

# HPLC 测定不同产地牛蒡草中绿原酸含量

李艳丽,许亮,杨燕云,康廷国\*

(辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的:建立测定牛蒡草主要活性成分绿原酸含量的方法,并比较不同产地牛蒡草绿原酸的含量差异,为牛蒡草质量控制提供依据。方法:采用 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),以乙腈-0.4% 磷酸水溶液(8:92)为流动相,检测波长 327 nm,体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 10 μL,外标法定量。结果:绿原酸得到良好分离,在 0.041 8~4.18 μg 与峰面积积分值呈良好的线性关系,平均加样回收率为 100.3%。结论:该方法简便、准确、分离度良好,为牛蒡草的质量控制提供了依据。

**[关键词]** 牛蒡草; 绿原酸; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0117-03

## Determination of Chlorogenic Acid in *Arctium lappa* by HPLC

LI Yan-li, XU Liang, YANG Yan-yun, KANG Ting-guo\*

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC method to determine the content of chlorogenic acid in *Arctium lappa*, and to compare the content in *A. lappa* which from different regions. **Method:** HPLC was performed on an Agilent C<sub>18</sub> analytical column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) at 30 °C with acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution as the mobile phase; the detection wavelength was 372 nm and the flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. **Result:** Chlorogenic acid was separated perfectly, and its linearity was good in ranges of 0.041 8-4.18 μg. The average recovery was 100.3%. **Conclusion:** The validated method is simple, accurate, and had a good resolution. It can be able to provide the basis for the quality control of *A. lappa*.

**[Key words]** *Arctium lappa*; chlorogenic acid; HPLC

牛蒡草为两年生菊科草本植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的全草,在我国分布广泛,主要用于头风痛、烦闷、金疮、乳痈、皮肤风痒等<sup>[1]</sup>。牛蒡叶中含槲皮素、槲皮苷、咖啡酸、木犀草素、绿原酸、水杨酸、对香豆酸、芦丁等<sup>[2]</sup>;还含有三萜类化合物 3α-hydroxy-lanosta-5, 15-diene and 3α-acetoxy-hop-22

(29)-ene<sup>[3]</sup>及微量的木脂素<sup>[4]</sup>和黄酮苷<sup>[5]</sup>等。绿原酸是其主要成分,也是其抗氧化、抗菌<sup>[6-7]</sup>等生物活性的主要有效成分。自 1963 年起牛蒡草就收载于《中国药典》,作为阳和解凝膏中的君药<sup>[8]</sup>,但现今对牛蒡的利用集中于果实及其根部,造成地上部分大量的浪费,因此很有必要建立牛蒡草(地上部分)的质量标准。作者欲建立了测定牛蒡草(地上部分)主要成分绿原酸含量的 HPLC,并对采集自 30 个产地的牛蒡草进行测定,为牛蒡草的质量控制提供参考。

### 1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪, VWD 紫外检测器, Agilent Chem station 化学工作站; CP225D 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius), JD60-4 型 1/万电子分析天平(沈阳龙腾电子有限公司), KQ3200B 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

**[收稿日期]** 20111227(011)

**[基金项目]** 辽宁省科技厅博士科研启动基金项目(20111133);辽宁中医药大学青年药学人才基金项目(YXRC0920)

**[第一作者]** 李艳丽,硕士研究生在读,从事中药鉴定及品质评价方面的研究, Tel:13889241186

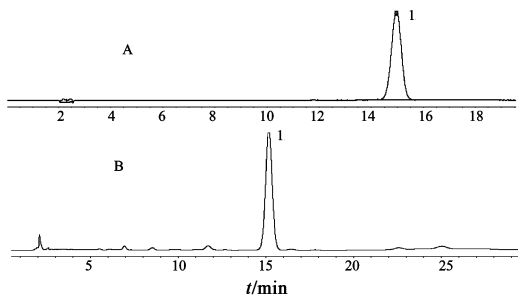
**[通讯作者]** \* 康廷国,教授,博士研究生导师,从事中药鉴定与品种评价研究, Tel:0411-87586028, E-mail: xul@lnutcm.edu.cn

牛蒡草药材采自不同产地,经辽宁中医药大学康廷国教授、王冰教授鉴定为菊科植物牛蒡的干燥茎叶。

绿原酸对照品购自中国食品药品检定研究院(批号 110753-200413),乙腈、磷酸为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.4% 磷酸水溶液(8:92),检测波长 327 nm,体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 10 μL。在此条件下,对照品和样品的色谱图 1;理论塔板数不低于 6 000。



1. 绿原酸

图 1 对照品(A)与样品(B)色谱

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取干燥至恒重的绿原酸对照品,用 70% 的甲醇配制质量浓度为 0.076 8 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取本品粉末 0.25 g(过 60 目筛),置于具塞锥形瓶中,精密加入 70% 的甲醇溶液 25 mL,超声处理 25 min,滤过,滤液用 70% 的甲醇溶液定容至 25 mL,摇匀,过微孔滤膜(0.45 μm)即得。

**2.4 线性关系的考察** 精密吸取绿原酸对照品溶液(0.418 g·L<sup>-1</sup>) 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 mL,定容至 10 mL,得到一系列质量浓度的对照品溶液,各吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪,记录峰面积值。以绿原酸的质量浓度为横坐标,峰面积值为纵坐标,绘制标准曲线。得到回归方程  $Y = 3\ 141.2X - 5.345\ 7$  ( $r = 0.999\ 8$ ),结果表明绿原酸在 0.041 8 ~ 4.18 μg 与峰面积值呈良好的线性关系。

**2.5 精密度试验** 供试品溶液按上述色谱条件测定,连续进样 6 次,每次 10 μL,记录峰面积值。结果峰面积的 RSD 1.05% ( $n = 6$ ),表明本仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 精密吸取同一供试品溶液

10 μL,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 测得峰面积,以考察样品溶液在检测过程中待测成分的稳定性。结果 RSD 1.45%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

**2.7 重复性试验** 精密称取同一样品 6 份,按供试品溶液的制备方法制备,按上述色谱条件和方法进行测定,记录峰面积值,计算绿原酸含量。绿原酸平均含量为 7.13 mg·g<sup>-1</sup>,RSD 1.86%,表明本法重复性良好。

**2.8 加样回收试验** 精密称取已知含量为 7.57 mg·g<sup>-1</sup> 的样品(产地为恒仁)0.1 g,共 6 份,精密加入质量浓度为 0.076 8 g·L<sup>-1</sup> 的绿原酸对照品 10 mL,再加入 15 mL 50% 甲醇溶液,按供试品制备方法制备得到样品溶液,测得含量并计算回收率。结果平均加样回收率为 100.3%,RSD 2.39%。结果见表 1。

表 1 绿原酸加样回收试验

No.	取样量 /g	样品含量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.108 8	0.823 6	1.560 7	96.0	100.3	2.39
2	0.115 2	0.872 1	1.663 4	103.0		
3	0.098 9	0.748 6	1.530 9	101.9		
4	0.103 4	0.782 7	1.557 0	100.8		
5	0.105 2	0.796 4	1.564 0	100.0		
6	0.101 7	0.769 9	1.538 9	100.1		

注:对照品加入量均为 0.768 mg。

**2.9 不同产地样品中绿原酸的含量测定** 取不同产地的牛蒡草药材,按 2.3 项下方法制得供试品溶液,分别精密吸取 10 μL,测定,用外标法计算绿原酸的含量,结果见表 2。

## 3 讨论

**3.1 色谱条件的优化** 比较了不同比例(13:87, 10:90, 8:92)的乙腈-0.4% 磷酸水溶液<sup>[9]</sup>,最后以乙腈-0.4% 磷酸水(8:92)的分离效果最佳,确定为流动相。

**3.2 供试品溶液的制备方法选择** 考察了不同提取方法回流提取、超声提取各 0.5 h,结果回流较超声提取的绿原酸含量稍高,但相差甚微,考虑到超声方法的简便性,最后确定用超声提取。还比较了不同提取溶剂,30%, 50%, 70%, 100% 的甲醇溶液及不同提取时间 15, 25, 35, 40 min,最后确定以 70% 的甲醇溶液提取 25 min 即可完全。

表2 不同产地牛蒡草原酸的含量( $n=4$ )

No.	产地	绿原酸含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD/%
1	辽宁省本溪县	6.65	2.76
2	辽宁省抚顺市清源县	5.30	2.13
3	辽宁省大连市双D港	9.86	2.00
4	辽宁省大连市大黑山	1.70	2.92
5	辽宁省北镇	3.19	2.70
6	辽宁省抚顺市新宾县	6.39	2.70
7	辽宁省宽甸县	4.73	1.00
8	辽宁省凤城市	3.27	2.60
9	辽宁省铁岭市	3.15	2.24
10	辽宁省桓仁县	7.57	0.09
11	辽宁省岫岩县	4.74	1.05
12	甘肃省天水市	2.25	0.72
13	甘肃省宕昌县	2.84	2.74
14	甘肃省会川镇	8.79	2.57
15	江苏省徐州市金陵	9.36	0.76
16	陕西省太白县	1.87	3.00
17	陕西省陇南市武都区	2.19	2.91
18	陕西省宁陕县	1.50	0.94
19	陕西省太白山	1.18	1.80
20	吉林省延吉市	5.89	1.60
21	吉林省敦化	14.58	0.05
22	吉林省桦甸	2.47	2.29
23	河北省承德	7.74	1.64
24	黑龙江省伊春	3.76	1.32
25	黑龙江省哈尔滨市阿城区	0.55	1.30
26	黑龙江省五常	1.00	0.71
27	浙江省建德市	0.28	2.57
28	浙江省淳安县	0.178	1.99
29	山东省苍山县(栽培)	25.13	1.69
30	山东省庄坞(栽培)	8.52	1.49

**3.3 结果分析** 不同产地的牛蒡草中绿原酸含量相差很大,其中以云南、辽宁、吉林、河北省等地含量较高,而陕西、甘肃、浙江、黑龙江省得含量则较低。原因可能与采收时期、海拔、地质、气候环境及储存运输等因素有关,这将为牛蒡草规范化栽培的地域选择提供参考。

对牛蒡草主要化学成分绿原酸进行定量分析,建议本品中绿原酸( $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ )含量不低于0.3%,希望可以为牛蒡草质量标准的建立提供依据。

#### [参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上册[M]. 上海:上海人民出版社,1977:435.
- [2] 娄在祥. 牛蒡功能性成分及其抗氧化、抗菌活性研究[D]. 江苏:江南大学,2010.
- [3] Jeelani S, Khuroo M A. Triterpenoids from *Arctium lappa* [J]. Nat Prod Res, 2011(1):1.
- [4] 刘世名,陈靠山, SCHLEMMANN Willibald, 等. 牛蒡叶中微量木脂体牛蒡子苷和牛蒡子苷元的分离与鉴定[J]. 色谱,2003,(1):52.
- [5] 刘世名,陈靠山, Willibald Schliemann, 等. 聚酰胺柱层析反相高效液相色谱电喷雾离子质谱法分离鉴定牛蒡叶中两种黄酮苷[J]. 分析化学,2003,31(8):1023.
- [6] Kardosova A, M achova E. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides[J]. Fitoterapia,2006,77(5):367.
- [7] Pereira J V, Bergamo D C, Pereira J O, et al. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections[J]. Braz Dent J,2005,16(3):192.
- [8] 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,2010:66.
- [9] 朱晓丽,宋亚芳,李学林,等. 高效液相色谱法测定野菊花中绿原酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):32.

[责任编辑 顾雪竹]