

HPLC 法测定杏香兔耳风中绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素

冯育林^{1,2}, 张武岗^{1,2}, 孙丽仁², 何明珍¹, 罗晓健^{1,2*}, 王跃生¹, 杨世林^{1,2}

1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 建立杏香兔耳风中绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素的测定方法。方法 采用高效液相色谱法测定杏香兔耳风中绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素的量。色谱条件为 Diamonsil™ C₁₈ 柱 (250 mm×40 mm, 5 μm); 流动相 甲醇 (A) -0.1%磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 28% A; 15~25 min, 28%~40% A; 25~50 min, 40% A); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 328 nm; 柱温室温。结果 杏香兔耳风中绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素的线性范围分别为 0.132~1.32、0.078~0.78、0.034~0.34 μg, 平均加样回收率分别为 99.1%、103.1%、99.3%。结论 该方法快速简便、精密度好、灵敏度高, 可用于杏香兔耳风中绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素的同时测定。

关键词: 杏香兔耳风; 绿原酸; 3, 5-二咖啡酰奎宁酸; 木犀草素; HPLC

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)03-0513-02

Determination of chlorogenic acid, 3, 5-dicaffeoylquinic acid, and luteolin in *Ainsliaea fragrans* by HPLC

FENG Yu-lin^{1,2}, ZHANG Wu-gang^{1,2}, SUN Li-ren², HE Ming-zhen¹, LUO Xiao-jian^{1,2}, WANG Yue-sheng¹, YANG Shi-lin^{1,2}

1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

Key words: *Ainsliaea fragrans* Champ.; chlorogenic acid; 3, 5-dicaffeoylquinic acid; luteolin; HPLC

杏香兔耳风 *Ainsliaea fragrans* Champ. 为菊科兔耳风属植物, 主产江苏、浙江、江西、福建等地, 生于山坡灌木林下, 沟边草丛等处。具有清热利湿、凉血解毒等功效, 用于治疗虚劳咳血、湿热黄疸、水肿、痈疽肿毒等病症^[1]。《江西省中药材标准》中记载其用于慢性宫颈炎、白带、毒蛇咬伤等^[2]。目前, HPLC 法方便、快捷、准确, 已经成为中药材质量控制的主要方法^[3-4]。本实验采用高效液相法对绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素进行测定, 为制定杏香兔耳风质量标准及临床应用提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, Agilent 1100 色谱工作站, 二极管阵列检测器, Mettler AE240 型十万分之一电子天平 (Mettler 瑞士), RE51CS 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素对照品均由本实验室自制 (质量分数大于 98%)。杏香兔耳风为市售药材 (批号分别为: 201001、201002、201003), 经江西中医学院杨世林教授鉴定为菊科植物杏香兔耳风 *Ainsliaea fragrans* Champ. 的干燥全草。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

啡酰奎宁酸和木犀草素对照品均由本实验室自制 (质量分数大于 98%)。杏香兔耳风为市售药材 (批号分别为: 201001、201002、201003), 经江西中医学院杨世林教授鉴定为菊科植物杏香兔耳风 *Ainsliaea fragrans* Champ. 的干燥全草。甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱 (250 mm×40 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A) -0.1%磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0~15 min, 28% A; 15~25 min, 28%~40% A; 25~50 min, 40% A); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 328 nm; 柱温室温。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取绿原酸对照品 13.21 mg、3, 5-二咖啡酰奎宁酸对照品 7.80 mg、木犀草素对照品 3.73 mg,

收稿日期: 2011-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102787); 国家“十一五”科技支撑计划资助项目 (2006BAI06A01-01); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09103-352)

作者简介: 冯育林 (1977—), 男, 江西抚州人, 博士, 副教授, 研究方向为中草药活性成分及质量标准研究。E-mail: fengyulin2003@hotmail.com

*通讯作者 罗晓健 Tel: (0791)7119619 E-mail: luoxj98@126.com

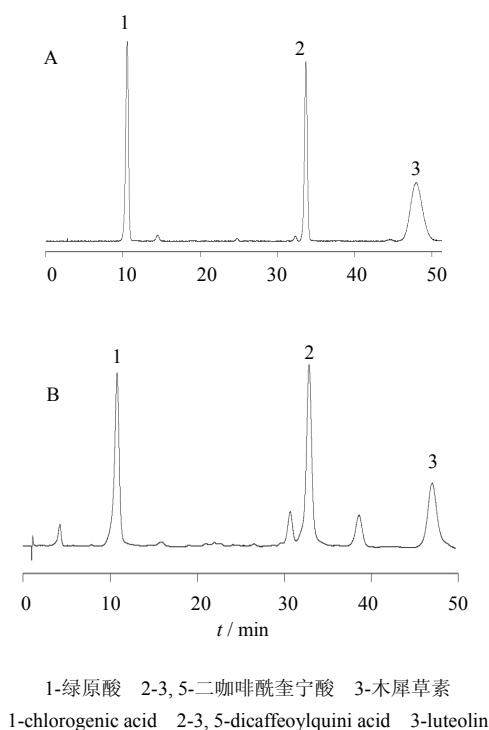


图 1 对照品(A)和样品(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

置 100 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取杏香兔耳风全草样品 0.5 g, 置圆底烧瓶中, 加入 50 mL 70%乙醇溶液, 回流提取 30 min, 滤过, 取滤液 40 mL 减压蒸干后用甲醇溶解, 转移至 50 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1、2、4、6、8、10 μ L 注入液相色谱仪, 在上述条件下进行分析, 测定对照品色谱峰面积。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得到回归方程。绿原酸 $Y=3\,700.8X+14.741$, $r=0.999\,2$, 在 $0.132\sim 1.32\,\mu\text{g}$ 呈良好的线性关系; 3, 5-二咖啡酰奎宁酸 $Y=8\,308.7X-11.583$, $r=0.999\,4$, 在 $0.078\sim 0.78\,\mu\text{g}$ 呈良好的线性关系; 木犀草素 $Y=3\,451.4X-69.919$, $r=0.999\,4$, 在 $0.034\sim 0.34\,\mu\text{g}$ 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取杏香兔耳风供试品 (批号 201001) 溶液 1 份, 进样 10 μ L, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 计算得绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素峰面积的 RSD 分别为 0.87%、1.43%、2.48%。

2.6 稳定性试验

取供试品 (批号 201001) 溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μ L 进行分析, 测定色谱峰面积, 计算得绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素峰面积的 RSD 分别为 1.46%、1.66%、2.48%。

2.7 重现性试验

取杏香兔耳风样品 (批号 201001) 5 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素质量分数的 RSD 分别为 1.35%、1.10%、2.69%。

2.8 加样回收率试验

精密称取适量杏香兔耳风样品 (批号 201001) 0.25 g, 分别精密加入一定量的对照品溶液, 按供试品溶液制备方法处理, 测定, 计算绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素的回收率分别为 99.1%、103.1%、99.3%; RSD 分别为 2.55%、2.86%、2.39%。

2.9 样品测定

取 3 份杏香兔耳风药材, 制备供试品溶液, 进样测定峰面积, 按回归方程计算绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素的平均质量分数分别为 3.88、3.50、0.130 mg/g。

3 讨论

本研究采用甲醇-0.1%磷酸水梯度洗脱, 得到较好的分离度, 且保留时间适当。本方法可以很好地测定杏香兔耳风中绿原酸、3, 5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素, 可以为杏香兔耳风的质量控制提供参考和科学依据。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [2] 江西省卫生厅. 江西省中药材标准 [M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 1997.
- [3] 李 蓉, 秦民坚. HPLC 法测定薄叶鸢尾中 5 种异黄酮 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 297-299.
- [4] 陈根顺, 徐丽芳, 李 鹏. 草珊瑚的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 293-296.