

HPLC 法测定山绿茶不同炮制品种中绿原酸和芦丁的含量*

Content Determination of Chlorogenic Acid and Rutin in Different Processed Shanlücha by HPLC

陈 勇, 李艳苓, 李 立, 潘丽娜, 李 兵, 谢 臻

CHEN Yong, LI Yan-ling, LI Li, PAN Li-na, LI Bing, XIE Zhen

(广西中医学院药学院, 广西南宁 530001)

(Medicinal College, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi, 530001, China)

摘要:为了选出山绿茶的最佳炮制工艺,建立山绿茶中绿原酸和芦丁的含量测定方法,采用高效液相色谱法(HPLC)测定山绿茶不同炮制品中绿原酸和芦丁的含量。结果表明,HPLC法能较好地测定山绿茶中绿原酸和芦丁的含量,绿原酸进样量在 $0.01032\sim 0.6192\mu\text{g}$ 范围内有良好的线性关系, $r=0.9998$,平均回收率 98.86% , RSD 为 2.54% 。芦丁进样量在 $0.02004\sim 1.2024\mu\text{g}$ 范围内有良好的线性关系, $r=0.9999$,平均回收率 102.31% , RSD 为 2.17% 。该法简便、准确、专属性强,可作为检测山绿茶中绿原酸和芦丁含量的方法。

关键词:高效液相色谱法 绿原酸 芦丁 山绿茶

中图分类号:O657.72 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2006)S0-0416-03

Abstract: To select the best processing method for shanlücha and establish a method for content determination of chlorogenic acid and rutin in shanlücha. Using HPLC to determine the contents of chlorogenic acid and rutin in shanlücha. Chlorogenic acid and rutin can be determined by HPLC, the chlorogenic acid showed a good linear relationship in a range of $0.01032\sim 0.6192\mu\text{g}$, $r=0.9998$, the average recovery was 98.86% and RSD was 2.54% , and the rutin also showed a good linear relationship in a range of $0.02004\sim 1.2024$, $r=0.9999$, the average recovery was 102.31% and RSD was 2.17% . The method is simple, accurate, with strong specificity, which can be used for the quantitative determination and control of shanlücha.

Key words: HPLC, chlorogenic acid, rutin, shanlücha

山绿茶为冬青科植物海南冬青(*Ilex hainanensis* Merr.)的叶经加工炮制而成。山绿茶为广西少数民族民间中草药,使用历史悠久。目前山绿茶主要作为生产山绿茶降压制剂(如山绿茶降压片、双山冲剂等)的原料药材使用。山绿茶具有清热解毒,消肿止痛,活血通脉的功效,主要用于降血压、降血脂、降胆固醇及冠心病、脑血管意外所致的偏瘫,以及风热感冒、肺热咳嗽、咽喉水肿、扁头体炎、痢疾

等病症^[1]。山绿茶的炮制加工方法目前大多数按绿茶的加工方法和工艺进行。传统的炮制工艺可能会破坏山绿茶中的有效成分。

目前对山绿茶的研究主要集中在化学成分的提取分离与鉴定、以及降压药理与临床研究等方面^[2~13]。本文采用新的炮制方法和工艺对山绿茶进行比较研究,通过主要化学成分的含量测定,以确定山绿茶的最佳炮制方法和工艺。在实验指标与考核方面:除采用清炒和不加热直接阴干的炮制方法外,还在烘箱中用 60C 、 70C 和 80C 烘制 1h 、 1.5h 和 2h ,取出,放凉的炮制方法。通过对山绿茶中主要成分绿原酸和芦丁的含量测定,选出山绿茶的最佳炮

收稿日期:2006-09-30

作者简介:陈 勇(1961-),男,教授,主要从事药物分析,中药质量控制教学与科研工作。

* 广西科技厅科技攻关项目(合同号:桂科攻 0322024-4B)。

制工艺为清炒,并建立了山绿茶中绿原酸和芦丁的 HPLC 含量测定方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司出品);C18 柱(大连依利特分析仪器有限公司出品, Hipsil ODS $5\mu\text{m}$, $4.6 \times 250\text{mm}$); BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯提供); AE100S 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司出品); Millipore simplicity-185 超纯水器(美国密理博公司出品); SB2200-T 超声波清洗器(上海必能信公司出品); 芦丁对照品、绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 0080-9705,供含量测定用); 水为超纯水; 甲醇、乙腈、异丙醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

1.2 供试品溶液制备

供试品溶液按正交实验所得的最佳方法进行提取:取药材粗粉 0.6g,精密称定,精密加入 50%乙醇 25ml,称定重量,超声处理 40min,放冷,再称定重量,用 50%乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液 1ml 于 1.5ml 离心管中,以 10000r/min 速度离心 10min,取上清液备用。

1.3 对照品溶液制备

精密称取绿原酸对照品 2.5mg,置 25ml 量瓶中,加 50%乙醇至刻度,摇匀,得浓度为 0.1032mg/ml 的对照品溶液。

精密称取芦丁对照品 5.0mg,置 25ml 量瓶中,加 50%乙醇至刻度,摇匀,得浓度为 0.2004mg/ml 的对照品溶液。

1.4 色谱条件

采用梯度洗脱的方法,在一个测定周期内同时测定山绿茶中绿原酸和芦丁的含量。以乙腈为流动相 A,以 0.1%磷酸溶液为流动相 B,按表 1 进行梯度洗脱;检测波长为 340nm。绿原酸在 11min 左右出峰,芦丁在 27min 左右出峰,两者均与相邻组分峰分离, $R > 1.5$,达到分离要求,且峰形尖锐无拖尾,能够满足色谱定量要求。色谱图见图 1~4。

表 1 梯度洗脱条件

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~30	9~20	91~80
30~50	20	80

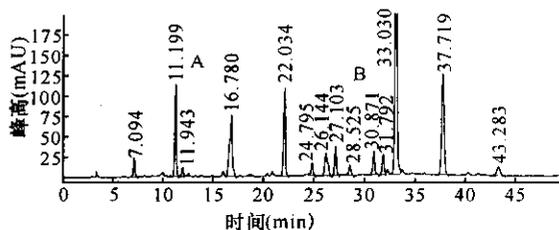


图 1 山绿茶药材炮制品 HPLC 色谱图

A. 绿原酸; B. 芦丁。

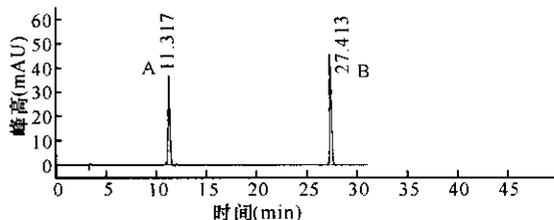


图 2 绿原酸、芦丁对照品混合溶液 HPLC 色谱图

A. 绿原酸; B. 芦丁。

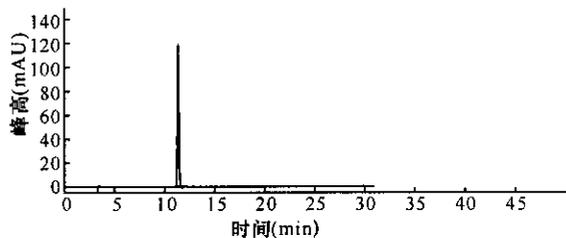


图 3 绿原酸对照品 HPLC 色谱图

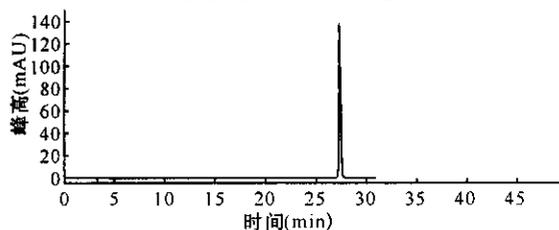


图 4 芦丁对照品 HPLC 色谱图

1.5 线性关系考察

分别取上述绿原酸对照品溶液(0.1032mg/ml)和芦丁对照品溶液(0.2004mg/ml) 0ml、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml、6ml 分别置入 10ml 量瓶中,分别加入 50%乙醇至刻度,摇匀,各取 $10\mu\text{l}$,注入高效液相色谱仪中,测定,以进样量 $C(\mu\text{g})$ 为横坐标,峰面积值 A 为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程得绿原酸标准曲线为 $A = 2337.35C - 7.68, r = 0.9998$; 芦丁标准曲线为 $A = 1402.45C - 2.95, r = 0.9999$,绿原酸对照品进样量在 $0.01032 \sim 0.6192\mu\text{g}$ 之间与峰面积值呈良好的线性关系,芦丁对照品进样量在 $0.02004 \sim 1.2024\mu\text{g}$ 之间与峰面积值呈良好的线性关系。

1.6 精密度试验

取供试品溶液 $10\mu\text{l}$,连续进样 6 次,分别测定其

峰面积值,绿原酸平均峰面积值为 1317.6, *RSD* 为 0.71% ($n=6$), 芦丁平均峰面积值为 438.1, *RSD* 为 0.57% ($n=6$), 结果表明仪器精密度符合要求。

1.7 稳定性试验

取供试品溶液每隔 4h 分别进样 10 μ l, 连续进样 6 次, 测定, 在 24h 内绿原酸平均峰面积值为 1319.1, *RSD* 为 0.83% ($n=6$), 芦丁平均峰面积为 439.3, *RSD* 为 0.66% ($n=6$)。说明供试品溶液在 24h 内稳定。

1.8 重复性试验

取同一批供试品, 精密称取 0.6g, 共 6 份, 按供试品溶液制备方法制备, 测定, 绿原酸平均含量为 2.455, *RSD* 为 0.75% ($n=6$), 芦丁平均含量为 1.294, *RSD* 为 1.38% ($n=6$)。说明重复性良好。

1.9 加样回收试验

精密称取已测知含量的供试品适量, 分别精密加入一定量的绿原酸对照品(0.1032mg/ml)和芦丁对照品(0.2004mg/ml)溶液, 按供试品溶液的制备方法制备, 进样 10 μ l, 记录色谱图, 计算回收率。结果见表 2 和表 3。

表 2 绿原酸加样回收率测定结果

编号	原有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{X} (%)	<i>RSD</i> (%)
1	0.05924	0.0516	0.1088	96.10	98.86	2.54
2	0.05926	0.0516	0.1093	96.97		
3	0.05838	0.0516	0.1114	102.68		
4	0.05926	0.0516	0.1112	100.75		
5	0.05857	0.0516	0.1101	99.25		
6	0.05926	0.0516	0.1095	97.40		

表 3 芦丁加样回收率测定结果

编号	原有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	\bar{X} (%)	<i>RSD</i> (%)
1	0.2509	0.3006	0.5515	100.01	102.31	2.17
2	0.2472	0.3006	0.5460	99.41		
3	0.2564	0.3006	0.5645	102.52		
4	0.2562	0.3006	0.5649	102.70		
5	0.2534	0.3006	0.5675	104.47		
6	0.2564	0.3006	0.5714	104.782		

2 样品含量测定

分别精密称取山绿茶不同炮制品 0.6g, 按供试品溶液制备方法制备, 精密吸取供试品溶液及对照品溶液各 10 μ l, 进样, 记录色谱图。以外标一点法计算各样品中芦丁与绿原酸含量, 结果见表 4。

表 4 山绿茶不同炮制品含量测定结果 ($n=4$)

炮制品	绿原酸含量 (mg/g)	芦丁含量 (mg/g)
传统工艺炮制	0.937	1.060
80℃ 烘制 2h	0.103	0.251
80℃ 烘制 1.5h	0.111	0.254
80℃ 烘制 1h	0.106	0.261
70℃ 烘制 2h	0.0981	0.279
70℃ 烘制 1.5h	0.0694	0.170
70℃ 烘制 1h	0.0597	0.212
60℃ 烘制 2h	0.0357	0.217
60℃ 烘制 1.5h	0.0415	0.329
60℃ 烘制 1h	0.0601	0.442
阴干药材	0.237	0.919
清炒药材	2.244	1.3653

表 4 结果显示, 清炒药材中, 绿原酸和芦丁含量最高, 分别为 2.244mg/g, 1.3653mg/g; 其次分别为传统炮制药材和阴干药材, 60℃、70℃ 和 80℃ 烘制药材中绿原酸和芦丁含量均最低。

3 讨论

采用高效液相色谱法测定山绿茶不同炮制品中绿原酸和芦丁的含量, 具有灵敏、快速、简便的优点。可作为山绿茶不同炮制品的质量控制方法。

山绿茶不同炮制品中芦丁含量测定结果初步表明: 以清炒药材含量最高, 其次分别为传统炮制药材、阴干药材, 60℃、70℃ 和 80℃ 烘制药材中绿原酸和芦丁的含量均最低。清炒药材中芦丁、绿原酸含量较高可能是炒时温度较高, 炒制时间短而将药材中的酶迅速破坏掉, 绿原酸和芦丁没有被酶分解, 因而含量较高。而阴干药材中存在酶, 所以绿原酸和芦丁被酶部分分解, 因而含量较低。而烘制的药材可能由于炮制温度较低, 时间相对较长药材中的酶没有被破坏, 反而在这个温度下产生较高的酶活性, 所以烘制的药材绿原酸和芦丁的含量最低。故认为山绿茶的炮制方法以清炒为佳。

本试验结果表明, 山绿茶的烘制工艺设计还存在一定的问题, 在设计上还可提高烘制的温度, 如 100℃、120℃、150℃, 甚至可以达到 200℃, 以达到快速杀酶的作用, 对于这些考虑, 在以后的试验中将进一步研究与探讨。

参考文献:

- [1] 广西壮族自治区卫生厅编. 广西中药材标准: 1990 年版[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1992: 137-138.

6h、8h 后测定,牛磺酸含量 *RSD* 为 2.8%。

2.8 加标回收率试验

在已知含量的样品中加入 3 个浓度水平的标准溶液,测定得到的加标回收率见表 2。表 2 结果说明本方法较准确。

表 2 回收率试验结果

样品原含量 (mg)	加入量 (mg)	测定值(mg)			回收率 (%)
		1	2	3	
0.574	0.600	0.578	0.586	0.588	97.48
0.574	0.300	0.295	0.298	0.297	98.89
0.574	0.200	0.205	0.199	0.202	101.0

3 结论

用改进后的柱前衍生高效液相色谱法测定红牛

维生素功能饮料中牛磺酸的含量,较为简便,分离效果好,测定结果准确可靠,满足分析要求。适合一般实验室分析和用于该产品的质量控制。

参考文献:

- [1] 邓思珊,林绥,郑晓萍. HPLC 测定金绒莲口服液中牛磺酸含量[J]. 海峡药学,2000,12,(4):29-30.
- [2] 郑纲,林少彬. 高效液相色谱法测定食品中的牛磺酸[J]. 卫生研究,1998,27(4):266-268.
- [3] 杨祖英,张平伟. 高效液相色谱法测定食品中的牛磺酸[J]. 卫生研究,1998,27(3):192-194.
- [4] GB/T 5009. 食品中牛磺酸的测定[S]. 169-2003.
- [5] 何照范,张迪清. 保健食品化学及其检测技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998:131-132.

(上接第 418 页)

- [2] 闵知大,覃开活. 海南冬青中的一个新三萜甙[J]. 药学学报,1984,19(9):691-696.
- [3] 赵登飞. HPLC 测定山绿茶胶囊中芦丁的含量[J]. 中成药,2002,24(9):724-725.
- [4] 陈一,黄凤娇,钟正贤,等. 山绿茶的降压作用[J]. 中草药,1983,14(4):27-30.
- [5] 陈凌,秦永文. 山绿茶降压片的降压疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志,2001,21(2):134-135.
- [6] 惠元诚,束志勤. 山绿茶降压片逆转高血压左室肥厚的疗效观察[J]. 南京医科大学学报,2001,21(6):564-565.
- [7] 董泽民. 复方山绿茶缓释袋泡剂的研究[J]. 中成药,1993,15(12):7-9.
- [8] 藏吾,马明彦. 山绿茶降压片治疗原发性高血压的疗效观察[J]. 中成药,1997,19(12):21-22.
- [9] 赵铁良,胡文忠,邢春清. 山绿茶降压片治疗高血压病疗效观察[J]. 北京中医,1999,18(6):55-56.
- [10] 廖国营. 中族山绿茶降压片治疗高血压病 120 例疗效观察[J]. 河北医药,2001,23(4):268-269.
- [11] 毛晓刚. 山绿茶降压片治疗老年高血压病 56 例临床观察[J]. 浙江中西医结合杂志,2002,12(12):760.
- [12] 刘健. 山绿茶降压片治疗原发性高血压 101 例临床观察[J]. 安徽中医临床杂志,2002,14(5):339-340.
- [13] 唐耀平,刘鹰,方显明. 山绿茶治疗老年单纯收缩期高血压 80 例分析[J]. 中医学刊,2004,22(8):1502-1503.