% ($n = 6$). **Conclusion** The method is simple, accurate, and highly reproducible, and could be used for the quality control of the herbs of *C. turczaninowii*.

Key words: *Crepis turczaninowii* C. A. Mey.; chlorogenic acid; HPLC; determination

还阳参为菊科植物屠还阳参 *Crepis turczaninowii* C. A. Mey. 的干燥全草, 味苦、性微寒, 具有益气、止嗽平喘、清热降火之功效, 用于治疗慢性支气管炎、肺结核等疾病^[1]。其含有甾醇类成分, 包括伪蒲公英甾醇乙酸酯、β-谷甾醇等, 此外, 还含有多糖类、有机酸类、环烯醚萜类等成分^[2], 其中有机酸以绿原酸为主。绿原酸广泛存在于菊科植物及自然界其他植物中, 具有抗菌消炎、抗病毒等生物活性^[3], 是本品清热解暑功效的物质基础之一, 因此本实验以绿原酸为指标, 建立还阳参药材 HPLC 测定方法, 为其质量控制标准的建立提供科学依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪 (G1322A 排

气阀、G1311A 泵、G1313A 柱温箱、G1315B 紫外检测器、G1328A Man. Inj、Sino Chrom DDS-BP 色谱柱、Agilent 1100 化学工作站), 戴安高效液相色谱仪 (包括 UltiMate 3000RS 泵、UltiMate 3000RS 自动进样器、UltiMate 3000RS 柱箱、UltiMate 3000RS 可变波长检测器、Acclaim120 C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Chromleon™ 工作站); KQ3200DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), BP211D 电子分析天平 (德国赛多利斯)。

1.2 试药

绿原酸对照品 (质量分数 ≥ 98%, 中国食品药品检定研究院, 批号 110753-200413), 甲醇 (分析纯), 磷酸 (分析纯), 乙腈 (一级色谱纯), 超纯水; 还阳参药材经山西省药品检验所高天爱主任药师鉴

收稿日期: 2012-02-18

基金项目: 山西省中药材、中药饮片地方标准研究项目 (2011024A)

作者简介: 李小贝 (1987—), 女, 湖北襄阳人, 在读硕士研究生, 研究方向为中药的药效物质基础及制剂的现代化研究。

Tel: 15698413465 E-mail: myfaverbeibei@163.com

*通讯作者 倪艳 (1965—), 女, 山西五寨人, 主任药师, 学士学位, 主要从事中药的药效物质基础及制剂的现代化研究。

Tel: (0351)4668028 E-mail: niyan_01@hotmail.com

定为菊科植物屠还阳参 *Crepisturczaninowii* C. A. Mey. 的干燥全草。药材来源见表 1。

表 1 药材来源

Table 1 Sources of herbs of *C. turczaninowii*

编号	批号	采集地	采集时间
CT-1	20110801	山西山阴玉井镇	2011年08月
CT-2	20110901	山西山阴玉井镇	2011年09月
CT-3	20110902	山西山阴玉井镇	2011年09月
CT-4	20110701	山西山阴吴马营乡	2011年07月
CT-5	20110802	山西山阴吴马营乡	2011年08月
CT-6	20110702	山西山阴下喇叭乡	2011年07月
CT-7	20110803	山西山阴下喇叭乡	2011年08月
CT-8	20110903	山西沁源鱼儿泉乡	2011年09月
CT-9	20110904	内蒙古察右中旗科布尔镇	2011年09月
CT-10	20111001	内蒙古察右中旗广益隆镇	2011年10月

2 方法与结果

2.1 波长的选择

利用 HPLC 进行全波长扫描, 在 327 nm 波长下绿原酸峰面积积分值最大, 即测得绿原酸量最高, 故选择 327 nm 作为 HPLC 测定绿原酸的检测波长。

2.2 色谱条件

Sino Chrom DDS-BP 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液 (13:87); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 327 nm; 柱温 25 °C。理论塔板数应不低于 12 000。

2.3 对照品溶液的制备

取绿原酸对照品 1.0 mg, 精密称定, 置于 25 mL 棕色量瓶, 加入 50%甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制得 40 μg/mL 对照品的溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取药材粗粉 0.5 g, 精密称定, 精密加入 50%甲醇 50 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷再称定质量, 用 50%甲醇补足减失的质量, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 专属性试验

分别测定对照品和供试品, 结果在对照品色谱峰相应保留时间处无干扰, 表明供试品溶液中的其他成分对测定结果无影响, 结果见图 1。

2.6 线性范围的考察及其标准曲线的绘制

精密吸取对照品溶液 2、4、6、10、14、18 μL, 分别注入液相色谱仪。按上述色谱条件测定峰面积。以对照品的进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标绘制

标准曲线, 得回归方程 $Y=3\ 885.7X-0.184\ 2$, $r=1$, 结果表明, 绿原酸进样量在 0.046~0.644 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

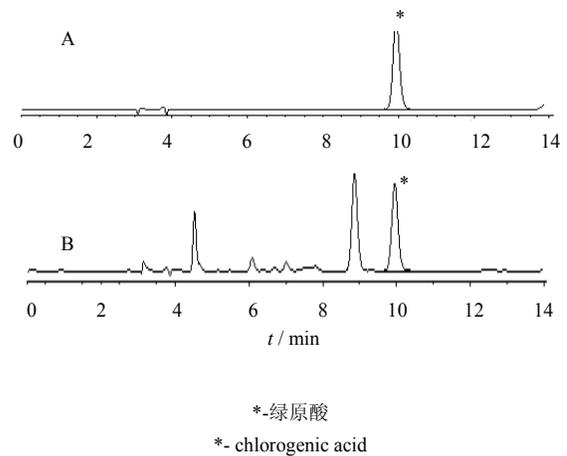


图 1 绿原酸对照品 (A) 和还阳参药材 (B) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC chromatograms of chlorogenic acid reference substance (A) and herbs of *C. turczaninowii* (B)

2.7 精密度试验

精密吸取对照品溶液 10 μL, 按上述色谱条件重复进样 6 次, 绿原酸峰面积值 RSD 为 0.22% ($n=6$), 表明仪器的精密度良好。

2.8 重复性试验

取同一份样品 6 份, 按上述方法测定, 绿原酸平均质量分数 RSD 为 1.14% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

取同一份供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样 10 μL, 测得绿原酸的峰面积值 RSD 为 0.22% ($n=6$), 表明供试品溶液至少在 10 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验

取同一批已测定样品 6 份, 每份 0.25 g, 精密称定, 分别加入绿原酸对照品溶液适量, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 结果平均回收率为 101.9%, RSD 为 1.22% ($n=6$), 表明该方法准确度好。

2.11 样品测定

取 10 个批次不同产地还阳参药材样品, 按照上述方法制备供试品溶液, 依照已确定的色谱条件测定, 按峰面积值计算样品中绿原酸的质量分数。结果还阳参药材中绿原酸质量分数为 0.072 8%~0.265 4%, 平均值为 0.134 8%。结果见表 2。

表2 样品测定结果
Table 2 Determination of chlorogenic acid

序号	质量分数/%
CT-1	0.072 8
CT-2	0.073 3
CT-3	0.075 5
CT-4	0.142 3
CT-5	0.144 1
CT-6	0.080 5
CT-7	0.080 5
CT-8	0.265 4
CT-9	0.207 3
CT-10	0.205 9

2.12 耐用性

本实验考察了实验条件的耐用性,在相同的实验条件下用不同的仪器,对相同的样品进行了分析。

色谱条件一:安捷伦液相色谱仪:Sino Chrom ODS-BP 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液(13:87),体积流量 1.0 mL/min,检测波长327 nm,柱温25 °C,进样量10 μL。

色谱条件二:戴安液相色谱仪:Acclaim120 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液(13:87),体积流量 1.0 mL/min,检测波长 327 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μL。

结果显示两种条件下测量结果基本无差别,质量分数分别为 0.073 3%和 0.071 9%,说明该方法耐用性较好。

2.13 检出限和定量限

取供试品溶液逐级稀释后,按照上述色谱条件进样测定。以 S/N=3 求得绿原酸的检出限为 0.01 ng;以 S/N=10 求得绿原酸的定量限为 0.04 ng。

3 讨论

还阳参为我国民间习用药材,尚未收入国家和地方标准。本实验对其进行了系统研究,首次建立

了 HPLC 测定方法,并对其进行了方法学考察,得出该方法简单可行、灵敏度高、重现性好、准确度高,并使用安捷伦和戴安两种液相色谱仪进行了测定,色谱峰和分离度均良好,测定结果不受影响,说明本方法耐用性好,可用于还阳参药材的质量控制,为其质量标准的建立提供了科学依据及其纳入地方标准奠定基础。

本实验对流动相进行了考察。参考《中国药典》2010 年版一部金银花绿原酸的定量测定法,以乙腈-0.4%磷酸(13:87)作为流动相^[4],以此为基础对流动相的组成比例进行了调整,分别以乙腈-0.4%磷酸(13:87)、乙腈-0.4%磷酸(12:88)、乙腈-0.4%磷酸(11:89)为流动相进行了测定,结果表明流动相比例为乙腈-0.4%磷酸(13:87)时,绿原酸出峰最快,且峰形较好,和样品中其他组分峰可达基线分离,最后确定以乙腈-0.4%磷酸(13:87)作为流动相。

实验结果显示,CT-1、CT-2、CT-3、CT-6、CT-7 批次的样品绿原酸质量分数均较低,CT-8、CT-9、CT-10 批次的样品绿原酸质量分数较高,其中 CT-8 最高(0.265 4%),可能与样品采集时间和产地有关。不同产地的药材性状有所差别,内蒙产的还阳参根部较其他产地还阳参的根部发达,长治产还阳参生长环境比较肥沃,叶片肥大,这可能是导致 CT-8、CT-9、CT-10 3 个批次还阳参绿原酸较 CT-1、CT-2、CT-3、CT-6、CT-7 批次样品绿原酸质量分数高的原因。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上册. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [2] 倪 艳, 卢方晋, 郝旭亮, 等. 还阳参化学成分的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(4): 51-52.
- [3] 张鞍灵, 马 琼, 高锦明, 等. 绿原酸及其类似物与生物活性 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 173-175.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.