

HPLC同时测定灯盏细辛提取物中3种有效成分的含量

王舒

(菏泽学院, 山东 菏泽 274015)

[摘要] 目的:建立同时测定灯盏细辛提取物中野黄芩苷,3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸和3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸的含量测定方法。方法:采用高效液相色谱法,大连依利特 C₁₈ 色谱柱(4.6mm x 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1%磷酸(22:78),检测波长330 nm,流速1 mL·min⁻¹,柱温35℃。结果:野黄芩苷,3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸和3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸分别在0.032 7~1.308 0 μg($r=0.999 9$),0.048 2~1.928 0 μg($r=0.999 9$),0.058 3~2.332 0 μg($r=0.999 8$)呈良好的线性关系,加样回收率分别为99.74%(RSD=1.9%),100.23%(RSD=1.4%),99.33%(RSD=1.3%)。结论:本法简便、快捷,结果准确、重复性好,可用于灯盏细辛提取物中3种有效成分的含量测定。

[关键词] 灯盏细辛提取物;野黄芩苷;3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸;3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸;含量测定

[中图分类号] **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0072-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190072

HPLC Determination of Three Active Components in Extract of Erigerontis Herba WANG Shu
(Heze University, Heze 274015, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of scutellarin, 3, 5-dicaffeoylquinic acid (3, 5-DCQA), 3, 4-dicaffeoylquinic acid (3, 4-DCQA) in extract of Erigerontis Herba. **Method:** The HPLC method was carried out on Dalian Elite C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) evaluated with acetonitrile-0.1% phosphoric acid (22:78) as mobile phase, the flow rate was 1 mL·min⁻¹, the temperature of column was at 35 °C, the detection wavelength was at 330 nm for UV detection. **Result:** The calibration curves were linear in the range of 0.032 7 to 1.308 0 μg ($r=0.999 9$) for scutellarin, 0.048 2 to 1.928 0 μg ($r=0.999 9$) for 3, 5-DCQA, 0.058 3 to 2.332 0 μg ($r=0.999 8$) for 3, 4-DCQA, respectively. The average recoveries were 99.74% with RSD 1.9%; 100.23% with RSD 1.4% and 99.33% with RSD 1.3% respectively. **Conclusion:** The assay demonstrated that the method was simple, it had adequate accuracy and selectivity to quantify the three active components in extract of Erigerontis Herba.

[Key words] extract of Erigerontis Herba; scutellarin; 3, 5-dicaffeoylquinic acid; 3, 4-dicaffeoylquinic acid; determination

灯盏细辛^[1]能治疗多种眼病,并且疗效确切,视神经保护功能是灯盏细辛治疗眼病的主要机制^[2]。前期工作对灯盏细辛药材不同溶剂提取部位进行了药效筛选,结果发现野黄芩苷等黄酮类和3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸等咖啡酰类化合物是灯盏细辛视神经保护的有效组分^[3-5]。对灯盏细辛及其提取物中黄酮类和咖啡酰类化合物的研究,有助于灯盏细辛及灯盏细辛提取物的质量控制。对药材、提取物及制剂中两类化合物的质量控制,一般采用HPLC法测定野黄芩苷,紫

外-可见分光光度法测定总黄酮或总咖啡酰含量^[6-7]。由于药材及提取物中有其他共存物质,紫外吸收光谱往往彼此重叠、干扰,缺乏专属性。与紫外-可见分光光度法相比,HPLC法具有更强的选择性和更高的灵敏度。因此,采用HPLC法进行多指标成分的含量测定,将是对灯盏细辛及其提取物进行质量控制的有效方法。

1 材料

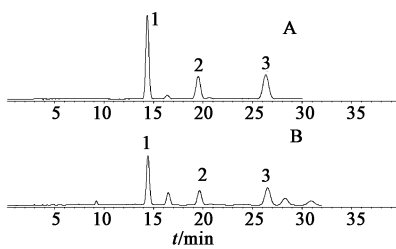
1200系列液相色谱仪(四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD检测器,美国

Agilent), BP121S1 型分析天平(德国赛多利斯公司), SZ-96 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣仪器厂)。野黄芩苷对照品(批号 110587-201005, 中国食品药品检定研究院), 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品(批号 05-200906, 纯度 $\geq 98\%$, 成都瑞芬思生物科技有限公司), 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品(自制, 纯度 $\geq 98\%$), 实验用水为超纯水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯。

灯盏细辛药材购自云南省玉溪市华宁县青龙镇药材收购站, 经菏泽学院蒋培红教授鉴定为菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* 的干燥全草。灯盏细辛提取物为本课题组制备(取灯盏细辛药材粉末加 15 倍量水浸泡 35 min 后, 煮沸提取 1 h, 滤过后再加 12 倍量水煮沸提取 1 h, 合并提取液, 通过 1.5 倍药材量的 AB-8 型大孔吸附树脂, 以水洗至洗脱液无色, 再以 4 倍树脂体积的 65% 乙醇洗脱, 65% 乙醇洗脱液回收溶剂, 减压干燥, 研细, 得浅棕色至黄棕色粉末^[8])。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 大连依利特 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸(22:78), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 330 nm, 进样量 10 μL。在上述色谱条件下, 野黄芩苷, 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸, 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸与其他峰分离度 > 1.5, 峰形较好, 对照品及供试品的色图谱见图 1。



1. 野黄芩苷; 2. 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸; 3. 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸

图 1 灯盏细辛 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Erigerontis Herba*

2.2 对照品溶液的制备 取野黄芩苷, 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸和 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸对照品适量, 精密称定, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 配制成质量浓度分别为野黄芩苷 0.327 g·L⁻¹, 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 0.482 g·L⁻¹, 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸 0.583 g·L⁻¹ 的对照品储备液, 摇匀, 备用。

2.3 供试品溶液的制备 取灯盏细辛提取物 50

mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加入甲醇 60 mL, 超声溶解, 取出, 放冷, 再加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即为供试品溶液。

2.4 线性关系的考察 分别精密量取 2.2 项中的野黄芩苷(0.327 g·L⁻¹), 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸(0.482 g·L⁻¹), 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸(0.583 g·L⁻¹) 对照品储存液 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配制成野黄芩苷质量浓度为 3.27, 16.35, 32.70, 65.40, 98.10, 130.8 mg·L⁻¹, 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸质量浓度为 4.82, 24.10, 48.20, 96.40, 144.60, 192.80 mg·L⁻¹, 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸质量浓度为 5.83, 29.15, 58.30, 116.6, 174.9, 233.2 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液, 进样各 10 μL, 测定。以峰面积(A)为纵坐标, 进样量(μg)为横坐标, 得回归方程分别为: $Y_{\text{野黄芩苷}} = 1550.3X - 0.2059$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸}} = 1504.1X - 1.4986$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸}} = 1638.9X - 8.5443$ ($r = 0.9998$), 结果表明野黄芩苷, 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸和 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸分别在 0.0327 ~ 1.3080, 0.0482 ~ 1.9280, 0.0583 ~ 2.3320 μg 呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 在上述色谱条件下, 连续等量重复进样 5 次, 测定, 结果野黄芩苷, 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸, 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸的峰面积 RSD 分别为 0.6%, 1.4%, 0.3%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取灯盏细辛提取物, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1 项下进样分析。结果野黄芩苷, 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸, 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.7%, 0.8%, 表明在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批灯盏细辛提取物 6 份, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 测得各成分质量分数依次为野黄芩苷 10.57%, 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸 4.79%, 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸 6.91%; RSD 依次为 1.4%, 1.6%, 0.7%。表明重复性良好。

2.8 回收率试验 取已知含量的灯盏细辛提取物 6 份, 每份约 25 mg, 精密称定, 加入一定量的对照品溶液, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下方法进样分析, 结果见表 1。

2.9 含量测定 取不同批次的灯盏细辛提取物, 按

表 1 灯盏细辛中 3 个成分加样回收率试验

Table 1 Results of recovery experiment of Erigerontis Herba

对照品	取样量 /mg	样品中 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
野黄芩苷	25.10	3.18	3.20	6.33	98.44	99.74	1.9
	25.00	3.17	3.20	6.34	99.06		
	25.30	3.21	3.20	6.50	102.81		
	25.30	3.21	3.20	6.37	98.75		
	25.35	3.22	3.20	6.46	101.25		
	25.35	3.22	3.20	6.36	98.15		
3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	25.10	1.44	1.45	2.88	99.31	100.23	1.4
咖啡酰奎宁酸	25.00	1.45	1.45	2.91	100.69		
	25.30	1.45	1.45	2.92	101.38		
	25.30	1.46	1.45	2.89	98.62		
	25.35	1.46	1.45	2.90	99.31		
	25.35	1.46	1.45	2.94	102.07		
3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸	25.10	2.06	2.00	4.01	97.50	99.33	1.3
咖啡酰奎宁酸	25.00	2.05	2.00	4.03	99.00		
	25.30	2.08	2.00	4.05	98.50		
	25.30	2.08	2.00	4.09	100.50		
	25.35	2.09	2.00	4.11	101.00		
	25.35	2.09	2.00	4.08	99.50		

2.3 项下制备供试品溶液,测定 5 批灯盏细辛提取物中野黄芩苷、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸的含量,结果见表 2。

表 2 灯盏细辛中 3 种成分的含量测定 (n=2)

Table 2 Results of determining tested samples (n=2)

No.	野黄芩苷	3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸	3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸
20140708	13.24	5.76	8.19
20141012	8.27	4.03	5.59
20141026	10.57	4.78	6.91
20141030	13.99	4.85	7.42
20141109	6.77	4.56	6.79

3 讨论

灯盏细辛提取物的成分主要是野黄芩苷、灯盏甲素、野黄芩素等黄酮类,以峰面积计约为 54.04%;以及 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸等咖啡酰类,以峰面积计约为 45.96%。其中,野黄芩苷是公认的灯盏细辛的主要活性成分^[9];3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸文献报道具有视神经保护活性^[10]。因此,在指

标成分选择时,选择了野黄芩苷、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸,建立了采用高效液相色谱法同时测定灯盏细辛提取物中黄酮类及酚酸类 3 种化合物含量的方法。

采用 DAD 在 200~400 nm 波长进行紫外扫描,野黄芩苷、3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸、3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸的最大吸收波长在 328~335 nm 之间,综合考虑,选择检测波长为 330 nm。

考察了甲醇-水、乙腈-水流动相,由于野黄芩苷、3,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸为微偏酸性,流动相中不加酸出现拖尾峰,故在流动相中加入酸来改善分离效果。实验证明,乙腈-水流动相中加入 0.1% 磷酸,峰对称因子在 0.96~1.00,理论塔板数在 9 000 以上,分析时间约为 30 min,野黄芩苷和 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸及 3,4-二-O-咖啡酰奎宁酸的保留时间分别约为 14.414, 19.620, 26.494 min。

[参考文献]

[1] 林榕. 中国植物志. 74 卷[M]. 北京: 科技出版社, 1985;308.

[2] 路雪婧, 张富文, 张艺, 等. 灯盏细辛总黄酮对视神经的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 510-514.

[3] 万丽丽. 野黄芩苷药动学研究进展[J]. 中国药房, 2007, 18(30): 2385-2387.

[4] 张静, 杨文宇, 张艺, 等. 灯盏细辛化学成分及视神经保护活性成分的研究[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(22): 1695-1697.

[5] 张静, 王毓杰. 灯盏细辛制剂神经保护活性-化学对比研究[J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(4): 68-71.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010;100.

[7] 任琦, 谢媛媛, 祖双. 灯盏细辛中多酚类成分定性、定量的分析[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1176-1184.

[8] 普元柱. 灯盏细辛提取物酚类成分分析及血清药物化学初步研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2010.

[9] Takenaka M, Nagata T, Yoshida M. Stability and bioavailability of antioxidants in garland (*Chrysanthemum Coronarium* L.) [J]. Biosci Viotechnol Biochem, 2000, 64(12): 2689-2691.

[10] Yuta I, Masam S, Yoshimi N J, et al. Brazilian green propolis protects against retinal damage *in vitro* and *in vivo* [J]. ECAM, 2006, 3(1): 71-77.

[责任编辑 顾雪竹]