

RP-HPLC 法同时测定昆仑雪菊中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素的量

木合塔尔·吐尔洪^{1,2}, 买买提·吐尔逊^{1,2}, 热萨莱提·伊敏¹, 楚刚辉^{1,2}, 木尼热·阿不都克力木^{2*}

1. 喀什大学化学与环境科学学院, 新疆 喀什 844006

2. 新疆特色药食用植物资源化学实验室, 新疆 喀什 844006

摘要: 目的 采用高效液相色谱-二极管阵列检测方法, 建立昆仑雪菊中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素的测定方法。方法 色谱柱为安捷伦 HC-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.01%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 检测波长 315 nm; 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min。结果 昆仑雪菊中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素分别在 2.0~60 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、5.0~100 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、1.0~40 μg/mL ($r=0.999\ 9$) 和 0.5~40 μg/mL ($r=0.999\ 9$) 呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 102.4% (RSD 为 1.05%)、98.6% (RSD 为 1.28%)、103.6% (RSD 为 0.95%)、101.2% (RSD 为 1.12%)。结论 该方法操作简便、易行、稳定, 具有良好的灵敏性、重现性和回收率, 可用于昆仑雪菊药材的质量控制。

关键词: 高效液相色谱-二极管阵列检测法; 昆仑雪菊; 绿原酸; 芦丁; 槲皮素; 木犀草素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)09-1601-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.026

Simultaneous determination of chlorogenic acid, rutin, quercetin, and luteolin in kunlun snow daisy for uighur medicine by RP-HPLC

Mheta'er·Tu'erhong^{1,2}, Mamat·Turson^{1,2}, Resalat·Yimin¹, CHU Gang-hui^{1,2}, Munira·Abudukeremu²

1. College of Chemistry and Environmental Science, Kashgar University, Kashgar 844006, China

2. Xinjiang Laboratory of Native Medicinal and Edible Plant Resources Chemistry, Kashgar 844006, China

Abstract: Objective The high performance liquid chromatography diode array detection method was used to establish the determination methods for the contents of chlorogenic acid, rutin, quercetin, and luteolin in Kunlun snow daisy (*Coreopsis tinctoria*, *Coreopsis tinctoriae Folium*). **Methods** Agilent HC-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was CH₃OH (A)-0.01% H₃PO₄ (B) for the gradient elution with flow rate of 1.0 mL/min, the detection wavelength was 315 nm and the column temperature was 30 ℃. **Results** There was a linear correlation between the concentration of chlorogenic acid 2.0—60 μg/mL ($r=0.999\ 8$), rutin 5.0—100 μg/mL ($r=0.999\ 9$), quercetin 1.0—40 μg/mL ($r=0.999\ 9$), and luteolin 0.5—40 μg/mL ($r=0.999\ 9$). The average recovery rates of chlorogenic acid, rutin, quercetin, and luteolin were 102.4% (RSD=1.05%, $n=5$), 98.6% (RSD=1.28%, $n=5$), 103.6% (RSD=0.95%, $n=5$), and 101.2% (RSD=1.12%, $n=5$), respectively. **Conclusion** The analysis method is simple, rapid, reproducible, accurate, and reliable. It could be used to identify and evaluate the quantitative determination of chlorogenic acid, rutin, quercetin, and luteolin contents in Kunlun snow daisy.

Key words: high performance liquid chromatography diode array detection method; Kunlun snow daisy (*Coreopsis tinctoria* Nutt., *Coreopsis tinctoriae Folium*); chlorogenic acid; rutin; quercetin; luteolin

昆仑雪菊 (Kunlun snow daisy), 学名蛇目菊, 别名两色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt., 维吾尔语“古丽恰尔”^[1-2], 是在新疆维吾尔药物中能与天山雪莲齐名并具有较高药用价值和独特功效的高寒野生植物。通过长期临床试验表明, 长期冲泡饮用对糖尿病、高血压、高血脂以及冠心病患者

有较显著的效果^[3-4]。除此之外昆仑雪菊还具有减肥养颜、抗菌消炎、营养心肌、改善睡眠质量等功效^[5]。目前为止对昆仑雪菊有效成分分离提取的研究较多^[6-10], 富含黄酮类化合物^[11-18]。现有研究证实, 绿原酸及槲皮素、芦丁、木犀草素等黄酮类物质及其与糖结合形成的苷是昆仑雪菊花对心血管

收稿日期: 2015-07-30

基金项目: 自治区高校科研计划重点项目 (XJEDU2011147)

作者简介: 木合塔尔·吐尔洪 (1961—), 男, 教授, 研究方向为天然产物有效成分分析。

Tel: 13899167692 Fax: (0998)2893543 E-mail: tumut@sohu.com

*通信作者 木尼热·阿不都克力木, 女, 教授, 研究生导师, 主要从事天然产物有效成分提取分离及纯化研究。

Tel: 13899167692 E-mail: munira818@163.com

疾病及糖尿病等慢性疾病具有预防与保护作用的主要活性成分^[19]。买买提·艾买提等^[20]和赵文惠等^[21]利用 RP-HPLC 法对昆仑雪菊中木犀草素和绿原酸的量进行了测定。袁辉等^[22]利用 HPLC 法测定昆仑雪菊中绿原酸和黄芩苷的量。但是尚未见用 HPLC 法同时分离测定昆仑雪菊中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素量的相关文献报道。本实验以不同批次昆仑雪菊研究对象,建立 HPLC-二极管阵列法同时测定昆仑雪菊中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素量的方法,以期为昆仑雪菊药材的质量控制和药理作用研究及新疆特色资源的充分开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 材料与试剂

槲皮素对照品(批号 100081,中国食品药品检定研究院);芦丁对照品(批号 0080-9705,中国食品药品检定研究院);绿原酸(质量分数 $\geq 98\%$)、木犀草素(质量分数 $\geq 98\%$)对照品均购自 Aladdin Chemistry Co. Ltd.;甲醇、乙腈为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。昆仑雪菊分 4 批(I~IV)采购于喀什东巴扎茶叶街,经喀什大学生物与地理科学系司马义教授鉴定为菊科(Asteraceae)金

鸡菊属 *Coreopsis* Linn. 多年生草本植物两色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt. 的头状花序。

1.2 仪器与设备

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(配有 SPD-M20A 二极管阵列检测器, DGU-20A5 在线脱气机, LC-solution 工作站); KQ3200DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XA-1 型多功能粉碎机(江苏姜堰市分析仪器厂); ZK-82B 真空干燥箱(上海市实验仪器总厂);赛多利斯 BS224S 型电子天平(德国)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

准确称取绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素对照品各 5.0 mg 于 25 mL 量瓶中,用甲醇完全溶解,稀释并定容至刻度,摇匀,得 200 $\mu\text{g/mL}$ 各对照品储备液。分别准确吸取不同体积绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素对照品储备液于 7 个 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得到 7 组混合对照品溶液,在冰箱里保存($6\text{ }^{\circ}\text{C}$)。7 组混合对照品溶液中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素的质量浓度见表 1。

表 1 混合对照品溶液中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素的质量浓度

Table 1 Concentration of chlorogenic acid, rutin, quercetin, and luteolin in mixed reference solution

对照品	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$						
	1	2	3	4	5	6	7
绿原酸	2.0	5.0	10.0	20.0	30.0	40.0	60.0
芦丁	5.0	10.0	20.0	40.0	60.0	80.0	100.0
槲皮素	1.0	2.0	5.0	10.0	20.0	30.0	40.0
木犀草素	0.5	1.0	5.0	10.0	20.0	30.0	40.0

2.2 供试品溶液的制备

准确称取干燥、粉碎、过筛(60 目)的昆仑雪菊粉末 1.0 g,加 75%甲醇(25 mL),浸泡 1 h,超声提取 20 min,抽滤除渣,55 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩滤液至干,放置室温,用甲醇定容至 25 mL,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,滤液置于冰箱备用。

2.3 色谱条件

色谱柱:安捷伦 HC-C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-0.01%磷酸水溶液(B),梯度洗脱,洗脱程序见表 2;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 315 nm;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL 。

2.4 线性关系考察

分别吸取 7 组混合对照品溶液 20 μL 进样,按照“2.3”项下色谱条件测定其峰面积。每组重复

表 2 洗脱程序

Table 2 Elution procedure

t/min	A/%	B/%
0.0	25	75
1.5	25	75
8.0	60	40
12.0	45	55
15.0	55	45
20.0	55	45
30.0	25	75

6 次,以对照品在混合溶液中的质量浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,实验结果表明峰面积与质量浓度呈良好的线性关系。得到的线性回归方程、相关系数、线性范围见表 3。

表 3 回归方程、相关系数、线性范围

Table 3 Linear regression equation, correlation coefficient, and linear range

组分	回归方程	相关系数	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
绿原酸	$A=157\ 631.5\ C+25\ 463$	0.999 8	2.0~60
芦丁	$A=128\ 634.3\ C+12\ 501$	0.999 9	5.0~100
槲皮素	$A=202\ 546.2\ C+5\ 686$	0.999 9	1.0~40
木犀草素	$A=125\ 638.1\ C+12\ 865$	0.999 9	0.5~40

2.5 精密度和重复性试验

混合对照品溶液,按“2.3”项色谱条件下连续进样 5 次,测定绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素峰面积的 RSD 分别为 1.02%、0.95%、0.85%、1.38% 和 1.52%,表明仪器精密度良好。精密称取同一昆仑雪菊样品 5 份,每份约 1.0 g,按“2.2”项方法制备供试品溶液,按上述色谱条件进行测定,计算样品中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素质量分数的 RSD 分别为 1.14%、0.85%、1.37%和 1.62%,实验结果表明重复性良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一样品溶液,分别放置 0、3、6、9、12 h 后,按“2.2”项色谱条件下进样检测。计算绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素峰面积的 RSD 分别为 0.96%、1.52%、1.41%和 1.06%。结果表明样品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.7 加样回收率试验

准确称取已测定的昆仑雪菊样品 I 粉末 5 份,每份 0.5 g,分别精密加入不同量的绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素对照品溶液,按“2.2”项方法制备加标样品溶液,按上述色谱条件进行测定,以外标法计算回收率。结果绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素平均回收率分别为 102.4%、98.6%、103.5%、

101.2%, RSD 分别为 1.05%、1.28%、0.95%、1.12%。

2.8 样品测定

分精密吸取按“2.2”项下方法制备的昆仑雪菊供试品溶液 10 μL ,注入高效液相色谱仪,按“2.3”项色谱条件下进行测定。混合对照品和样品的 HPLC 色谱图见图 1,记录绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素面积积分值,代入回归方程计算,测定结果见表 4。

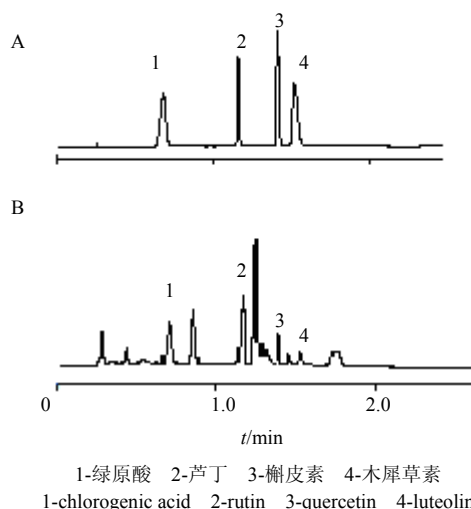


图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed reference substances (A) and samples (B)

表 4 样品中绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素的测定结果

Table 4 Determination of chlorogenic acid, rutin, quercetin, and luteolin

样品批次	绿原酸/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	芦丁/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	槲皮素/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	木犀草素/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
I	2 549.2	1 982.4	318.8	125.2
II	2 487.1	2 034.2	309.1	107.3
III	2 382.0	1 925.9	291.7	95.8
IV	2 408.1	2 157.1	348.8	82.7
平均值	2 456.6	2 024.9	317.1	102.8

3 讨论

3.1 检测波长的确定

利用二极管阵列检测器能够在一次运行中同时采集 200、254、280、315、327、360 nm 波

长色谱图的特点,结合文献报道^[23-24],芦丁和槲皮素在 315 nm 波长下色谱峰的峰形对称,达到定量分析要求,因此,可以确定 315 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择

根据文献^[25-26]考察了不同比例的甲醇-乙酸, 甲醇-0.1%磷酸水溶液, 甲醇-0.01%磷酸水溶液, 乙腈-磷酸水溶液为流动相, 分别做等度洗脱或梯度洗脱, 观察样品中各个有效成分的分离情况, 当甲醇-0.01%磷酸水溶液作为流动相, 梯度洗脱时, 绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素峰形良好能达到基线分离, 并且与其他杂质峰得到了良好的分离, 峰形良好。因此, 用甲醇-0.01%磷酸水溶液梯度洗脱分离绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素。

3.3 提取溶剂及提取法的选择

以不同浓度甲醇为提取溶剂考察了回流法、索氏提取法、浸提法、超声波法、解析法的不同方法的提取效果。结果显示, 用 75%甲醇超声提取 20 min, 浸泡 1 h, 再超声波提取 20 min 的方法, 对绿原酸、芦丁、槲皮素和木犀草素的提取率最高, 而且超声提取具有操作简单易行、能耗较低、快速高效、不破坏有效成分的特点。故选择 75%甲醇超声提取 20 min, 浸泡 1 h, 再超声提取 20 min 作为昆仑雪菊中有效成分的提取方法。

昆仑雪菊以其高的观赏价值和奇妙的药用价值而备受青睐。昆仑雪菊资源丰富, 开发利用前景光明。该方法简便快速、准确可靠、重现、精密度、稳定性、回收率都较好, 是一种较好的测定方法。适用于同时测定昆仑雪菊中芦丁和槲皮素。为昆仑雪菊资源的深度开发利用、药用价值研究以及质量评价提供了科学依据。

参考文献

- [1] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志 (第 5 卷) [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999.
- [2] 木合布力·阿布力孜, 张 燕, 景兆均, 等. 新疆昆仑雪菊化学成分的初步定性研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(6): 628-630.
- [3] 姜保平, 许利嘉, 贾晓光, 等. 两色金鸡菊的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 567-573.
- [4] 胡正梅, 马清河. 昆仑雪菊的研究进展 [J]. 新疆中医药, 2014, 32(6): 76-78.
- [5] 过利敏, 张 平, 张 谦, 等. 雪菊化学成分分析、提取、及其物活性研究进展 [J]. 食品科学, 2014, 35(7): 298-304.
- [6] 古丽江·马合苏提汗, 李新霞, 李彬彬, 等. 气相色谱法测定新疆昆仑雪菊挥发油中柠檬烯的含量 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(17): 96-99.
- [7] 沈维治, 邹宇晓, 刘 凡, 等. 雪菊与市售菊花活性成分的比较研究 [J]. 热带作物学报, 2012, 33(12): 2284-2287.
- [8] 沈维治, 邹宇晓, 刘 凡, 等. 顶空固相微萃取气质联用分析比较雪菊与市售菊花的挥发性成分 [J]. 热带作物学报, 2013, 34(4): 771-776.
- [9] 符继红, 史岷山. 新疆昆仑雪菊中微量元素的测定及溶出性研究 [J]. 食品科技, 2013, 38(10): 297-300.
- [10] 张彦丽, 阿布都热合曼·合力力, 阿依吐伦·斯马义. 苯酚-硫酸法测定维吾尔药昆仑雪菊多糖含量的研究 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(11): 2205-2207.
- [11] 张彦丽, 韩艳春, 阿依吐伦·斯马义. 分光光度法测定维吾尔药昆仑雪菊中总皂苷的含量 [J]. 西北药学杂志, 2011, 26(2): 87-88.
- [12] 孙自增, 毕肯·阿不都克力木, 张彦丽, 等. 不同产地雪菊化学成分含量测定及模式识别研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 174-178.
- [13] 吴 瑛, 王秀芳, 袁守亮. 响应面分析昆仑雪菊水溶性黄酮类化合物的提取工艺 [J]. 食品科学, 2013, 34(6): 129-133.
- [14] 阿不都哈力力·艾力, 西力扎提·阿布来提, 古海妮萨·麦合木提, 等. 超声微波协同萃取维药雪菊中总黄酮工艺研究 [J]. 广州化工, 2013, 41(7): 75-77.
- [15] 古扎力努尔·艾尔肯, 李新霞, 毛新民, 等. 新疆两色金鸡菊中绿原酸与总黄酮含量测定及指纹图谱的建立 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(3): 248-251.
- [16] 景玉霞, 兰 卫. 不同产地昆仑雪菊总黄酮含量测定 [J]. 新疆中医药, 2012, 30(5): 62-64.
- [17] 张彦丽, 茹鲜古丽·哈斯木, 丁海燕, 等. 超声-微波协同萃取法提取昆仑雪菊中总黄酮的研究 [J]. 广州化工, 2011, 39(21): 57-59.
- [18] 买买提·艾买提, 木合布力·阿布力孜, 孟 磊. 新疆昆仑雪菊水溶性总黄酮的含量测定 [J]. 海峡药学, 2010, 22(10): 56-58.
- [19] 王 艳, 张彦丽, 阿依吐伦·斯马义. 分光光度法测定新疆昆仑雪菊中总黄酮的含量 [J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(8): 817-819.
- [20] 买买提·艾买提, 赵文惠, 木合布力·阿布力孜, 等. 反相高效液相色谱法测定昆仑雪菊中绿原酸的含量 [J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(12): 1370-1372.
- [21] 赵文惠, 朱雅琪, 李新霞. 反相高效液相色谱法测定昆仑雪菊中木犀草素的含量 [J]. 新疆医科大学学报, 2014, 37(5): 567-560.
- [22] 袁 辉, 赵建勇, 杨文菊. 新疆不同产地雪菊 UPLC 指纹图谱的建立及其成分测定 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1223-1226.
- [23] 中华人民共和国卫生部药品标准维吾尔分册 [S]. 1999.
- [24] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [25] 宾 婕, 刘 洁, 张春勇, 等. 正交设计优选苦荞中芦丁和槲皮素的提取工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2011, 27(4): 437-439.
- [26] 黄 菊, 翟淑敏. 正交设计和响应面法优化荞麦中芦丁提取工艺的比较 [J]. 粮食与油脂, 2014, 27(9): 45-48.