

维吾尔族药阿纳其根中绿原酸的含量测定

董洁 冀娇娇 王加利 袁将 王贝贝 赵爽 郑尊善 刘永刚

(北京中医药大学中药学院,北京,100102)

摘要 目的:建立测定维吾尔族药阿纳其根中绿原酸含量的高效液相色谱法(HPLC)。方法:色谱柱为 Agilent 5 TC-C₁₈ 柱(5 μm,4.6 mm×150 mm),以乙腈-0.4%磷酸水(13:87,V/V)为流动相,流速为0.8 mL·min⁻¹,紫外检测波长为327 nm。结果:绿原酸在质量为0.0484 mg~0.968 mg范围内呈良好线性关系,回归方程:Y=2296316.8X-1369.4(r=0.9999),平均回收率为100.20%,RSD=2.75%。结论:该方法简便、灵敏、重现性好,可用于阿纳其根中绿原酸的含量测定。

关键词 维药;阿纳其根;HPLC;绿原酸;含量测定

Method Study for Determination of Chlorogenic Acid in Anacyclus pyrethrum DC. of Uygur Medicine by RP-HPLC

Dong Jie, Ji Jiaojiao, Wang Jiali, Yuan Jiang, Wang Beibei, Zhao Shuang, Zheng Zunshan, Liu Yonggang

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract Objective: A high performance liquid chromatography method(HPLC) was established to determine chlorogenic acid in the root of Anacyclus pyrethrum. DC. **Methods:** HPLC analysis was actualized on an Agilent 5 TC-C₁₈(5 μm,4.6 mm×150 mm) column with mobile phase of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution(13:87,V/V), flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, detection wavelength was 327 nm. **Results:** The calibration curve was a good linear with a range of 0.0484~0.968 mg·for chlorogenic acid(Y=2296316.8X-1369.4, r=0.9999). The average recovery rate for chlorogenic acid was 100.20%, RSD=2.75%. **Conclusion:** This method is simple, sensitive, reproducible, which is suitable for the quality control of the root of Anacyclus pyrethrum. DC.

Key Words Uygur Medicine; Anacyclus pyrethrum. DC.; HPLC; Chlorogenic acid; Content determination

中图分类号:R29;R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.067

维吾尔族药(简称维药)作为民族药之一,是中医学宝库的重要组成部分。维药拥有数千年的用药历史,是维吾尔族人民在防病治病的过程中,积累了丰富的应用植物、动物、矿物防病与治病的实践经验和生产技术,并逐渐形成了独具维吾尔族文化特色的药理学,具有博大精深的医学理论体系。它和中医、藏医等民族医药学相比,有着其独特的治病理念。近些年,因其独特的疗效和深厚的文化底蕴引起越来越多的关注。但是,目前对于维药的药效物质基础研究甚少,并且缺少明确的质量标准,这些都限制着维药的进一步发展。因此,建立科学合理的维药质量标准,对维药现代化发展具有重要的意义。

阿纳其根,据《中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册》^[1]和《维吾尔药材标准》^[2]等记载,其系菊科 Compositae 植物罗马除虫菊 Anacyclus pyrethrum. DC. 干燥的根,维药名:阿克尔开尔哈,别名为阿吉而哈而哈、欧都里开日合、比合台尔混库依。主要分布于北非或南部欧洲,我国新疆亦有分

布。原植物罗马除虫菊为多年生草本,高15~45 cm,多具长柔毛,在春秋季节采挖,洗净,切断,晒干^[3]。其性味为三级末四级首干热^[3-4],具有生干生热,祛寒强筋,开通阻滞,祛风止痛,燥湿化痰,滋补神经等功效;在维吾尔医中,主要用于白癜风、肿瘤、膝骨关节炎等疾病的治疗^[4-7],尤其是在治疗白癜风方面具有显著的疗效^[8-9]。目前,对于阿纳其根的化学成分研究甚少,并且含量测定尚未见报道。因此,本实验室在对阿纳其根进行物质基础分析的过程中,发现阿纳其根甲醇提取物中含有绿原酸类成分,而绿原酸又具有诸多生物活性,如抗氧化作用、抗癌作用、抗菌作用、抗病毒、保肝利胆、活血降压等^[10-16],是目前天然产物领域研究的热点之一^[10-13],现代科学对绿原酸的活性研究已深入到食品、医药、化妆品领域。且作为许多天然产物的活性成份,绿原酸在胃、小肠、大肠均有吸收且代谢广泛^[17-18]。故我们在此文首次提出了以绿原酸作为质量控制指标,建立阿纳其根的质量标准。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 LC-20A型高效液相色谱仪,包含PDA型紫外-可见检测器,四元梯度泵(日本岛津)。超声波清洗器(型号:KH-250,昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.1.2 试药 绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,供高效液相法含量测定用,纯度98%,批号:110753-201314);乙腈(色谱纯, sigma公司);甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);阿纳其根购自亳州市中正中药材饮片有限公司,批号为130704。经北京中医药大学中药学院谭鹏副教授鉴别为菊科植物罗马除虫菊(*Anacyclus pyerhturm. DC.*)的根。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Agilent 5 TC-₁₈柱(5 μm;4.6 mm×150 mm);流动相:乙腈-0.4%磷酸水(13:87, V/V);检测波长:327 nm;流速:0.8 mL·min⁻¹;柱温:40℃。

1.2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量,加甲醇制成每1 mL含48.4 μg的溶液,即得对照品溶液。所得 HPLC 图谱。见图1。

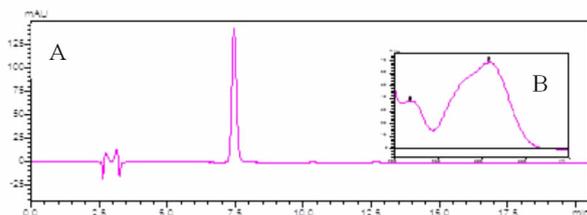


图1 A:绿原酸的HPLC图 B:200~400 nm范围内的光谱

1.2.3 供试品溶液的制备 取阿纳其根粉末约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇10 mL,称定重量,超声提取1 h,放冷,再称定重量,用甲醇补足减少的重量,摇匀,上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,得供试品溶液。所得 HPLC 图谱。见图2。

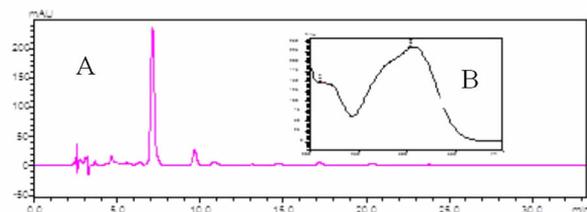


图2 A:阿纳其根甲醇提取物的HPLC图
B:200~400 nm范围内的光谱

1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 标准曲线绘制 精密吸取绿原酸对照品

2.5 mL(质量浓度为1.963 mg·mL⁻¹)置于5 mL容量瓶中,加甲醇稀释到刻度,摇匀。逐级稀释,得质量浓度分别为0.968 mg·mL⁻¹、0.3872 mg·mL⁻¹、0.1936 mg·mL⁻¹、0.0968 mg·mL⁻¹、0.0484 mg·mL⁻¹的对照品溶液,精密吸取上述各标准溶液10 μL注入高效液相色谱仪,记录其峰面积。以质量(X)为横坐标,色谱峰面积(Y)为纵坐标,进行回归,得回归方程:Y = 2296316.8X-1369.4 (r = 0.9999)。结果表明绿原酸在0.0484~0.968 mg按照实际的折算范围内呈良好线性关系。

1.2.4.2 精密度试验 精密吸取“2.2”项下对照品溶液,每次吸取10 μL,注入液相色谱仪,重复进样6次,测定峰面积,结果RSD=0.85%,结果表明,精密度良好。

1.2.4.3 稳定性试验 精密称取同一阿纳其根样品粉末0.5 g,按照“2.3”项下制备供试液,每次精密吸取10 μL,分别于0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h依次进样,测定峰面积,记录色谱图,结果RSD%=1.11%,表明样品在8 h内稳定。

1.2.4.4 重复性试验 精密称取同一阿纳其根样品粉末6份,每份0.5 g,按供试品项下制备供试液,精密吸取10 μL,注入高效液相色谱仪,记录峰面积,结果RSD=1.23%,阿纳其根中绿原酸平均含量为0.11%,表明重复性良好。

1.2.4.5 回收率试验 分别称取已知含量(1.10 mg·g⁻¹)的阿纳其根样品粉末6份,每份0.25 g,精密加入绿原酸对照品(0.3441 mg·mL⁻¹)溶液0.5 mL,供试品项下制备,精密吸取10 μL,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件,记录峰面积,计算得回收率如表1。

表1 阿纳其根中绿原酸的加样回收率(n=6)

序号	绿原酸原有量/mg	绿原酸加入量/mg	绿原酸测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
样品1	0.275	0.17	0.451	103.52	100.20	2.75
样品2	0.278	0.17	0.445	98.24		
样品3	0.279	0.17	0.442	95.88		
样品4	0.271	0.17	0.439	98.82		
样品5	0.276	0.17	0.451	102.94		
样品6	0.269	0.17	0.442	101.76		

表2 不同批次阿纳其根药材绿原酸含量测定

批次	含量(g/g)%
1	0.120
2	0.112
3	0.095
平均值	0.108

1.2.4.6 含量测定 精密吸取不同批次阿纳其根药材的供试液 10 μL 分别进样,记录峰面积,计算绿原酸的含量,结果见表 2。由表 2 得出,不同批次阿纳其根药材绿原酸含量在 0.095% ~ 0.120% 之间。

2 结果

2.1 检测波长的选择 选取 200 ~ 400 nm 的波长范围,对浓度为 48.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的绿原酸进行扫描,其最大吸收波长为 324,考虑到检测灵敏度等问题,固选取 327 nm 为本实验的检测波长。

2.2 流动相的选择 采用了多种色谱流动相:1) 甲醇 - 0.4% 的磷酸水 (10:90);2) 甲醇 - 0.1% 的甲酸水 (10:90);3) 乙腈 - 0.4% 磷酸水 (13:87);经比较得出,采用乙腈 - 0.4% 磷酸水 (13:87) 为流动相,得出的阿纳其根中绿原酸的峰型及分离度等都较其他方法优,出峰时间亦较理想,所以采用乙腈 - 0.4% 磷酸水 (13:87) 为色谱流动相。

2.3 绿原酸定量的方法 目前对于绿原酸含量测定的方法主要有:HPLC 法^[19-20,25]、薄层扫描法^[21]、毛细管电泳法^[22-25]等,而中药具有多成分的特点,固选用 HPLC 法进行定量。经方法学考察表明,本实验建立的方法简便、准确、可重复性好,可作为阿纳其根中绿原酸含量测定的方法。

3 讨论

本课题在物质基础研究过程中,首次发现阿纳其根甲醇提取物中含有绿原酸类化合物,并建立了其含量测定的方法。实验考虑了波长,流动相等的选择,发现在以乙腈 - 0.4% 磷酸水 (13:87, V/V) 为流动相,紫外检测波长为 327 nm 时,绿原酸在质量为 0.0484 ~ 0.968 mg 范围内呈良好线性关系。方法学考察发现,本法可以为维药阿纳其根的质量评价提供有效的方法和依据。

绿原酸类物质是植物中重要的次生代谢产物,分布在多种植物中,它是植物体内有氧呼吸过程中经莽草酸途径产生的一种苯丙素类产物,是多种植物的生物活性物质。在测定不同批次阿纳其根含量的过程中发现,不同批次阿纳其根中绿原酸含量有明显差异,因此在以后的研究中,需结合药效进行进一步研究,制定阿纳其根真伪和优劣的标准,进一步保证临床用药的安全有效。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:43-44.
[2] 新疆维吾尔自治区卫生厅编. 维吾尔药材标准[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1993:143-144.

[3] 顾永寿,顾永福. 维吾尔医常用药材[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1992:22-23.
[4] 古丽娜尔·卡斯木. 阿纳其根化学成分及其酪氨酸酶活性筛选研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2014.
[5] 帕尔哈提尔·赛买提,玉苏甫·买提努尔,热甫开提·赛吾力丁,等. 维药阿那其根散剂外敷治疗膝关节炎的临床疗效评价研究[J]. 中国民族医药杂志,2012,18(9):1-3.
[6] 金小越,王智颖,郭世民. 维药阿那其根醇提物及原粉胶囊的急性毒性试验[J]. 中国药物经济学,2013,3(9):31-32.
[7] 热娜古丽·阿布拉,买热木·多力坤. 关于治疗白癜风初探[J]. 中国民族医药杂志,2011,17(9):45-46.
[8] 穆巴拉克,阿衣古丽. 维吾尔医治疗白癜风介绍[A]. 中国民族医药学会. 全国首届侗医药学术研讨会论文集[C]. 北京:中国民族医药学会,2004:3.
[9] 古丽斯坦·阿吾提,何承辉,刘宣麟,等. 复方驱虫斑鸠菊丸质量标准[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):94-96.
[10] 刘颖,郭明晔,白根本. 绿原酸的研究进展[J]. 中药材,2012,35(7):1180-1185.
[11] 席利莎,木泰华,孙红男. 绿原酸类物质的国内外研究进展[J]. 核农学报,2014,28(2):292-301.
[12] Dos SMD, Almeida MC, Lopes NP, et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(11):2236-2240.
[13] 席利莎,木泰华,孙红男. 绿原酸类物质的国内外研究进展[J]. 核农学报,2014,28(2):292-301.
[14] 王辉,田呈瑞,马守磊,等. 绿原酸的研究进展[J]. 食品工业科技,2009,30(5):341-345.
[15] 吴江涛. 绿原酸的生物活性及其应用[J]. 现代农业科技,2009,2(19):349-350.
[16] 刘颖,郭明晔,白根本. 绿原酸的研究进展[J]. 中药材,2012,35(7):1180-1185.
[17] 高茹,林以宁,梁鸽,等. 绿原酸的吸收与代谢研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):316-319.
[18] Olthof MR, Hollman PC, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans[J]. J Nutr, 2001, 131(1):66-71.
[19] 李玉珍,肖怀秋. 绿原酸分析测定方法研究新进展[J]. 江苏调味副食品,2010,27(6):39-43.
[20] 肖文平,李娟. 金银花中绿原酸的提取和含量测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(35):21675-21676,21694.
[21] 聂松柳,孟楣. 薄层扫描法测定复方银花口服液液中绿原酸的含量[J]. 安徽医药,2010,14(10):1147-1149.
[22] 张莉莉. 金银花中绿原酸的提取方法研究和毛细管电泳测定[D]. 长春:吉林大学,2006.
[23] 颜流水,温振东,黄智敏,等. 毛细管电泳法测定金银花中绿原酸、芦丁和槲皮素[J]. 药物分析杂志,2007,27(3):367-370.
[24] 戴传云,高晓燕,汤波,等. 近红外光谱法测定双黄连口服液液中绿原酸和连翘苷的含量[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(2):358-362.
[25] 钟方晓. 高效液相及紫外分光光度法测定金银花中绿原酸和异绿原酸含量方法学比较[J]. 时珍国医国药,2005,16(3):212-212.