

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.05

UPLC-PDA 法测定蒲公英提取物中咖啡酸的含量

魏秀丽^{1,3}, 徐恩民^{1,3}, 刘霄飞^{1,3}, 李有志^{1,3*}, 张秀英², 王海军^{4,5}

(1.山东省兽药质量检验所, 济南 250022; 2.中国兽医药品监察所, 北京 100081;

3.山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 济南 250022;

4.北京生泰尔科技股份有限公司, 北京 102206; 5.北京市中兽药工程技术研究中心, 北京 102206)

[收稿日期] 2018-09-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0026-05 [中图分类号] S859.798

[摘要] 建立超高效液相色谱-二极管阵列检测法(UPLC-PDA法)测定蒲公英提取物中咖啡酸的含量。采用反相高效液相色谱法,用带有二极管阵列检测器的高效液相色谱仪(UPLC-PAD)对咖啡酸进行色谱分离和快速筛查。以 ACQUITY UPLCTMHSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)为分离柱,柱温:35 ℃;流动相体系:A 项为乙腈,B 项为 0.4%磷酸水溶液,进行梯度洗脱;流速:0.35 mL/min;进样量:5 μL;检测波长为 323 nm。通过光谱图、保留时间及峰面积参数对咖啡酸进行定性定量检测。咖啡酸在 1~100 μg/mL 的范围内线性良好($R^2=0.999$);0.25 μg/mL 咖啡酸对照品溶液与空白溶液的信噪比>3,为检出限,1 μg/mL 咖啡酸对照品溶液与空白溶液的信噪比>10,为定量限,完全满足检测需求。该方法色谱分离较好,分析速度较快,前处理简单,适用于蒲公英提取物中咖啡酸的定性定量检测。

[关键词] 蒲公英提取物;超高效液相色谱-二极管阵列检测法;咖啡酸;含量测定

Determination of Caffeic Acid Content in Dandelion Extract by UPLC-PDA

WEI Xiu-li^{1,3}, XU En-min^{1,3}, LIU Xiao-fei^{1,3}, LI You-zhi^{1,3*}, ZHANG Xiu-ying², WANG Hai-jun^{4,5}

(1. Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China; 2. China Institute of Veterinary Medicine Inspection,

Beijing 100081, China; 3. Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Monitoring and Risk Assessment for Animal Products, Jinan 250022, China;

4. Beijing Centre Biology Co., Ltd, Beijing 102206, China; 5. Beijing Veterinary Drugs Engineering Research Center; Beijing 102206, China)

Corresponding author: LI You-zhi, E-mail: 1914343652@qq.com

Abstract: This study was aimed to establish a high performance liquid chromatography-diode array (UPLC-PDA) test method for the determination of caffeic acid in dandelion extract. Caffeic acid can be separated and detected by reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC-PAD) with diode array detector. The test condition is like that: separate column is ACQUITY UPLCTMHSS T3 column (2.1 mm×100 mm-1.8 μm), the column temperature is 35 ℃, mobile phase consists of acetonitrile and 0.4% phosphoric acid solution for gradient elution, the flow rate is 0.35 mL/min, the injection volume is 5 μL, and the detection wavelength is

基金项目: 2015 年国家科技支撑计划“兽药安全与质量评价技术研究与应用”编号“BAD11B03-01”

作者简介: 魏秀丽,高级兽医师,从事兽药和细菌耐药性检测、中兽药标准制订、新兽药研发工作。

通讯作者: 李有志。E-mail: 1914343652@qq.com

323 nm. Caffeic acid is detected qualitatively and quantitatively by the retention time and peak response in the chromatogram. The linearity of the method for caffeic acid detection complies to the requirement at the range of 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2=0.999$). The limit of detection (LOD) is 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($S/N>3$), and the limit of quantitation (LOQ) is 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($S/N>10$), which fully demonstrates the compliance of the test method. this method is suitable for qualitative and quantitative determination of caffeic acid in dandelion extract with fine separation, quick analysis and simple pretreatment procedure of the sample.

Key words: dandelion extract; UPLC-PDA; caffeic acid; content determination

蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz、碱地蒲公英 *Taraxacum borealisinese Kitam* 或同属数种植物的干燥全草。味甘、微苦,性寒,无毒,用于疔疮肿毒、乳痈、咽痛、湿热黄疸、热淋涩痛。蒲公英同时含有蛋白质、脂肪、碳水化合物等,有丰富的营养价值,是药食兼用的食物。药材及相关制剂被收录于中华人民共和国药典和兽药典^[1-2]。由于其良好的治疗效果和亲民的价格,蒲公英提取物在兽药中的研究也成为热点,对其有效成分进行质量控制成为必然。蒲公英主要含有黄酮类、酚酸类、糖类、倍半萜内酯类等成分,其中以咖啡酸为代表成分。

有文献报道采用薄层色谱法 (TLC) 为蒲公英提取物制定定性鉴别方法;采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定其咖啡酸含量^[1-8]。前者耗时较长,实验室进行了改进。本文对经水提醇沉的蒲公英提取物,采用超高效液相色谱法对其有效成分咖啡酸进行定性和定量检测,方法经济快速,满足日常检测需求,为下一步蒲公英提取物的工艺调整和优化方案的筛选提供最快速的检测方法,为制定检测标准提供方法借鉴。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 分析天平:感量 0.00001g;仪器 Waters Acquity™ Ultra performance LC 超高效液相色谱仪。

1.2 药品及试剂 咖啡酸标准品,批号 110885-201703,含量 99.7%,中国食品药品检定研究院。甲酸、甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯;超纯水。蒲公英提取物为水提醇沉,北京生泰尔科技股份有限公司小试生产的产品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLCTMHSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流动相 A:乙腈;流动相 B:水溶液 (0.4% 磷酸),进行梯度洗脱;流速:0.35 mL/min;进样量:5 μL ;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$ 。二极管阵列检测器,检测波长为 323 nm。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件表

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	曲线
0	10	90	
0~3	10→15	90→85	6
3~6	15→35	85→65	6
6~10	35→50	60→50	6
10~11	50→10	50→90	6
11~12	10	90	6

2.2 样品制备

2.2.1 样品 蒲公英提取物

2.2.2 标准储备液的制备 精密称取咖啡酸对照品 9.36 mg,加甲醇至 100 mL,制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,作为咖啡酸标准储备液。

2.2.3 标准工作液的制备 取适量标准储备液,用初始比例流动相稀释,制备成系列浓度为:1.0、2.0、5.0、10、20、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准工作液,并绘制标准曲线。

2.2.4 蒲公英提取物样品的制备 精密称取蒲公英提取物样品约 0.5、0.2、0.1、0.05 g,置 15 mL 离心管中,加 5% 甲酸甲醇溶液溶解并定容至 10 mL,超声 30 min,5000 rpm.离心 10 min,过滤至 15 mL 离心管中,作为样品初始液;分别精密量取相应浓度

的样品初始液适量,用初始比例流动相稀释 5 倍,摇匀,0.22 μm 滤膜滤过,上机测试。

2.3 方法线性考察

2.3.1 专属性试验 咖啡酸对照品和蒲公英提取物样品待测液,在 2.1 项条件下,色谱保留时间为 3.45 min 左右见图 1-图 2。光谱图见图 3-图 4。

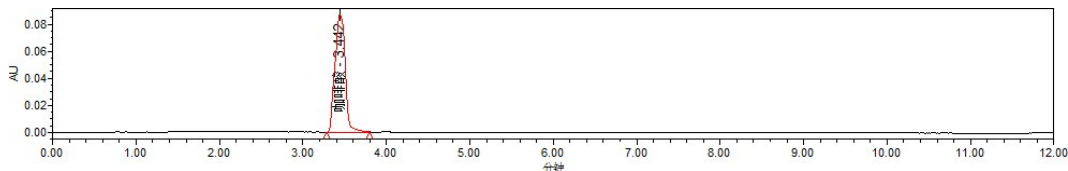


图 1 10ug/mL 咖啡酸对照品色谱图

Fig 1 Chromatogram of 10ug/mL caffeic acid reference substance

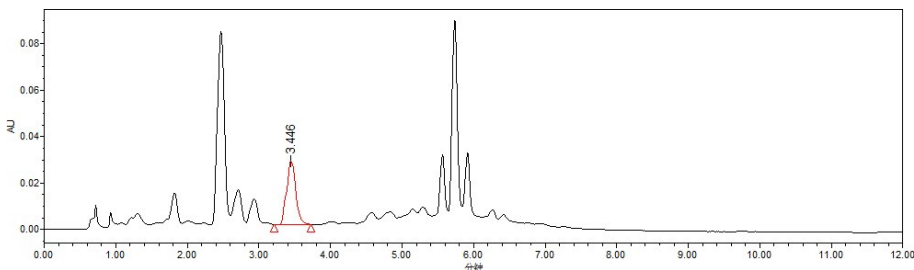


图 2 蒲公英提取物样品中咖啡酸色谱图

Fig 2 Caffeic acid chromatogram of dandelion extract sample

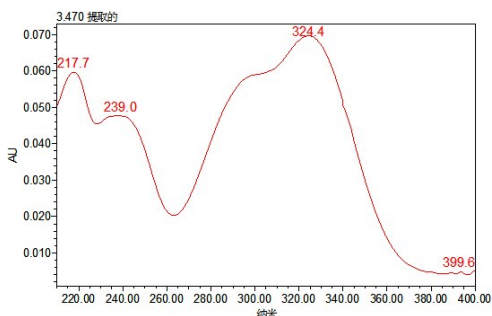


图 3 10ug/mL 咖啡酸对照品光谱图

Fig 3 Spectra of 10ug/mL caffeic acid reference substance

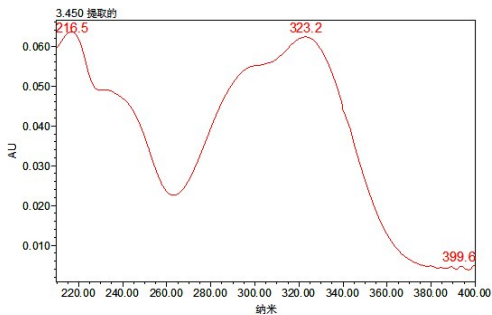


图 4 蒲公英提取物样品中咖啡酸光谱图

Fig 4 caffeic acid spectrum of dandelion extract sample

由光谱图可以看出对照品和样品中咖啡酸的紫外最大吸收波长分别为 324.4、323.2 nm。测试比较 323 与 324 nm 波长的峰面积,323 nm 处咖啡酸峰面积更大些,见表 2。定量检测时选择 323 nm 波长。

表 2 不同波长的峰面积比较

Tab 2 Comparison of pesk area of different wavelengths

取样量/g	峰面积 323 nm	峰面积 324 nm
0.5	588920	587947
0.2	269816	269012
0.1	145007	144395
0.05	76489	75908

2.3.2 咖啡酸标准曲线 在选定的色谱条件下,使用梯度洗脱的方法,可以有效地分离各杂质峰,在 1~100 μg/mL 的范围内标准曲线方程为 $y = 70200x + 38300$, Y 为咖啡酸峰面积, X 为咖啡酸的浓度,其相关系数 R^2 为 0.999,线性良好。见图 5。

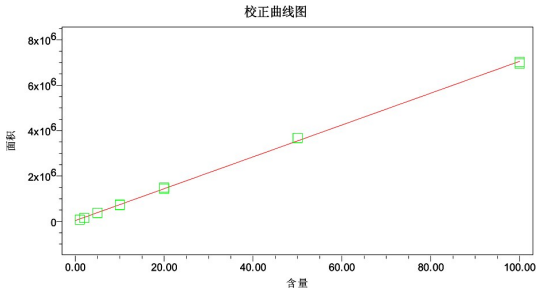


图 5 咖啡酸标准曲线图

Fig 5 Standard curve of caffeic acid

2.3.3 重复性试验 配制 10 ug/mL 咖啡酸对照品溶液,重复 6 份,进样,计算咖啡酸峰面积 RSD 为 0.82%。

2.3.4 精密度试验 取 10 ug/mL 咖啡酸对照品溶液,重复进样 6 次,计算咖啡酸峰面积 RSD 为 0.51%。

2.3.5 稳定性试验 取“2.3.4”项下 10 ug/mL 咖啡酸对照品溶液,在室温放置 3、6、12、24 h;在 4 °C 放置 3、6、12、24 h 后,各进样 5 μL,计算咖啡酸峰面积 RSD 为 0.73%。

2.3.6 检测限和定量限 0.25 ug/mL 咖啡酸对照品溶液信噪比>3 为检出限,1 ug/mL 咖啡酸对照品溶液信噪比>10 为定量限。

2.3.7 取样量及校正方法的选择 称取蒲公英提取物样品约 0.5、0.2、0.1、0.05 g,各 2 个平行,处理后,约为 0.5 g 称样量的上机溶液的峰面积与 10 ug/mL 的对照品溶液的峰面积较为接近,其他的峰面

积按比例减小,最终选取 5 ug/mL 的对照品溶液对约 0.2 g 称样量的上机溶液进行定量计算,平均值为 0.77 mg/g,与按标准曲线含量计算结果 0.785 mg/g 相差 0.015 mg/g,随着取样量的减少,两者计算的偏差越来越大,见表 3,最终选择称取 0.2 g 样品进行处理,并按照相近峰面积浓度的单点计算含量。

表 3 不同校正方法的含量结果比较

Tab 3 comparison of content results of different correction methods

取样量/g	相应单点校正结果 / (mg · g ⁻¹)	标准曲线校正结果 / (mg · g ⁻¹)	偏差/%
0.49203	0.76	0.78	2.60
0.49891	0.69	0.72	4.26
0.20900	0.81	0.82	1.23
0.21422	0.73	0.75	2.70
0.10439	0.83	0.72	14.19
0.10569	0.79	0.68	14.97
0.05211	0.87	0.53	48.57
0.05176	0.80	0.43	60.16

2.3.8 添加回收试验 精密称取蒲公英提取物样品约 0.1 g,置 15 mL 离心管中,加 8 mL 咖啡酸对照品储备液,加 5% 甲酸甲醇溶液 2 mL,同供试品同样处理上机测试。回收率在 94%~101% 的范围内,满足准确度的要求。

表 4 咖啡酸添加回收率结果

Tab 4 Results of recovery for caffeic acid

序号	取样量/mg	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	100.21	0.7716	0.7488	1.4761	94.08	97.02	2.03
2	101.91	0.7847	0.7488	1.5119	97.11		
3	100.11	0.7708	0.7488	1.5013	97.55		
4	101.38	0.7806	0.7488	1.5005	96.14		
5	99.95	0.7696	0.7488	1.5194	100.13		
6	102.51	0.7893	0.7488	1.5167	97.14		

3 讨论与结论

实验选择了超高效液相色谱法对蒲公英提取物中的咖啡酸进行定性和定量测定。与 2015 版中国兽药典^[1]、中国药典^[2]中蒲公英的检测方法和文献报道方法相比^[3-8]，一是鉴别采用了光谱法，省却了薄层色谱法鉴别^[1-2]繁琐的操作，节省了多种如乙酸乙酯、乙酸丁酯等有机溶剂的使用，保护了环境；二是采用了 UPLC，定量的色谱图出峰保留时间提前至 3.5 min 左右，运行时间短 12 min，流速 0.35 mL/min，比文献 HPLC 方法^[1-8]节省了大量的流动相；三是摒弃了甲醇、磷酸盐缓冲液等^[1-8]作为流动相，降低了色谱柱因磷酸盐易堵的风险。

使用超高效液相色谱-PDA 检测器，对蒲公英提取物中的咖啡酸进行定性和定量测定，方法准确度高，灵敏度好，经济可行，绿色环保，并为生产企业下一步调整优化蒲公英提取物的生产工艺提供快速的检测方法。

参考文献：

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二部 2015 年版 [S].
China Veterinary Pharmacopoeia Commission. The second Veterinary Pharmacopoeia of the people's Republic of China, 2015 [S].

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部 2015 年版 [S].
State Pharmacopoeia Commission. The first part of the Pharmacopoeia of the people's Republic of China, 2015 [S].

[3] 褚娜. 蒲公英提取物质量分析方法研究 [D]. 黑龙江中医药

大学, 2015.

Chu Na. Study on the quality analysis method of dandelion extract [D]. Heilongjiang University of traditional Chinese Medicine, 2015.

[4] 贝京, 于光福. 高效液相色谱法测定蒲公英提取物中咖啡酸含量 [J]. 中国野生植物资源, 2010, 29 (03) : 54-56.
Bei J, Yu G F. Determination of caffeic acid in dandelion extract by high performance liquid chromatography [J]. Wild Plant Resources of China, 2010: 29 (03) : 54-56.

[5] 潘见, 梁娟, 谢慧明. 蒲公英提取物的质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2008 (09) : 2064-2065.
Pan S, Liang J, Xie H. Study on the quality standard of dandelion extract [J]. Shi Zhenguo Chinese Medicine, 2008 (09) : 2064-2065.

[6] 宋萍萍, 王凌, 蒋学华. HPLC 测定注射用蒲公英冻干粉针剂中的绿原酸和咖啡酸 [J]. 华西药理学杂志, 2010, 25 (03) : 346-348.
Song P P, Wang L, Jiang X H. Determination of Lv Yuan acid and caffeic acid in dandelion lyophilized powder for injection by hplc [J]. Huaxi Journal of Pharmacy, 2010-25 (03) : 346-348.

[7] 彭德乾. 蒲公英根部化学成分研究 [D]. 齐齐哈尔大学, 2012.
Peng D Q. Studies on the chemical constituents of dandelion root [D]. Qiqihar University, 2012.

[8] 林文艳. 蒲公英化学成分研究及板蓝根 HPLC 指纹图谱研究 [D]. 浙江大学, 2005.
Lin W Y. Studies on the Chemical constituents and hplc fingerprint of Radix Isatidis [D]. Zhejiang University, 2005.

(编辑:陈希)