

HPLC 测定新疆产短星火绒草中绿原酸和咖啡酸的含量

龚健, 卢帅, 索菲娅*, 王傲立, 叶星

(新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定新疆产短星火绒草中绿原酸和咖啡酸含量的方法, 并用于短星火绒草中绿原酸和咖啡酸含量的测定。方法: 采用 Diamonsil™ (钻石) C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.5% 磷酸溶液(10:90), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长 280 nm。结果: 绿原酸线性范围 0.08 ~ 0.76 μg ($r = 0.999\ 9$), 平均加样回收率 99.48%, RSD 2.82%。咖啡酸线性范围 0.051 ~ 0.459 μg ($r = 0.999\ 9$), 平均加样回收率 100.31%, RSD 0.96%。结论: 该法简单、准确、重复性好, 可用于测定短星火绒草中绿原酸和咖啡酸含量。

[关键词] 短星火绒草; 绿原酸; 咖啡酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0050-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110050

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140324.1609.023.html>

[网络出版时间] 2014-03-24 16:09

Determination of Chlorogenic Acid and Caffeic Acid in *Leontopodium brachyactis* from Xinjiang by HPLC

GONG Jian, LU Shuai, SUO Fei-ya*, WANG Ao-li, YE Xing

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of chlorogenic acid and caffeic acid in *Leontopodium brachyactis* from Xinjiang for the first time. **Method:** The stationary phase was Diamonsil™ C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column and the mobile phase was acetonitrile-0.5% phosphoric acid (10:90). The flow rate was maintained at 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was set at 40 °C. The detective wavelength was set at 280 nm. **Result:** The liner range of chlorogenic acid was 0.08-0.76 μg ($r = 0.999\ 9$). The average recovery was 99.48% (RSD 2.82%). The liner range of caffeic acid was 0.051-0.459 μg ($r = 0.999\ 9$). The average recovery was 100.31% (RSD 0.96%). **Conclusion:** The method is simple, accurate and sensible, and can be used to determine the content of the chlorogenic acid and caffeic acid in *L. brachyactis*.

[Key words] *Leontopodium brachyactis*; chlorogenic acid; caffeic acid; HPLC

[收稿日期] 20130410 (015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31160073);新疆维吾尔自治区教育厅项目(XJEDU2010112);新疆维吾尔自治区科技厅项目(201091245)

[第一作者] 龚健, 在读硕士, 从事资源植物研究, Tel: 15276826986, E-mail: ggj2011@163.com

[通讯作者] * 索菲娅, 硕士, 副教授, 从事植物化学和新药研发, Tel: 13009651827, E-mail: sophi3106@sina.com

短星火绒草系菊科火绒草属植物^[1]。本属全世界约有 56 种, 主要分布在亚洲和欧洲的寒带、温带和亚热带地区的山地, 我国有 40 余种, 主要集中在西部和西南部, 特别是青藏高原地区^[2], 其中有 25 种在民间作为药用^[3]。新疆火绒草属植物药源丰富, 新疆分布有 6 个种, 主要分布在新疆天山山脉的草原、山坡一带^[1]。火绒草属植物以地上全草入药, 性寒, 味微苦, 具有疏风解表、清热凉血、消炎利尿等功效^[1]。常用于肾脏疾病的治疗^[4-6]。火绒草

属植物主要含有挥发油类、黄酮类、苯丙素类、甾体类咖啡酸、原儿茶醛、阿魏酸和苯乙双胍等化学成分^[7-9]。有文献^[10-11]报道采用高效液相色谱法测定了不同产地火绒草中咖啡酸和原儿茶醛成分以及火绒草中原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸和咖啡酸的含量。研究发现,绿原酸和咖啡酸为短星火绒草中主要有效成分,二者的含量在总提物中的含量较高。本实验采用 HPLC 法测定短星火绒草中绿原酸和咖啡酸的含量,可以控制短星火绒草药材的质量。

1 材料

LC-20A 液相色谱系统(日本岛津,CT-20AC 型柱温箱,SIL-20AC 型自动进样器,SPD-20AV 型紫外检测器,DGU-20A3 型自动脱气机)。

绿原酸(批号 110753-200413)、咖啡酸(批号 110885-200102)对照品均购自中国食品药品检定研究院),乙醇、磷酸均为分析纯,乙腈为色谱纯,水为超纯水。

实验药材采集于新疆吉木萨林场,采样时间为 2009 年 7~9 月,由新疆大学生命科学与技术学院索菲娅副教授鉴定为菊科火绒草属短星火绒草 *Leontopodium brachyactis* Gandog. 的全草。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

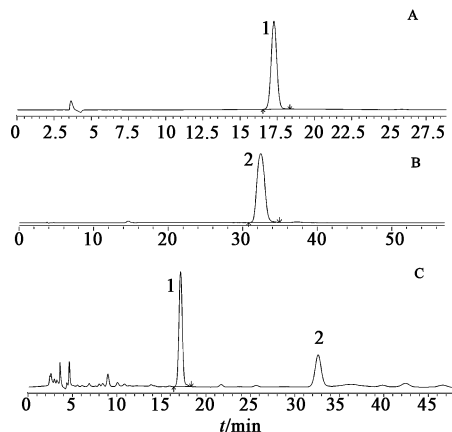
2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、咖啡酸对照品 1.05 mg,置于 25 mL 量瓶中,加 50% 乙醇稀释至刻度,摇匀,即得。因绿原酸受热见光易分解,宜用棕色量瓶贮存并置 4 °C 冰箱备用。使用前以 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.1.2 供试品溶液的制备 取短星火绒草样品细粉 1.0 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 50% 乙醇 100 mL,密塞,称定质量,超声提取 1 h,放冷,再称定质量,补足减失的质量,摇匀,滤过,吸取滤液上 C₁₈ 固相萃取柱,取续滤液,即得供试品溶液。使用前以 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.2 色谱条件 Diamonsil™ (钻石) C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温 40 °C,流动相乙腈-0.5% 磷酸溶液 (10:90),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,进样量 6 μL。

2.3 系统适用性试验 分别取对照品溶液和供试品溶液各 6 μL 进样测定。在 2.2 项色谱条件下,绿原酸色谱峰与样品中其他相邻组分色谱峰达到基线分离,理论塔板数 >7 000。见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取 2.1 项下的对照品溶液 2,6,10,14,18 μL 注入液相色谱仪中,按上述



A, B. 对照品; C. 样品; 1. 绿原酸; 2. 咖啡酸
图 1 短星火绒草 HPLC

色谱条件测定峰面积,以对照品进样量为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得 $Y_{\text{绿原酸}} = 6.0992 \times 10^{-7}X + 1.6270 \times 10^{-2}$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{咖啡酸}} = 3.6871 \times 10^{-7}X + 7.2375 \times 10^{-3}$ ($r = 0.9999$),结果表明绿原酸在 0.08~0.76 μg,咖啡酸在 0.051~0.459 μg 与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取上述供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件进行测定,重复进样 5 次,结果供试品溶液中绿原酸的 RSD 2.2%,咖啡酸的 RSD 1.6%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件 8 h 内连续进样 8 次,3 d 内每天进样 3 次,考察日内稳定性和日间稳定性,绿原酸和咖啡酸日内 RSD 分别为 2.2% 和 2.0%,日间 RSD 分别为 1.2% 和 1.8%,表明供试品溶液日内稳定性和日间稳定性均较好。

2.7 重复性试验 精密吸取同一供试品溶液 6 份,依上述测定方法测定,结果表明,6 份样品中绿原酸平均含量为 0.379%,RSD 1.2%;咖啡酸平均含量为 0.242%,RSD 1.8%。表明重复性良好。

2.8 回收率试验 取短星火绒草样品细粉 1.0 g 6 份,精密称定,分别置 100 mL 具塞锥形瓶中,分别精密加入 3.2 mg 绿原酸对照品和 2.0 mg 咖啡酸对照品,按 2.1.2 项下供试品制备方法制备,进样 6 μL,分别计算绿原酸和咖啡酸的平均加样回收率和 RSD,结果见表 1,2。

2.9 样品含量测定 取不同产地的短星火绒草样品细粉 1.0 g,精密称定,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 6 μL,进样,结果见表 3。

表 1 绿原酸加样回收率试验

取样量 /g	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1.016 3	3.508	3.26	6.701	97.96	99.48	2.82
0.989 1	3.414	3.30	6.850	104.13		
1.000 7	3.454	3.29	6.747	100.10		
1.002 5	3.460	3.37	6.803	99.20		
1.053 8	3.637	3.28	6.774	95.64		
1.018 3	3.515	3.31	6.820	99.85		

表 2 咖啡酸加样回收率试验

称样量 /g	样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1.016 3	2.080	2.17	4.216	98.44	100.31	0.96
0.989 1	2.024	2.02	4.056	100.58		
1.000 7	2.048	2.11	4.168	100.47		
1.002 5	2.052	2.12	4.190	100.86		
1.053 8	2.157	2.05	4.230	101.14		
1.018 3	2.084	2.12	4.212	100.38		

表 3 不同产地短星火绒草中绿原酸和咖啡酸的含量测定

样品	绿原酸	咖啡酸
1	0.375	0.211
2	0.094	0.103
3	0.327	0.196

mg · g⁻¹

3 讨论

分别考察了甲醇-0.5%磷酸溶液(25:75),乙腈-0.5%磷酸(15:85),甲醇-1%甲酸溶液(20:80),乙腈-1%乙酸溶液(15:85)等系统作为流动相,结果分离效果均不够理想,后调整流动相为乙腈-0.5%磷酸溶液(10:90),绿原酸峰型对称,与周围色谱峰基线分离,理论板数达7 000以上,能够满足样品含量测定要求。

曾对60%乙醇、50%乙醇和30%乙醇提取溶剂进行优选,结果发现60%乙醇和30%乙醇提取样品中绿原酸含量偏低,其提取效果低于50%乙醇提取,故选择50%乙醇为该样品提取溶剂。

比较了50%的乙醇回流提取和超声提取法的得率,差别不大,故本试验采用50%的乙醇超声提

取,制备供试品溶液。在加样回收率试验时,结果欠佳,可能与提取溶剂较少有关,所以加大提取溶剂体积,同时为了保证提取样品溶液浓度保持在较高水平且杂质较少,将提取溶剂改为100 mL 50%乙醇。

本试验对不同产地、不同批次的短星火绒草药材中的绿原酸和咖啡酸进行了含量测定,因产地、采收时间、贮存时间长短等因素不同,含量差异较大,须建立统一的药材质量标准。本方法简便、灵敏、准确,可为短星火绒草药材的质量控制提供参考依据,对进一步确定药材的最佳产地、扩大火绒草属药用资源具有一定的参考意义。

[参考文献]

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志. 第75卷[M]. 北京:科学出版社,1979:72.
- [2] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志. 第五卷[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:59.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,1996:14.
- [4] 李礼,张国刚,左甜甜,等. 中药火绒草化学成分的研究(II)[J]. 中南药学,2008,6(4):422.
- [5] 温彩红,陈其秀,陈冉,等. 火绒草的研究进展[J]. 内蒙古医学院学报,2005,27(5):90.
- [6] 曹跃,王丽,周翎,等. 火绒草中总黄酮的纯化工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):38.
- [7] 武彦文,高文远,苏艳芳,等. 火绒草属植物的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2005,30(4):245.
- [8] 刘英估,姜鸿,康廷国,等. 火绒草研究概况[J]. 辽宁中医药大学学报,2010,12(8):46.
- [9] Safer Stefan, Cicek Serhat S, Pieri Valerio, et al. Metabolic fingerprinting of *Leontopodium* species (Asteraceae) by means of ¹H-NMR and HPLC-ESI-MS [J]. Phytochem,2011,72(11/12):1379.
- [10] 邹国安,李水清,王光忠,等. 高效液相色谱法测定火绒草中咖啡酸和原儿茶醛的含量[J]. 湖北中医学院学报,2006,8(1):45.
- [11] 姜鸿,王光函,张颖,等. HPLC法测定火绒草中原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸和咖啡酸[J]. 中成药,2011,33(11):2023.

[责任编辑 顾雪竹]