

HPLC 法测定金沙藤中绿原酸、咖啡酸和 *p*-香豆酰葡萄糖

王采奕^{1,2}, 胡筱希³, 闵建国¹, 邹准¹, 周艳林¹, 邹节明^{1*}

1. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004

2. 河北师范大学化学与材料科学学院, 河北 石家庄 050024

3. 南京农业大学理学院, 江苏 南京 210095

摘要: 目的 建立一种同时测定金沙藤中绿原酸、咖啡酸和 *p*-香豆酰葡萄糖的方法。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Phenomenex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-乙腈-1%冰醋酸 (5:5:90) 为流动相, 检测波长为 325 nm, 柱温 35 ℃。结果 绿原酸、咖啡酸和 *p*-香豆酰葡萄糖分别在 0.368~2.760、0.064~0.480、0.102~0.765 μg 内呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 101.48%、99.56%、101.73%, RSD 分别为 1.44%、0.92%、1.62%。结论 该方法操作简便、准确、重复性好, 可用于金沙藤及其提取物的质量控制。

关键词: 金沙藤; *p*-香豆酰葡萄糖; 绿原酸; 咖啡酸; HPLC

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)02-0273-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.022

Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid, and 6-*O*-*p*-coumaroyl-*D*-glucopyranose in *Lygodii Herba* by HPLC

WANG Cai-yi^{1,2}, HU Xiao-xi³, MIN Jian-guo¹, ZOU Zhun¹, ZHOU Yan-lin¹, ZOU Jie-ming¹

1. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China

2. College of Chemical and Material Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China

3. College of Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of chlorogenic acid, caffeic acid, and 6-*O*-*p*-coumaroyl-*D*-glucopyranose in *Lygodii Herba*. **Methods** The determination was developed on Phenomenex C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), methanol-acetonitrile-1% glacial acetic acid (5:5:90) was used as mobile phase, the detective wavelength was 325 nm, and the column temperature was 35 ℃. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid, caffeic acid, and 6-*O*-*p*-coumaroyl-*D*-glucopyranose were 0.368—2.760, 0.064—0.480, and 0.102—0.765 μg, respectively. The average recoveries were 101.48% (RSD = 1.44%), 99.56% (RSD = 0.92%), and 101.73% (RSD = 1.62%), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, and highly reproducible, which could be used for the quality control of *Lygodii Herba*.

Key words: *Lygodii Herba*; 6-*O*-*p*-coumaroyl-*D*-glucopyranose; chlorogenic acid; caffeic acid; HPLC

金沙藤 *Lygodii Herba* 为海金沙科植物海金沙 *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw.、小叶海金沙 *L. microphyllum* (Cav.) R. Br. 或曲轴海金沙 *L. flexuosum* (L.) Sw. 的干燥地上部分, 本品始载于《证类本草》, 李时珍谓: “生山林下, 茎细如线, 引于竹木上, 叶背多皱纹, 皱处有沙子, 壮如蒲黄粉, 黄赤色, 不开花, 细根坚强, 其沙及草皆可入药”^[1-2]。现收载于《广西中药材标准》《广西瑶药质量标准》中, 具有清热解毒、利水通淋的功能^[3]。现代研究表明金沙藤富含有机酸类、酚类和黄酮类

等多种化合物^[4-5]。系统研究发现, 以绿原酸、咖啡酸为代表的苯丙烯酸类为其主要成分, 金沙藤中咖啡酸的测定方法已有报道^[6], 本实验建立了其中绿原酸、咖啡酸和 *p*-香豆酰葡萄糖 3 个主要成分同时测定方法, 为更全面地评价金沙藤药材及相关提取物的质量奠定基础。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

金沙藤采自广西桂林地区 (批号分别为 140803、140804、140805、141201、141202、141203),

收稿日期: 2014-11-12

基金项目: 国家科技重大专项 (2011ZX09201-201-17); 西南民族药协同创新中心资助课题 (CICSEM 2013-A3); 桂工信投资项目 ([2013]258)

*通信作者 邹节明, 教授级高级工程师, 博士生导师。Tel: (0773)5842588 E-mail: zjm@sanjin.com.cn

经桂林三金药业股份有限公司钟小清高级工程师鉴定为海金沙 *Lygodium japonicum* (Thunb.) Sw. 的干燥地上部分, 药材留样存放于桂林三金药业股份有限公司药物研究所标本室。绿原酸、咖啡酸对照品购自中国食品药品检定研究院, *p*-香豆酰葡萄糖对照品为自制 (质量分数均大于 98%)。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

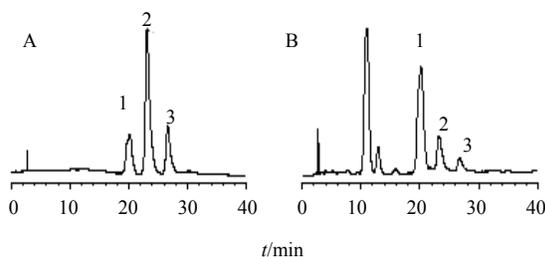
1.2 仪器

Waters 2695 高效液相色谱仪, DAD 二极管阵列检测器 (Waters, 美国), Empower 工作站, BuG-40 超声仪 (必能信, 上海 Branson)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-乙腈-1%冰醋酸 (5:5:90); 体积流量 1 mL/min; *p*-香豆酰葡萄糖、绿原酸、咖啡酸检测波长为 325 nm; 柱温 35 °C; 在上述色谱条件下, *p*-香豆酰葡萄糖、绿原酸、咖啡酸对应的保留时间为 20.3、23.2、26.6 min, 分离度良好, 色谱图见图 1。



1-*p*-香豆酰葡萄糖 2-绿原酸 3-咖啡酸
1-6-*O-p*-coumaroyl-*D*-glucopyranose 2-chlorogenic acid 3-caffeic acid

图 1 混合对照品 (A) 及金沙藤 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A) and *Lygodii Herba* (B)

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取 25 °C 干燥至恒定质量的 *p*-香豆酰葡萄糖、绿原酸、咖啡酸对照品适量, 置棕色量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照品储备溶液 (质量浓度分别为 1.019、0.921、0.402 mg/mL)。分别吸取 *p*-香豆酰葡萄糖、绿原酸、咖啡酸的储备液 0.5、2.0、0.8 mL 移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 作为混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取金沙藤粉末 (过 2 号筛) 约 1.5 g, 置具塞锥形瓶中, 加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声

处理 30 min, 放冷, 称定质量, 加甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 2、4、6、8、10、15 μL 注入液相色谱仪, 以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 得绿原酸回归方程为 $Y=1.110 \times 10^6 X+1.047 \times 10^6$, $r=0.999 3$; 咖啡酸回归方程为 $Y=2.451 \times 10^6 X+3.477 \times 10^6$, $r=0.999 3$; *p*-香豆酰葡萄糖回归方程为 $Y=1.057 \times 10^6 X+3.248 \times 10^6$, $r=0.999 3$ 。结果表明, 绿原酸、咖啡酸和 *p*-香豆酰葡萄糖分别在 0.368~2.760、0.064~0.480 和 0.102~0.765 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密称取金沙藤粉末 (批号 140803, 过 2 号筛) 约 1.5 g, 制备供试品溶液, 进样 10 μL, 重复进样 6 次, 测定绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酰葡萄糖的峰面积, 分别计算质量分数, 测得质量分数的 RSD 分别为 0.03%、0.12%、0.13%。

2.6 稳定性试验

精密称取金沙藤粉末 (批号 140803, 过 2 号筛) 约 1.5 g, 制备供试品溶液, 室温下放置, 分别于 0、4、8、16、24、48 h 精密吸取供试品溶液 10 μL, 测定绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酰葡萄糖的峰面积值, 并分别计算质量分数, 测得其质量分数的 RSD 值分别为 1.03%、1.12%、0.41%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验

精密称取同一批金沙藤粉末 (批号 140803, 过 2 号筛) 6 份, 分别制备供试品溶液, 分别测定并计算绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酰葡萄糖的量, 测得样品中绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酰葡萄糖平均质量分数分别为 0.076%、0.015%、0.200%, RSD 分别为 0.47%、1.90%、2.45%, 结果表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

精密称取已测定的金沙藤粉末 (批号 140803, 过 2 号筛) 0.75 g, 平行 6 份, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入 *p*-香豆酰葡萄糖 (1.019 mg/mL) 对照品溶液 1.5 mL、绿原酸 (0.921 mg/mL) 对照品溶液 0.6 mL 和咖啡酸 (0.402 mg/mL) 对照品溶液 0.3 mL, 制备供试品溶液, 测定并计算加样回收率, 绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酰葡萄糖的平均回收率分别为 101.48%、99.56%、101.73%, RSD 分别为 1.44%、0.92%、1.62%。

2.9 样品测定

取各批次金沙藤粉末(过2号筛)1.5 g,各2份,精密称定,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别测定其中绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酰葡萄糖的量,结果见表1。

表1 金沙藤中绿原酸、咖啡酸和*p*-香豆酰葡萄糖的测定(*n*=3)
Table 1 Determination of chlorogenic acid, caffeic acid, and 6-*O*-*p*-coumaroyl-*D*-glucopyranose in *Lygodii Herba* (*n*=3)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	绿原酸	咖啡酸	<i>p</i> -香豆酰葡萄糖
140803	0.76	0.15	2.00
140804	0.55	0.09	1.35
140805	1.02	0.21	2.11
141201	0.84	0.22	1.69
141202	0.69	0.09	1.31
141203	0.91	0.18	1.87

不同批次金沙藤均能检测出3个目标成分,相比而言,绿原酸、*p*-香豆酰葡萄糖的量较高,可以优先考虑作为金沙藤质量控制指标。

3 讨论

制备供试品溶液时,考察了不同提取溶剂,发现水、乙醇虽能较好地提取相关成分,但同时提取较多杂质成分,干扰目标成分的检测,故选择甲醇作为提取溶剂,经简单超声处理即能有效地提取目

标成分。

尝试用甲醇-乙腈-水作为流动相,发现绿原酸、咖啡酸峰形拖尾。流动相中加入适量冰醋酸,可有效改善拖尾现象。经不同流动相配比,发现以甲醇-乙腈-1%冰醋酸(5:5:90)作为流动相,目标峰的分度良好、保留时间合适。

分别取绿原酸、咖啡酸和*p*-香豆酰葡萄糖对照品溶液,在200~400 nm进行紫外光谱扫描,结果绿原酸最大吸收在219、325 nm,咖啡酸最大吸收在221、322 nm,*p*-香豆酰葡萄糖最大吸收在228、314 nm,为确保不同成分均有较高灵敏度和减少杂质干扰,最终选择325 nm作为检测波长,对3种成分可以同时有效测定。

参考文献

- [1] 肖培根. 新编中药志(第3卷)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] 彭海燕, 钟小清, 吕高荣, 等. 金沙藤药材的名实考证[J]. 中草药, 2013, 44(21): 3063-3066.
- [3] 广西中药材标准[S]. 1990.
- [4] 严海, 王力生, 周艳林, 等. 金沙藤与海金沙化学成分的比较[J]. 中草药, 2010, 41(12): 2092-2094.
- [5] 何胜旭, 孟杰, 吕高荣, 等. 金沙藤与海金沙药理作用的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2149-2152.
- [6] 徐世霞, 晁若冰. RP-HPLC测定海金沙藤中咖啡酸的含量[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(6): 552-553.