

HPLC 同时测定苍耳子中 6 个化学成分的含量*

朵睿^{1,2}, 刘玉红¹, 王明奎³, 易进海^{1**}

(1. 四川省中医药科学院 成都 610041; 2. 泸州医学院 泸州 646000; 3. 中国科学院成都生物所 成都 610041)

摘要 目的: 用 HPLC 同时测定苍耳子中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、噻嗪双酮苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸 6 个化学成分的含量。方法: 采用 Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇-0.1% 磷酸为流动相进行梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 35 °C。结果: 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、噻嗪双酮苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸色谱峰分离良好。进样量分别在 0.012~1.2、0.028~2.8、0.012~1.2、0.014~1.4、0.024~2.4、0.011~1.1 μg 范围内线性关系良好。平均回收率($n=6$) 分别为 102.3%、96.4%、99.1%、103.1%、103.0%、103.4%, RSD 分别为 1.8%、1.1%、1.8%、1.5%、2.0%、1.9%。结论: 建立的苍耳子 HPLC 含量测定方法可用于苍耳子的质量控制。
关键词: 中药质量控制; 苍耳子; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 噻嗪双酮苷; 1,5-二咖啡酰奎宁酸; 4,5-二咖啡酰奎宁酸; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文献编号: 0254-1793(2013)01-0078-05

HPLC simultaneous determination of the content of 6 constituents in Fructus Xanthii*

DUO Rui^{1,2}, LIU Yu-hong¹, WANG Ming-kui³, YI Jin-hai^{1**}

(1. Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041, China; 2. Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective: To establish a method for simultaneous determination of 6 constituents (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, xanthoside, 1,5-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-dicaffeoylquinic acid) in Fructus Xanthii. **Methods:** The assay was conducted on a Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with methanol-0.1% H₃PO₄ as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 254 nm and the column temperature was 35 °C. **Results:** The correlation coefficient between concentration and chromatographic peak area of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, xanthoside, 1,5-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-dicaffeoylquinic acid was over 0.9999 in the range of 0.012-1.2, 0.028-2.8, 0.012-1.2, 0.014-1.4, 0.024-2.4, 0.011-1.1 μg, respectively. The average recoveries ($n=6$) of 6 constituents were 102.3%, 96.4%, 99.1%, 103.1%, 103.0%, and 103.4%, respectively; RSDs were 1.8%, 1.1%, 1.8%, 1.5%, 2.0%, and 1.9%, respectively. **Conclusion:** The established method can be used for the quality control of Fructus Xanthii.

Key words: traditional Chinese medicine quality control; Fructus Xanthii; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; xanthoside; 1,5-dicaffeoylquinic acid; 4,5-dicaffeoylquinic acid; HPLC

苍耳子 (Fructus Xanthii) 为菊科植物苍耳 (*Xanthium sibiricum* Patr. et Widd.) 的干燥成熟带种皮的果实, 具有散风除湿、通鼻开窍的功效^[1-2]。其来源广泛, 全国各地均有生长, 我国共有苍耳属植物 4 种 2 变种^[2], 不同生长环境下的

苍耳子质量参差不齐^[3], 故对苍耳子进行质量控制尤为重要。苍耳子所含化学成分复杂, 其中酚酸类、噻嗪双酮及其苷类物质为苍耳子的有效成分, 具抗炎镇痛等作用^[3]。酚酸类成分以及噻嗪双酮苷的含量测定已分别有文献报道, 但这种单

* 国家重点基础研究发展计划(973 计划) 课题(2009CB522804)

** 通讯作者 Tel: (028) 85210843; E-mail: yijinhai@yahoo.com.cn

一类成分指标的质量控制模式,难以全面反映苍耳子的真实质量。本文利用 HPLC 法,在同一条件下同时测定不同产地苍耳子药材及饮片中 5 个酚酸(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸)和噁嗪双酮苷的含量,优化了测定条件,该方法简便可行,为控制苍耳子的质量提供科学方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(包括四元泵, DAD 检测器,柱温箱,自动进样器,工作站); HU10300/40B 超声波清洗仪;岛津 AUW220D 型十万分之一天平;Sigma 3K15 高速冷冻离心机;Millipore Milli-Q Integral 3 超纯水机。

对照品:新绿原酸(批号 MUST-10091501)、隐绿原酸(批号 MUST-10091811)、1,5-二咖啡酰奎宁酸(批号 MUST-10061706)、4,5-二咖啡酰奎宁酸(批号 MUST-11081803)购自成都曼思特生物制品有限公司(纯度均大于 98.0%);绿原酸(批号 0753-200111)购自中国食品药品检定研究院(纯度大于 98.0%);噁嗪双酮苷(自制,HPLC 峰面积归一化法测定纯度为 98.4%),理化性质和光谱数据分析,鉴定其结构。水为纯净水;其余试剂均为分析纯。苍耳子购于四川、辽宁、河北、山东、吉林、湖北、云南等地,由四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为菊科植物苍耳(*Xanthium sibiricum* Patr. et Widd.)的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、噁嗪双酮苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的对照品适量,加 50% 甲醇溶液配制每 1 mL 含新绿原酸 0.0246 mg、绿原酸 0.0560 mg、隐绿原酸 0.0236 mg、噁嗪双酮苷 0.0270 mg、1,5-二咖啡酰奎宁酸 0.0488 mg、4,5-二咖啡酰奎宁酸 0.0222 mg 的混合对照品溶液 I。精密吸取上述混合对照品溶液 1 mL,加 50% 甲醇溶液稀释至 10 mL,摇匀,即得混合对照品溶液 II。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取苍耳子粉末(过 40 目筛)约 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加 50% 甲醇(含 5% 甲酸)溶液 20 mL,超声(功率 300 W 频率 40 kHz)处理 40 min,放冷,用 50% 甲醇(含 5% 甲酸)补重,于 12000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液为供试品溶液。

2.3 色谱条件 采用 Eclipse XDB-C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm) 色谱柱,柱温 35 °C,流动相为甲醇-

0.1% 磷酸 梯度洗脱(0 min,10% 甲醇;5 min,15% 甲醇;12 min,15% 甲醇;15 min,20% 甲醇;20 min,25% 甲醇;25 min,25% 甲醇;30 min,27% 甲醇;32 min,35% 甲醇;60 min,40% 甲醇),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 254 nm。在上述条件下色谱图见图 1。

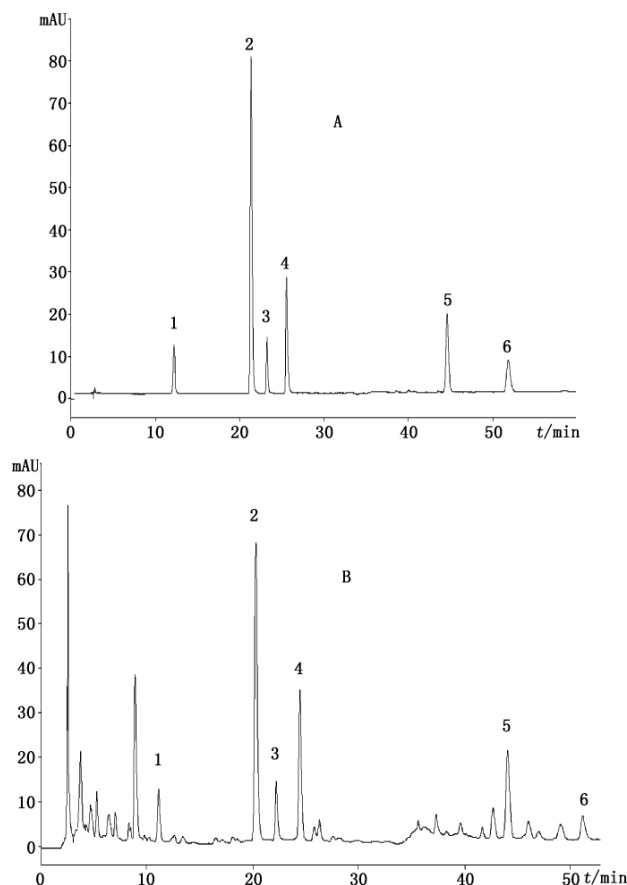


图 1 对照品(A)及 2 号样品(B) 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances(A) and No. 2 sample(B)

- 1. 新绿原酸(neochlorogenic acid) 2. 绿原酸(chlorogenic acid)
- 3. 隐绿原酸(cryptochlorogenic acid) 4. 噁嗪双酮苷(xanthiside)
- 5. 1,5-二咖啡酰奎宁酸(1,5-dicaffeoylquinic acid) 6. 4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-dicaffeoylquinic acid)

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 I 5、10、15、20、50 μL 和混合对照品溶液 II 5、10、15、20 μL,注入液相色谱仪中,按照上述色谱条件测定。分别以进样量 X(μg) 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,计算回归方程,结果见表 1。

2.5 精密度试验 精密吸取 2 号样品的供试品溶液 10 μL,按上述色谱条件连续进样 5 次,记录峰面积。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、噁嗪双酮苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸峰面积的 RSD(n=5) 分别为 0.8%、0.2%、0.3%、0.7%、0.6%、1.1% 表明仪器精密度良好。

表1 线性关系试验结果

Tab 1 Results of linear relation test

成分(component)	线性方程(linear equation)	<i>r</i>	线性范围(linear range) / μg
新绿原酸(neochlorogenic acid)	$Y = 947.2X - 3.19$	0.9999	0.012 - 1.2
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y = 2.701 \times 10^3 X + 8.97$	0.9999	0.028 - 2.8
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	$Y = 944.0X - 1.98$	0.9999	0.012 - 1.2
噻嗪双酮苷(xanthoside)	$Y = 1.886 \times 10^3 X - 6.03$	0.9999	0.014 - 1.4
1,5-二咖啡酰奎宁酸(1,5-dicaffeoylquinic acid)	$Y = 1.015 \times 10^3 X + 4.18$	0.9999	0.024 - 2.4
4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-dicaffeoylquinic acid)	$Y = 1.129 \times 10^3 X - 9.96$	0.9999	0.011 - 1.1

2.6 稳定性试验 精密吸取2号样品的供试品溶液10 μL , 室温下分别于0、2、4、6、12、24 h 进样测定, 新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、噻嗪双酮苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸峰面积的RSD ($n = 6$) 分别为1.8%、0.1%、0.4%、0.6%、0.2%、0.8%, 表明供试品溶液在24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一批苍耳子(2号样品)粉末约1 g, 共5份, 精密称定, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 进样10 μL , 记录峰面积, 计算含量及其RSD。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、噻嗪双酮苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的平均含量 ($n = 5$) 分别为0.069、1.330、0.274、0.607、1.533、0.252 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为1.2%、1.0%、1.2%、0.6%、0.8%、0.8%。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的苍耳子(2号样品)约0.5 g, 共6份, 精密称定, 分别精密加入含新绿原酸0.0375 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、绿原酸0.6800 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、隐绿原酸0.1348 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、噻嗪双酮苷0.3071 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、1,5-二咖啡酰奎宁酸0.7609 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、4,5-二咖啡酰奎宁酸0.1234 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液1 mL, 按照

“2.2”项下方法制备供试溶液, 进样10 μL , 计算回收率。结果新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、噻嗪双酮苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸平均回收率 ($n = 6$) 分别为102.3% (RSD = 1.8%)、96.4% (RSD = 1.1%)、99.1% (RSD = 1.8%)、103.1% (RSD = 1.5%)、103.0% (RSD = 2.0%)、103.4% (RSD = 1.9%)。

2.9 检测限与定量限 在选定的色谱条件下, 当信噪比为3时, 测得新绿原酸、隐绿原酸的检测限为1.2 ng, 绿原酸、噻嗪双酮苷的检测限为0.5 ng, 1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的检测限为1.0 ng; 当信噪比为10时, 测得新绿原酸、隐绿原酸的定量限为4.1 ng, 绿原酸、噻嗪双酮苷的定量限为1.7 ng, 1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的定量限为3.3 ng。

2.10 样品测定结果 取苍耳子粉末约1 g, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.3”项色谱条件测定34批苍耳子中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、噻嗪双酮苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸的含量, 进样量10 μL , 记录峰面积, 采用外标法计算各样品中各成分的含量平均值, 结果见表2。

表2 样品含量测定结果($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n = 2$)

Tab 2 Results of content determination of samples

样品号 (sample No.)	样品来源 (from)	新绿原酸 (neochlorogenic acid)	绿原酸 (chlorogenic acid)	隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	噻嗪双酮苷 (xanthoside)	1,5-二咖啡酰奎宁酸 (1,5-dicaffeoylquinic acid)	4,5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-dicaffeoylquinic acid)
1*	辽宁本溪 (Benxi, Liaoning)	0.197	0.983	0.477	0.559	1.204	0.314
2*	辽宁本溪 (Benxi, Liaoning)	0.069	1.330	0.275	0.607	1.533	0.252
3*	辽宁本溪 (Benxi, Liaoning)	—	1.534	0.077	0.524	1.638	0.116
4*	辽宁本溪 (Benxi, Liaoning)	—	1.483	0.068	0.517	1.594	0.134
5	辽宁沈阳 (Shenyang, Liaoning)	0.021	1.672	0.032	0.591	1.337	0.171

续表 2

样品号 (sample No.)	样品来源 (from)	新绿原酸 (neochlorogenic acid)	绿原酸 (chlorogenic acid)	隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	噻嗪双酮苷 (xanthoside)	1,5-二咖啡酰奎宁酸 (1,5-dicaffeoylquinic acid)	4,5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-dicaffeoylquinic acid)
6	山东枣庄 (Zaozhuang , Shandong)	—	1. 614	0. 199	0. 272	2. 142	0. 289
7*	山东济南 (Jinan , Shandong)	0. 024	1. 234	0. 126	0. 545	2. 507	0. 154
8*	呼伦贝尔 (Hulun Buir)	—	1. 514	0. 108	0. 432	0. 637	0. 082
9	内蒙赤峰 (Chifeng , Inner Mongolia)	0. 013	1. 598	0. 046	0. 626	0. 532	0. 162
10	内蒙包头 (Baotou , Inner Mongolia)	0. 013	1. 390	0. 105	0. 578	2. 449	0. 138
11	河北保定 (Baoding , Hebei)	0. 023	1. 277	0. 077	0. 570	2. 275	0. 171
12	河北安国 (Anguo , Hebei)	—	1. 400	0. 052	0. 533	2. 141	0. 132
11	河北安国 (Anguo , Hebei)	0. 041	1. 178	0. 103	0. 534	2. 597	0. 115
14*	河北石家庄 (Shijiazhuang , Hebei)	0. 029	1. 255	0. 099	0. 313	0. 984	0. 410
15	吉林长春 (Changchun , Jilin)	0. 023	1. 494	0. 112	0. 566	0. 138	0. 160
16*	陕西西安 (Xi'an , Shaanxi)	0. 036	1. 357	0. 079	0. 389	1. 968	0. 162
17*	新疆乌鲁木齐 (Urumqi , Xinjiang)	0. 054	1. 138	0. 112	0. 500	2. 336	0. 148
18*	青海西宁 (Xining , Qinghai)	—	2. 080	0. 035	0. 373	0. 859	0. 221
19	四川成都 (Chengdu , Sichuan)	—	1. 426	0. 090	0. 624	1. 596	0. 147
20	四川成都 (Chengdu , Sichuan)	—	1. 444	0. 083	0. 542	3. 057	0. 120
21	四川成都 (Chengdu , Sichuan)	0. 024	1. 041	0. 098	0. 299	2. 973	0. 123
22	四川成都 (Chengdu , Sichuan)	—	1. 614	0. 199	0. 272	2. 142	0. 131
23*	四川成都 (Chengdu , Sichuan)	—	1. 421	0. 061	0. 484	1. 497	0. 149
24*	湖北十堰 (Shiyan , Hubei)	0. 033	1. 177	0. 081	0. 530	0. 356	0. 197
25*	云南昆明 (Kunming , Yunnan)	—	1. 556	0. 101	0. 533	2. 123	0. 142
26*	甘肃兰州 (Lanzhou , Gansu)	—	1. 421	0. 061	0. 484	1. 497	0. 100
27*	广西玉林 (Yulin , Guangxi)	0. 027	1. 132	0. 193	0. 121	1. 185	0. 491
28	广东广州 (Guangzhou , Guangdong)	0. 016	1. 188	0. 054	0. 408	2. 139	0. 135

续表 2

样品号 (sample No.)	样品来源 (from)	新绿原酸 (neochlorogenic acid)	绿原酸 (chlorogenic acid)	隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	噻嗪双酮苷 (xanthoside)	1,5-二咖啡酰奎宁酸 (1,5-dicaffeoylquinic acid)	4,5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-dicaffeoylquinic acid)
29	广东汕头 (Shantou , Guangdong)	0.019	1.054	0.029	0.197	0.373	0.390
30*	江西九江 (Jiujiang , Jiangxi)	0.065	1.573	0.177	0.351	0.493	0.360
31*	江苏苏州 (Suzhou , Jiangsu)	0.016	1.301	0.039	0.498	2.162	0.121
32*	浙江宁波 (Ningbo , Zhejiang)	0.025	1.342	0.149	0.383	1.574	0.151
33*	上海 (Shanghai)	0.173	0.717	0.359	0.461	0.210	0.351
34	安徽亳州 (Bozhou , Anhui)	0.018	1.331	0.079	0.372	0.354	0.148

注(note): “—”未检出(not detected); * 饮片(processed products)

3 讨论

3.1 色谱条件的优化 在文献^[3-4]基础上进一步优化色谱条件 缩短分析时间 待测成分达到基线分离, 最终确定了本文所述的流动相。文献^[3-5]分别采用 254 nm、327 nm 作为噻嗪双酮苷与酚酸类物质的检测波长 本文采用 DAD 检测器考察 结果显示在 254 nm 处新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、噻嗪双酮苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸 6 个成分均有较大响应值 故选择 254 nm 作为检测波长。

3.2 样品提取方法考察 参考文献^[5-7], 本实验用水、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇、50% 甲醇(含 5% 甲酸)、70% 甲醇(含 5% 甲酸) 作为提取溶剂, 结果表明以 50% 甲醇(含 5% 甲酸) 溶液提取效率为佳, 峰形较好。此外, 还考察了超声与加热回流 2 种提取方法, 结果表明二者提取效果无明显差异。故本实验采用 50% 甲醇(含 5% 甲酸) 超声提取。提取溶剂用量和超声处理时间依据文献^[5]确定。

3.3 结论 本文测定结果显示 北方产苍耳子(1~18) 与南方产苍耳子(19~34) 中各成分含量无明显差异 表明苍耳子化学成分含量与产地无相关性, 同文献报道^[3]一致。根据测定结果还可以看出 绿原酸和 1,5-二咖啡酰奎宁酸为苍耳子的主要成分, 其中 1,5-二咖啡酰奎宁酸的含量差异较大, 含量最高者为 3.057 mg · g⁻¹, 最低者为 0.138 mg · g⁻¹, 二者相差约 22 倍。各批次苍耳子中 1,5-二咖啡酰奎宁酸含量平均值为 1.587 mg · g⁻¹, RSD 达到 85.0%。此外, 苍耳子炮制品中新绿原酸和隐绿原酸含量比生品高 与

文献报道^[6]一致。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 115
- 2 HUANG Li - juan(黄丽娟), GAO Ying - ying(高莹莹), XU Duan - lian(许锻炼), et al. The effective mite - killing portion of Fructus Xanthii(苍耳子体外抑杀眼部蠕形螨的有效部位研究). *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2010, 30(11): 2048
- 3 QIU Yu - ling(邱玉玲), DAI Ying - hui(代英辉), WANG Dong(王东), et al. Determination of content of xanthoside from fruit of *Xanthium sibiricum* by HPLC(HPLC 法测定苍耳子中苍耳子噻嗪双酮苷的含量). *J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报)*, 2010, 4(4): 306
- 4 HAN Ting(韩婷), LI Hui - liang(李慧梁), HU Yuan(胡园), et al. Phenolic acids in Fructus Xanthii and detmerination of contents of total phenolic acids in dieffrent species and different populations of Xanthium in China(苍耳子中酚酸类化合物及不同品种和居群苍耳子中总酚酸含量的测定). *China Integr Med(中西医结合学报)*, 2006, 4(2): 194
- 5 SU Zhi - jun(苏芝军). Study on the quanlity control of traditional Chinese medieine Fructus Xanthii(中药苍耳子的质量评价研究): [Thesis(学位论文)]. Guangzhou(广州): Guangzhou University of Chinese Medicine(广州中医药大学), 2010
- 6 MING Qian - liang(明乾良), GAO Xiang(高翔), ZHANG Hong(张宏), et al. Determination of chlorogenic acid in three species of cocklebur fruits from different regions of China by HPLC method(用 HPLC 法测定不同地区三种苍耳子中绿原酸的含量). *Pharm Care Res(药学服务与研究)*, 2008, 8(4): 258
- 7 YUAN Ke - hua(苑克花), GUO Ji - zhao(郭吉兆), XIE Fu - wei(谢复伟), et al. Gradient pyrolysis of chlorogenic acid(绿原酸的梯度热裂解分析). *Tobacco Chem(烟草化学)*, 2011, 5: 34

(本文于 2012 年 11 月 12 日修改回)