

高效液相色谱法同时测定青钱柳中 9 种指标成分的含量

汪荣斌^{1,2}, 秦亚东¹, 陈颖³, 王存琴³, 李林华¹, 周守标^{2*}¹安徽中医药高等专科学校; ²安徽师范大学; ³皖南医学院, 芜湖 241000

摘要:建立高效液相色谱法同时测定青钱柳中绿原酸、香草酸、逆没食子酸、异槲皮苷、阿福豆苷、槲皮苷、山奈酚、山奈素和乌苏酸含量的方法。采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为 0.2% 磷酸乙腈-0.2% 磷酸水, 梯度洗脱; 流速为 0.7 mL/min, 柱温 35 °C; 检测波长: 香草酸、逆没食子酸和乌苏酸为 210 nm; 绿原酸、异槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山奈酚和山奈素为 360 nm。青钱柳在该色谱条件下 9 种成分分离较好, 平均加样回收率为 95.86% ~ 103.30%, RSD < 2.5%。该方法简便、准确、重复性好, 适用于青钱柳中绿原酸、香草酸、逆没食子酸、异槲皮苷、阿福豆苷、槲皮苷、山奈酚、山奈素和乌苏酸含量的同时测定。

关键词:青钱柳; 高效液相色谱; 多指标成分; 不同产地; 含量测定

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.11.016

Simultaneous Determination of Nine Chemical Markers of Cyclocaryae Folium by HPLC

WANG Rong-bin^{1,2}, QIN Ya-dong¹, CHEN Ying³, WANG Cun-qin³, LI Lin-hua¹, Zhou Shou-biao^{2*}¹Anhui college of Traditional Chinese Medicine, Anhui Wuhu 241000, China; ²Anhui Normal University, Anhui wuhu 241000, China; ³Wannan medical college, Anhui Wuhu 241000, China

Abstract: HPLC method was developed for the simultaneous determination of chlorogenic acid, vanillic acid, ellagic acid, sioquercitin, afzelin, quercetin, kaempferol, kaempferidol and ursolic acid in Cyclocaryae Folium. The ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) was used with 0.2% phosphoric acid in acetonitrile (A) and 0.2% phosphoric acid in water (B) as mobile phases in gradient elution mode. The flow rate was 0.7 mL/min, the column temperature was 35 °C. The DAD detection wavelength was set at 210 nm for vanillic acid, ellagic acid and ursolic acid, 360 nm for the others. As a result, nine chemical markers were separated well, the average recoveries were between 95.86-103.30%, RSD < 2.5%. The developed HPLC method was simple, accurate and reproducible. It is suitable for the determination of nine chemical markers of Cyclocaryae Folium.

Key words: Cyclocaryae Folium; HPLC; multiple chemical marks; content determination

青钱柳 *Cyclocarya Folium* 为胡桃科青钱柳属植物青钱柳 *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk. 的叶, 植物青钱柳是我国独有的单种属, 在我国长江以南有广泛分布。《中华本草》及《全国中草药汇编》中均有青钱柳药用记载, 在民间以青钱柳作为茶饮品, 具有悠久的历史。青钱柳主要含有黄酮、三萜、多糖、有机酸类成分^[1,2]。文献报道, 青钱柳具

有降血糖、降血脂等药理作用^[3,4], 其含有的鞣花酸(逆没食子酸)、槲皮苷、槲皮素等成分具有显著的 α-葡萄糖苷酶抑制活性^[5], 使青钱柳在降血糖方面具有好的开发价值。然而, 目前对青钱柳质量控制方面的研究较弱, 虽有文献报道^[6,7], 采用 HPLC 法对青钱柳中绿原酸、异槲皮苷、槲皮苷等成分进行了含量测定, 但青钱柳中香草酸及其降血糖活性成分逆没食子酸的含量测定研究尚未见报道, 同时, 现有的研究多只测定青钱柳药材中 3 到 5 个成分的含量。本研究选择同时测定青钱柳中 9 种主要成分即绿原酸、香草酸、逆没食子酸、异槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山奈酚、山奈素以及乌苏酸的含量, 采用安捷伦 1290 型液相色谱仪, 以 3.5 μm 小粒径色谱柱

收稿日期: 2017-07-24 接受日期: 2017-08-16

基金项目: 安徽省卫生计生委中医药科研课题(2014zy45); 安徽省高校优秀青年人才支持计划(gxyq2017209); 安徽高校自然科学研究重点项目(KJ2015A343); 安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助重点项目(gxbjZD2016106)

* 通信作者 E-mail: zhoushoubiao@vip.163.com

有效缩短了分析时间,利用 DAD 双波长进行检测,实现了上述 9 种成分含量的同时测定,以期为青钱柳质量控制及深层次开发提供参考和依据。

1 材料与仪器

1.1 仪器

安捷伦 1290 型高效液相色谱仪 (Agilent, USA), DV215CD 型 Discovery 电子天平 (Ohaus Corporation, USA), KQ250 型超声波清洗仪 (上海市昆

山超声仪器有限公司), U-16K 型台式离心机 (Sigma, Germany)。

1.2 材料

青钱柳样品采收于安徽、江西和湖南 (表 1), 均为野生, 经安徽中医药高等专科学校刘晓龙研究员鉴定为 *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk. 的干燥叶片。阳光下晒干至恒重, 除去叶柄, 叶片剪成碎片, 置于密封袋中 4 °C 冰箱中储存, 备用。

表 1 5 批青钱柳样品信息

Table 1 The detailed information of samples

样品编号 Sample No.	来源 Source	采集时间 Collection date	经纬度 Latitude and longitude	海拔 Altitude (m)
1	安徽芜湖 Anhui Wuhu	2016.9	31°18'06.86"N 118°22'23.22"E	11
2	江西九江 Jiangxi Jiujiang	2015.9	29°11'46.23"N 114°28'35.26"E	277
3	江西宜春 Jiangxi Yichun	2016.9	28°30'50.10"N 114°22'02.37"E	350
4	湖南张家界 Hunan Zhangjiajie	2016.9	29°23'42.47"N 110°09'45.05"E	326
5	安徽黄山 Anhui Huangshan	2016.9	30°05'07.84"N 118°08'48.08"E	601

1.3 试剂与试剂

绿原酸 (批号: RA0426FA14)、山奈素 (批号: S31M7D12085)、山奈酚 (批号: R03F6C1)、槲皮素 (批号: C20J6Y1722) 对照品购自上海源叶生物科技有限公司; 异槲皮苷 (批号: 110833-201304) 对照品购自中国食品药品检定研究院; 香草酸 (批号: X-030-170322)、逆没食子酸 (批号: R-004-170426)、阿福豆苷 (批号: CFS201701)、乌苏酸 (批号: R-006-161216) 对照品购自上海远慕生物科技有限公司; 色谱级乙腈、磷酸 (美国 TEDIA 公司)、水为实验室自制超纯水、甲醇等化学试剂为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 青钱柳样品供试液制备

青钱柳经干燥处理后, 除去叶柄, 粉碎, 过 80 目筛, 收集于密封袋中 4 °C 冰箱中储存。取各青钱柳粉末约 0.1 g, 置于 15 mL 具塞离心管中, 精密加入 10.0 mL 甲醇-水溶液 (8:2/V:V), 室温下超声提取 1 h 后离心处理 (5000 rpm) 15 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔有机滤膜, 取续滤液备用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定 3~5 mg 的绿原酸、香草酸、逆没食子

酸、异槲皮苷、阿福豆苷、槲皮苷、山奈酚、山奈素和乌苏酸对照品各适量, 分别置于 9 个 10 mL 棕色容量瓶中, 以甲醇-水 (8:2/V:V) 溶液定容至刻度, 用时稀释至所需浓度, 所有对照品溶液均置 4 °C 冰箱中储存备用, 色谱图见图 1A、B 所示。

2.3 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm); 流动相为 0.2% 磷酸乙腈 (A) 及 0.2% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序如下: 0~15 min, 15%~35% A; 15~50 min, 35%~85% B; 流速 0.7 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 210、360 nm, 进样量 10 μL, 典型青钱柳 HPLC 色谱图见图 1C、D 所示。

2.4 定量分析

2.4.1 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下制备的绿原酸、香草酸、逆没食子酸、异槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山奈酚、山奈素、乌苏酸对照品溶液适量, 以 80% 甲醇水溶剂稀释成系列不同浓度梯度, 按“2.3”项下色谱条件进样测定峰面积, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 进样量 (X, μg) 进行回归, 9 种成分工作曲线、线性系数及线性范围如表 2 所示, 表明线性关系良好。

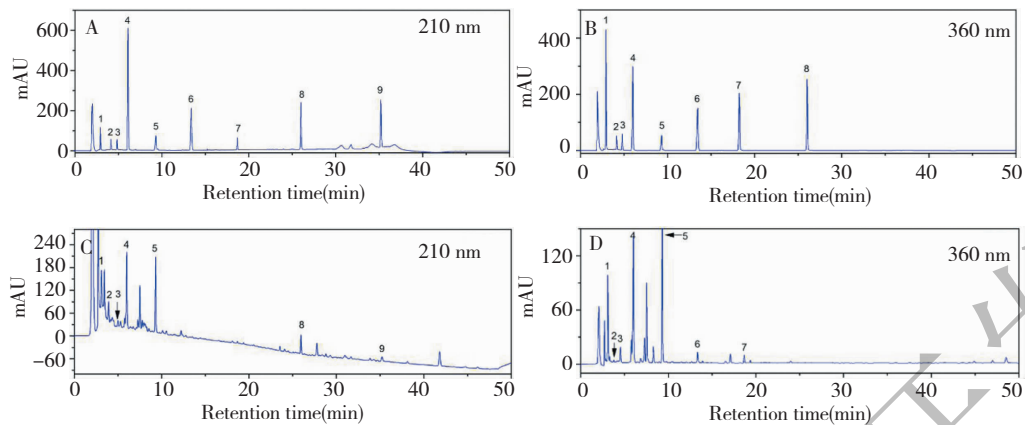


图1 9成分混合对照品210nm检测波长(A)、360nm检测波长(B)以及样品在210nm检测波长(C)、360nm检测波长(D)下HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of nine mixed standards under detection wavelength 210 nm (A), 360 nm (B) and typical sample under detection wavelength 210 nm (C), 360 nm (D)

注:1. 绿原酸, 2. 香草酸, 3. 逆没食子酸, 4. 异槲皮苷, 5. 阿福豆苷, 6. 槲皮素, 7. 山奈酚, 8. 山奈素, 9. 乌苏酸

Note: 1. chlorogenic acid, 2. vanillic acid, 3. ellagic acid, 4. sioquercitin, 5. afzelin, 6. quercetin, 7. kaempferol, 8. kaempferidel, 9. ursolic acid

表2 9成分工作曲线及线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges of 9 chemical markers

指标成分 Chemical marks	回归方程 Calibration curve	线性系数 r	线性范围 Linear range (μg)
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y = 320.72X - 5.7147$	0.9992	0.2562 ~ 3.0744
香草酸 Vanillic acid	$Y = 11.99X + 1.322$	0.9991	0.0103 ~ 0.1230
逆没食子酸 Ellagic acid	$Y = 2286.2X + 0.5875$	0.9997	0.0233 ~ 0.2790
异槲皮苷 Sioquercitin	$Y = 92.082X - 12.686$	0.9994	0.3094 ~ 3.7128
阿福豆苷 Afzelin	$Y = 462.81X + 5.1362$	0.9997	0.2300 ~ 23.0000
槲皮苷 Quercetin	$Y = 115.14X - 17.86$	0.9993	0.8176 ~ 4.0880
山奈酚 Kaempferol	$Y = 94.395X + 11.87$	0.9997	0.9672 ~ 4.8360
山奈素 Kaempferidel	$Y = 133.45X - 24.34$	0.9995	1.1300 ~ 5.6500
乌苏酸 Ursolic acid	$Y = 1482.5X - 1.5786$	0.9992	0.4475 ~ 44.7500

2.4.2 精密度实验

取“2.2”项下制备的混合对照品溶液, 进样量为10 μL , 连续自动进样6次, 记录9个成分峰面积并计算RSD, 结果在210 nm波长下香草酸、逆没食子酸、乌苏酸RSD在1.02~2.24%之间; 360 nm波长下绿原酸、异槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山奈酚、山奈素RSD在0.27~0.69%之间, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性实验

取青钱柳样品(安徽芜湖), 按“2.1”项下条件制备供试品溶液, 分别于0、2、4、6、8、10、12 h进样,

按“2.3”项下色谱条件测定, 记录9个成分峰面积并计算RSD, 结果在210 nm波长下香草酸、逆没食子酸、乌苏酸RSD在1.36~2.71%之间; 360 nm波长下绿原酸、异槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山奈酚、山奈素RSD在0.72~2.11%之间, 表明青钱柳供试品溶液在12h内保持稳定。

2.4.4 重复性实验

精密称取青钱柳样品(安徽芜湖)粉末5份, 按“2.1”项下条件制备供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件测定, 记录9个成分峰面积, 并计算9个成分含量及RSD, 结果在210 nm波长下香草酸、逆没食子

酸、乌苏酸含量的 RSD 在 1.48 ~ 1.87% ;360 nm 波长下绿原酸、异槲皮苷、阿福豆苷、槲皮素、山奈酚、山奈素含量的 RSD 在 0.47 ~ 1.66% 之间,表明测试方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率实验

精密称取安徽芜湖青钱柳粉末约 0.1 g,按“2.

1”项下方法制备供试液,离心后(5000 rpm,10 min)精密量取供试液适量,分别按 9 种成分含量的 80%、100% 和 120% 加入各对照品溶液适量后,震荡均匀,按“2.3”项下色谱条件进行测定,平行 3 次,计算加样回收率,结果见表 3 所示。

表 3 加样回收率实验结果($n=3$)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of the 9 chemical markers ($n=3$)

指标成分 Chemical markers	样品含量 Content in sample (mg)	加入量 Standard added (mg)	测得值 Measured value (mg)	加样回收率 Recovery (%)	平均回收率 ± RSD Average recovery ± RSD (%)
绿原酸 Chlorogenic acid	a0.1641	0.1282	0.2867	95.63	97.36 ± 1.19
	b0.1641	0.1641	0.3255	98.35	
	c0.1641	0.1960	0.3564	98.11	
异槲皮苷 Sioquercitin	a0.2938	0.2720	0.5627	98.86	98.22 ± 0.57
	b0.2938	0.2938	0.5816	97.96	
	c0.2938	0.3520	0.6382	97.84	
槲皮素 Quercetin	a0.1600	0.1285	0.2913	102.18	101.31 ± 0.96
	b0.1600	0.1610	0.3234	101.49	
	c0.1600	0.1960	0.3565	100.26	
山奈酚 Kaempferol	a0.3650	0.2920	0.6477	96.82	98.96 ± 2.49
	b0.3650	0.3650	0.7242	98.41	
	c0.3650	0.4380	0.8102	101.64	
山奈素 Kaempferidel	a0.1530	0.1226	0.2722	97.22	97.79 ± 0.87
	b0.1530	0.1530	0.3041	98.76	
	c0.1530	0.1835	0.3317	97.38	
香草酸 Vanillic acid	a0.1810	0.1440	0.3214	97.50	97.37 ± 0.41
	b0.1810	0.1810	0.3578	97.68	
	c0.1810	0.2172	0.3915	96.92	
逆没食子酸 Ellagic acid	a0.6670	0.5330	1.2206	103.86	103.30 ± 1.66
	b0.6670	0.6670	1.3651	104.66	
	c0.6670	0.8010	1.4790	101.37	
阿福豆苷 Afzelin	a0.3830	0.3060	0.6744	95.23	95.86 ± 0.57
	b0.3830	0.3830	0.7512	96.14	
	c0.3830	0.4600	0.8256	96.22	
乌苏酸 Ursolic acid	a0.4710	0.3760	0.8291	95.24	96.16 ± 1.32
	b0.4710	0.4710	0.9307	97.60	
	c0.4710	0.5650	1.0113	95.63	

注:上标 a、b、c 分别表示对照品的加入量为样品含量的 80%、100% 和 120%,其余各成分相同。

Note: Superscript letters a, b, c indicated the adding amount of standards were 80%, 100% and 120% of the content in sample, respectively.

2.4.6 含量测定

取各青钱柳样品干粉 0.1 g,精密称定,按“2.

1”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进行测定,各样品测定 3 次,记录峰面积并计算含

量,结果见表4。

表4 9种指标成分含量测定结果(mg/g, n=3)

Table 4 Determination results of 9 chemical markers (mg/g, n=3)

样品编号 Sample No.	绿原酸 Chlorogenic acid	香草酸 Vanillic acid	逆没食子酸 Ellagic acid	异槲皮苷 Sioquere- itin	阿福豆苷 Afzelin	槲皮素 Quercetin	山奈酚 Kaemp- ferol	山奈素 Kaemp- feridel	乌苏酸 Ursolic acid
1	4.1027	0.1886	1.1202	3.3451	8.1507	0.7970	0.9134	0.7649	3.4579
2	1.6353	0.2580	0.3240	1.8723	3.1897	0.3455	0.1464	0.5155	1.4013
3	0.6113	0.3212	0.2286	0.2226	0.6129	ND	0.1605	0.5604	1.8933
4	2.1765	0.3924	0.5576	1.5934	7.2300	0.1706	0.0635	0.3059	2.0484
5	4.1120	0.2516	0.2582	0.6177	2.9517	ND	ND	0.9125	1.7233

注:ND表示未检测到该成分。

Note:ND indicated not detected.

3 讨论与结论

在色谱条件的选择上,青钱柳含量测定研究方面已有学者进行报道^[6,7],文献含量测定都是使用5 μm 填料的常规分析色谱柱,分析时间长达60~80 min,本文采用3.5 μm 小粒径填料柱进行分析,有效缩短了分析时间(37 min);检测波长本文采用210、360 nm 同时检测,能够兼顾到青钱柳中更多化学成分,能够实现文中所述9种成分含量的同时测定,丰富了青钱柳质量评价指标。为检测到更多的化学成分,并在提取过程中尽可能全成分保留,不破坏化学成分,避免高温提取方式,并与传统提取方式进行比较,选择超声提取;同时考查了水、甲醇溶剂进行提取,结果发现采用体积分数为80%甲醇水溶液进行室温超声提取所制备的供试品溶液中色谱峰较多。

通过实验直观看文中5个产地来源的青钱柳样品间9种成分含量差异较大,与其他文献含量报道大致相似^[6,7]。吴琳琳等报道了不同采收期绿原酸、异槲皮苷、槲皮素、山奈酚的含量差异较大^[7],与本文研究基本相符。本文建立高效液相色谱法,采用3.5 μm 小粒径填料色谱柱,利用DAD双波长同时检测实现了对青钱柳样品中9种成分的含量测定,丰富了青钱柳全面质量控制指标,经方法学考察,所建立方法简便可行、准确度高、重复性好,为青钱柳药效物质基础深层次研究奠定基础。

参考文献

- 1 Fan BD(范冰舵),Wei Y(魏颖),Liu YY(刘洋洋),et al. Research progress in chemical constituents and hyperglycemic activity of *Cyclocarya paliurus*. *China Exp Formu*(中国实验方剂学杂志),2014,20:239-242.
- 2 Li J(李俊),Huang XS(黄锡山),Lu YY(陆园园),et al. Chemical constituents of *Cyclocarya paliurus*. *Chin Tradit Patent Med*(中成药),2008,2:238-240.
- 3 Kurihara H,Fukami H,Kusumoto A,et al. Hypoglycemic action of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) in normal and diabetic mice. *Biosci Biotechnol Biochem*,2003,4:877-880.
- 4 Yi X(易醒),Xie MY(谢明勇),Wen HL(温辉梁),et al. Hypoglycemic effects of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Ilijinsk. on alloxan diabetic mice. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2001,13:52-57.
- 5 Fan L(范莉),Wang YL(王业玲),Tang L(唐丽). Review on screening methods for alpha-glucosidase inhibitors from natural resources. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2016,28:313-321.
- 6 Li CN(李春娜),Fan BD(范冰舵),Liu YY(刘洋洋),et al. Simultaneous determination of five active components in *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Ilijinsk extractive by HPLC-DAD wavelength switching. *Liaoning J TCM*(辽宁中医杂志),2015,6:1283-1285.
- 7 Wu LL(吴琳琳),Yao WL(姚文丽),Luo Y(罗奕),et al. Establishment of HPLC fingerprints of *Cyclocarya paliurus* at determination of four constituents. *Chin Tradit Patent Med*(中成药),2017,2:347-352.