

HPLC-DAD 波长转换法同时测定不同产地 滇桂艾纳香中 4 种成分的含量

姜建萍, 王美琪, 马雯芳*, 陈秋伶, 韦明妹, 陈晖
(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的:建立滇桂艾纳香药材中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和芦丁 4 种成分的含量测定方法,同步测定 4 种成分含量,为滇桂艾纳香药材的质量控制提供参考。方法:采用 HPLC 转换波长法,Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~25 min,10%~18% A;25~45 min,18%~40% A),检测波长 256 nm(0~15 min,原儿茶酸),327 nm(15~30 min,绿原酸、咖啡酸),360 nm(30~60 min,芦丁),柱温 20℃,流速 1.0 mL·min⁻¹。结果:滇桂艾纳香中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁进样量分别在 0.007~0.13 μg($r=0.999\ 98$),0.219~4.38 μg($r=0.999\ 94$),0.014~0.28 μg($r=0.999\ 97$),0.049~0.98 μg($r=0.999\ 97$)与峰面积呈良好的线性关系,平均加样回收率分别为 98.84%(RSD 2.2%),101.16%(RSD 0.9%),98.00%(RSD 2.8%),101.73%(RSD 1.4%)。含量测定结果显示,百色平果县所产药材中原儿茶酸、绿原酸和芦丁含量均较高,百色靖西县和四川药材咖啡酸含量较高。结论:所建立的方法稳定可靠,灵敏度高,重复性好,可同时测定滇桂艾纳香药材中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和芦丁 4 种成分的含量,可为滇桂艾纳香药材质量评价提供参考。

[关键词] 滇桂艾纳香;波长转换;原儿茶酸;绿原酸;咖啡酸;芦丁

[中图分类号] R282;R931;R2-031;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0072-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030072

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1100.006.html>

[网络出版时间] 2017-11-14 11:00

Simultaneous Determination of Four Components in *Blumea riparia* by HPLC with Wavelength Switching

JIANG Jian-ping, WANG Mei-qi, MA Wen-fang*, CHEN Qiu-ling, WEI Ming-mei, CHEN Hui
(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To determinate the contents of protocatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and rutin in *Blumea riparia* by HPLC, and provide references for its quality control. **Method:** The HPLC analysis was carried out by Inertsil ODS-3 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) with acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid solution (B) as the mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was set at 256 nm (0-15 min, protocatechuic acid), 327 nm (15-30 min, chlorogenic acid and caffeic acid), and 360 nm (30-60 min, rutin). In addition, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and column temperature was 20℃. **Result:** Protocatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and rutin showed good linearity in the range of 0.007-0.13 μg ($r=0.999\ 98$), 0.219-4.38 μg ($r=0.999\ 94$), 0.014-0.28 μg ($r=0.999\ 97$) and 0.049-0.98 μg ($r=0.999\ 97$) respectively, and the recovery of those 4 components were 98.84% (RSD 2.2%), 101.16% (RSD 0.9%),

[收稿日期] 20170804(007)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118272);广西卫生厅项目(GZBZ14-06);广西研究生教育计划创新项目(YCSW2017167)

[第一作者] 姜建萍,博士,教授,从事中药、民族药成分及质量控制方向研究,Tel:0771-3132106,E-mail:jjpoffice@gmail.com

[通信作者] *马雯芳,博士,副教授,从事中药品种、品质研究,Tel:0771-4953513,E-mail:alswen@163.com

98.00% (RSD 2.8%) and 101.73% (RSD 1.4%) respectively. The content determination results showed that the contents of protocatechuic acid, chlorogenic acid and rutin were higher in Pingguo samples; and the content of caffeic acid was higher in Jingxi and Sichuan samples. **Conclusion:** The established method can be used to determine the contents of protocatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and rutin. Such stable, reliable and repeatable analytical model can provide a reference for the quality evaluation and its control on *Blumea riparia*.

[Key words] *Blumea riparia*; wavelength switching; HPLC; protocatechuic acid; chlorogenic acid; caffeic acid; rutin

滇桂艾纳香壮族药名管牙,别名白花九里明、千里光、华艾纳香,在广西、云南、广东等地均有分布。其味微苦,性微温,有祛风除湿,散瘀止血,利水除湿之功效^[1-2]。滇桂艾纳香为壮族常用的草药^[3],制备的中成药制剂妇血康和滇桂艾纳香胶囊能活血化瘀、止血调经,在临床上用于治疗瘀血阻滞、月经过多、经期过长、产后恶露不绝等证^[4]。《广西中药材标准》和《广西壮族自治区壮药质量标准》将滇桂艾纳香进行收载,从性状、显微和理化鉴别方面对其质量进行控制^[5-6],但含量测定等相关质量评价标准尚未建立。

研究文献表明,滇桂艾纳香中含有大量有机酸、黄酮类等成分^[7],含量测定的研究多集中于原儿茶酸和绿原酸等成分^[8-10],目前尚无同时测定 2 种以上成分含量的相关报道。结合文献和前期研究,课题组发现滇桂艾纳香中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和芦丁的含量较高,且具有多种药理作用^[11-12]。本文采用 HPLC 波长转换法,同步测定原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和芦丁的含量,对 12 个批次滇桂艾纳香药材进行了含量测定,有利于更高效、全面地评价药材质量,可为滇桂艾纳香药材的质量控制提供参考。

1 材料

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪(包括 G-1311C 高压四元泵, G-1329B 自动进样器, G-1311C 在线真空脱气机, G-1316A 柱温箱, G-1315D 可变波长检测器, Agilent 1260 series 色谱工作站, 美国安捷伦科技公司), TGL-16B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 日本 GL Sciences 公司), FA1104 型电子分析天平(上海精科天平), DP5 系列超纯水器(法国密里博公司)。

对照品绿原酸(批号 110753-201716), 芦丁(批号 100080-201409), 原儿茶酸(批号 110809-201205), 咖啡酸(批号 110885-200102), 均购自中国食品药品检定研究院; 磷酸为分析纯(国药集团化学试剂有限公司), 乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公

司), 水为超纯水。

12 批滇桂艾纳香药材购于广西、四川及越南, 经广西中医药大学中药鉴定教研室田慧教授鉴定为菊科植物假东风草 *Blumea riparia* 的干燥全草, 药材来源见表 1。各批次药材均晒干后打粉, 过 24 目筛, 备用。

表 1 滇桂艾纳香药材信息

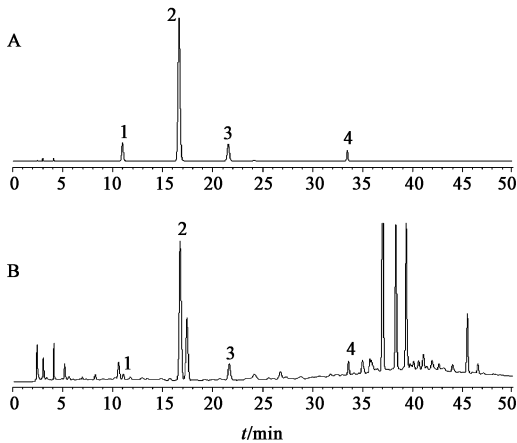
Table 1 Specific information of *Blumea riparia*

编号	产地	购买时间
DGANX-1	百色市田阳县	2014-02-03
DGANX-2	百色市凌云县	2015-02-12
DGANX-3	百色市靖西县	2015-04-01
DGANX-4	百色市隆林县	2015-08-02
DGANX-5	越南	2015-09-01
DGANX-6	百色市那坡县	2015-10-02
DGANX-7	百色市隆林县	2016-01-03
DGANX-8	四川	2016-01-01
DGANX-9	百色市靖西县	2016-02-02
DGANX-10	百色市平果县	2017-02-12
DGANX-11	百色市那坡县	2017-03-09
DGANX-12	百色市平果县	2017-04-02

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 25 min, 10% ~ 18% A; 25 ~ 45 min, 18% ~ 40% A), 检测波长 256 nm(0 ~ 15 min, 原儿茶酸), 327 nm(15 ~ 30 min, 绿原酸、咖啡酸), 360 nm(30 ~ 60 min, 芦丁), 进样量 10 μL, 柱温 20 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和芦丁的色谱峰分离度均 > 1.5, 理论板数均 > 6 000, 混合对照品和供试品色谱见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁对照品适量, 以 60% 甲醇稀释定容, 制成原儿茶酸、绿原酸、咖啡、芦丁分别为 0.013, 0.438, 0.028, 0.098 g·L⁻¹ 的混合对照品



1. 原儿茶酸;2. 绿原酸;3. 咖啡酸;4. 芦丁

图1 混合对照品(A)和滇桂艾纳香供试品(B)HPLC色谱

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed standards (A) and *Blumea riparia* (B)

溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取滇桂艾纳香药材粉末约3 g,精密称定,加入60%甲醇30 mL,称定质量,回流提取60 min,冷却至室温,用60%甲醇补足质量,过滤,取续滤液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取2.2项下的混合对照品溶液0.25,0.5,1,2,4,5 mL,分别置于5 mL量瓶中,以60%甲醇稀释至刻度,取稀释后的混合对照品溶液各10 μL注入高效液相色谱仪,按2.1项下色谱条件测定峰面积。以各成分的进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。得原儿茶酸回归方程为 $Y = 32\,218.803X + 1.142$ ($r = 0.999\,98$),绿原酸回归方程为 $Y = 25\,919.914X + 10.566$ ($r = 0.999\,94$),咖啡酸回归方程 $Y = 49\,226.129X + 0.203$ ($r = 0.999\,97$),芦丁回归方程 $Y = 10\,178.951X + 0.830$ ($r = 0.999\,97$),结果表明,原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁对照品进样量分别在0.007~0.13,0.219~4.38,0.014~0.28,0.049~0.98 μg线性关系良好。

2.4.2 精密度考察 取同一混合对照品溶液,照2.1项下色谱条件连续进样6次,测定4种成分的峰面积,计算峰面积的RSD。结果原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁峰面积的RSD依次为0.4%,0.1%,0.4%,0.3%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性考察 取同一滇桂艾纳香药材(DGANX-4)供试品溶液,分别于制备后的0,2,4,8,12,24 h进样测定,测定4种成分的峰面积值,计算

峰面积的RSD。结果原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁的RSD分别为1.2%,0.2%,0.5%,0.9%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.4 重复性考察 取同一批滇桂艾纳香药材(DGANX-4)粉末6份,精密称定,按2.3项下方法制备供试品溶液,分别进样10 μL,测定峰面积,计算4种成分的含量。结果表明本方法重复性良好,原儿茶酸质量分数为0.019 mg·g⁻¹,RSD 2.0%;绿原酸质量分数为0.824 mg·g⁻¹,RSD 1.3%;咖啡酸质量分数为0.055 mg·g⁻¹,RSD 2.8%;芦丁质量分数为0.144 mg·g⁻¹,RSD 2.0%。

2.4.5 加样回收率试验 取滇桂艾纳香药材(DGANX-4)粉末6份,各约1.5 g,精密称定。加入原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁质量分数分别为0.036,1.230,0.101,0.220 g·L⁻¹的混合对照品溶液1 mL,按2.3项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算加样回收率和RSD。结果原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁的平均回收率分别为98.84%,101.16%,98.00%,101.73%,RSD分别为2.2%,0.9%,2.8%,1.4%,见表2。

2.5 含量测定 分别称取各批次的滇桂艾纳香药材粉末约3 g,各3份,精密称定,按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,计算样品中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁的含量。结果见表3。

3 讨论

本实验首先对提取溶剂和提取方法进行单因素考察,对30%甲醇,50%甲醇,70%甲醇,甲醇,30%乙醇,50%乙醇,70%乙醇,95%乙醇,无水乙醇进行考察,结果表明60%乙醇的提取效果较好;同时分别考察了超声、回流和冷浸法对提取结果的影响,发现回流法的提取效率最佳。对溶剂用量进行考察时发现,溶剂体积为称样量25倍时,测量所得含量与10倍时无明显差别,但溶剂体积较大时,供试品溶液浓度较低,峰面积较小,尤其是原儿茶酸。为得到较大的峰面积,在对测量结果无明显影响的前提下,综合考虑减小溶剂体积,以获得较大浓度的供试品溶液,故选择30 mL作为溶剂用量。同时对提取时间进行考察,结果表明,以60%甲醇作为溶剂,用量30 mL,回流提取1 h所得的供试品成分含量最高。

原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和芦丁的最大吸收波长相距较远,分别为256,327,323,257 nm,实验对比了不同单一波长检测下所得图谱,发现图谱无法同时较好反映4种成分的含量情况。为获得更加准

表 2 滇桂艾纳香药材中 4 种成分的加样回收率测定

Table 2 Recovery test of 4 components in *Blumea riparia*

成分	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
原儿茶酸	1.500 0	0.028 5	0.036 0	0.064 2	99.17	98.84	2.2
	1.500 6	0.028 5	0.036 0	0.064 3	99.44		
	1.500 1	0.028 5	0.036 0	0.064 2	99.17		
	1.500 6	0.028 5	0.036 0	0.065 3	102.22		
	1.500 3	0.028 5	0.036 0	0.063 5	97.22		
	1.500 5	0.028 5	0.036 0	0.063 0	95.83		
绿原酸	1.500 0	1.236 0	1.230 0	2.485 8	101.61	101.16	0.9
	1.500 6	1.236 5	1.230 0	2.476 9	100.85		
	1.500 1	1.236 1	1.230 0	2.462 7	99.72		
	1.500 6	1.236 5	1.230 0	2.481 8	101.24		
	1.500 3	1.236 2	1.230 0	2.478 8	101.02		
	1.500 5	1.236 4	1.230 0	2.497 3	102.51		
咖啡酸	1.500 0	0.082 5	0.101 0	0.185 7	102.18	98.00	2.8
	1.500 6	0.082 5	0.101 0	0.183 1	99.60		
	1.500 1	0.082 5	0.101 0	0.178 5	95.05		
	1.500 6	0.082 5	0.101 0	0.181 5	98.02		
	1.500 3	0.082 5	0.101 0	0.178 6	95.15		
	1.500 5	0.082 5	0.101 0	0.181 5	98.02		
芦丁	1.500 0	0.216 0	0.220 0	0.438 5	101.14	101.73	1.4
	1.500 6	0.216 1	0.220 0	0.437 1	100.45		
	1.500 1	0.216 0	0.220 0	0.436 5	100.23		
	1.500 6	0.216 1	0.220 0	0.441 8	102.59		
	1.500 3	0.216 0	0.220 0	0.444 7	103.95		
	1.500 5	0.216 1	0.220 0	0.440 6	102.05		

确的结果,采用波长转换法^[13-14],分别选定在各成分最大吸收波长下检测,即 256 nm 下测定原儿茶酸,327 nm 下测定绿原酸和咖啡酸,360 nm 下测定芦丁。通过转换波长检测所得的图谱基线平稳,原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和芦丁各峰的分度度好,峰型佳,可获得较好的测定结果。

本实验建立了 HPLC-DAD 波长转换法测定滇桂艾纳香中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和芦丁含量的方法,该方法稳定,灵敏度高,为滇桂艾纳香中活性成分的研究提供了基础,为滇桂艾纳香药材的质量控制和评价提供了数据。所测得 12 批样品的 4 种成分含量均有一定差别,百色平果县所产滇桂艾纳香中原儿茶酸、绿原酸和芦丁含量均较高,百色靖西县和四川所产滇桂艾纳香中咖啡酸含量较高,对比

表 3 12 批滇桂艾纳香样品中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、芦丁含量测定

Table 3 Content determination results of protocatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and rutin in 12 samples

编号	原儿茶酸	绿原酸	咖啡酸	芦丁
DGANX-1	0.018	0.474	0.023	0.212
DGANX-2	0.018	0.591	0.030	0.060
DGANX-3	0.013	0.317	0.019	0.109
DGANX-4	0.019	0.824	0.055	0.144
DGANX-5	0.008	0.138	0.008	0.017
DGANX-6	0.007	0.109	0.006	0.017
DGANX-7	0.011	0.424	0.014	0.206
DGANX-8	0.029	0.517	0.063	0.119
DGANX-9	0.018	0.413	0.092	0.040
DGANX-10	0.031	2.201	0.041	0.465
DGANX-11	0.009	0.172	0.012	0.090
DGANX-12	0.021	2.154	0.029	0.096

原药材发现,咖啡酸含量较高的批次均有较多的花,推测滇桂艾纳香中咖啡酸含量变化与花期有关。广西百色市不同采收县的药材总成分含量区别也较明显,其中广西百色平果县药材总成分含量最高,提示百色平果县所产滇桂艾纳香药材质量最佳;广西百色那坡县药材总成分含量最低,其临床疗效可能受含量影响有所降低。综上所述,合适的产地和采收时间对获得较高质量的药材有重要意义,其产地和采收时间与药材质量的关系还有待进一步验证。

药材质量控制的目的之一是确保临床效果,其可在药理作用上可得到直观反映,本文所测定的 4 种成分中,原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸被认为是多种止血药中发挥止血作用的有效成分^[15];芦丁具有抑菌、抗炎镇痛作用^[16],与滇桂艾纳香产后止血的药理作用有一定相关性,本文测定了药材中以上 4 种成分的含量,对滇桂艾纳香药材的质量评价有重要意义。

[参考文献]

[1] 广西壮族自治区革委会卫生局. 广西本草选编. 上册 [M]. 南宁:广西人民出版社,1974:925.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第 7 册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:745-746.
[3] 黄燮才. 广西民族药简编 [M]. 南宁:广西壮族自治区卫生局药品检验所,1980:236.
[4] 张晓金. 妇血康颗粒治疗流产后子宫出血不净的临

- 床研究[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(1): 6-8.
- [5] 广西卫生厅. 广西中药材标准. 第2册[M]. 南宁: 广西壮族自治区食品药品监督管理局, 1996: 274-278.
- [6] 广西壮族自治区壮药质量标准. 第1卷[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2008: 196-197.
- [7] 姜建萍, 杜秀, 丘琴, 等. 不同产地滇桂艾纳香中总黄酮的含量测定[J]. 广西中医学院学报, 2009, 12(4): 44-46.
- [8] 陈美安, 姜建萍, 甄汉深, 等. 滇桂艾纳香乙酸乙酯提取物中总黄酮的含量测定[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(7): 15-16.
- [9] 何成章, 陆华. 正交试验优选滇桂艾纳香的提取工艺[J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2909-2910.
- [10] 谢培德, 桑彤, 龚秀珍. 反相高效液相色谱法测定滇桂艾纳香中原儿茶酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(4): 35-37.
- [11] 张来新. 从小蓟中提取止血药成分咖啡酸[J]. 中成药, 2002, 24(10): 71-72.
- [12] Gullón B, Lú-Chau T A, Moreira M T, et al. Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability[J]. Trends Food Sci Technol, 2017, 67(7): 220-235.
- [13] 甄亚钦, 田伟, 王迎春, 等. HPLC 波长切换法同时测定广藿香配方颗粒中咖啡酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷和广藿香酮的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 79-83.
- [14] 王琿, 张振秋. HPLC 波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 116-118.
- [15] 陈溪, 李书渊, 朱少旋. 止血中药的研究进展[J]. 中国医药指南, 2012, 10(3): 58-60, 62.
- [16] 臧志和, 曹丽萍, 钟铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展[J]. 医药导报, 2007, 26(7): 758-760.

[责任编辑 顾雪竹]