

高效液相色谱法同时测定蒲公英中咖啡酸和阿魏酸的含量

晏媛, 刘世霆, 许重远, 谭亚非 (南方医科大学南方医院药学部, 广州 510515)

摘要:目的 建立了 RP-HPLC 法对蒲公英中咖啡酸和阿魏酸同时定量, 考察不同产地蒲公英中咖啡酸、阿魏酸的含量。方法 利用高效液相色谱法梯度洗脱。色谱条件为: Hypersil BDS C18 分析柱(5 μ m, 4.6mm $\times$ 250 mm), 柱温 40 $^{\circ}$ C, 流动相为甲醇 - 0.01M 磷酸二氢钾溶液(磷酸调 pH 为 3.7)梯度洗脱, 流速 1.0mL $\cdot$ min $^{-1}$, 检测波长 323nm。结果 咖啡酸、阿魏酸浓度与峰面积呈良好线性关系, 线性范围分别是: 咖啡酸 8.192~81.92 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$, $r=0.9991$ ($n=6$); 阿魏酸 1.96~39.2 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$, $r=0.9992$ ($n=6$); 回收率咖啡酸为 95.3%~98.2%, 阿魏酸为 92.1%~95.3%($n=9$)。结论 本方法测定了 9 个不同产地或不同批号的蒲公英样品中咖啡酸、阿魏酸的含量, 该方法分离度好, 快速, 简便, 重现性好。

关键词: 蒲公英; 咖啡酸; 阿魏酸; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.799.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2006)03-0229-03

Determination of caffeic acid and ferulic acid in Herba Taraxaci by RP-HPLC

YAN Yuan, LIU Shi-ting, XU Zhong-yuan, TAN Ya-fei (Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of caffeic acid and ferulic acid in a traditional Chinese medicine - Herba Taraxaci. from different habitats. **METHODS** HPLC analysis was performed on a Hypersil BDS C₁₈ column (4.6 mm $\times$ 250mm, 5 μ m) with the methanol - potassium dihydrogen phosphate (pH=3.7) as mobile phase in gradient mode, the column temperature was set up 40 $^{\circ}$ C, the flow rate was 1.0mL $\cdot$ min $^{-1}$ and the detecting wavelength was at 323nm. **RESULTS** The linear response ranges from 8.192 to 81.92 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ of caffeic acid ($r=0.9991$, $n=6$) and from 1.96 to 39.20 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ of ferulic acid ($r=0.9992$, $n=6$); the recoveries($n=9$) of caffeic acid and ferulic acid were 95.3%~98.2% and 92.1%~95.3%, respectively. **CONCLUSION** All 9 samples from different habitats were determined by HPLC. The method is a practicable method in determination of the caffeic acid and ferulic acid in the Herba Taraxaci.

KEY WORDS: Herba Taraxaci; caffeic acid; ferulic acid; HPLC

蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. - Mass.、碱地蒲公英 *T. sinicum* Kitag 或同属种植物的干燥全草。我国蒲公英药用资源非常丰富, 各地都有分布。蒲公英具清热解毒, 消肿散结, 利尿通淋的功效。近年来药理实验研究表明蒲公英具广谱抗菌作用, 临床用于各种急性慢性感染, 其化学成分研究分离出的咖啡酸和阿魏酸具有广谱抗菌作用^[1-3]。中国药典 2000 版一部采用高效液相色谱法测定

中国现代应用药学杂志 2006 年 6 月第 23 卷第 3 期

其主要成分咖啡酸的含量, 并规定含咖啡酸不得少于 0.02%^[4]。本实验首次建立了 HPLC 同时测定蒲公英中咖啡酸和阿魏酸的含量的方法, 可用于蒲公英药材及其中成药制剂的质量控制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 公司高效液相色谱仪: Waters515 型泵, 996 二极

Chin JMAP, 2006 June, Vol. 23 No. 3 • 229 •

管阵列检测器, Millennium32 工作站, 超纯水器(Mill-Qplus USA) SK5200LH 型超声波仪(上海科导超声仪器有限公司, 200W, 59HZ), TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

咖啡酸对照品(供含量测定用, 批号: 885-200001) 中国药品生物制品检定所提供。阿魏酸对照品(供含量测定用, 批号: 0773-9910) 中国药品生物制品检定所提供。蒲公英药材为市售品, 购自广东省药材公司并经鉴定为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. 的干燥全草。甲醇为色谱纯(天津四友生物医学技术有限公司)、磷酸二氢钾、甲酸、磷酸等均为分析纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ 分析柱(5 μm, 250 mm × 4.6 mm), (大连依利特科学仪器有限公司), 流动相 A 为甲醇; 流动相 B 为 0.01mol · L⁻¹ 的磷酸二氢钾溶液(1% 磷酸调 pH 为 3.7); 梯度洗脱条件: 流动相 A 从 30% 到 85%, 分析时间为 18min, 时间为 0, 15, 18 min; A(%) 为 30, 85, 85; 流速: 1 mL · min⁻¹; 检测波长: 323nm; 柱温: 40℃; 进样量: 10μL。

1.3 溶液的制备

1.3.1 咖啡酸对照品溶液的制备 精密称取咖啡酸对照品 2 mg 于 25mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至 25mL, 然后精密量取 1, 2, 3, 4, 5mL 分别置 10mL 量瓶中, 得 8, 16, 24, 32, 40μg · mL⁻¹ 对照品溶液, 用 0.45μm 的脂溶性滤膜过滤, 续滤液至样品小瓶中备用。

1.3.2 阿魏酸对照品溶液的制备 精密称取阿魏酸对照品 2 mg 于 50mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至 50mL, 然后精密量取 0.5, 1, 2, 4, 5mL 分别置 10mL 量瓶中, 得 2, 4, 8, 16, 20μg · mL⁻¹ 对照品溶液, 用 0.45μm 的脂溶性滤膜过滤, 续滤液至样品小瓶中备用。

1.3.3 蒲公英样品溶液的制备 蒲公英样品 60℃ 干燥后粉碎成细粉, 过 100 目筛。精密称取生药粉末 1g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 5% 甲酸的甲醇溶液 10mL, 密塞, 摇匀, 称定重量, 超声提取 30min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用 5% 甲酸的甲醇溶液补足减失的重量, 摇匀, 离心, 取上清液, 用 0.45 μm 的脂溶性滤膜过滤, 续滤液至样品小瓶中备用。

2 结果

2.1 流动相及洗脱方式的考察优化

分别用乙腈、甲醇与 pH 为 3.2, 3.7, 4.2 的磷酸二氢钾溶液组合成不同流动相体系进行洗脱, 结果发现甲醇-磷酸二氢钾(pH=3.7)体系得到的色谱峰形较好, 且较稳定。以梯度洗脱法在 18min 内可使全部色谱峰流出, 且咖啡酸和阿魏酸能得到较好的基线分离。理论塔板数以咖啡酸计算为 13071, 以阿魏酸计算为 5512。见图 1。

2.2 线性关系考察

分别精密吸取浓度为 8, 16, 24, 32, 40, 80μg · mL⁻¹ 的咖啡酸对照品溶液 10μL, 按上述色谱条件分别进样, 以咖啡酸浓度(μg · mL⁻¹) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程: Y = 53 737. 3X - 36 730. 4 r = 0. 999 1 在 8. 192 ~ 81. 92μg · mL⁻¹ 范围内呈线性关系(n = 6)。分别精密吸取浓度为 2, 4,

8, 16, 20, 40μg · mL⁻¹ 的阿魏酸对照品溶液 10μL, 按上述色谱条件分别进样, 以阿魏酸浓度(μg · mL⁻¹) 为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程: Y = 51 874. 3X - 2 647. 27, r = 0. 999 2 在 1. 96 ~ 39. 2μg · mL⁻¹ 范围内呈线性关系(n = 6)。

2.3 精密度试验

分别精密吸取 32 μg · mL 的咖啡酸、8 μg · mL 的阿魏酸对照品溶液 10μL, 在上述色谱条件下, 重复进样 5 次, 分别计算咖啡酸、阿魏酸的峰面积, 咖啡酸 RSD 为 1. 2%; 阿魏酸 RSD 为 1. 3%。

2.4 重复性考察

精密称取同一蒲公英粉末样品 5 份, 每份 1g, 照样品溶液制备方法进行提取处理后, 精密吸取 10μL 在上述色谱条件下进样分析, 计算峰面积考察方法的重复性, 咖啡酸的 RSD 为 1. 8%, 阿魏酸为 RSD = 1. 6%, 结果说明使用该法处理样品重现性良好。

2.5 稳定性实验

蒲公英样品溶液制备后, 分别在 0, 2, 4, 8, 24h 测定咖啡酸、阿魏酸的峰面积, 结果表明咖啡酸、阿魏酸在 24h 内稳定性良好, RSD 分别为 2. 8%, 2. 3%。

2.6 加样回收率试验

分别精密吸取一定量的对照品溶液, 挥干溶剂后, 依次加入精密称取的已测知含量的甘肃产蒲公英 9 份, 各 1g, 3 份为 1 组, 按样品溶液制备项下处理, 在上述色谱条件下进样分析, 回收率结果见表 1。

表 1 回收率实验结果(n = 3)

组分	加入量(μg)	测得量(μg)	平均回收率(%)	RSD(%)
咖啡酸	102. 4	99. 9	97. 6	3. 5
	204. 8	195. 1	95. 3	2. 1
	307. 2	301. 7	98. 2	2. 8
阿魏酸	98. 0	90. 3	92. 1	2. 7
	196. 0	186. 8	95. 3	3. 1
	294. 0	278. 7	94. 8	1. 8

2.7 样品测定

收集不同产地、不同批号的蒲公英药材 9 批, 按样品溶液制备项下处理后, 在上述色谱条件下进样分析, 用外标法计算蒲公英药材中咖啡酸、阿魏酸的含量, 结果见表 2, 色谱图见图 1。

表 2 样品测定结果(%)

Tab 2 Determination of Herba Taraxaci sample

编号	产地	咖啡酸含量(mg/g)	阿魏酸含量(mg/g)
1	甘肃(Ⅰ)	0. 392	0. 0731
2	甘肃(Ⅱ)	0. 259	0. 0542
3	甘肃(Ⅲ)	0. 310	0. 0318
4	广州	0. 268	0. 0254
5	内蒙古	0. 352	0. 0915
6	河北	0. 205	0. 0307
7	哈尔滨	0. 302	0. 0546
8	湖南	0. 224	0. 0433
9	成都	0. 186	0. 0350

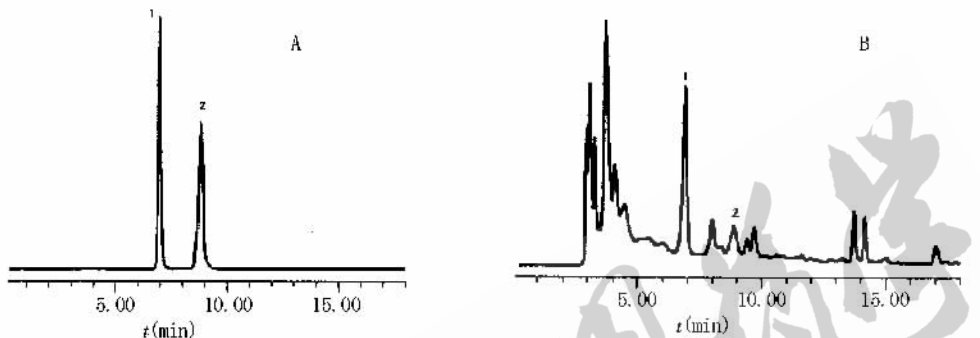


图1 对照品(A)、蒲公英药材(B)色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substance(A) and Herba Taraxaci(B)

1. 咖啡酸(caffeic acid); 2. 阿魏酸(ferulic acid)

3 讨论

3.1 实验通过对蒲公英药材甲醇超声提取, 甲醇索氏提取, 乙醇渗漉提取浓缩后用不同有机相萃取等提取方法进行优选后, 选用了简便、快速、得率较高的甲醇超声提取方法。

3.2 中国药典规定: 蒲公英中咖啡酸含量不得少于0.02%。本实验中9个不同产地或不同批号的蒲公英药材相比, 因蒲公英药材的来源、产地不同, 其所含咖啡酸的含量也有很大差异, 就同一产地而言, 批号不同的蒲公英, 其咖啡酸及阿魏酸的含量也有明显不同, 这可能与药材采挖时间等有关。

3.3 有文献^[3]报道: 通过测定蒲公英中咖啡酸和绿原酸的含量来控制中药蒲公英的质量, 我们在研究过程中没发现绿原酸的峰, 质谱分析中没有绿原酸的离子峰, 也没发现阿魏酸的离子峰, 但液质联用时没发现绿原酸的离子峰, 却发现阿魏酸的离子峰, 便采用分离酚酸类化合物的流动相^[5]对蒲公英药材进行色谱分离, 获得较好的分离效果。参照中国药典的方法只能获得咖啡酸的色谱峰, 无法区分阿魏酸。本实验首次采用了咖啡酸和阿魏酸2种对照品, 对蒲公英进行质量标准的考察, 这对蒲公英的质量控制具有重要意义。

3.4 在选择流动相时, 用乙腈-磷酸盐做流动相, 样品分离度不好; 换甲醇-磷酸盐为流动相后, 咖啡酸和阿魏酸的分离度好, 峰形较好。缓冲液pH选择: 本实验比较pH为3.2, 3.7, 4.2的磷酸二氢钾溶液, 结果发现, pH=3.7时, 基线平稳, 峰形尖锐、对称并达到基线分离。虽然咖啡酸和阿魏酸均在10min内出峰, 但等度洗脱没找到合适的浓度比将两者分离并使后面的峰尽快流出, 最终选择梯度洗脱。

参考文献

- [1] 赵守训, 杭秉倩. 蒲公英的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2001; 20(3): 1.
- [2] 凌云, 鲍燕燕, 张永林, 等. 兴安蒲公英的化学成分研究[J]. 中草药, 2000; 31(1): 10.
- [3] 凌云, 范国强, 肖樾, 等. 中药蒲公英的质量标准研究[J]. 中草药, 1999; 30(12): 897.
- [4] 中国药典2000年版一部[S]. 2000: 289.
- [5] Li Z, Wang L, Yang G, et al. Study on the determination of polyphenols in tobacco by HPLC Coupled with ESI-MS after solid-phase extraction[J]. J Chromatogr Sci, 2003, 41(1): 36.

收稿日期: 2005-05-25