

UPLC 同时测定维药毛菊苣和菊苣中 5 种化学成分的含量

胡君萍¹, 迪丽拜尔·马木提¹, 李渊¹, 柳惠斌², 杨建华^{3*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学附属肿瘤医院, 乌鲁木齐 830011;
3. 新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的: 建立同时测定维药毛菊苣和菊苣中 5 种化学成分含量的 UPLC 分析方法。方法: 采用 UPLC, Hypersil BDS C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.4% 磷酸溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。结果: 秦皮甲素、秦皮乙素、山莴苣素、菊苣酸、山莴苣苦素分别在 0.025 ~ 0.225, 0.01 ~ 0.05, 0.2 ~ 1.0, 0.1 ~ 0.5, 0.24 ~ 1.20 μg 线性关系良好, 相关系数分别为 0.999 3, 0.999 9, 0.999 8, 0.999 9, 0.999 9, 平均加样回收率分别为 99.37%, 98.66%, 99.63%, 100.05%, 99.97%。结论: 《中国药典》记载两种菊苣的各成分含量差异很大, 毛菊苣以山莴苣苦素、山莴苣素和秦皮乙素含量较高, 菊苣以菊苣酸含量高, 药材的质量控制和评价值得进一步研究。

[关键词] 毛菊苣; 菊苣; 秦皮甲素; 秦皮乙素; 山莴苣素; 菊苣酸; 山莴苣苦素

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)17-0065-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170065

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1333.009.html>

[网络出版时间] 2014-07-15 13:33

Simultaneous Determination of Five Components in Uyghur Drug *Cichorium glandulosum* and *C. intybus* by UPLC

HU Jun-ping¹, Dilibar Mamuti¹, LI Yuan¹, LIU Hui-bin², YANG Jian-hua^{3*}

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;
2. Affiliated Tumor Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;
3. First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** This study was conduct to establish an UPLC method for the simultaneous determination of five components aesculin, esculetin, lactucin, cichoric acid and lactucopicrin in Uyghur drug *Cichorium glandulosum* and *C. intybus*. **Method:** Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used as the stationary phase. The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.4% phosphoric acid aqueous with a gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Column temperature was 30 °C. The detection wavelength was 254 nm. **Result:** All calibration curves showed good linear regression ($r > 0.999 3$) within test ranges. The validation data indicated excellent precision and good recovery. **Conclusion:** The method was successfully applied to quantify five components in *C. glandulosum* and *C. intybus*, which could be used as comprehensive quality evaluation of Cichorium.

[Key words] *Cichorium glandulosum*; *C. intybus*; aesculin; esculetin; lactucin; cichoric acid; lactucopicrin

[收稿日期] 20131113(016)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960526)

[第一作者] 胡君萍, 博士, 教授, 从事新疆特色药用资源的开发与利用研究, E-mail: hjp-yft@163.com

[通讯作者] * 杨建华, 博士, 从事中药新药研究与开发, E-mail: yjh-yft@163.com

菊苣为维吾尔族和蒙古族的习用药材,来源于菊科植物毛菊苣或菊苣的干燥地上部分或根。《中国药典》记载,菊苣“微苦、咸、凉”,具有清肝利胆、健胃消食、利尿消肿之功效,用于湿热黄疸、胃痛食少、水肿尿少、肝炎、肾炎、肠炎、气管炎等疾病的治疗^[1]。国外学者对菊苣化学成分研究较多,因其含有一般蔬菜中没有的苦味物质,具有清肝利胆的功效;毛菊苣主要分布于新疆南疆地区,维吾尔语称“卡森”,其地上部分、根和种子均可入药,《中华人民共和国卫生部药品质量标准(维吾尔药分册)》中记载的许多成方制剂,如肝胆口服液、卡森颗粒、护肝布祖热颗粒、龙葵果蒸露、炎消迪娜尔糖浆等多以毛菊苣为主药^[2]。毛菊苣的主要化学成分包括倍半萜、香豆素及黄酮等^[3-4],维吾尔医学将毛菊苣作为抗肝炎制剂的主要原料,课题组前期探讨了毛菊苣不同药用部位和不同极性提取物对四氯化碳致小鼠肝损伤的

保护作用^[5]。菊苣中香豆素类化合物秦皮乙素已发现具有肝保护作用^[6],倍半萜内酯成分也显示出明显的保肝作用^[7],为阐明《中国药典》收载两种菊苣化学成分的差异,探讨菊苣肝保护作用的物质基础,本文建立了 UPLC 同时测定菊苣中秦皮甲素、秦皮乙素、山萸苣素、菊苣酸、山萸苣苦素等 5 种化学成分的含量,为控制菊苣药材质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器 ACQUITY 型 UPLC, ACQUITY 型 PDA (美国 Waters), S-114 型电子天平(丹佛仪器有限公司), UB-7 型 pH 计(丹佛仪器有限公司)。

1.2 试药 药材均购自新疆乌鲁木齐市医院、药店及药材公司,由新疆医科大学药学院胡君萍鉴定为毛菊苣 *Cichorium glandulosum* 和菊苣 *C. intybus* 的干燥根,见表 1,凭证标本保存于新疆医科大学生药理学标本室。

表 1 药材来源

药材编号	品种	来源	药材编号	品种	来源
12001	<i>Cichorium glandulosum</i>	维吾尔医院	12006	<i>C. intybus</i>	维吾尔医院
12002	<i>C. glandulosum</i>	阿不力克木药店	12007	<i>C. intybus</i>	市药材公司
12003	<i>C. glandulosum</i>	康爱多药店	12008	<i>C. intybus</i>	中医院
12004	<i>C. glandulosum</i>	阿米提药店	12009	<i>C. intybus</i>	肿瘤医院
12005	<i>C. glandulosum</i>	维吾尔医药店	12010	<i>C. intybus</i>	益康药店

对照品:山萸苣素、山萸苣苦素(自制,从毛菊苣根中分离制备得到,经¹H-NMR 和¹³C-NMR 确定结构,采用 HPLC 面积归一化法测定其纯度 > 98%),秦皮甲素、秦皮乙素购自上海同田生物技术有限公司(批号 09040722, 09040724),菊苣酸购自中国食品药品检定研究院(批号 09080321)。

乙腈为色谱纯试剂(美国 Fisher 公司),磷酸、甲醇为分析纯试剂,水为高纯水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品秦皮甲素 0.5 mg、秦皮乙素 1.0 mg、山萸苣素 1.0 mg、菊苣酸 0.5 mg、山萸苣苦素 1.2 mg,加甲醇分别制成质量浓度为 0.05, 0.01, 0.2, 0.1, 0.24 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.2 供试品溶液的制备 分别取毛菊苣和菊苣样品,粉碎,过 60 目筛,各精密称取 5 g,加甲醇 50 mL 热回流提取 0.5 h,放置冷却后过滤,并用 20 mL 甲醇冲洗残渣,合并提取液,减压浓缩干燥,浸膏用甲醇溶解,定容到 10 mL,待用。

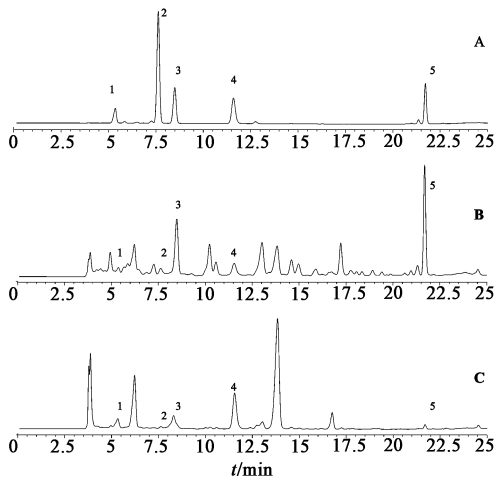
2.3 色谱条件 Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.4% 磷酸溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 16% A; 10 ~ 16 min, 16% ~ 25% A; 16 ~ 25 min, 25% ~ 80% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。

2.4 系统适应性试验考察 在上述色谱条件下,秦皮甲素、秦皮乙素、山萸苣素、菊苣酸和山萸苣苦素的保留时间分别为 5.476, 7.519, 8.480, 11.525, 21.540 min;理论塔板数按秦皮甲素峰计算 > 3 000,供试品中各色谱峰与相邻峰分离度 > 1.5。见图 1。

2.5 线性关系考察 精密吸取秦皮甲素对照品储备液 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 mL,秦皮乙素对照品储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,山萸苣素对照品储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,菊苣酸对照品储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,山萸苣苦素对照品储备液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,按 2.3 项色谱条件操作,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,分别得回归方程。结果见表 2。

表2 5种化学成分标准曲线

成分	回归方程	<i>r</i>	范围/ μg	LOD/ng	LOQ/ng
秦皮甲素	$Y = 9.18 \times 10^5 X + 2.80 \times 10^4$	0.999 6	0.025 ~ 0.23	10.80	36.00
秦皮乙素	$Y = 6.73 \times 10^6 X - 68.7$	0.999 9	0.01 ~ 0.05	0.99	3.32
山茛苣素	$Y = 1.94 \times 10^6 X + 1.60 \times 10^4$	0.999 9	0.2 ~ 1.00	2.79	9.36
菊苣酸	$Y = 2.22 \times 10^6 X + 2.40 \times 10^3$	0.999 9	0.1 ~ 0.50	0.69	2.34
山茛苣苦素	$Y = 1.34 \times 10^6 X - 5.60 \times 10^3$	0.999 9	0.24 ~ 1.20	0.33	1.17



1. 秦皮甲素;2. 秦皮乙素;3. 山茛苣素;4. 菊苣酸;
5. 山茛苣苦素;A. 混合对照品;B. 毛茛苣;C. 菊苣

图1 毛茛苣和菊苣 UPLC

2.6 检测限和定量限 通过稀释对照品溶液,进样测定,确定检测限和定量限,检测限信噪比为 3:1,定量限信噪比为 10:1,结果见表 2。

2.7 精密度试验 精密吸取秦皮甲素、秦皮乙素、山茛苣素、菊苣酸、山茛苣苦素混合对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,记录峰面积,其峰面积的 RSD 分别为 1.08%,1.02%,1.03%,0.86%,1.70%,结果表明该方法精密度良好。

2.8 重复性试验 精密称取同一批的毛茛苣(12001)供试品 6 份,按 2.2 项方法制备并测定,求得秦皮甲素、秦皮乙素、山茛苣素、菊苣酸、山茛苣苦素含量的 RSD 分别为 1.90%,0.71%,1.23%,0.95%,1.61%,表明该法重复性较好。

2.9 稳定性试验 精密吸取秦皮甲素、秦皮乙素、山茛苣素、菊苣酸、山茛苣苦素混合对照品溶液 10 μL ,分别于 0,2,4,8,12 h,进样测定,记录峰面积,其 RSD 1.56%,1.28%,1.17%,1.10%,1.42%,表明对照品的甲醇溶液在 12 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验 精密称取同一批已知含量的毛茛苣(12001)药材 9 份,分别加入高、中、低相应量的对照品,按供试品溶液制备方法操作,秦皮甲

素、秦皮乙素、山茛苣素、菊苣酸、山茛苣苦素的平均回收率分别为 98.17%,101.12%,99.84%,100.47%,99.91%。结果见表 3。

表3 毛茛苣中5种成分的加样回收率($n=3$)

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
秦皮甲素	2.501	2.689	2.0	4.629	96.99	2.34
	2.501	2.689	2.5	5.118	97.16	1.68
	2.500	2.688	3.0	5.699	100.37	2.31
秦皮乙素	2.501	1.564	1.2	2.783	101.61	2.64
	2.501	1.564	1.5	3.101	102.46	2.05
	2.500	1.563	1.8	3.350	99.28	1.63
山茛苣素	2.501	36.370	28.0	64.293	99.73	1.69
	2.501	36.366	35.0	71.390	100.07	1.62
	2.500	36.354	42.0	78.238	99.72	1.54
菊苣酸	2.501	77.093	60.0	137.995	101.50	1.34
	2.501	77.084	75.0	151.236	98.87	1.37
	2.500	77.059	90.0	167.983	101.03	1.02
山茛苣苦素	2.501	83.597	64.0	147.926	100.52	1.23
	2.501	83.587	80.0	163.994	100.51	1.69
	2.500	83.560	96.0	178.320	98.71	1.77

2.11 样品测定 分别取毛茛苣和菊苣样品制备供试品溶液,取供试品 10 μL 进样,代入标准曲线,外标法计算得秦皮甲素、秦皮乙素、山茛苣素、菊苣酸、山茛苣苦素的含量,见表 4。测定结果显示,两种药材均含有上述 5 种化学成分,但含量差异大,毛茛苣药材中山茛苣苦素、山茛苣素、秦皮乙素的含量比菊苣高,菊苣药材中菊苣酸含量高,两种药材中秦皮甲素含量相当。

3 讨论

探讨了乙腈-0.4%磷酸,乙腈-0.4%甲酸,甲醇-0.1%磷酸,甲醇-0.2%甲酸等流动相对上述 5 种成分分离效果,确定乙腈-0.4%磷酸梯度洗脱分离效果好且峰形较佳。对柱温的考察结果显示,30 $^{\circ}\text{C}$ 时色谱的分离度优于 20 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$,故柱温设

表 4 毛菊苣和菊苣样品中各成分 ($n=3$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	秦皮甲素	秦皮乙素	山萹苣素	菊苣酸	山萹苣苦素
12001	1.075	0.625 2	14.540	30.82	33.42
12002	0.978	0.591 9	7.407	24.44	37.58
12003	1.123	0.468 2	7.853	22.98	18.94
12004	0.880	0.548 4	7.702	23.75	32.69
12005	1.018	0.427 6	7.588	22.99	26.78
12006	1.883	0.053 9	3.207	167.67	2.62
12007	0.955	0.031 1	3.662	96.36	5.33
12008	1.259	0.059 3	3.778	87.23	5.08
12009	1.102	0.071 3	3.738	34.97	3.77
12010	1.492	0.051 9	3.727	63.72	2.38

定在 30 ℃。山萹苣素、山萹苣苦素的_{最大吸收波长}为 267 nm,秦皮甲素和秦皮乙素_{最大吸收波长}为 349 nm,菊苣酸_{最大吸收波长}为 335 nm,通过二极管阵列检测器考察上述 5 种化学成分均于 254 nm 有吸收,为保证所有成分能同时测定,故选择 254 nm 为检测波长。

2010 年版《中国药典》_{记载的两种菊苣药材}均有 HPLC 含量测定研究,罗嫻等^[8]采用 HPLC 法测定菊苣地上部分和根中秦皮甲素、秦皮乙素、山萹苣苦素和羽扇豆醇含量;再娜布·吐合达洪^[9]采用 HPLC 法测定毛菊苣根、茎、种子中绿原酸、秦皮乙素、山萹苣素和山萹苣苦素等成分的含量。但对两种菊苣药材有效成分含量比较研究尚未见报道,本文采用 UPLC 法同时测定了毛菊苣和菊苣中秦皮甲素、秦皮乙素、山萹苣素、菊苣酸和山萹苣苦素的含量,经含量比较发现:毛菊苣以山萹苣苦素、山萹苣素和秦皮乙素含量较高,菊苣以菊苣酸含量高,鉴于两种药材化学成分差异大,因此控制菊苣药材质量意义重大。作为《中国药典》_{记载的菊苣药材},二者

的化学成分及药理作用差异值得深入研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:291.
[2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品质量标准(维吾尔药分册)[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999.
[3] Yang W Z, Wang H, Shang J, et al. Chemical constituents from *Cichorium glandulosum* [J]. Chin J Nat Med, 2009, 7(3):193.
[4] Wu H, Su Z, Yang Y, et al. Isolation of three sesquiterpene lactones from the roots of *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr A, 2007, 1176(1/2):217.
[5] 杨建华,李渊,闫冬,等. 维药毛菊苣对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药,2012,23(10):2383.
[6] Atmaca M, Bilgin H M, Obay B D, et al. The hepatoprotective effect of coumarin and coumarin derivates on carbon tetrachloride-induced hepatic injury by antioxidative activities in rats [J]. J Physiol Biochem, 2011, 67:569.
[7] Ahmed B, Khan S, Masood M H, et al. Anti-hepatotoxic activity of cichotyboside, a sesquiterpene glycoside from the seeds of *Cichorium intybus* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(3/4):223.
[8] 罗嫻,刘晟,方鲁延,等. HPLC 测定菊苣药材中的有效成分[J]. 华西药学杂志,2007,22(6):671.
[9] 再娜布·吐合达洪,仲婕,信学雷,等. 毛菊苣药材不同部位主要活性成分含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(8):1018.

[责任编辑 顾雪竹]