

RP-HPLC 法同时测定返魂草中 3 种酚酸类成分

姜振邦, 刘有平, 李小童, 邸欣*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 建立同时测定返魂草药材中氢醌、绿原酸和咖啡酸量的 RP-HPLC 方法。方法 返魂草药材先以 15% 乙醇回流提取, 再用醋酸乙酯-丙酮(50:1)萃取后, 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm)分离, 以乙腈和含 0.4% 磷酸、0.1% 三乙胺的水溶液为流动相, 进行梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL/min, 检测波长为 286 nm(氢醌)和 326 nm(绿原酸和咖啡酸)。结果 氢醌、绿原酸和咖啡酸的质量浓度分别在 5.00~30.0、15.0~90.0、2.50~15.0 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系, 回收率分别为 96.3%、95.1%、97.8%, RSD 分别为 2.1%、2.4%、2.2%。结论 该方法可用于返魂草药材的质量控制。

关键词:返魂草; 氢醌; 绿原酸; 咖啡酸; 反相高效液相色谱法

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)11-1819-03

返魂草 *Senecio cannabifolius* Less. 为菊科千里光属多年生草本植物, 通常以全草入药, 具有清热消肿、散瘀、止血、镇痛的功效。返魂草在长白山地区常被用于感染性危重症病人的救治, 民间流传其具有起死还魂的作用, 故而得名“返魂草”。目前, 返魂草单方制剂临床用于治疗肺内感染、慢性支气管炎、喘息性支气管炎、急性呼吸道感染等症, 效果良好。已经发现, 返魂草中的酚酸类成分具有显著的抗菌、抗病毒作用^[1~4], 是返魂草中重要的药理活性成分, 因而也是控制返魂草药材质量的重要指标成分。返魂草药材中绿原酸的定量测定方法已有文献报道^[5,6]。为更全面评价返魂草药材的质量, 本实验建立了同时测定返魂草中氢醌、绿原酸和咖啡酸 3 种酚酸类成分的 RP-HPLC 方法。

1 仪器与试药

Agilent1100 型高效液相色谱仪, 配有自动进样器、四元梯度泵和 ChemStations A. 09.03 色谱工作站; KQ-50B 型超声清洗器; TG328A 型分析天平; RE-52A 型旋转蒸发器。

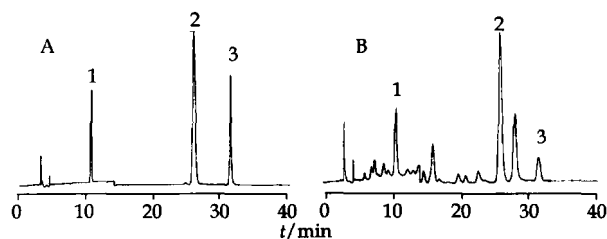
氢醌对照品(自制, 质量分数>98.6%), 绿原酸对照品(批号 110753-200413, 中国药品生物制品检定所), 咖啡酸对照品(批号 110885-200101, 中国药品生物制品检定所), 乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

返魂草药材购自吉林省抚松县, 由沈阳药科大学药教研室路金才副教授鉴定为菊科植物返魂草 *Senecio cannabifolius* Less. 的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 相为含 0.4% 磷酸和 0.1% 三乙胺的水溶液, B 相为乙腈, 梯度洗脱程序为: 0~12 min, B 由 70% 线性增加至 11%, 12~40 min, B 由 11% 线性增加至 13%; 体积流量: 0.8 mL/min; 检测波长: 0~14 min, 286 nm, 14~40 min, 326 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

在上述色谱条件下, 3 组分的色谱峰与各相邻色谱峰的分度均大于 1.5, 理论塔板数均不低于 7 000。对照品与供试品的色谱图见图 1。



1-氢醌 2-绿原酸 3-咖啡酸
1-hydroquinone 2-chlorogenic acid 3-caffeic acid

图 1 对照品(A)及样品(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of reference substance (A) and sample solution (B)

2.2 对照品储备液的制备: 精密称取氢醌、绿原酸、咖啡酸对照品适量, 用甲醇溶解, 配制成质量浓度分别为 500、1 500、250 mg/L 的对照品储备液。精密量取各储备液 2 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液。操作全程避光。

收稿日期: 2009-01-05

作者简介: 姜振邦(1983—), 男, 辽宁沈阳人, 硕士研究生。E-mail: kkbyb@163.com

* 通讯作者 邸欣 Tel: (024)23986342 E-mail: dixin63@hotmail.com

2.3 供试品溶液的制备:取返魂草药材粉末约 2.5 g,精密称定,置一圆底烧瓶中,加入 15%乙醇 50 mL,加热回流提取 3 次,每次 1.5 h,合并提取液,减压浓缩至 50 mL,转移至分液漏斗中,加入 2%盐酸 1 mL,摇匀,用醋酸乙酯-丙酮(50:1)等体积萃取 5 次,合并萃取液,减压蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察:精密量取混合对照品储备液 0.5、1、1.5、2、2.5、3 mL,分别置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,分别进样分析。以对照品峰面积(A)对质量浓度(C)进行线性回归,得氢醌、绿原酸和咖啡酸的回归方程分别为: $A_I = 33.218 C_I + 1.313 3, r = 0.999 9$; $A_{II} = 53.494 C_{II} - 8.566 7, r = 0.999 8$; $A_{III} = 142.34 C_{III} - 1.033 3, r = 0.999 9$,结果表明,氢醌、绿原酸和咖啡酸的质量浓度分别在 5.00~30.0、15.0~90.0、2.50~15.0 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验:取同一份混合对照品溶液,连续进样 6 次,记录峰面积,计算得氢醌、绿原酸和咖啡

酸峰面积的 RSD 分别为 1.2%、0.71%、1.4%。

2.6 稳定性试验:取同一份供试品溶液,于室温下密闭避光放置,分别在 0、2、4、8、12 h 进样分析,计算得氢醌、绿原酸和咖啡酸质量分数的 RSD 分别为 1.7%、2.3%、1.4%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重现性试验:取同一批返魂草药材,按“2.3”方法平行制备 6 份供试品溶液,分别进样分析,计算得氢醌、绿原酸和咖啡酸质量分数的 RSD 分别为 1.8%、2.1%、2.2%。

2.8 回收率试验:取已知量的返魂草药材粉末约 1.25 g,精密称定,共称取 6 份,分别精密加入各对照品储备液适量,按“2.3”方法制备供试品溶液,分别进样分析,计算得氢醌、绿原酸和咖啡酸的平均回收率分别为 96.3%、95.1%、97.8%,RSD 分别为 2.1%、2.4%、2.2%。

2.9 样品测定:取返魂草药材,按“2.3”方法制备供试品溶液,分别进样分析,用外标法计算供试品中 3 种酚酸类成分的质量分数。多批药材的质量分数测定结果见表 1。

表 1 返魂草中 3 种酚酸的测定($n=3$)

Table 1 Determination of three kinds of phenolic acids in *S. cannabifolius* ($n=3$)

批次(产地)	氢 醌		绿原酸		咖啡酸	
	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RSD/%
1 (吉林长白山)	0.096 9	1.30	0.379	0.71	0.062 3	1.10
2 (吉林长白山)	0.095 8	1.20	0.357	1.20	0.074 6	1.80
3 (吉林长白山)	0.092 6	1.50	0.366	1.40	0.066 7	1.70
4 (黑龙江牡丹江)	0.194 0	1.10	0.373	0.99	0.052 9	1.30
5 (黑龙江牡丹江)	0.140 0	0.91	0.351	1.20	0.044 1	1.20
6 (黑龙江牡丹江)	0.117 0	1.50	0.368	1.60	0.053 5	1.60
7 (河北阳泉)	0.085 0	1.30	0.221	0.73	0.033 4	0.77
8 (河北阳泉)	0.084 1	0.96	0.227	0.98	0.032 7	1.40
9 (内蒙古乌浩特)	0.095 9	1.20	0.243	1.10	0.035 1	1.10
10 (内蒙古乌浩特)	0.093 7	1.00	0.255	0.89	0.034 2	0.93

3 讨论

3.1 取溶剂乙醇的体积分数和倍量、回流提取时间和次数进行了考察。直观分析结果表明,以氢醌的量为评价指标,影响因素的大小顺序为乙醇体积分数>提取时间>提取次数>溶剂倍量,以绿原酸和咖啡酸的量为评价指标,影响因素的大小顺序为乙醇体积分数>提取次数>提取时间>溶剂倍量;方差分析结果表明,乙醇体积分数对氢醌和咖啡酸的量有显著影响。综合考虑确定最优提取条件为用 20 倍量的 15%乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h。返魂草经回流提取后,提取液中干扰成分众多,它们在 0~15 min 被洗脱出来,干扰氢醌的测定,进一步用醋酸乙酯-丙酮(50:1)萃取后,则可除去大部分干

扰物质。萃取前加入盐酸酸化可提高氢醌、绿原酸和咖啡酸的萃取效率^[7]。

3.2 经紫外光谱扫描,氢醌在 286 nm 处有最大吸收,绿原酸和咖啡酸在 326 nm 处有最大吸收,为提高检测的灵敏度,本实验利用了紫外检测器的程序波长功能,分别选择各待测组分的最大吸收波长进行检测。

3.3 氢醌容易氧化,绿原酸遇光不稳定,故对照品溶液和供试品溶液应避光密闭保存,并且应注意分析操作全程避光。

参考文献:

- [1] 李丽静,王继彦,王本祥,等. 返魂草提取物及其有效成分抗病毒机制的研究[J]. 陕西中医学院学报, 2004, 27(6): 65-66.
- [2] 李丽静,王继彦,王 岩,等. 返魂草提取物及其有效成分抗病毒作用的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(8): 585-587.

- [3] 杨秀东,冯乾坤,李婷婷,等. 麻叶千里光化学成分及药理作用研究[J]. 长春中医药大学学报, 2006, 22(3): 70-71.
- [4] 吴斌,吴立军,金史哲,等. 麻叶千里光抗菌活性成分的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [5] 王继彦,李丽静,张莲珠. HPLC法测定返魂草及其注射剂中绿原酸[J]. 中草药, 2005, 36(8): 1166-1167.
- [6] 南敏伦,赫玉芳,刘静月,等. HPLC法测定不同产地返魂草中绿原酸的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(2): 119-121.
- [7] 杨海燕,孙海峰,汪爱国,等. 醋酸乙酯萃取绿原酸过程研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2241-2242.

HPLC法测定不同产地5种中药材中熊果酸

赵庆春¹, 杜占权², 张琳², 宋庆宇³, 史国兵¹

(1. 沈阳军区总医院 药剂科, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 3. 大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116027)

摘要:目的 运用高效液相色谱法对不同产地山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂和连翘中熊果酸的量进行测定。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱: Kromasil C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-乙酸胺 (69: 31: 0.6); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 215 nm。结果 对比不同产地的5种药材, 连翘中熊果酸的平均质量分数最高, 达0.237%; 山楂、夏枯草、柿蒂稍低, 平均质量分数分别为0.180%、0.158%、0.212%; 冬凌草最低, 为0.124%。结论 本方法简便、准确、重现性好, 可作为中药材中熊果酸的定量测定方法。

关键词: 高效液相色谱法; 熊果酸; 山楂; 夏枯草; 冬凌草; 柿蒂; 连翘

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)11-1821-03

熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌苏酸, 属于α-香树脂醇型(α-amyrin)五环三萜类化合物, 存在于多种植物体内。已有研究表明, 熊果酸具有镇静、消炎、抗菌、抗溃疡、降低血糖等多种生物效应, 近年来发现熊果酸具有增强免疫、抗肿瘤、诱导癌细胞分化和抗血管生长的作用, 同时熊果酸对肝炎、艾滋病的治疗还有较强的效果, 是一种极具开发价值的植物活性成分^[1~3]。熊果酸在药用植物中分布广泛, 现已从30多种药用植物中分离提取到熊果酸, 本实验采用HPLC法针对文献报道^[4~6]中量较高的5种药材山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂和连翘中熊果酸的量进行了测定, 以比较其量的高低, 为熊果酸的进一步开发利用奠定基础。

1 仪器与试剂

Waters 510 高效液相色谱仪, 紫外检测器(Waters 484型), N2000型色谱工作站(浙大智达信息工程有限公司); KQ3200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

熊果酸对照品是从植物柿蒂中提取纯化得到, 经IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR光谱鉴定结构, HPLC归一化法测定质量分数在99.0%以上; 药材山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂、连翘均采自其主要产地, 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定, 分别为蔷薇科植

物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bunge 的干燥成熟果实、唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗、唇形科香茶菜属植物 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的全草、柿树科植物柿 *Diospyros kaki* Thunb. 的干燥宿萼、木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。甲醇、乙腈为色谱纯, 水为纯化水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-乙酸胺 (69: 31: 0.6); 体积流量: 1 mL/min; 进样量: 10 μL。检测波长: 215 nm; 熊果酸与相邻峰分离度为1.7。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取熊果酸对照品25 mg, 置50 mL量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成0.5 mg/mL的溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 将阴干的山楂、夏枯草、冬凌草、柿蒂、连翘样品置50℃下烘干3 h, 粉碎, 过40目筛, 取各样品粉末10 g, 精密称定, 置量瓶中, 加入80%乙醇100 mL, 超声提取30 min, 再浸泡2 h后滤过, 滤渣按同样的方法再提取2次, 合并滤液, 45℃减压浓缩至干, 用无水乙醇转移并定容至100 mL量瓶中, 摇匀, 0.45 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

收稿日期: 2009-01-17

作者简介: 赵庆春(1967—), 主任药师, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药有效成分及其质量标准研究。

Tel: (024)28856205 13309882912 E-mail: zhaoqc53@yahoo.com.cn