

高效液相色谱法测定追风伞提取物中5种酚酸类成分含量

陈婷, 徐加兵

(江苏省扬州市食品药品检验检测中心, 江苏 扬州 225000)

摘要:目的 建立同时测定追风伞提取物中绿原酸、芦丁、异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素及刺槐素含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为Phenomenex C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A)-0.2%醋酸水溶液(B), 梯度洗脱, 流速为1 mL/min, 柱温为30℃, 检测波长为334 nm。结果 绿原酸、芦丁、异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素及刺槐素质量浓度分别在4.132 5~165.300 0 mg/L, 6.440 0~257.600 0 mg/L, 3.980 0~159.200 0 mg/L, 4.352 5~174.100 0 mg/L, 3.592 5~143.700 0 mg/L范围内与峰面积线性关系良好, 平均回收率分别为98.28%, 99.10%, 98.23%, 98.61%, 98.02%, 其样品含量分别为1.701, 3.940, 2.179, 3.070, 1.881 mg/g。结论 该方法快速、准确、重复性好, 可用于评价和控制追风伞提取物的质量。

关键词:追风伞提取物; 高效液相色谱法; 绿原酸; 芦丁; 异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷; 木犀草素; 刺槐素; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R932; R284.2; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)24-0022-04

Content Determination of Five Kinds of Phenolic Acids in the Extract of *Lysimachia Paridiformis* by HPLC

Chen Ting, Xu Jiabing

(Yangzhou Municipal Food and Drug Inspecting and Testing Center, Yangzhou, Jiangsu, China 225000)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for content determination of chlorogenic acid, rutin, isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside, luteolin and acacetin in the extract of *Lysimachia paridiformis*. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol(A)-0.2% acetic acid(B), gradient elution, the flow rate was 1 mL/min, the column temperature was 30℃, and the detection wavelength was 334 nm. **Results** Good linear relationship was found in the range of 4.132 5~165.300 0 mg/L for chlorogenic acid, 6.440 0~257.600 0 mg/L for rutin, 3.980 0~159.200 0 mg/L for isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside, 4.352 5~174.100 0 mg/L for luteolin, 3.592 5~143.700 0 mg/L for acacetin. The average recovery rates for chlorogenic acid, rutin, isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside, luteolin and acacetin were 98.28%, 99.10%, 98.23%, 98.61% and 98.02%, respectively, and the content of chlorogenic acid, rutin, isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside, luteolin and acacetin in the extract of *Lysimachia paridiformis* were 1.701, 3.940, 2.179, 3.070, 1.881 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is rapid, accurate and reproducible, which can be used for evaluating and controlling the quality standard of the extract of *Lysimachia paridiformis*.

Key words: extract of *Lysimachia paridiformis*; HPLC; chlorogenic acid; rutin; isorhamnetin-3-O-β-D-glucoside; luteolin; acacetin; content determination; quality control

追风伞为报春花科植物狭叶落地梅 *Lysimachia paridiformis* Franch. Var. *stenophylla* Franch. 的全草或根, 又名惊风伞、公接骨丹、背花草、灯台草等, 主要分布于我国四川、广西、贵州、云南等地, 味苦、辛, 性温, 无毒, 有祛风通络、活血止痛功效, 以及抗炎、抗风湿^[1-3]和抗氧化^[4]等药理作用, 常用于治疗风湿痹痛、半身不遂、小儿惊风、跌打及骨折等^[5], 亦常与其他药材组成复方制剂(巴布剂、凝胶剂、胶囊等)用于治疗风湿关节炎等引起的疼痛^[6-8]。追风伞的主要成分为黄酮类、甾醇类、脂肪酸类及挥发油类化合物^[9-12], 目前, 我国学者主要对追风伞的黄酮类化合物提取工艺进行研究^[13-14]。本研究中以追风伞提取物中绿原酸、芦丁、异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷、木犀草素、刺槐素为测定指标, 采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定

追风伞提取物中上述5种活性成分的含量, 为追风伞有关的新药及保健产品的开发提供试验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20A型液相系统(日本岛津株式会社); N2000型双通道色谱站(浙江大学智能信息工程研究所); RE5299型旋转蒸发器(上海雅东玻璃制品有限公司); TopPette型微量移液器(大龙兴创实验仪器<北京>有限公司); KH3200型超声清洗机(宁波恒大超声设备有限公司); MS205型电子天平(梅特勒-托利多国际有限公司)。

1.2 试剂

绿原酸对照品(批号为110753-201716), 芦丁对照品(批号为100416-201607), 木犀草素对照品(批号

为 111520-201605),均购自中国食品药品检定研究院;异鼠李素-3-O- β -D-葡萄糖苷对照品(上海纯优生物科技有限公司,批号为 P201703);刺槐素(上海远慕生物科技有限公司,批号为 P201606);追风伞药材(亳州吉贝尔现代中药饮片科技有限公司赠送,广西产,由本中心房克慧主任鉴定为报春花科植物狭叶落地梅 *Lysimachia paridiformis* Franch. Var. *stenophylla* Franch. 的全草或根;追风伞提取物(自制,批号分别为 20170816, 20170824, 20170905);甲醇(色谱纯,美国天地有限公司);纯化水(杭州娃哈哈集团有限公司),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

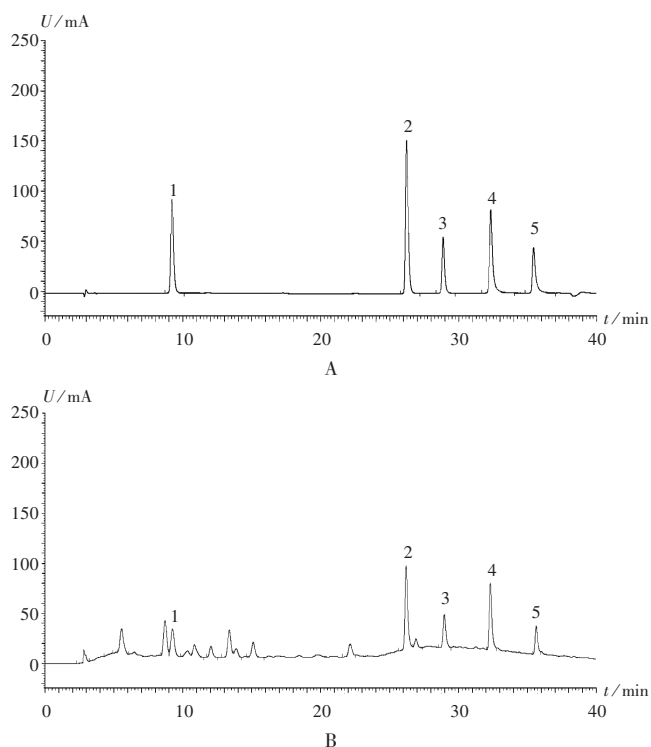
2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇(A)-0.2% 醋酸水溶液(B),梯度洗脱(0~17 min 时 10% A → 42% A, 17~25 min 时 42% A → 60% A, 25~40 min 时 60% A → 90% A);流速:1 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L;检测波长:334 nm。

2.2 溶液制备

对照品溶液:精密称取绿原酸、芦丁、异鼠李素-3-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素和刺槐素对照品适量,置 50 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,配成质量浓度分别为 330.6, 515.2, 318.4, 348.2, 287.4 mg/L 的对照品贮备液。

供试品溶液:称取经干燥并粉碎过 40 目的追风伞药材适量,加 12 倍量纯化水回流提取 1 次,收集提取液,再将药材残渣用 8 倍量纯化水回流提取 2 次,收集提取液,过 150 目筛,合并上述 3 次提取液,加 95% 乙醇醇沉至含醇量为 50%,12 h 后离心去沉淀,收集上清液,减压浓缩。浓缩液上样 HPD400 大孔吸附树脂,依次用 2 倍柱体积纯化水和 2 倍柱体积 20% 乙醇洗脱,以除去无机盐、水溶性及部分醇溶性杂质,再用 70% 乙醇洗脱 4 倍柱体积,收集洗脱液,浓缩并真空干燥,干燥提取物粉碎并置密封袋中保存备用。使用时称取追风伞提取物约 100 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用 70% 乙醇超声溶解并定容,摇匀,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。



1. 绿原酸 2. 芦丁 3. 异鼠李素-3-O- β -D-葡萄糖苷
4. 木犀草素 5. 刺槐素

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

2.3 方法学考察

专属性考察:精密量取 2.2 项下两种溶液适量,按 2.1 项下色谱条件进样,得 HPLC 色谱图,详见图 1。可见,在该色谱条件下,5 种成分的分度均良好。

线性关系考察:精密吸取 2.2 项下混合对照品贮备液适量,制成系列质量浓度的混合对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件进样分析,以峰面积(A)对对照品质量浓度(C)进行线性回归,得回归方程,详见表 1。

精密度试验:精密吸取混合对照品溶液,重复进样 6 次,分别记录峰面积。结果见表 2,表明仪器精密度良好。

重复性试验:称取追风伞提取物(批号为 20170816) 6 份,每份约 100 mg,依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录峰面积,计算含量。结果见表 2,表明方法重复性良好。

表1 线性关系考察结果(n=6)

成分	质量浓度(mg/L)						回归方程	r(n=6)	质量浓度线性范围(mg/L)
	1	2	3	4	5	6			
A	165.300 0	82.650 0	41.325 0	16.530 0	8.265 0	4.132 5	$A = 25\,397\,C + 1\,301.2$	0.999 8	4.132 5 ~ 165.300 0
B	257.60	128.80	64.40	25.76	12.88	6.44	$A = 24\,109\,C - 2\,427.5$	0.999 7	6.44 ~ 257.60
C	159.20	79.60	39.80	15.92	7.96	3.98	$A = 22\,356\,C - 1\,891.9$	0.999 8	3.98 ~ 159.20
D	174.100 0	87.050 0	43.525 0	17.410 0	8.705 0	4.352 5	$A = 30\,385\,C - 17\,977$	0.999 6	4.352 5 ~ 174.100 0
E	143.700 0	71.850 0	35.925 0	14.370 0	7.185 0	3.592 5	$A = 27\,894\,C - 16\,598$	0.999 7	3.592 5 ~ 143.700 0

注:A 为绿原酸,B 为芦丁,C 为异鼠李素-3-O- β -D-葡萄糖苷,D 为木犀草素,E 为刺槐素。下表同。

表2 精密性、重复性、稳定性试验结果

成分	精密性试验 ($n=6$)		重复性试验 ($n=6$)		稳定性试验的
	质量浓度(mg/L)	RSD(%)	平均含量(mg/g)	RSD(%)	RSD(%, $n=8$)
A	16.53	1.03	1.702	1.41	1.16
B	25.76	0.85	3.957	1.09	0.99
C	15.92	0.98	2.183	1.18	1.07
D	17.41	1.12	3.065	1.24	1.21
E	14.37	1.07	1.868	1.32	1.18

稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样分析,分别于0,1,3,6,9,12,18,24 h时进样测定,记录峰面积。结果见表2,表明供试品溶液在24 h内稳定。

加样回收试验:称取已知含量的追风伞提取物(批号为20170816)6份,每份约50 mg,精密称定,加入3 mL绿原酸、芦丁、异鼠李素-3-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素和刺槐素质量浓度分别为41.325, 64.400, 39.800, 43.525, 35.925 mg/L的混合对照品溶液,置10 mL容量瓶中,甲醇定容至刻度,经0.45 μ m微孔滤膜滤过后进样,计算峰面积。结果见表3。

2.4 样品含量测定

精密称取3批次追风伞提取物,每批约100 mg,制备3份供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样,记录峰面积,分别计算含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 色谱条件选择

检测波长^[15-17]:通常根据各个待测成分的紫外吸收情况,综合选择一个各成分均具有较好吸收的波长作为检测波长。紫外全波长扫描结果显示,最大吸收波长绿原酸为253 nm和326 nm,芦丁为258 nm和361 nm,异鼠李素-3-O- β -D-葡萄糖苷为255 nm和353 nm,木犀草素为255 nm和350 nm,刺槐素为334 nm。综合考虑,选择334 nm作为检测波长。

流动相:乙腈-水和甲醇-水为常用流动相体系,一般添加酸提高分离度和改善峰形^[18-20]。本研究中尝试采用乙腈-水、甲醇-水等度系统不同比例流动相分别对绿原酸、芦丁、异鼠李素-3-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素和刺槐素5种成分进行分离,结果2种等度系统均不能使各成分很好地分离,且保留时间亦相对较长,故在此基础上采用乙腈-水、甲醇-水梯度洗脱对各成分进行洗脱分离,结果甲醇-水梯度洗脱对各成分的分离度要优于乙腈-水梯度洗脱,且加入0.2%醋酸调整峰形。

柱温:尝试采用不同柱温(25,30,35 $^{\circ}$ C)考察对各成分分离度的影响,结果显示,在30 $^{\circ}$ C时色谱基线较平稳,且分离度较25 $^{\circ}$ C和35 $^{\circ}$ C好,故最终选择柱温为30 $^{\circ}$ C。

表3 加样回收试验结果 ($n=6$)

成分	取样量 (mg)	样品含量 (μ g)	加入量 (μ g)	测得量 (μ g)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
A	50.42	85.81	123.98	207.52	98.17	98.28	1.38
	50.36	85.71	123.98	206.76	97.64		
	50.53	86.00	123.98	209.27	99.43		
	50.27	85.56	123.98	205.31	96.59		
	50.65	86.21	123.98	210.56	100.30		
B	50.09	85.25	123.98	206.23	97.58	99.10	1.45
	50.42	199.51	193.20	389.50	98.34		
	50.36	199.27	193.20	391.93	99.72		
	50.53	199.95	193.20	394.27	100.58		
	50.27	198.92	193.20	387.77	97.75		
C	50.65	200.42	193.20	388.75	97.48	98.23	1.36
	50.09	198.21	193.20	392.84	100.74		
	50.42	110.07	119.40	226.37	97.40		
	50.36	109.94	119.40	227.71	98.63		
	50.53	110.31	119.40	229.47	99.80		
D	50.27	109.74	119.40	226.38	97.69	98.61	1.16
	50.65	110.57	119.40	225.58	96.32		
	50.09	109.35	119.40	228.18	99.52		
	50.42	154.54	130.58	283.35	98.64		
	50.36	154.35	130.58	284.38	99.58		
E	50.53	154.87	130.58	282.02	97.37	98.02	1.02
	50.27	154.08	130.58	281.45	97.54		
	50.65	155.24	130.58	286.20	100.29		
	50.09	153.52	130.58	281.83	98.26		
	50.42	94.18	107.78	198.98	97.24		
	50.36	94.07	107.78	201.56	99.73	98.02	1.02
	50.53	94.39	107.78	198.89	96.96		
	50.27	93.90	107.78	199.87	98.32		
	50.65	94.61	107.78	200.51	98.26		
	50.09	93.57	107.78	198.74	97.58		

表4 追风伞提取物中5种活性成分含量 ($n=3$)

成分	含量(mg/g)				RSD(%)
	I	II	III	平均	
A	1.698	1.679	1.725	1.701	1.36
B	3.959	3.987	3.874	3.940	1.49
C	2.181	2.153	2.204	2.179	1.17
D	3.068	3.046	3.097	3.070	0.83
E	1.871	1.910	1.863	1.881	1.34

注: I, II, III样品批号分别为20170816, 20170824, 20170905。

3.2 方法评价

本研究中建立的HPLC法可同时测定追风伞提取物中绿原酸、芦丁、异鼠李素-3-O- β -D-葡萄糖苷、木犀草素和刺槐素的含量,且快速、准确、重复性好,可用于评价和控制追风伞提取物的质量,并为追风伞相关产品的开发提供试验依据。