

苍耳子中绿原酸含量的测定 高效液相色谱法

一、摘要

本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定苍耳子中绿原酸的含量。色谱条件: C_{18} 色谱柱 ($4.6 \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$), 流速为 1.0mL/min , 柱温为 30°C , 进样量为 $5\mu\text{L}$, 检测波长为 327nm 。实验结果: 绿原酸峰的理论塔板数为 9948; 在连续进样 7 针的重复性测试中, 绿原酸保留时间的 RSD 为 0.162%, 峰面积的 RSD 为 0.391%; 绿原酸的仪器检出限为 $0.104\mu\text{g/mL}$, 仪器定量限为 $0.345\mu\text{g/mL}$; 对苍耳子样品进行测定, 苍耳子中绿原酸的含量为 0.54%, 加标回收率为 87.9%。因此, Wooking K2025 高效液相色谱仪可以满足《中国药典 (2020 年版) 一部》中苍耳子中绿原酸含量测定的需求。

二、背景

苍耳子属菊科、苍耳属一年生草本菊科植物苍耳的带总苞的果实, 属于常用中草药, 具有散风、除湿、通窍等功效。

绿原酸是一种有机化合物, 半水合物为针状结晶 (水), 110°C 变为无水化合物, 25°C 水中溶解度为 4%, 热水中溶解度更大, 易溶于乙醇及丙酮, 极微溶于醋酸乙酯。绿原酸具有抗艾滋病毒、抗肿瘤细胞、抗菌、提高中枢兴奋、利胆、抗致畸、抗过敏及调节细胞色素 P450 连接酶的活性等功能。

三、实验过程

1 范围

适用于苍耳子中绿原酸的含量测定。

2 原理

苍耳子中的绿原酸经含 5%甲酸的 50%甲醇溶液超声提取, 在 327nm 处有紫外吸收, 使用高效液相色谱法测定, 外标法定量。

3 试剂与材料

3.1 水: 符合 GB/T 6682 的一级水;

3.2 甲醇: 色谱纯;

3.3 甲酸: 色谱纯;

3.4 5%甲酸的 50%甲醇溶液: 取 500mL 甲醇 (3.2), 加入 50mL 甲酸 (3.3), 用水定容至 1L;

3.5 绿原酸对照品: CAS 号: 520-18-3, 纯度: 99.2%;

3.6 乙腈: 色谱纯;

3.7 磷酸: 色谱纯;

3.8 0.4%磷酸溶液: 精密量取磷酸 (3.7) 4mL, 用水定容至 1L;

3.9 流动相: 乙腈:0.4%磷酸溶液 (3.8) =50:50;

3.10 市售苍耳子饮片样品。

4 仪器与设备

4.1 高效液相色谱仪: K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温

箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站;

4.2 分析天平: 精确到 0.0001g;

4.3 超声波清洗机;

4.4 涡旋振荡器;

4.5 容量瓶: 10mL, 棕色带刻度;

4.6 具塞锥形瓶: 100mL;

4.7 0.22 μ m 微孔滤膜, 有机相。

5 测定步骤

5.1 标准溶液的配制

5.1.1 绿原酸标准储备液: 取绿原酸对照品 (3.5) 适量, 用5%甲酸的50%甲醇溶液 (3.4) 溶解, 配制成绿原酸浓度为1.0mg/mL的标准储备液。

5.1.2 绿原酸标准系列工作液: 分别取绿原酸标准储备液 (5.1.1) 适量, 用5%甲酸的50%甲醇溶液 (3.4) 配制成浓度分别为5.0 μ g/mL、10.0 μ g/mL、20.0 μ g/mL、50.0 μ g/mL、100.0 μ g/mL、200.0 μ g/mL的标准系列工作液。

5.2 供试品溶液的制备

取经粉碎的苍耳子样品粉末约0.5g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶 (4.6) 中, 精密加入5%甲酸的50%甲醇溶液 (3.4) 25mL, 称定重量, 超声处理40分钟, 放冷, 再称定重量, 用5%甲酸的50%甲醇溶液 (3.4) 补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液 (置棕色瓶中), 即得。

5.3 色谱条件

- a) 色谱柱: C_{18} , $4.6 \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$ 或者相当的色谱柱;
- b) 流动相: 详见 3.9;
- c) 流速: 1.0mL/min ;
- d) 进样量: $5\mu\text{L}$;
- e) 柱温: 30°C ;
- f) 检测器及波长: 紫外-可见光检测器, 检测波长为 327nm 。

6 实验结果

6.1 重复性测试

按照上述色谱条件 (5.3) 进行采集, 绿原酸标准溶液 (浓度为 $50\mu\text{g/mL}$) 的色谱图如图 1 所示, 积分结果如表 1 所示。

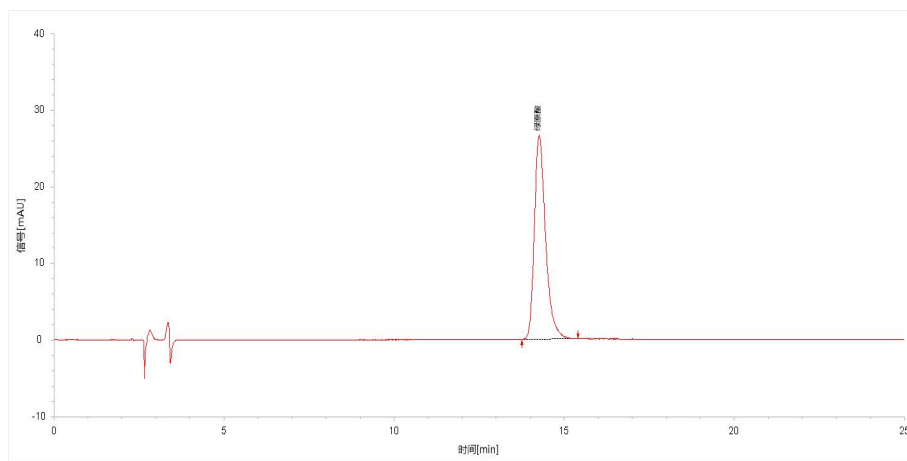


图 1 绿原酸标准溶液的色谱图

表 1 绿原酸标准溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
绿原酸	14.275	607.352	26.663	9948	-	1.39

由表 1 中数据可知，绿原酸峰的理论塔板数为 9948，满足《中国药典（2020 年版）一部》中理论塔板数按绿原酸峰计算应不小于 3000 的要求。

将绿原酸标准溶液连续进样 7 针，叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

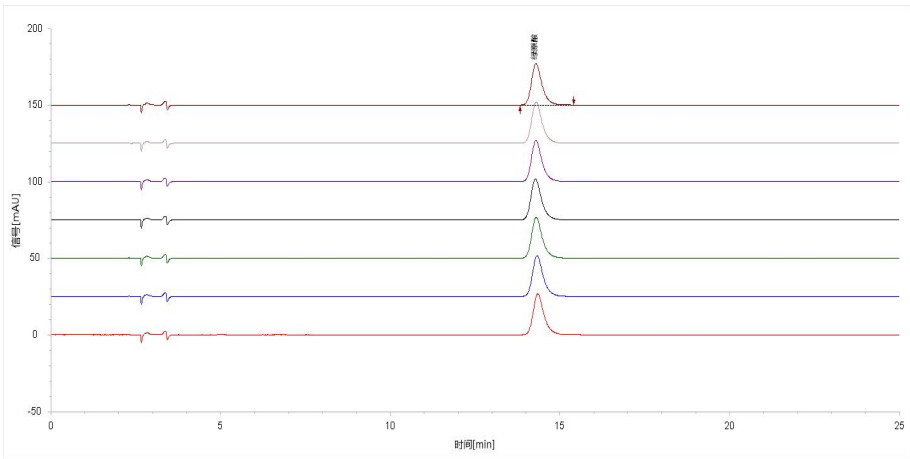


图 2 绿原酸标准溶液叠加的色谱图

表 2 绿原酸标准溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物		1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
绿原酸	保留时间 (min)	14.358	14.333	14.308	14.292	14.300	14.308	14.300	14.314	0.162
	峰面积 (mAU.s)	594.523	593.106	592.660	591.721	588.986	589.070	588.844	591.273	0.391

*本报告仅供委托方进行科研、产品研发之目的使用。
*本报告有关的检测数据、结果不具有向委托方之外的任何主体、社会公众的证明、验证作用。

将绿原酸标准溶液连续进样 7 针进行重复性测试, 绿原酸保留时间的 RSD 为 0.162%, 峰面积的 RSD 为 0.391%, 具有良好的定性定量重复性。

6.2 仪器灵敏度测试

灵敏度测试的色谱图如图 3 所示, 计算结果见表 3。

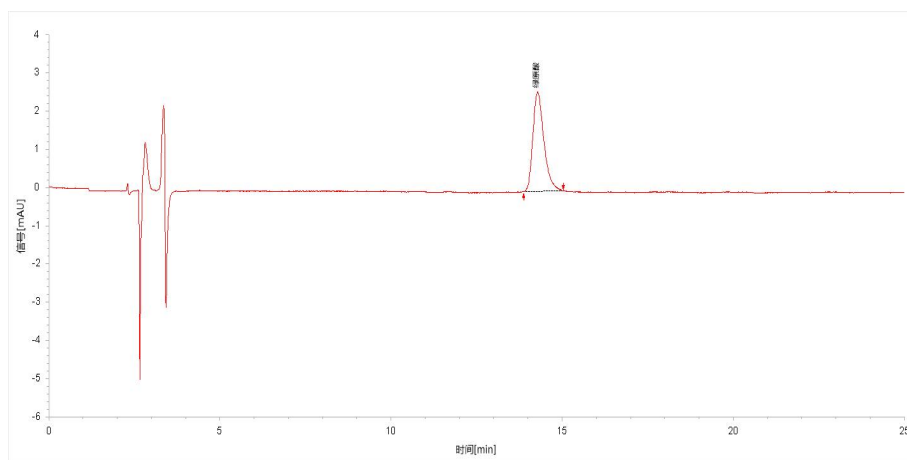


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

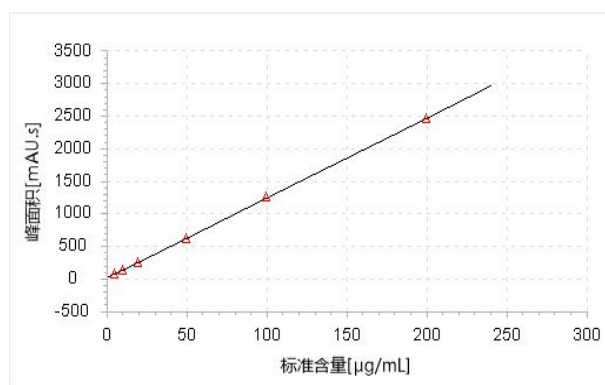
目标物	浓度	峰高	噪声	S/N	LOD	LOQ
	($\mu\text{g/mL}$)	(mAU)	(mAU)		($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
绿原酸	5.0	14.292	0.018	144.7	0.104	0.345

通过计算, 绿原酸的仪器检出限为 $0.104\mu\text{g/mL}$, 仪器定量限为 $0.345\mu\text{g/mL}$ 。

6.3 含量测定

6.3.1 校准曲线

按照上述色谱条件（5.3）进行采集，将绿原酸标准系列工作液（5.1.2）上机测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程和确定系数如图 4 所示。



方程式	$y=12.31021*x-3.29858$
-----	------------------------

相关系数(R)	0.9999
---------	--------

确定系数(R ²)	0.9998
-----------------------	--------

图 4 绿原酸的校准曲线

由图 4 可知，绿原酸在测定浓度范围内呈现良好的线性关系，确定系数 R^2 在 0.999 以上。绿原酸标准系列工作液叠加的色谱图如图 5 所示。

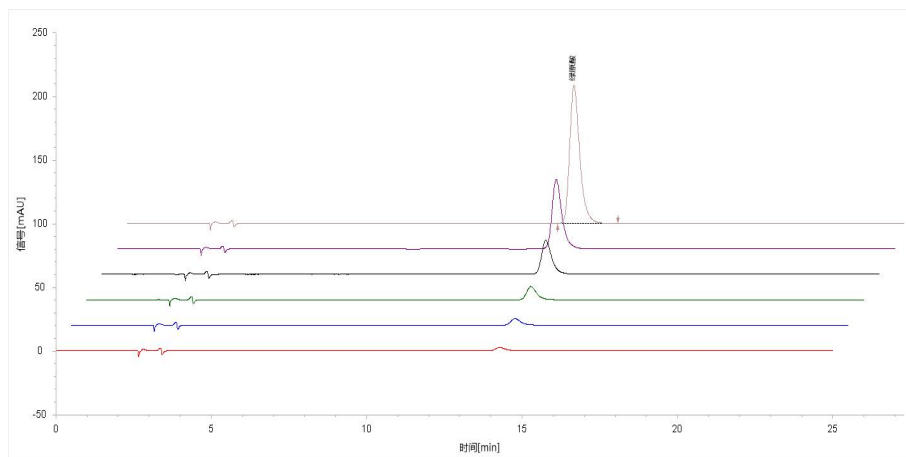


图 5 绿原酸标准工作液叠加色谱图

6.3.2 含量测定

按照步骤 5.2 对市售苍耳子样品进行处理。依据公式（1）进行计算，苍耳子样品及苍耳子样品加标的色谱图如图 6~图 7 所示。

$$\omega = \frac{C \times V}{m \times 10^6} \times 100 \quad \text{----公式（1）}$$

式中： ω ----为苍耳子试样中绿原酸的含量，单位为百分数（%）；

C ----为通过校准曲线得到的试样中绿原酸的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ----为试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

m ----为试样的质量，单位为克（g）；

10^6 和 100----为换算系数。

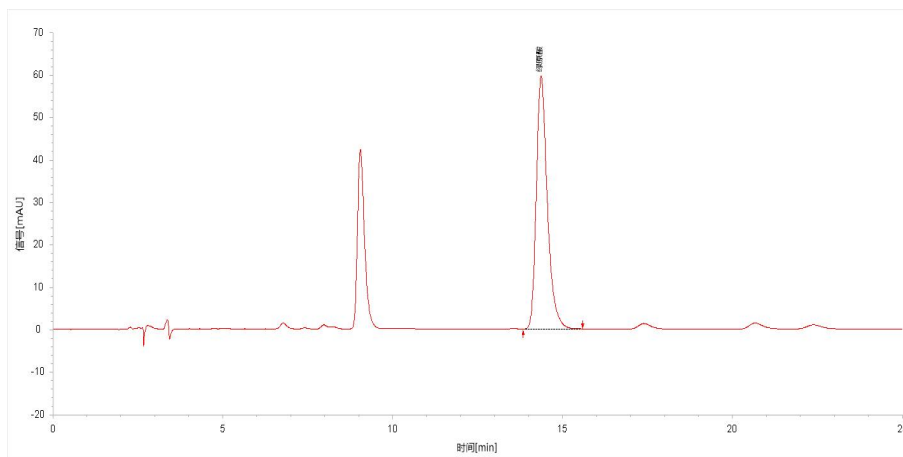


图 6 苍耳子样品的色谱图

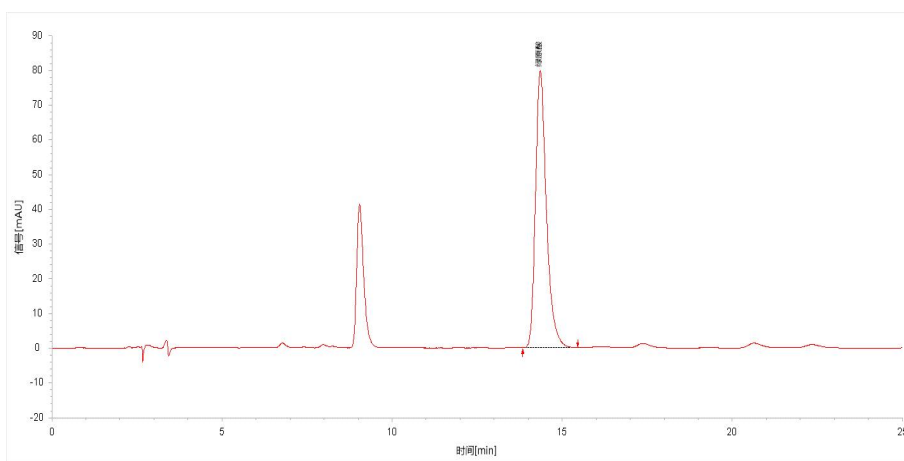


图 7 苍耳子样品加标的色谱图

由公式 (1) 计算苍耳子样品中绿原酸的含量, 该样品中绿原酸的含量为 0.54%, 满足《中国药典 (2020 年版) 一部》中绿原酸含量不得少于 0.25% 的要求, 加标回收率为 87.9%。

四、结论

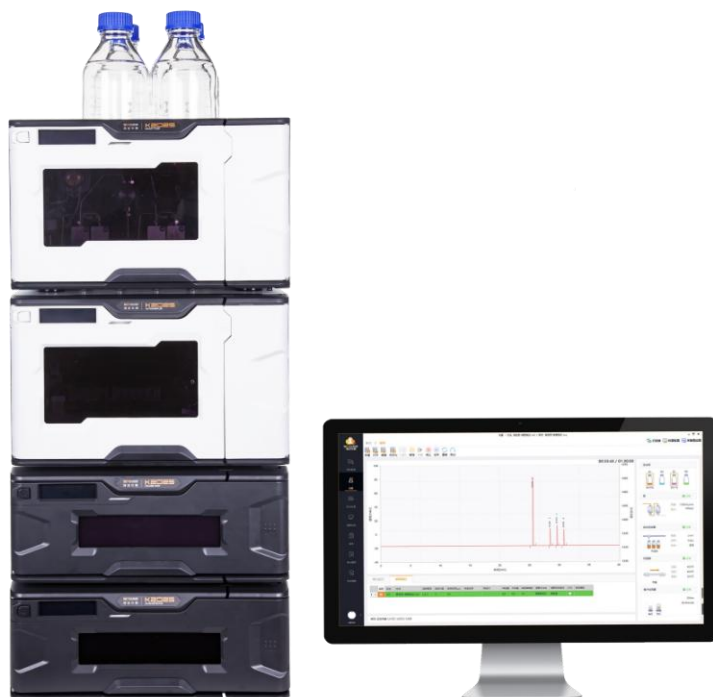
通过对绿原酸的理论塔板数、重复性、灵敏度的测定以及对苍耳子中绿原酸含量进行测定, 实验结果表明: 绿原酸峰的理论塔板数为 9948, 满足《中国药典 (2020 年版) 一部》中理论塔板数按绿原酸峰计算应不小于 3000 的要求; 在重复性测试中, 绿原酸保留时间的 RSD 为 0.162%, 峰面积的 RSD 为 0.391%, 具有良好的定性定量重复性; 绿原酸的仪器检

出限为 $0.104\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 $0.345\mu\text{g/mL}$ ；对苍耳子样品进行测定，该样品中绿原酸的含量为 0.54%，满足《中国药典（2020 年版）一部》中绿原酸含量不得少于 0.25% 的要求，加标回收率为 87.9%。因此，Wooking K2025 高效液相色谱仪可以满足《中国药典（2020 年版）一部》中苍耳子中绿原酸含量测定的需求。

附 1: 仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<u>Pump Unit 泵单元</u>
1	62MPa 二元高压输液泵 (内置溶剂托盘)
2	流动相瓶 (肖特瓶, 1L)
3	脱气机
4	四通道溶剂切换阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector 进样器</u>
1	自动进样器
2	样品瓶 (2mL, 含瓶盖)
3	脱气组件
4	100 μ L 定量环
C)	<u>Column Oven 柱温箱</u>
1	色谱柱恒温箱 (室温以下 10°C 至 85°C)
2	色谱柱: Kromasil 100-5-C ₁₈ 4.6 $\times$ 250mm, 5 μ m
D)	<u>Detector 检测器</u>
1	紫外-可见光检测器
E)	<u>Workstation 工作站</u>
1	Wookinglab (中文版)

附 2: 悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)



报告人: 张帆

联系方式: 15120069384