

HPLC 测定大血藤药材中绿原酸的含量

丁越, 张永, 丁文平*, 张彤, 陶建生, 荣蓉
(上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 建立大血藤药材中绿原酸的含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱法, Diamonsil ODS-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-4% 磷酸水(11:89), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 327 nm, 柱温 25 °C。结果: 绿原酸在 0.000 102 ~ 0.010 2 mg 线性关系良好。加样回收率为 102.4%, RSD 1.7% (n=6)。结论: 采用 HPLC 测定大血藤药材中绿原酸的含量, 样品处理方法便捷, 测定方法简单, 结果准确可靠, 可用于大血藤饮片、大血藤制剂的质量控制。

[关键词] 绿原酸; 高效液相色谱法; 含量测定; 大血藤

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0099-04

Determination of Chlorogenic Acid in *Sargentodoxa cuneata* by High Performance Liquid Chromatography

DING Yue, ZHANG Yong, DING Wen-ping*, ZHANG Tong, TAO Jian-sheng, RONG Rong
(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the determination method of chlorogenic acid in *Sargentodoxa*

[收稿日期] 20120104(022)

[基金项目] 上海市科委资助项目(09dZ1975500); 上海市人才发展基金项目(20111015); 上海市教委基金项目(10SG40, J50302)

[第一作者] 丁越, 高级实验师, 博士在读, 从事中药制药技术与中药制剂研究, Tel: 13564146474, E-mail: dingyue-2001@hotmail.com

[通讯作者] * 丁文平, 副主任药师, 从事中药学质量控制研究, Tel: 13901853669, E-mail: dingwp08@163.com

和异狄试剂酮, 因此这两个指标的检测是有必要的。

[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, 2010: 附录 57.

[2] 朱宝安, 蒋木庚, 金林红, 等. 毛细管气相色谱法分析中药半夏中有机氯农药的残留[J]. 农药, 2004, 43(2): 92.

[3] 祝贺, 宋爱华, 田杨, 等. GC-MS 法同时测定中药材中 29 种农药残留量[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(6): 342.

[4] 吴剑威, 徐荣, 赵润怀, 等. QuEChERS-气相色谱法快速检测五十种中药材中九种有机氯农药残留的方法研究[J]. 分析科学学报, 2011, 27(2): 167.

[5] 郑征伟, 毛秀红, 苗水, 等. 气相色谱双塔双柱法同时测定中药材中 56 种有机氯类及拟除虫菊酯类农药残留量[J]. 药科学报, 2010, 45(3): 353.

[6] 郭青, 吕霞, 谭力, 等. 固相萃取 GC-ECD 法同时测定中药材中 5 种中药材中 26 种有机氯和拟除虫菊酯农药残留量[J]. 中国天然药物, 2009, 7(3): 210.

[7] 李耿, 杨洪军, 边宝林. 中药农药残留的研究现状评述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 71.

[8] 荣维广, 郭华, 杨红. 我国中药材农药残留污染研究现状[J]. 农药, 2006, 45(5): 302.

[9] 苗水, 陆继伟, 郑征伟, 等. 气相色谱-质谱联用法同时测定中药材中 53 种农药残留方法[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(16): 1263.

[10] 赫丽丽, 薛健. 银杏叶中 18 种有机氯农药的多残留分析[J]. 分析化学, 2006, 34(2): 231.

[11] 杨健, 李鹏跃, 边宝林. 气相色谱法测定鲜地黄中有机氯类农药残留量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 28.

[12] 刘童, 王永林, 王爱民, 等. 荜苳药材中 12 种有机氯及拟除虫菊酯农药残留分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 47.

[13] 曾小星, 万益群, 谢明勇, 等. 气相色谱-电子捕获检测器同时测定茶叶中有机氯和拟除虫菊酯类农药残留[J]. 分析科学学报, 2008, 24(6): 636.

[责任编辑 顾雪竹]

cuneata. **Method:** HPLC was used with Diamonsil ODS-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) as chromatographic column and acetonitrile-4% phosphoric acid solution (11:89) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹; the detection wavelength was set at 327 nm and the column temperature was kept at 25 °C. **Result:** The linear range of chlorogenic acid was 0.000 102-0.010 2 mg. The average recovery was 102.57%, RSD 0.83% (n = 6). **Conclusion:** The method of sample processing was simple and the HPLC method was accurate and reliable. It can be used for the quality control of *S. cuneata* and its preparation.

[**Key words**] chlorogenic acid; HPLC; content determination; *Sargentodoxa cuneata*

大血藤始载于《图经本草》，其后古典《本草纲目》、《简易草药》等均有记载^[1]。《中草药学》记载的别名有血藤、活血藤、黄省藤等^[2]。根据《中国药典》记载，其正品为木通科大血藤属落叶木质藤本大血藤的干燥藤茎^[3]。该植物为我国特有，为第三纪古热带植物区系的孑遗植物，目前分布于黄河流域、秦岭及以南各省区，主产于江西、湖北、湖南、河南、浙江、安徽、福建等地^[4-5]。其味苦、性平，归大肠、肝经，具有清热解毒、活血、祛风止痛的功效，用于肠痈腹痛、热毒疮疡、经闭、痛经、跌扑肿痛、风湿痹痛^[6]。在我国苗族人民中广泛使用大血藤来治疗风湿、类风湿病，疗效佳，副作用小^[7]。现代药理学研究还发现红藤具有明显的抑菌抗炎效应和免疫调节作用^[8]。化学成分研究表明大血藤中含有鞣质、糖苷、环多酚类、三萜皂苷类、木质素类、黄酮类、甙类及有机酸类等多种化学成分。其中毛柳苷、原儿茶酸、绿原酸、没食子酸、阿魏酸酰胺、3-0-咖啡酰奎宁酸等酚类物质通常具有抗菌、消炎、利胆、镇痛等作用，对心血管系统和抗肿瘤方面也表现出特有的功效^[9-10]。目前《中国药典》并未规定大血藤药材质量控制中含量测定的方法和指标。施伶俐等^[6]采用 HPLC 测定大血藤中红景天苷的含量，所测红藤样品中红景天苷的含量约为 0.25%。绿原酸是大血藤中又一主要成分，现代药理学研究表明绿原酸具有心血管保护、抗诱变及抗癌变、抗菌及抗病毒、降脂、抗白血病等作用^[11]。目前未见大血藤中绿原酸的含量测定方法的报道。本文参考文献[12-14]，通过高效液相色谱法建立了大血藤药材中绿原酸的含量测定方法，可用于大血藤饮片、大血藤制剂的质量控制。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 series 高效液相色谱仪 (VWD 检测器、四元恒流泵、在线脱气机、手动进样器)，美国安捷伦公司；XS105DU 型电子天平，梅特勒-托利多(中国)；SB3200 型超声波清洗器，宁波新芝生物科技公司；色谱柱为 DIKMA-Diamonsil ODS-

C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。

1.2 药品及试剂 红藤药材(经上海中医药大学中药学实验室李俊松老师鉴定为木通科植物大血藤 *Sargentodoxa cuneata* Rehd. et wils. 的干燥藤茎)；绿原酸对照品，上海同田生物技术有限公司，批号 11060433，供含量测定用；甲醇、乙腈为色谱纯，Merck 公司；水为纯净水；其他试剂均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 大血藤药材中绿原酸提取方法的考察

2.1.1 样品提取方法的考察

2.1.1.1 水煎提取法 称取大血藤药材粗粉约 2.5 g，精密称定，置 250 mL 烧杯中，加水煎煮 2 次，每次用水量为 50 mL，煎煮时间为 1 h，冷却过滤，合并滤液，定容至 100 mL，取续滤液测定大血藤药材中绿原酸的含量。

2.1.1.2 回流提取法 称取大血藤药材粗粉约 2.5 g，精密称定，置 150 mL 三角烧瓶中，加入 95% 乙醇 50 mL，加热回流 1 h，冷却过滤，回收乙醇，用水定容至 100 mL，取续滤液测定大血藤药材中绿原酸的含量。

2.1.1.3 超声提取法 称取大血藤药材粗粉约 0.5 g，精密称定，置 50 mL 具塞三角烧瓶中，精密量取 25 mL 50% 甲醇水溶液于三角烧瓶中，超声 30 min，冷却过滤，取续滤液进样测定大血藤药材中绿原酸的含量，结果见表 1。

表 1 3 种提取方法对大血藤药材中绿原酸的提取效率的比较 (n = 3)

提取方法	绿原酸含量/mg · g ⁻¹	RSD/%
50% 甲醇水超声法	6.95	0.7
水煎煮提取法	5.20	2.2
95% 乙醇回流法提取	6.76	1.2

结果表明，3 种提取方法中，水煎煮提取效率较低，超声提取法和乙醇回流提取法对大血藤药材中绿原酸的提取效率相当，考虑到超声提取法工艺简单、时间较短，因此选择超声提取法提取大血藤药材

中的绿原酸。

2.1.2 样品提取溶剂的考察 分别称取同一批大血藤药材粗粉约 0.5 g,共 9 份,精密称定质量,于 50 mL 的具塞三角烧瓶中,每 3 份为一组,分别精密移取 25 mL 水、50% 甲醇、100% 甲醇于三角烧瓶中,密封,称定质量,超声 30 min,放冷,再称重,用相应的溶剂分别补足失重,摇匀,过滤,取续滤液进样测定大血藤药材中绿原酸的含量,结果见表 2。

表 2 3 种溶剂对大血藤药材中绿原酸的提取的影响 ($n=3$)

提取溶剂	提取效果绿原酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
水	5.80	2.5
50% 甲醇水	6.85	0.4
100% 甲醇	4.54	2.5

结果表明,100% 甲醇和水对大血藤中绿原酸的提取效率较低,因此选择提取效率较高的 50% 甲醇水溶液作为大血藤样品的提取溶剂。

2.1.3 样品提取溶剂用量的考察 分别称取同一批大血藤药材粗粉约 0.5 g,共 9 份,精密称定质量,于 50 mL 的具塞三角烧瓶中,每 3 份为一组,分别精密移取 25,50,100 mL 的 50% 甲醇水溶液于三角烧瓶中,密封,称定质量,超声 30 min,放冷,再称重,用相应的溶剂分别补足失重,摇匀,过滤,取续滤液进样测定大血藤药材中绿原酸的含量,结果见表 3。

表 3 溶剂用量对大血藤药材中绿原酸提取的影响 ($n=3$)

溶剂用量/mL	提取效果绿原酸/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
25	6.95	0.7
50	6.77	1.3
100	6.4	0.5

结果表明,随着提取溶剂用量的增加,而提取效果并没有明显增加,所以选择 25 mL 50% 甲醇水的溶液作为大血藤样品的提取溶剂。

2.2 大血藤药材中绿原酸 HPLC 含量测定方法学研究

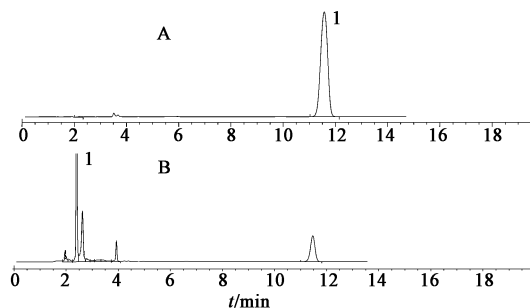
2.2.1 供试品溶液的制备 称取大血藤药材粗粉约 0.5 g,精密称定质量,于 50 mL 的具塞三角烧瓶中,精密移取 25 mL 50% 甲醇水溶液于三角烧瓶中,密封,称定质量,超声 30 min,放冷,再称重,用相应的溶剂分别补足失重,摇匀,过滤,取续滤液备用。

2.2.2 对照品溶液的制备 称取绿原酸约 25 mg,精密称定,用 50% 甲醇水溶液配成 $0.5108\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的绿原酸对照品溶液。

2.2.3 色谱条件与系统适用性试验 DIKMA-Diamonsil ODS- C_{18} 色谱柱 ($4.6\text{ mm}\times 250\text{ mm},5\text{ }\mu\text{m}$),乙腈-4% 磷酸水 (11:89) 为流动相,检测波长 327 nm ,

流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,理论板数按绿原酸峰计不低于 1 500。

如图 1,大血藤提取液样品色谱图中具与绿原酸对照品保留时间一致的色谱峰,且与其他成分的色谱峰分离良好。



A. 对照品; B. 样品; 1. 绿原酸

图 2 大血藤提取液样品液相色谱

2.2.4 线性关系考察 精密称取绿原酸对照品适量,用 50% 甲醇水溶液分别配制成 0.510 8, 0.256 4, 0.128 2, 0.102 56, 0.051 08, 0.025 64, 0.005 108 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的绿原酸对照品溶液,进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。以进样量 $X(\text{mg})$ 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,进行回归分析,标准曲线回归方程 $Y = 2\,793\,656.3X + 60.2 (r = 0.999\,5)$ 。结果表明,绿原酸进样量在 $0.000\,102 \sim 0.010\,2\text{ mg}$ 进样量与峰面积线性关系良好。绿原酸的最低定量限为 $0.002\,554\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2.5 精密度试验 取绿原酸对照品溶液 ($0.005\,108, 0.102\,16, 0.510\,8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。在同一试验条件下重复进样 6 次,分别测得峰面积,记录峰面积,平均峰面积 RSD 分别为 2.8%, 1.4%, 0.6%, 表明本测定方法精密度良好。

2.2.6 重复性试验 平行取同一批次大血藤药材粗粉 6 份,每份 0.5 g,精密称定,照 2.2.1 项下方法处理,在给定的色谱条件下进行测定,结果 6 份大血藤药材中绿原酸的平均含量 $6.95\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 0.7%。结果表明本测定方法重复性良好,符合 HPLC 定量分析要求。

2.2.7 稳定性试验 取大血藤药材粉末 0.5 g,精密称定,按药材供试品处理方法处理供试品溶液一份,于 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24 h 不同时间点进样测定峰面积,平均峰面积为 7 656.9, RSD 1.9%, 表明样品溶液中绿原酸在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 回收率试验 采用加样回收法,取已知绿原酸含量为 $6.95(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$ 的大血藤药材粉末 0.25 g,

精密称定,分别加一定量的绿原酸对照品,按加样回收实验计算回收率,结果测得回收率在 95% ~ 105%,平均回收率 102.4%,RSD 1.7%,表明本法具有良好的回收率,见表 4。

表 4 大血藤药材中绿原酸的含量测定加样回收率试验

样品 称重 /g	样品 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
0.254 8	1.771	1.491	3.325	104.2		
0.253 8	1.764	1.491	3.325	104.7		
0.253 1	1.760	1.850	3.625	100.8	102.4	1.7
0.263 1	1.760	1.850	3.650	102.2		
0.252 9	1.758	2.210	3.975	100.3		
0.253 1	1.759	2.210	4.000	101.4		

2.3 大血藤药材中绿原酸含量测定 取收集的大血藤样品,按大血藤药材中绿原酸的 HPLC 含量测定方法测定,结果见表 5。

表 5 大血藤药材中绿原酸的含量测定

产地	批号	绿原酸/mg·g ⁻¹	RSD/%
江西	110615	7.25	1.4
江西	101106	3.51	1.1
湖南	091202	4.16	0.8
江西	100507	7.10	0.4
安徽	100807	6.80	1.5
湖北	101201	4.95	2.2

结果表明,全国各地不同批次大血藤药材中绿原酸的含量不尽相同,可考虑用绿原酸作为大血藤药材质量控制指标。

3 讨论

通过对大血藤药材中绿原酸含量测定研究发现其含量较高,且文献^[8-9]表明绿原酸具有广泛生理活性和药理活性的物质,具有利胆、抗菌、降压、增加白血球及兴奋中枢神经系统、抗肿瘤、降脂、清除自由基等多种药理作用,对消化系统、血液系统和生殖系统疾病均有显著疗效。目前文献未见大血藤药材的质量控制指标的报道,故本文选择绿原酸作为大血藤药材质量控制的指标成分来建立其含量测定的方法。

大血藤药材中绿原酸的含量测定方法研究中,以绿原酸的提取效率为指标,比较了水煎提取、乙醇回流和超声提取 3 种不同提取方法的提取效率,选择了提取效率较高,操作简单的超声提取法来提取绿原酸。同时通过提取溶剂和溶剂用量的考察,优选了大血藤药材中绿原酸的提取工艺:称取大血藤药材粗粉约 0.5 g,精密称定质量,于 50 mL 的具塞

三角烧瓶中,精密移取 25 mL 50% 甲醇水溶液于三角烧瓶中,密封,称定质量,超声 30 min,放冷,再称重,用相应的溶剂分别补足失重,摇匀,过滤,取续滤液备用。

本法样品处理方法便捷,测定方法简单,测定结果准确可靠,具有良好的重复性和回收率,实践结果表明,可用于大血藤饮片和大血藤制剂的质量控制。

[参考文献]

[1] 李运景. 鸡血藤,大血藤考证[J]. 中药材,2002,25(9):669.

[2] 陆连英.《本草纲目》中红藤本草考证[J]. 时珍国医国药,2000,11(2):70.

[3] 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,2010:19.

[4] 王景祥. 浙江植物志[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1992:39.

[5] 张宏意,廖文波,陈月琴,等. 大血藤的 rDNA ITS 序列分析[J]. 广西植物,2008,28(6):737.

[6] 施伶俐,桂双英,周金凤. HPLC 法测定大血藤中红景天苷的含量[J]. 安徽医药,2011,15(4):441.

[7] 付钰,王光义. 中药大血藤对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞 MMP-2、MMP-9 的影响[J]. 贵州医药,2009,12(33):1097.

[8] 李莉,杨梅,闫敏. 红藤对小鼠免疫功能及同种异基因皮肤移植排斥反应的抑制作用[J]. 中国免疫学杂志,2009,3(25):223.

[9] 毛水春,顾谦群,崔承彬,等. 中药大血藤中酚类化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学杂志,2004,14(6):326.

[10] 田瑛,张慧娟,屠爱萍,等. 中药大血藤的酚性化合物[J]. 药学报,2005,40(7):628.

[11] 吴卫华,康桢,欧阳冬生. 绿原酸的药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发,2006,18:691.

[12] 李秋红,冯宇飞,刘佩莉,等. 高剂量双黄连粉针中绿原酸的药动学及其在唾液中的分布[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(5):47.

[13] 卫昌华. 高效液相色谱法测定返魂草颗粒中绿原酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(4):15.

[14] 丁家欣,张秋海,张智. 高效液相色谱法测定牛蒡根中绿原酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(1):14.

[责任编辑 顾雪竹]