

RP-HPLC同时测定不同产地路边青药材中 4种活性成分的含量

詹十音*

(湖北省中西医结合医院, 武汉 430015)

[摘要] 目的:建立反相高效液相色谱法同时测定路边青药材中咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚含量的方法。方法:采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.5% 甲酸水溶液梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 340 nm。结果:咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚分别在 0.045 ~ 1.130, 0.095 ~ 2.370, 0.105 ~ 2.635, 0.041 ~ 1.030 μg 线性关系良好, 平均加样回收率($n=6$)分别为 99.0%, 98.5%, 97.7%, 100.7%, RSD 分别为 1.0%, 0.9%, 1.0%, 1.6%。结论:该方法简便、快捷, 重复性好, 可用于路边青药材的质量控制。

[关键词] 路边青; 咖啡酸; 槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷; 山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷; 山柰酚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0098-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140098

Simultaneous Determination of Four Constituents in *Geum aleppicum* by RP-HPLC

ZHAN Shi-yin*

(Hubei Provincial Hospital of Integrated Chinese & Western Medicine, Wuhan 430015, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for simultaneously determining caffeic acid, quercetin-3-*O*-glucoside, kaempferol-3-*O*-glucoside and kaempferol in *Geum aleppicum* by RP-HPLC. **Method:** The quantitative analysis of *G. aleppicum* was carried out on Agilent C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase was acetonitrile-0.5% formic acid with gradient elution, flow rate was 0.8 mL · min⁻¹, column temperature was maintained at 25 °C, and detection wavelength was 340 nm. **Result:** The linear relationships of caffeic acid, quercetin-3-*O*-glucoside, kaempferol-3-*O*-glucoside and kaempferol fell within the ranges of 0.045-1.130, 0.095-2.370, 0.105-2.635, 0.041-1.030 μg, respectively. Their average recoveries ($n=6$) were 99.0%, 98.5%, 97.7%, 100.7% with the relative standard deviations (RSDs) of 1.0%, 0.9%, 1.0%, 1.6%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate, sensitive, which can be used for quality control of *G. aleppicum*.

[Key words] *Geum aleppicum*; caffeic acid; quercetin-3-*O*-glucoside; kaempferol-3-*O*-glucoside; kaempferol

路边青为蔷薇科路边青属植物干燥全草,别名蓝布正、追风七、海棠菜、老五叶,生长地点多集中在林内和林缘,以及洼地、湿地和水边等,为2015年版《中国药典》收录药材蓝布正的基源植物之一。具有益气健脾、补血养阴、润肺化痰的功效,主要用于治疗气血不足、虚癆咳嗽、脾虚带下等证^[1]。路边

青药材是中成药复方穿心莲片、感清糖浆的重要组成部分之一^[2-3],含有萜类、黄酮类、苯丙素类和挥发油等有效成分,其中黄酮类化合物为主要有效成分之一,槲皮素,槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷,5,7,4-三羟基黄酮,山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷及山柰酚等黄酮类化合物具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等活性^[4-8]。近年来

[收稿日期] 20160128(006)

[通讯作者] * 詹十音,主管药师,从事中药质量标准研究工作, Tel:13871081883, E-mail: zsy1835@qq.com

对路边青药材的化学成分和种植开发研究得比较深入,但对路边青药材的质量控制研究比较少,同时测定路边青药材中多种活性成分含量的文章未见报道^[9-11]。本研究通过高效液相色谱法同时测定路边青药材中咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚的含量,为路边青药材及其制剂的质量控制提供定量依据的补充。

1 材料

1200 型液相色谱仪[美国 Agilent,配置 G1311C 型四元梯度泵, G1315D 型二极管阵列检测器(DAD), G1316A 型柱温箱, G1329B 型自动进样器、Agilent Chemstation 色谱工作站(Version B. 04. 02)], KQ-500 DE 型数控超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司,功率 500 W,频率 40 kHz)。水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

路边青药材购自不同地区药店,经湖北中医药大学陈科力教授鉴定为蔷薇科植物路边青 *Geum aleppicum* 的干燥全草;对照品咖啡酸(批号 110885-201405),槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷(批号 111809-201306)和山柰酚(批号 110861-201310)购自中国食品药品检定研究院;山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷(南京替斯艾么中药研究所,批号 TCM010-150624, HPLC 测定,纯度 >98. 0%)。

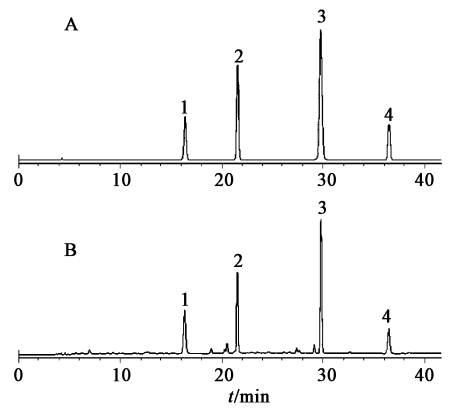
2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液 精密称取上述各对照品适量,加入 50% 乙醇制成含咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚分别为 4. 52, 2. 37, 5. 27, 4. 12 g·L⁻¹ 的单一对照品储备液。分别取单一对照品储备液适量,配制成含咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚分别为 45. 2, 94. 8, 105. 4, 41. 2 mg·L⁻¹ 的混合溶液。

2.2 供试品溶液 取路边青粉末(过四号筛) 0. 5 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加 50% 乙醇 20 mL,超声提取 30 min,提取 2 次,滤过,合并滤液定容到 50 mL,过 0. 45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件及系统适用性考察 采用 Agilent C₁₈ 色谱柱(4. 6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0. 5% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 10% ~ 20% A; 15 ~ 40 min, 20% ~ 35% A),流速 0. 8 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 340 nm,进样量 10 μL。各色谱峰与相邻峰的分度均 >1. 5,理论塔板数均 >1 万。见图 1。

2.4 线性关系考察 取 2. 1 项下混合对照品溶液,



A. 对照品; B. 路边青; 1. 咖啡酸; 2. 槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷; 3. 山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷; 4. 山柰酚

图 1 路边青 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of *Geum aleppicum*

分别进样 1, 5, 10, 15, 20, 25 μL,注入液相色谱仪,重复进样测定 3 次,记录色谱峰。以进样量 *X*(μg) 为横坐标,峰面积平均值 *Y* 为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚等成分线性关系良好,回归方程、线性范围、相关系数,见表 1。

表 1 4 种成分的线性范围及回归方程(*n* = 6)

Table 1 Regression equations and correlation coefficients of four compositions(*n* = 6)

| 成分 | 线性方程 | <i>r</i> | 线性范围/μg |
|-----------------------|-------------------------|----------|---------------|
| 咖啡酸 | $Y = 1\ 235.7X - 3.502$ | 0.999 9 | 0.045 ~ 1.130 |
| 槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | $Y = 1\ 130.5X - 2.576$ | 0.999 9 | 0.095 ~ 2.370 |
| 山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | $Y = 1\ 127.1X - 8.274$ | 0.999 8 | 0.105 ~ 2.635 |
| 山柰酚 | $Y = 1\ 310.5X - 1.764$ | 0.999 9 | 0.041 ~ 1.030 |

2.5 精密度试验 精密吸取上述 4 个成分混合对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,测定峰面积。结果咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚峰面积的 RSD 分别为 1. 0%, 0. 7%, 0. 7%, 1. 8%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取路边青样品(广东饶平 150428) 6 份,按 2. 2 项下方法制备供试品溶液,在 2. 4 项色谱条件下分析测定,记录咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚的峰面积值,代入 2. 4 项下回归方程,计算。结果样品中咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚的平均质量分数分别为 1. 76, 3. 82, 5. 13, 1. 53 mg·g⁻¹, RSD 依次为 1. 1%, 0. 9%, 0. 6%, 2. 2%,表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一份供试品(广东饶平

150428) 溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样 10 μL , 记录色谱图, 计算咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚色谱峰的峰面积值, 计算其 RSD 分别为 1.4%, 0.8%, 0.9%, 1.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取 2.7 项中已测知含量的路边青(广东饶平 150428) 粉末 6 份, 每份约 0.25 g, 精密稳定, 分别置具塞锥形瓶中, 分别精密加入相当于咖啡酸 0.452 mg, 槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷 0.948 mg, 山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷 1.265 mg, 山柰酚 0.421 mg 的对照品储备液各适量, 按 2.2 项下的方法制备供试品溶液, 在上述色谱条件下进样 10 μL , 记录峰面积, 计算回收率, 结果见表 2, 表明方法准确度良好。

表 2 路边青中 4 种成分的加样回收率试验

Table 2 Result of recovery tests of four constituents in *Geum aleppicum*

| 成分 | 称样量 /g | 样品 中量 /mg | 加样量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均值 /% | RSD /% |
|-----------------------|-----------|-----------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| 咖啡酸 | 0.2515 | 0.443 | 0.452 | 0.886 | 98.01 | 99.0 | 1.0 |
| | 0.2502 | 0.440 | 0.452 | 0.882 | 97.79 | | |
| | 0.2511 | 0.442 | 0.452 | 0.888 | 98.67 | | |
| | 0.2502 | 0.440 | 0.452 | 0.889 | 99.34 | | |
| | 0.2516 | 0.443 | 0.452 | 0.896 | 100.22 | | |
| | 0.2521 | 0.444 | 0.452 | 0.895 | 99.78 | | |
| 槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | 0.2515 | 0.961 | 0.948 | 1.910 | 100.11 | 98.5 | 0.9 |
| | 0.2502 | 0.956 | 0.948 | 1.893 | 98.84 | | |
| | 0.2511 | 0.959 | 0.948 | 1.891 | 98.31 | | |
| | 0.2502 | 0.956 | 0.948 | 1.888 | 98.31 | | |
| | 0.2516 | 0.961 | 0.948 | 1.890 | 98.00 | | |
| | 0.2521 | 0.963 | 0.948 | 1.886 | 97.36 | | |
| 山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | 0.2515 | 1.290 | 1.265 | 2.506 | 96.13 | 97.7 | 1.0 |
| | 0.2502 | 1.284 | 1.265 | 2.529 | 98.42 | | |
| | 0.2511 | 1.288 | 1.265 | 2.530 | 98.18 | | |
| | 0.2502 | 1.284 | 1.265 | 2.509 | 96.84 | | |
| | 0.2516 | 1.291 | 1.265 | 2.540 | 98.74 | | |
| | 0.2521 | 1.293 | 1.265 | 2.529 | 97.71 | | |
| 山柰酚 | 0.2515 | 0.385 | 0.412 | 0.800 | 100.73 | 100.7 | 1.6 |
| | 0.2502 | 0.383 | 0.412 | 0.804 | 102.18 | | |
| | 0.2511 | 0.384 | 0.412 | 0.794 | 99.51 | | |
| | 0.2502 | 0.383 | 0.412 | 0.800 | 101.21 | | |
| | 0.2516 | 0.385 | 0.412 | 0.807 | 102.43 | | |
| | 0.2521 | 0.386 | 0.412 | 0.790 | 98.06 | | |

2.9 样品测定 精密称取路边青药材粉末 0.5 g, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 精密取 10 μL 进样分析, 测定峰面积, 代入 2.4 项下回归方程计算各成分含量, 结果见表 3。

表 3 路边青药材中 4 种成分的质量分数 ($n=3$)

Table 3 Contents of four constituents in *Geum aleppicum* ($n=3$)

| 批号 | 产地 | 咖啡酸 | 槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | 山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 | 山柰酚 |
|--------|------|------|-----------------------|-----------------------|------|
| 150428 | 广东饶平 | 1.76 | 3.82 | 5.13 | 1.53 |
| 150714 | 福建华安 | 2.11 | 3.64 | 5.30 | 1.97 |
| 150908 | 湖南宁乡 | 1.96 | 3.02 | 5.94 | 2.83 |
| 151009 | 四川新津 | 2.44 | 2.71 | 6.15 | 2.91 |
| 150623 | 广东潮州 | 1.83 | 3.22 | 1.67 | 2.02 |
| 150508 | 安徽亳州 | 0.89 | - | 3.90 | - |
| 151021 | 贵州安顺 | 1.02 | 3.51 | - | - |
| 150917 | 湖北恩施 | 1.46 | 3.02 | 5.94 | 2.83 |
| 150829 | 浙江临安 | - | - | 2.06 | 3.81 |
| 151102 | 广西上林 | 2.44 | 2.71 | 6.15 | 2.91 |

注:“-”代表未检出。

3 讨论

在供试品的制备方法中, 考察了水和体积分数 10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% 的乙醇溶液及超声处理 20, 30, 40, 60 min 的提取效果。结果表明 50% 乙醇溶液超声处理 30 min 能有效提取路边青样品中的待测成分。

咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚的最大紫外吸收波长分别为 329, 340, 350, 340 nm, 试验考察发现, 340 nm 波长下, 各色谱峰分离度好, 杂质干扰小, 因此选择 340 nm 为检测波长。另外, 对乙腈-水、甲醇-水、甲醇-磷酸水溶液、甲醇-甲酸水溶液等多个溶剂系统进行选择, 发现用含有甲醇的洗脱系统, 各色谱峰峰形较差, 有拖尾, 经过多次试验, 最终确定了以乙腈-0.5% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 可使待测组分得到很好的基线分离, 且能有效地防止色谱峰的拖尾。

由测定结果可知, 10 批不同产地的路边青药材中咖啡酸、槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、山柰酚的含量差异较大, 其原因可能与采收期及不同产地湿度、温度、阳光和土质等外部生长环境因素有关。有关各组分含量、采收时间之间的动态变化以及产地之间含量的差异, 将在后期试验中进

一步研究。本试验对路边青多个成分同时进行测定,建立的方法简便、快速、准确,对于路边青的质量控制具有重要意义。

[参考文献]

[1] 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,2015:350-351.
[2] 张慧晔,潘雪峰,徐小飞,等. 复方穿心莲片的薄层鉴别研究[J]. 中成药,2015,37(2):460-462.
[3] 田源红,张英,刘赟,等. 感清中间产品的质理标准研究[J]. 中成药,2013,35(4):729-733.
[4] 王莉宁,徐必学,林华容,等. 蓝布正化学成分的研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(4):798-799.
[5] 杨威,郑明善,吕惠子. 路边青化学成分的研究[J]. 延边大学医学学报,2013,36(1):32-34.
[6] 欧阳玉祝,陈小东,唐红玉,等. 路边青中总多酚的提取与分离研究[J]. 食品科学,2009,30(16):44-47.

[7] 张怡莎,周欣,陈华国,等. 不同方法提取的蓝布正挥发油的化学成分研究[J]. 药物分析杂志,2008,28(2):263-266.
[8] 张飞. 蓝布正的化学成分及质理控制研究[D]. 上海:上海交通大学,2012.
[9] Cheng X R, Qin J J, Zeng Q, et al. Taraxasterane-type triterpene and neolignans from *Geum japonicum* Thunb var. *chinense* F. Bolle. [J]. *Planta Medica*, 2011,77(18):2061-2065.
[10] 段灿灿,裴显,杨晓伟,等. 三种干燥方法对蓝布正中没食子酸含量测定的影响[J]. 湖北农业科学,2015,54(19):4815-4817.
[11] 宋全枝,王占新,张砚凯,等. 路边青种群构件结构及生长规律分析[J]. 吉林中医药,2015,35(12):1252-1254.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中华中医药学会、中国中医科学院中药研究所主办的学术刊物。本刊创建于1995年10月,主要设置栏目包括复方配伍专论、方剂学研究、药剂与炮制、资源与鉴定、化学分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、中医传承及相关综述等。目前为CSCD来源期刊、中文核心期刊、RCCSE中国学术期刊排行榜核心期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为中国中医药优秀期刊及中国学术期刊优秀期刊。

本刊为半月刊,16开本,234页,标准刊号ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价35元,全年840元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号2-417;国外由中国国际图书贸易集团有限公司办理发行,代号SM4655,欢迎订阅。读者还可通过本刊编辑部办理邮购,地址:北京市东城区东直门内南小街16号,收件人:《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编100700,Tel:(010)84076882,E-mail:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。