

HPLC 同时测定小蓟中蒙花苷和绿原酸的含量

侯坤¹, 许浚², 张铁军^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

[摘要] 目的: 建立同时测定小蓟中绿原酸和蒙花苷含量的测定方法, 并用此方法测定不同产地小蓟药材的含量。方法: HPLC 法, 采用 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 为色谱柱; 以甲醇为流动相 A, 以水(含 1% 冰乙酸)为流动相 B, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 35 ; 进样量 20 μL; 检测波长为 327 nm。结果: 蒙花苷、绿原酸的浓度与峰面积成良好的线性关系, 蒙花苷、绿原酸线性范围分别为 0.018 ~ 0.18 g·L⁻¹ (r=1) 和 0.005 ~ 0.05 g·L⁻¹ (r=0.9996); 加样回收率分别为 99.6% 和 99.3%, RSD 分别为 0.5% 和 1.1%。结论: 该法简便, 快捷, 结果准确、重复性好, 可用于小蓟药材中蒙花苷和绿原酸的质量控制。

[关键词] 小蓟; 蒙花苷; 绿原酸; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0062-03

Determination of Contents of Chlorogenic Acid and Acaciin in *Cirsium setosum* (willd.) MB. by HPLC Method

HOU Kun¹, XU Jun², ZHANG Tie-jun^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for the determination of chlorogenic acid and acaciin from common cephalanoplos herb. **Method:** Samples were analyzed by Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) with methanol-water (1% glacial acetic acid) as mobile phase in gradient elution, 327 nm as detected wavelength, 1.0 mL·min⁻¹ as flow-rate, 35 as temperature of column, 20 μL as injected volume. **Result:** The linear range of chlorogenic acid and acaciin was 0.005-0.05 g·L⁻¹ (r=0.9996) and 0.018-0.18 g·L⁻¹ (r=1), and the average recovery was 99.3% with RSD 1.1% and 99.6% with RSD 0.5% respectively. **Conclusion:** The method was rapid, convenient, accurate, and suitable for the quality control of contents of chlorogenic acid and acaciin in *Cirsium setosum* (willd.) MB.

[Key words] *Cirsium setosum* (willd.) MB; acaciin; chlorogenic acid; HPLC

小蓟为菊科植物刺儿菜 *Cirsium setosum*(willd.) MB. 的干燥地上部分, 味甘、苦, 性凉, 归心、肝经; 具有凉血止血、祛瘀消肿的功效, 主治衄血、吐血、尿血、便血、崩漏下血、外伤出血、痈肿疮毒等^[1]。现代

药效学和药理学研究发现小蓟具有止血、抗炎等药理作用; 起到止血作用的有效物质主要是有绿原酸、咖啡酸等有机酸类成分和蒙花苷、芦丁等黄酮类成分^[2]。绿原酸、咖啡酸等有机酸类成分对人血管内皮细胞有很好的保护作用, 能维持血管的通透性正常, 进而有止血的作用^[3]; 芦丁、蒙花苷等黄酮类成分可通过抗炎起到止血的效果^[2], 芦丁还可降低毛细血管的通透性^[4]。绿原酸和蒙花苷是小蓟药材中的主要成分, 同时亦是小蓟发挥止血抗炎作用的有效成分, 所以可共同作为控制小蓟药材质量的指标

[收稿日期] 20100519(006)

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BAI06A01-02)

[第一作者] 侯坤, 硕士, Tel: 13820349452

[通讯作者] * 张铁军, 研究员, 中药新药研发方向, Tel: 022-23006848

成分。但尚未见到对这 2 个成分进行同时测定的报道。本试验建立以 HPLC 法同时测定小蓟药材中蒙花苷和绿原酸含量的方法,并应用建立的方法对不同产地的 15 批小蓟药材中这 2 种成分的含量进行了测定,为小蓟药材的质量控制提供了参考依据。

1 仪器与试剂

Lab Alliance 高效液相色谱仪 (Series 二元泵系统, Model 201⁺ 紫外检测器, AXW-8 柱温箱, Lab Alliance 工作站); AB204-N (METTLER TOLEDO 公司生产)、PB303-N 电子分析天平 (METTLER TOLEDO 公司生产); HS-3120 超声清洗仪。

甲醇为色谱纯;冰乙酸为分析纯;水为去离子水;蒙花苷 (111528-200605) 和绿原酸对照品 (0753-200111) 均购自中国药品生物制品检定所。

本实验所用小蓟药材由天津药物研究院张铁军研究员鉴定为菊科植物刺儿菜 *C. setosum* (willd.) MB. 的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相以甲醇为流动相 A,以水 (含 1% 冰乙酸) 为流动相 B,梯度洗脱 0 ~ 15 min (A 25% ~ 48%), 15 ~ 40 min (A 48% ~ 52%); 1.0 mL·min⁻¹;柱温 35 °C;进样量 20 μL;检测波长 327 nm。在上述色谱条件下,绿原酸、蒙花苷与其他峰分离度大于 1.5,峰型较好,对照品与供试品的色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、蒙花苷适量,加甲醇制成 0.50 g·L⁻¹ 和 0.61 g·L⁻¹ 的对照品储备液,备用。精密移取绿原酸对照品储备液 1 mL、蒙花苷对照品储备液 3 mL 置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制成混合对照品溶液 (绿原酸 0.05 g·L⁻¹, 蒙花苷 0.18 g·L⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 取小蓟药材全草粉末 (过 2 号筛) 约 0.4 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇溶液 50 mL,浸泡 30 min,称定质量,超声处理 40 min,放冷,再称定质量,用提取溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系的考察 精密移取混合对照品溶液 0.5, 1, 2, 3, 4 mL 置 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,绿原酸系列浓度为 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05 g·L⁻¹;蒙花苷系列浓度为 0.018, 0.036, 0.072, 0.108, 0.144, 0.18 g·L⁻¹。吸取以上混合对

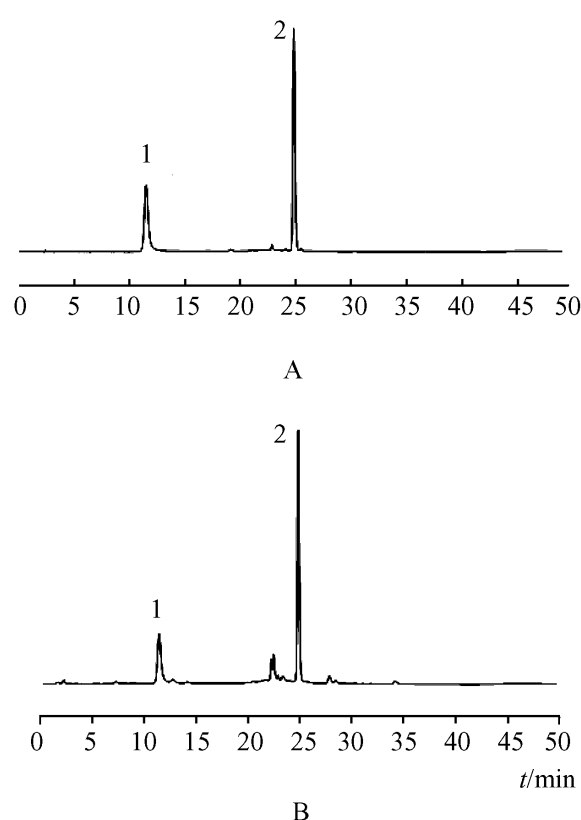


图 1 对照品 (A) 及供试品 (B) HPLC 色谱

1. 绿原酸对照品 (chlorogenic acid); 2. 蒙花苷对照品 (acaciin)

照品溶液 20 μL 进样,在 2.1 项色谱条件下进行分析。以各质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,得到蒙花苷标准曲线回归方程为 $Y = 3.00 \times 10^4 X + 5.49 \times 10^4$, $r = 1$;绿原酸标准曲线回归方程为 $Y = 5.62 \times 10^4 X - 6.59 \times 10^4$, $r = 0.9996$,表明蒙花苷浓度在 0.018 ~ 0.18 g·L⁻¹、绿原酸浓度在 0.005 ~ 0.05 g·L⁻¹ 具有良好的线性关系。

2.5 精密度试验 取小蓟药材全草粉末 (批号 007) 按 2.3 项下制备供试品溶液,按 2.1 项的色谱条件重复进样 6 次,记录峰面积,绿原酸的峰面积 RSD 1.7%,符合规定。

2.6 稳定性试验 取上述供试品溶液在放置 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 后,分别进样,记录绿原酸和蒙花苷的峰面积。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。绿原酸的 RSD 2.1%,蒙花苷的 RSD 1.8%,符合规定。

2.7 重复性试验 取小蓟药材全草粉末 (批号 007) 按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,测定绿原酸和蒙花苷的质量分数,结果蒙花苷的 RSD 1.5%,绿原酸的 RSD 2.3%,符合规定。

2.8 加样回收率试验 精密称取 2.7 项下已知含量的小蓟全草粉末 (批号 007, 含绿原酸 0.282%、蒙花苷 1.089%) 6 份,每份 0.2 g,分别各精密加入绿原酸对照品储备液 1 mL (0.50 g·L⁻¹)、蒙花苷对照品储备液 4 mL (0.61 g·L⁻¹),按 2.3 项下方法制成供试品溶液,测定含量,计算回收率。结果蒙花苷的

表 1 绿原酸和蒙花苷加样回收率 (n=2)

成分	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 /%
绿原酸	0.2006	0.5656	0.5000	1.0570	98.3	99.3	1.1
	0.2003	0.5648	0.5000	1.0553	98.1		
	0.2011	0.5671	0.5000	1.0642	99.4		
	0.2008	0.5663	0.5000	1.0698	100.7		
	0.2014	0.5679	0.5000	1.0703	100.5		
	0.2006	0.5657	0.5000	1.0612	99.1		
蒙花苷	0.2006	2.1845	2.42	4.5824	99.1	99.6	0.5
	0.2003	2.1813	2.42	4.5912	99.6		
	0.2011	2.19	2.42	4.6063	99.8		
	0.2008	2.1867	2.42	4.6044	99.9		
	0.2014	2.1932	2.42	4.5905	99.1		
	0.2006	2.1845	2.42	4.6083	100.2		

平均回收率 99.6%, RSD 0.5%; 绿原酸的平均回收率 99.3%, RSD 1.1%, 符合规定。结果见表 1。

2.9 含量测定 取不同产地的小蓟药材按 2.3 项下方法制备, 以外标法计算蒙花苷、绿原酸的含量, 结果见表 2。

表 2 不同产地的小蓟中蒙花苷和绿原酸的含量测定 (n=2) %

No.	产地	蒙花苷	绿原酸
001	山东青岛	0.73	0.12
002	江苏南京	0.70	0.22
003	陕西凤翔县	0.93	0.18
004	陕西礼泉县	0.97	0.56
005	陕西扶凤县	1.06	0.20
006	陕西扶凤县	0.86	0.15
007	陕西岐山县	1.09	0.28
008	陕西岐山县	0.87	0.29
009	陕西岐山县	1.22	0.24
010	陕西乾县	1.29	0.92
011	陕西乾县	0.57	0.22
012	陕西乾县	0.49	0.11
013	陕西乾县	0.77	0.22
014	陕西乾县	0.92	0.31
015	天津	0.82	0.40

3 讨论

3.1 提取方法和提取溶剂的选择 参考 2005 年, 2010 年版《中国药典》和相关文献, 本研究考察了甲醇超声提取; 甲醇索氏提取; 甲醇热回流提取。经比较得出, 甲醇超声提取完全, 简单易行。确定供试品溶液制备时采取超声处理提取后, 对提取所用的甲醇的浓度、超声前样品的处理时间及超声处理的时

间做了考察。最终确定了先将药材用提取溶剂 80% 甲醇水溶液浸泡 30 min, 再超声提取 40 min 的方法制备样品溶液。

3.2 流动相的选择 参考 2005 年, 2010 年版《药典》和文献[5-7], 对甲醇-1% 冰乙酸水、乙腈-1% 冰乙酸水系统进行了考察, 结果表明这两种流动相系统的分离效果相当, 只是用乙腈-1% 乙酸水系统作为流动相洗脱得到的色谱峰更尖锐一些, 考虑到乙腈比较昂贵, 故用甲醇-1% 乙酸水作为流动相。

3.3 影响药材含量的因素 表 2 的结果显示不同产地的小蓟药材中绿原酸和蒙花苷的含量存在差异, 且差异较大。说明生态环境的差异会对绿原酸和蒙花苷的含量造成影响。

[参考文献]

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005: 32.
- [2] 杨星昊, 崔敬浩, 丁安伟. 小蓟提取物对凝血、出血及实验性炎症的影响[J]. 四川中医, 2006, 24(1): 17.
- [3] 常翠青, 陈吉棣, 王香生. 有机酸对人血管内皮细胞的保护作用[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(2): 79.
- [4] 李惠, 原桂东, 金亚宏, 等. 槐花饮片及其提取物止血作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(11): 1007.
- [5] 陈毓, 丁安伟. HPLC 法测定小蓟中绿原酸的含量[J]. 天津中医药, 2005, 22(6): 507.
- [6] 张旭, 胡晓梅, 罗霄, 等. HPLC 测定甘松中的蒙花苷[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(4): 690.
- [7] 刘翔, 倪晓霓. 小蓟质量标准研究[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(4): 263.

[责任编辑 顾雪竹]