

## HPLC 法同时测定苍耳类药材中酚酸及蒽醌类成分的含量

刘娟秀<sup>1</sup>, 罗益远<sup>1</sup>, 刘训红<sup>1\*</sup>, 宋建平<sup>2</sup>, 侯 娅<sup>1</sup>, 马 阳<sup>1</sup>, 华愉教<sup>1</sup>, 王胜男<sup>1</sup><sup>1</sup>南京中医药大学, 南京 210023; <sup>2</sup>盐城卫生职业技术学院, 盐城 224006

**摘要:**建立 HPLC 同时测定苍耳子、苍耳草药材中绿原酸、新绿原酸、原儿茶醛、原儿茶酸、隐绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、阿魏酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、芦荟大黄素、大黄素及大黄酚含量的方法。采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。14 种成分的含量与峰面积的线性关系良好( $r > 0.9931$ ); 加样回收率为 97.18%~101.09%。苍耳类药材中酚酸和蒽醌类 14 种成分的含量存在差异, 其中绿原酸、原儿茶酸含量较高, 芦荟大黄素、大黄素、大黄酚含量较低。该方法简单、准确, 重现性较好, 可用于苍耳类药材内在质量的评价和控制。

**关键词:** 高效液相色谱法; 苍耳草; 苍耳子; 酚酸; 蒽醌; 含量测定

中图分类号: R932

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.6.012

## Simultaneous Determination of Phenolic Acids and Anthraquinones in Xanthii Herba and Xanthii Fructus by High Performance Liquid Chromatography

LIU Juan-xiu<sup>1</sup>, LUO Yi-yuan<sup>1</sup>, LIU Xun-hong<sup>1\*</sup>, SONG Jian-ping<sup>2</sup>,HOU Ya<sup>1</sup>, MA Yang<sup>1</sup>, HUA Yu-jiao<sup>1</sup>, WANG Sheng-nan<sup>1</sup><sup>1</sup>Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;<sup>2</sup>Yancheng health vocational & Technical College, Yancheng 224006, China

**Abstract:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, neochlorogenic acid, nprotocatechualdehyde, nprotocatechuic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, 1,3-dicaffeoylquinic acid, ferulic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, aloe emodin, emodin and chrysophanol in Xanthii Herba and Xanthii Fructus. The assay was conducted on an Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (250×4.6 mm, 5 μm) with methanol-0.1% formic acid in water as mobile phases. The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm and the column oven temperature was 35 °C. The injection volume was 10 μL. The calibration curves of the 14 constituents showed good linearity ( $r > 0.9931$ ) within the ranges of the tested concentrations. The average recoveries ( $n = 6$ ) of 14 constituents were 97.18%-101.09%. The results showed that the contents of these 14 constituents varied in Xanthii Herba and Xanthii Fructus. The contents of chlorogenic acid and protocatechuic acid were the highest, while the contents of aloe emodin, emodin and chrysophanol were lowest. The developed method was simple, accurate and reproducible. It can be used for the quality evaluation and control of Xanthii Herba and Xanthii Fructus.

**Key words:** HPLC; Xanthii Herba; Xanthii Fructus; phenolic acids; anthraquinones; determination

苍耳类药材苍耳草、苍耳子为同基源不同药用部位的药材<sup>[1]</sup>, 分别收载于 1989 版《江苏省中药材标准》、2015 版《中国药典》, 分别系菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. 的地上部分、成熟带总苞的

果实。苍耳草性微寒, 具清风热、解毒之功效, 主治鼻渊、风寒头痛、风湿痹痛、风疹、湿疹、疥癣等病症, 民间用药历史悠久<sup>[2]</sup>; 苍耳子性温, 具散风寒、通鼻窍、祛风湿之功效, 为历代治疗鼻渊及头痛的要药<sup>[3]</sup>。现代研究表明, 苍耳类药材含多种酚酸类和蒽醌类成分等, 酚酸类如绿原酸、新绿原酸、咖啡酸及多种咖啡酰奎宁酸等<sup>[4,5]</sup>, 具有抗炎、抗菌、抗血栓等作用<sup>[6,7]</sup>; 蒽醌类如芦荟大黄素、大黄素、大黄

收稿日期: 2015-07-13 接受日期: 2016-02-19

基金项目: 盐城市医学科技发展计划(YK2014051); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(YSKX-2014)

\* 通讯作者 Tel: 86-25-85811511; E-mail: liuxunh1959@sohu.com

酚等<sup>[8]</sup>,具有抗菌消炎、抗病毒、降血脂、增加免疫等作用<sup>[9]</sup>。这两类成分为苍耳类药材中的重要活性成分,是药材质量评价的主要指标性成分。中药疗效的发挥可能是多种成分综合作用的结果,所以建立多种有效成分或指标成分的含量测定方法,探讨多成分综合评价体系,更具有有效性和实用性。

目前苍耳类药材的质量评价,多以 HPLC 法测定绿原酸或多种酚酸类成分含量或以 UV 法测定总萘醌的含量<sup>[10-17]</sup>,尚未见对酚酸类及萘醌类多种成分同时分析的研究报道。本实验在前期研究基础上<sup>[18]</sup>,建立 HPLC 法同时测定苍耳类药材中酚酸类(绿原酸、新绿原酸、原儿茶醛、原儿茶酸、隐绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、阿魏酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸)和萘醌类(芦荟大黄素、大黄素、大黄酚)14 种成分含量的方法,对不同商品药材进行比较分析,并考察其加工炮制前后、同植株不同部位酚酸及萘醌类成分的动态变化,从而为苍耳类药材的安全性、有效性综合评价和内在质量的全面控制提供可靠的检测方法 & 科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Waters 2695-2998 型高效液相色谱仪,包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司),ME36S 型电子分析天平(德国赛多利斯公司);KQ-500E 型超声波清洗器(功率 500W,频率 40 kHz,昆山市超声仪器有限公司);DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海沪粤明科学仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

对照品:绿原酸(批号:110753-200413)、阿魏酸(批号:110773-201012)、咖啡酸(批号:110885-200102)、芦荟大黄素(批号:110756-201007)、大黄素(批号:110756-200110)、大黄酚(批号:110796-201017)购于中国食品药品检定研究院,纯度均 > 98%;新绿原酸(批号:12112712)、隐绿原酸(批号:12112605)、1,3-二咖啡酰奎宁酸(批号:12061112)、3,5-二咖啡酰奎宁酸(批号:12022803)、4,5-二咖啡酰奎宁酸(批号:12022804)购于成都普瑞法科技开发有限公司,纯度均 > 98%;原儿茶醛(批号:YECQ20140819)、原儿茶酸(批号:YECS20140411)、3,4-二咖啡酰奎宁酸(批号:

YLYB2014041901)购于南京春秋生物工程有限公司,纯度均 > 98%。甲醇(江苏汉邦科技有限公司)、甲酸(德国 Merck 公司)均为色谱纯,各种溶液配制用水均为重蒸水。

### 1.3 药材

苍耳类药材样品编号见表 1,经南京中医药大学中药鉴定教研室刘训红教授鉴定 S1 ~ S18 为苍耳草,系菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. 的干燥地上部分,S19 ~ S40 为苍耳子,系菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. 的干燥成熟带总苞的果实。其中 S23、S25 的自制炮制品为 S26、S27;S18(苍耳草)及 S25(苍耳子)为同一苍耳植株不同部位药材。除样品 S15 ~ S25 为实地采集外,其余样品均为商品药材,留样凭证存放于南京中医药大学中药鉴定实验室。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 × 4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 15 min,A:20% ~ 30%;15 ~ 30 min,A:30% ~ 35%;30 ~ 40 min,A:35% ~ 80%;40 ~ 55 min,A:80% ~ 100%),流速 1.0 mL/min,柱温 35 °C,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。

### 2.2 对照品溶液制备

精密称取绿原酸、新绿原酸、原儿茶醛、原儿茶酸、隐绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、阿魏酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚对照品适量,分别置于容量瓶中,加 70% 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,得对照品储备液。分别精密吸取上述储备液使 14 种对照品浓度依次为 0.410、0.127、0.117、0.076、0.105、0.107、0.099、0.094、0.124、0.316、0.169、0.551、0.613、0.662 mg/mL,作为混合对照品储备液。

### 2.3 供试品溶液制备

精密称取样品粉末(过 3 号筛)1.0 g,置于具塞锥形瓶中,加体积分数 70% 甲醇 40 mL 超声(500 W,40 kHz)提取 30 min,滤取滤液,滤渣加入体积分数 70% 甲醇 40 mL,超声(500 W,40 kHz)提取 30 min,滤取滤液,滤渣再加入体积分数 70% 甲醇 40 mL,超声(500 W,40 kHz)提取 30 min,滤取滤液,收取上述 3 次提取的滤液,减压蒸干部分溶剂,并定容

表 1 苍耳类药材样品  
Table 1 Sample information of *X. sibiricum*

编号 No.	样品 Sample	加工 Processing method	产地 Producing place	批号 Batch	来源 Source
S1	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	山东 Shandong	20130809	安徽国鑫中药饮片有限公司 Anhui Guoxin Herbal Pieces Co., Ltd.
S2	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	安徽 Anhui	20130914	安徽沪谯中药科技有限公司 Anhui Huqiao Medicine Technology Co., Ltd.
S3	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	山东 Shandong	20130914	安徽福春堂中药饮片有限公司 Anhui Fu Chun Tang Chinese medicine Yinpian Co., Ltd.
S4	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	安徽 Anhui	20130828	安徽亳州三义堂药业有限公司 Anhui Bozhou three Yi Tang Pharmaceutical Co., Ltd.
S5	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	河北 Hebei	20130703	安徽济人药业有限公司 Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd.
S6	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	江苏 Jiangsu		泰州高港中药饮片有限公司 Taizhou Gaogang Chinese Medicine Co. Ltd.
S7	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	江苏 Jiangsu	20130718	苏州春晖堂药业有限公司 Suzhou Chunhui Tong Pharmaceutical Co. Ltd.
S8	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	山东 Shandong	20130630	盐城市中医院 Yancheng Hospital of Traditional Chinese Medicine
S9	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	江苏 Jiangsu	20130825	亳州永刚饮片有限公司 Bozhou Yonggang pieces Co. Ltd.
S10	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	湖北 Hubei	20130622	南京药业股份有限公司 Nanjing medical Co. Ltd.
S11	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	江苏 Jiangsu	20130324	大华中药店 Dahua Chinese medicine shop
S12	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	安徽 Anhui	120803	益丰大药房 Yifeng Large Pharmacy
S13	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	江苏 Jiangsu	130912	江苏省中医院 Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Hospital
S14	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	湖北 Hubei	130803	安徽福春堂中药饮片有限公司 Anhui Fu Chun Tang Pharmaceutical Co., Ltd.
S15	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	江苏 Jiangsu	20130718	扬州仪征 Yizheng, Yangzhou
S16	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	安徽 Anhui	20130630	安徽亳州 Bozhou, Anhui
S17	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	山东 Shandong	20130825	山东青岛 Qingdao, Shandong
S18	苍耳草 <i>Xanthii Herba</i>	晒干 Sun drying	江苏 Jiangsu	20131015	南京中医药大学药苑 Nanjing University of Chinese Medicine of Jiangsu drug court
S19	苍耳子 <i>Xanthii Fructus</i>	晒干 Sun drying	河南 Henan	20131020	河南开封 Kaifeng, Henan
S20	苍耳子 <i>Xanthii Fructus</i>	晒干 Sun drying	四川 Sichuan	20131103	四川成都 Chengdu, Sichuan
S21	苍耳子 <i>Xanthii Fructus</i>	晒干 Sun drying	湖北 Hubei	20131028	湖北十堰 Shiyan, Hubei
S22	苍耳子 <i>Xanthii Fructus</i>	晒干 Sun drying	山东 Shandong	20130916	山东枣庄 Zaozhuang, Shandong
S23	苍耳子 <i>Xanthii Fructus</i>	晒干 Sun drying	内蒙 Inner Mongolia	20131107	内蒙赤峰 Chifeng, Inner Mongolia
S24	苍耳子 <i>Xanthii Fructus</i>	晒干 Sun drying	内蒙 Inner Mongolia	20131004	内蒙包头 Baotou, Inner Mongolia
S25	苍耳子 <i>Xanthii Fructus</i>	晒干 Sun drying	江苏 Jiangsu	20131015	南京中医药大学药苑 Nanjing University of Chinese Medicine of Jiangsu drug court

S26	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	内蒙 Inner Mongolia	20131107	内蒙赤峰 Chifeng, Inner Mongolia
S27	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	江苏 Jiangsu	20131015	南京中医药大学药苑 Nanjing University of Chinese Medicine of Jiangsu drug court
S28	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	江苏 Jiangsu		南通三越中药饮片有限公司 Nantong Sanyue Chinese Herbal Medicine Co. Ltd.
S29	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	山东 Shandong		安徽惠隆中药饮片有限公司 Anhui Huilong Chinese Herbal Medicine Co., Ltd.
S30	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	湖北 Hubei	20130401	大华中药店 Dahua Chinese medicine shop
S31	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	江苏 Jiangsu	120513007	北京同仁堂南京分店 Beijing Tongrentang Pharmacy
S32	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	河南 Henan	130911	益丰大药房 Yifeng Large Pharmacy
S33	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	江苏 Jiangsu	130826	江苏省中医院 Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Hospital
S34	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	四川 Sichuan		成都荷花池中药材市场 Chengdu Lotus Pond Chinese medicine market
S35	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	重庆 Chongqing		成都荷花池中药材市场 Chengdu Lotus Pond Chinese medicine market
S36	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	内蒙 Inner Mongolia	121201	亳州千草药业有限公司 Bozhou Qian Grass Pharmaceutical Co., Ltd.
S37	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	湖北 Hubei	130902	安徽福春堂中药饮片有限公司 Anhui Fu Chun Tang Pharmaceutical Co., Ltd.
S38	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	湖北 Hubei	130101	安徽天马中药饮片科技有限公司 Anhui Tianma Chinese herbal medicine science and Technology Co., Ltd.
S39	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	山东 Shandong	200007460	北京同仁堂亳州饮片有限责任公司 Beijing Bozhou Tongrentang pieces limited liability company
S40	苍耳子 Xanthii Fructus	炒黄 Yellowing by stir-frying	安徽 Anhui	140101	江苏省中医院 Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Hospital

至 100 mL 量瓶中,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

## 2.4 标准曲线

精密吸取“2.2”项下混合对照品储备液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL,用体积分数 70% 甲醇定容于 10 mL 量瓶中,备用。精密吸取 10  $\mu\text{L}$ ,按上述色谱条件进样分析,以对照品的峰面积( $Y$ )对相应的浓度( $X$ )进行线性回归,得回归方程、相关系数和线性范围。结果见表 2。

## 2.5 检测限与定量限

按“2.1”项色谱条件分析,以各化合物的信噪比( $S/N$ )等于 3 时相对应的浓度确定为最低检测限(LOD),以各化合物的信噪比( $S/N$ )等于 10 时相对应的浓度确定为最低定量限(LOQ)。结果见表 2。

## 2.6 系统适用性试验

在选定的条件下注入苍耳草供试品溶液。按  $n = 5.54(t_{\text{R}}/W_{\text{h}2})^2$  分别计算色谱柱理论板数  $n$ ;按  $R = 2$

$(t_{\text{R}2} - t_{\text{R}1}) / (W_1 + W_2)$  分别计算分离度。结果表明,理论板数、分离度均达到相关要求。结果见表 3、图 1。

## 2.7 精密度、稳定性、重复性

取一定浓度的混合对照品溶液,在 1 d 内连续进样 6 次,考察日内精密度,测得 14 种成分峰面积的 RSD,见表 3;连续 3d,每天连续进样 2 次,考察日间精密度。取苍耳草(S7)样品供试液,分别在 0、2、4、6、12、24 h 进样 6 次,测定 14 种成分峰面积 RSD,考察样品溶液中 14 种成分的稳定性。取苍耳草(S7)样品约 1.0 g,精密称定,按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,分别进样,测定峰面积,计算 14 种成分含量及其 RSD。结果上述 14 种成分峰面积 RSD,考察方法的重复性。结果表明,仪器精密度良好,样品溶液中 14 种成分在 24 h 内稳定,该方法的重复性良好。结果见表 3。

## 2.8 加样回收率

加样回收率试验:取已知含量的苍耳草(S7)样

表2 苍耳类药材中14种对照品标准曲线、检测限与定量限

Table 2 Calibration curves, LODs and LOQs of fourteen reference substances

化合物 Substances	线性方程 Regression equation	<i>r</i>	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )	检测限 LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	定量限 LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y = 2.76 \times 10^7 X + 178575$	0.9990	8.24 ~ 28.7	0.13	0.48
新绿原酸 Neochlorogenic acid	$Y = 1.08 \times 10^7 X - 11162$	0.9931	1.27 ~ 8.89	0.21	0.44
原儿茶醛 Protocatechuic aldehyde	$Y = 4.13 \times 10^6 X + 464.77$	0.9993	1.17 ~ 8.19	0.15	0.33
原儿茶酸 Protocatechuic acid	$Y = 1.25 \times 10^7 X - 5084.8$	0.9973	0.76 ~ 5.32	0.18	0.34
隐绿原酸 4-Dicaffeoylquinic acid	$Y = 1.93 \times 10^7 X - 5360.7$	0.9983	1.05 ~ 7.35	0.24	0.42
咖啡酸 Caffeic acid	$Y = 2.26 \times 10^7 X - 5386.7$	0.9991	1.07 ~ 7.49	0.15	0.35
1,3-二咖啡酰奎宁酸 1,3-Dicaffeoylquinic acid	$Y = 1.30 \times 10^7 X + 4879.3$	0.9987	0.99 ~ 6.93	0.34	0.49
阿魏酸 Ferulic acid	$Y = 1.11 \times 10^7 X - 3703.6$	0.9991	0.94 ~ 6.58	0.29	0.48
3,4-二咖啡酰奎宁酸 3,4-Dicaffeoylquinic acid	$Y = 3.03 \times 10^7 X - 10461$	0.9978	1.24 ~ 8.68	0.21	0.41
3,5-二咖啡酰奎宁酸 3,5-dicaffeoylquinic acid	$Y = 7.16 \times 10^7 X - 2830.5$	0.9984	3.16 ~ 22.12	0.12	0.35
4,5-二咖啡酰奎宁酸 4,5-Dicaffeoylquinic acid	$Y = 2.84 \times 10^7 X - 31234$	0.9993	1.69 ~ 11.83	0.26	0.55
芦荟大黄素 Aloeemodin	$Y = 4.33 \times 10^7 X + 167593$	0.9991	1.25 ~ 20.00	0.07	0.22
大黄素 Emodin	$Y = 2.99 \times 10^7 X - 1393.1$	0.9992	1.53 ~ 24.4	0.15	0.37
大黄酚 Chrysophanol	$Y = 9.77 \times 10^6 X - 3896.5$	0.9993	1.65 ~ 26.4	0.24	0.40

表3 理论板数、分离度试验结果

Table 3 Results of theoretical plate numbers and resolutions

化合物 Substances	保留时间 Retention time (min)	理论踏板数 Theoretical plate (n)	分离度 R	
			前 Before	后 After
绿原酸 Chlorogenic acid	7.399	6561	2.08	2.74
新绿原酸 Neochlorogenic acid	10.060	8971	2.78	1.63
原儿茶醛 Protocatechuic aldehyde	12.485	65297	1.69	4.47
原儿茶酸 Protocatechuic acid	13.872	28036	4.47	4.95
隐绿原酸 4-Dicaffeoylquinic acid	16.075	14897	1.50	2.39
咖啡酸 Caffeic acid	17.579	16719	2.39	6.40
1,3-二咖啡酰奎宁酸 1,3-Dicaffeoylquinic acid	27.656	35600	8.22	5.79
阿魏酸 Ferulic acid	35.289	74163	4.87	1.52
3,4-二咖啡酰奎宁酸 3,4-Dicaffeoylquinic acid	36.221	75632	1.52	7.91
3,5-二咖啡酰奎宁酸 3,5-dicaffeoylquinic acid	39.663	557777	7.91	5.99
4,5-二咖啡酰奎宁酸 4,5-Dicaffeoylquinic acid	42.059	129587	5.99	2.22
芦荟大黄素 Aloeemodin	44.575	523548	2.63	3.30
大黄素 Emodin	47.195	141794	2.21	3.10
大黄酚 Chrysophanol	48.778	285155	3.10	2.56

品0.5 g,精密称定,平行6次,分别精密加入一定量的绿原酸、新绿原酸、原儿茶醛、原儿茶酸、隐绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、阿魏酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚对照品溶液,按“2.2”项下方法制备供试溶液,进样测定并计算上述14种成分的回收率。结果见表4。

## 2.9 样品分析

将苍耳类药材样品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,采用外标法计算样品中绿原酸、新绿原酸、原儿茶醛、原儿茶酸、隐绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、阿魏酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚的含量,结果见表5。

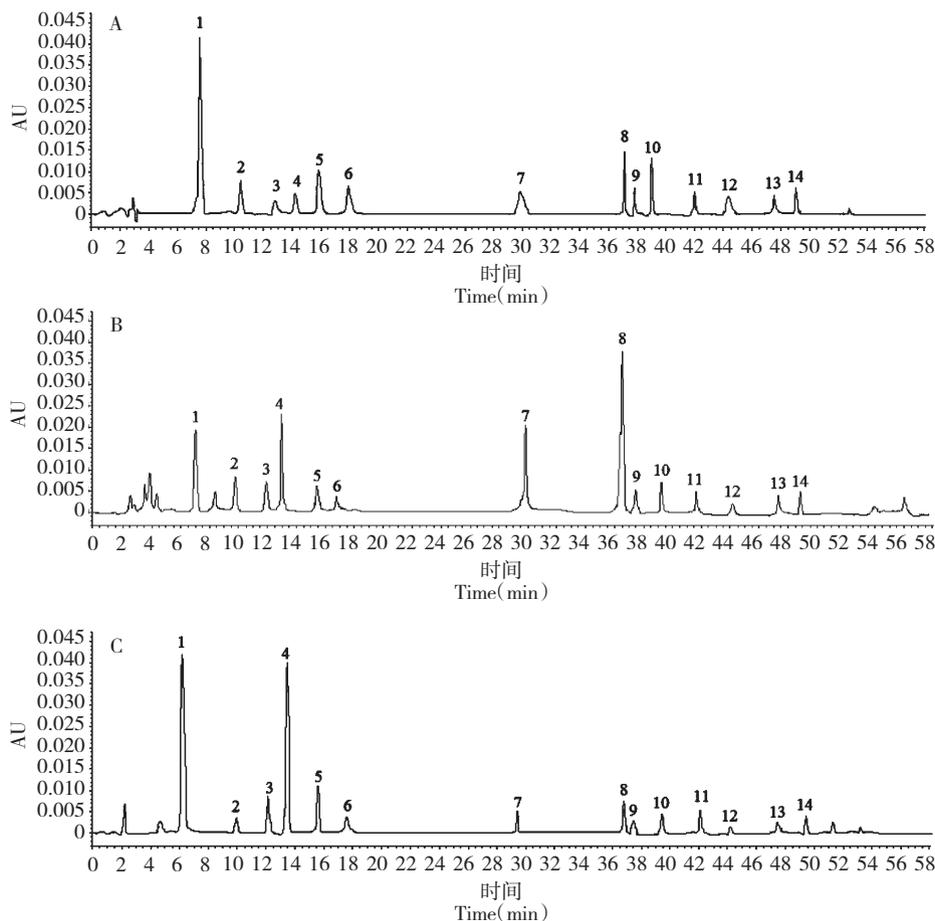


图1 混合对照品(A)、苍耳草样品(B)、苍耳子样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards (A), Xanthii Herba sample (B) Xanthii Fructus sample (C)

注:1-绿原酸;2-新绿原酸;3-原儿茶醛;4-原儿茶酸;5-隐绿原酸;6-咖啡酸;7-1,3,-二咖啡酰奎宁酸;8-阿魏酸;9-3,4-二咖啡酰奎宁酸;10-3,5-二咖啡酰奎宁;11-4,5-二咖啡酰奎宁酸;12-芦荟大黄素;13-大黄素;14-大黄酚

Note:1-Chlorogenic acid;2-Neochlorogenic acid;3-Protocatechuic aldehyde;4-Protocatechuic acid;5-4-Dicaffeoylquinic acid;6-Caffeic acid;7-1,3-Dicaffeoylquinic acid;8-Ferulic acid;9-3,4-Dicaffeoylquinic acid;10-3,5-Dicaffeoylquinic acid;11-4,5-Dicaffeoylquinic acid;12-Aloeemodin;13-Emodin;14-Chrysophanol

表4 精密度、稳定性、重复性及加样回收率试验结果

Table 4 Results of precision, stability, repeatability and recovery tests

化合物 Substances	精密度 Precision		稳定性 Stability ( $n=6$ ) RSD (%)	重复性 Repeatability ( $n=6$ ) RSD (%)	加样回收率 Recovery ( $n=6$ )	
	日内精密度 Intra-day ( $n=6$ ) RSD (%)	日间精密度 Inter-day ( $n=3$ ) RSD (%)			平均加样回收率 Average recovery (%)	
						RSD (%)
绿原酸 Chlorogenic acid	1.31	1.14	0.81	0.79	98.37	1.67
新绿原酸 Neochlorogenic acid	0.98	1.68	1.31	0.52	100.49	2.08
原儿茶醛 Protocatechuic aldehyde	1.19	1.06	1.27	1.81	99.19	2.46
原儿茶酸 Protocatechuic acid	0.69	0.76	0.48	0.58	97.53	1.42

隐绿原酸 4-Dicaffeoylquinic acid	1.46	1.23	1.22	0.91	99.13	2.10
咖啡酸 Caffeic acid	0.55	0.50	1.91	1.56	97.18	1.31
1,3-二咖啡酰奎宁酸 1,3-Dicaffeoylquinic acid	0.84	0.93	1.45	2.45	100.03	2.09
阿魏酸 Ferulic acid	1.24	1.15	0.63	0.85	98.15	1.72
3,4-二咖啡酰奎宁酸 3,4-Dicaffeoylquinic acid	0.37	0.46	1.07	2.31	98.75	2.14
3,5-二咖啡酰奎宁酸 3,5-dicaffeoylquinic acid	1.06	0.95	0.27	1.57	100.24	1.20
4,5-二咖啡酰奎宁酸 4,5-Dicaffeoylquinic acid	0.93	0.96	0.94	0.65	100.07	1.60
芦荟大黄素 Aloeemodin	0.61	0.86	1.10	2.42	100.35	1.30
大黄素 Emodin	1.11	1.04	1.16	0.26	101.09	1.04
大黄酚 Chrysophanol	0.88	0.82	0.33	1.23	99.22	1.84

表5 苍耳类药材中14种成分的含量测定结果(mg/g, n = 2)

Table 5 Contents determination results of the 14 investigated constituents in Xanthii Herba and Xanthii Fructus. (mg/g, n = 2)

编号 No.	绿原酸 Chlorogenic acid	新绿 原酸 Neoch lorogenic acid	原儿 茶醛 Protoca technic aldehyde	原儿 茶酸 Protoca technic acid	隐绿 原酸 4-Dicaffeoy lquinic acid	咖啡酸 Caffeic acid	1,3- 二咖啡 酰奎 宁酸 1,3- Dicaffeo ylquinic acid	阿魏酸 Ferulic acid	3,4- 二咖啡 酰奎 宁酸 3,4- Dicaff eoylquinic acid	3,5- 二咖啡 酰奎 宁酸 3,5- dicaffeo ylquinic acid	4,5- 二咖啡 酰奎 宁酸 4,5- Dicaffeo ylquinic acid	芦荟 大黄素 Aloe emodin	大黄素 Emodin	大黄酚 Chrysophanol
S1	0.102	-	0.278	-	0.167	0.091	0.083	0.153	0.052	0.114	0.126	0.072	-	-
S2	1.216	0.136	0.301	0.365	0.191	0.208	0.044	0.312	0.056	0.103	0.128	-	0.064	0.159
S3	0.613	0.146	0.237	0.246	0.186	-	0.113	0.106	0.047	0.136	0.129	0.011	0.061	-
S4	0.188	1.106	0.288	0.324	0.093	0.076	0.074	0.134	0.041	0.176	0.129	0.019	0.066	-
S5	0.177	0.194	0.230	0.383	-	0.108	0.064	0.189	0.058	-	0.127	0.011	0.055	-
S6	0.262	0.282	0.238	0.327	0.157	0.103	-	0.131	0.049	0.142	0.139	0.012	0.055	-
S7	0.177	0.169	0.271	0.453	0.186	0.120	0.121	0.182	0.049	0.348	0.134	0.019	0.031	0.050
S8	0.186	0.138	0.237	0.472	0.151	0.133	0.278	0.264	0.046	0.937	0.132	0.031	0.027	0.121
S9	0.303	0.113	0.227	0.525	0.219	0.178	0.129	0.116	0.043	0.126	0.129	0.030	0.065	0.142
S10	0.351	0.126	0.514	0.295	-	0.091	0.258	0.211	0.046	0.163	0.132	0.020	0.052	-
S11	0.177	0.121	0.258	0.651	0.175	0.080	0.047	0.175	0.043	0.220	0.127	0.006	0.061	0.143
S12	0.153	0.146	0.160	-	0.063	0.166	-	0.220	0.042	0.103	0.131	0.015	0.057	0.051
S13	0.151	0.110	0.268	0.589	0.078	0.092	0.167	0.205	0.085	0.177	0.131	0.023	0.062	0.056
S14	0.145	0.251	0.230	-	0.182	0.129	-	0.274	0.126	0.235	0.133	0.058	0.055	0.052
S15	0.558	0.250	0.207	0.759	0.194	0.101	0.596	1.147	0.177	0.218	0.159	0.023	0.049	0.068
S16	0.280	0.165	0.194	0.700	0.100	0.093	0.317	1.068	0.096	0.209	0.127	0.032	0.037	0.055
S17	0.115	0.142	0.572	0.111	-	0.111	0.072	1.279	0.081	0.192	0.134	0.018	0.049	-
S18	0.490	0.128	0.655	0.480	0.068	0.107	0.209	1.255	0.159	0.151	0.127	-	0.020	0.066

S19	1.717	0.151	0.279	1.699	0.319	0.130	0.135	0.266	0.055	0.105	0.134	0.005	0.023	0.077
S20	2.242	0.173	0.322	2.206	0.441	0.212	0.097	0.297	0.102	-	0.142	-	0.022	0.056
S21	3.966	0.224	0.705	1.373	0.603	0.098	0.127	0.522	0.228	0.138	0.156	0.020	0.023	0.073
S22	1.769	0.211	0.778	1.094	0.440	0.185	-	0.274	0.064	0.114	0.161	-	0.026	0.061
S23	2.032	0.200	0.450	1.792	0.429	0.097	0.144	0.258	0.060	0.090	0.169	0.005	0.034	0.054
S24	1.658	0.244	0.940	0.891	0.334	0.251	0.139	0.340	0.067	0.102	0.174	-	0.027	0.167
S25	1.267	0.198	0.516	1.030	0.177	0.067	0.263	0.553	0.155	0.095	0.145	0.008	0.028	0.114
S26	1.086	0.218	0.736	0.955	0.344	0.265	0.063	0.317	0.058	0.111	0.197	0.016	0.022	0.098
S27	0.973	0.294	0.681	0.782	-	0.168	0.115	1.078	0.109	0.089	0.164	0.006	-	-
S28	0.078	0.606	0.562	0.657	0.177	0.243	0.047	0.294	0.048	0.156	0.156	0.003	0.029	-
S29	2.109	0.427	-	0.497	0.165	0.261	-	-	-	0.118	-	0.009	-	-
S30	0.701	0.133	0.435	0.822	0.449	0.146	0.039	0.512	0.049	0.147	0.143	0.006	0.023	0.050
S31	0.715	0.243	0.340	0.892	0.308	0.199	0.036	0.285	0.055	0.161	0.156	0.022	0.016	
S32	0.969	0.193	0.331	1.217	0.477	0.385	0.079	0.366	0.059	-	0.193	0.029	0.019	0.073
S33	1.005	0.425	0.291	1.027	0.411	0.266	0.100	0.525	0.048	0.077	0.168	-	0.014	-
S34	1.409	0.193	0.510	1.143	0.227	0.149	0.035	0.270	0.050	0.056	0.122	0.031	0.013	0.121
S35	1.312	0.314	1.677	0.639	0.364	0.384	0.737	1.577	0.097	0.095	0.133	0.018	0.019	0.142
S36	1.414	0.297	0.825	1.068	0.218	0.307	0.057	0.190	0.060	0.090	0.197	0.002	0.025	-
S37	1.059	0.137	0.281	1.308	0.331	0.283	0.074	0.255	0.055	0.075	0.156	0.030	0.021	0.143
S38	2.922	0.258	1.103	0.945	0.457	0.198	0.056	0.646	0.202	0.119	0.171	-	0.027	0.051
S39	1.407	0.144	0.569	1.130	0.391	0.109	0.169	0.198	0.043	0.098	0.124	-	0.024	0.056
S40	1.749	0.190	0.254	1.483	0.333	0.287	0.081	0.387	0.048	0.110	0.143	0.020	0.018	0.052

注:“-”表示未检出”。

Note:“-” indicated “not detected”.

## 3 讨论与结论

### 3.1 样品提取条件的优化

采用单因素变量法,分别对苍耳草、苍耳子样品考察了不同提取方法(连续回流、超声)、提取溶剂(50% 甲醇、70% 甲醇、90% 甲醇、甲醇)、料液比(1:20、1:30、1:40、1:50 g/mL)、提取时间(30、60、90、120 min)和提取次数(1、2、3 次)考察。结果显示,苍耳草、苍耳子以 70% 甲醇超声提取 30 min,提取 3 次,料液比为 1:40 g/mL 的提取条件较佳。

### 3.2 色谱条件的优化

#### 3.2.1 色谱柱及流动相

分别对色谱柱<sup>[20]</sup>(YMC-Pack ODS-A C<sub>18</sub> 色谱柱(150×4.6 mm,5 μm)、ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250×4.6 mm,5 μm)及流动相(乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、甲醇-0.1% 甲酸水溶液)考察。结果显示,采用 SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250×4.6 mm,5 μm)色谱柱,以甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相,梯度洗脱、14 种被测成分达到基线分离,且峰形

较好。

#### 3.2.2 检测波长

采用二极管阵列检测器对检测波长进行考察,通过对供试品溶液和对照品溶液在 210~400 nm 下进行全波长扫描,综合评价各吸收峰强度及分离度,结果发现在 254 nm 下 14 种成分吸收峰具有较大的响应值。故确定检测波长为 254 nm。

### 3.3 实验结果分析

苍耳类药材中酚酸和萘醌类 14 种指标成分的含量存在一定差异,其中以绿原酸、原儿茶酸含量较高,芦荟大黄素、大黄素、大黄酚含量较低;苍耳草药材中以 1,3-二咖啡酰奎宁酸、阿魏酸含量差异较大,差值约为 14、12 倍,而苍耳子药材中各成分无明显差异。苍耳子药材中总酚酸和萘醌的含量均较苍耳草药材高,虽然这两个同基源不同药用部位的药材中化学成分类型基本一致,但指标成分的含量差异明显,这可能是其功效不同的原因之一<sup>[19]</sup>。苍耳子药材炮制前后含量发生变化,其中生苍耳子(S23、S25)酚酸总量、萘醌含量高于炒苍耳子(S26、

S27), 炒苍耳子中新绿原酸、原儿茶醛、阿魏酸含量相对较高; 同株植物苍耳地上部分(S18)与果实(S25)中, 苍耳草中原儿茶醛、咖啡酸、阿魏酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸含量高于苍耳子。

本实验建立了 HPLC 同时测定苍耳类药材中绿原酸、新绿原酸、原儿茶醛、原儿茶酸、隐绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、阿魏酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚含量的方法, 对苍耳类商品药材进行比较分析, 考察其加工炮制前后、同植株不同部位酚酸类成分的动态变化。该方法相对简单、准确, 重现性好, 可用于苍耳类药材内在质量的综合评价和全面控制。

#### 参考文献

- 1 Pharmacopoeia Committee of P. R. China (国家药典委员会). Chinese Pharmacopoeia, Vol I(中华人民共和国药典, 第一部). Beijing Chemical Industry Publishing Press, 2015, 162.
- 2 Nanjing University of Chinese Medicine. The Dictionary of Traditional Chinese Medicine (中药大典). Shanghai: Shanghai Science and Technology, 2005. 1486-1488.
- 3 Su XG(苏新国), Mi SQ(泌穗卿), Wang NS(王宁生), et al. 苍耳子药用研究进展. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2006, 17: 68-72.
- 4 Ruan GH(阮贵华), Li GK(李攻科). Advances in studies on chemical composition, segregation and analysis research of Fructus Xanthii. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2008, 30: 421-426.
- 5 Yang L(杨柳), Wu JX(吴金雄), Xu SJ(许舜军), et al. Characterization of phenolic acids and quantitative analysis of chlorogenic acid contained in Fructus Xanthii. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(19): 85-88.
- 6 Han T(韩婷), Li HL(李慧梁), Hu Y(胡园), et al. Phenolic acids in Fructus Xanthii and determination of contents of total phenolic acids in different species and populations of Xanthium in China. *J Chin Integr Med*(中国中西医结合学报), 2006, 4: 194-198.
- 7 Song LL(宋琳琳), Sha JQ(沙靖全), Zhao H(赵宏), et al. Determination of TPA content of *Xanthium sibiricum* Patr. ex Widder and anti-inflammatory effect. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2013, 24: 2331-2332.
- 8 Huang WH(黄文华), Yu JG(余竞光), Sun L(孙兰), et al. Study the chemical composition of traditional Chinese

medicine Fructus Xanthii. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2005, 30: 1027-1028.

- 9 Cao L(曹亮), Zhou JJ(周建军). Progress on anthraquinone compounds. *Northwest Pharm J*(西北药学杂志), 2009, 24: 237-238.
- 10 Tian J(田静), Xia YF(夏玉凤), Fang KH(房克慧). Simultaneous determination of 8 phenolic acids in *Xanthium sibiricum* medicines by HPLC. *Chin Med Mat*(中药材), 2013, 36: 1623-1626.
- 11 Duo R(朵睿), Liu YH(刘玉红), Wang MK(王明奎), et al. HPLC simultaneous determination of the content of 6 constituents in Fructus Xanthii. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2013, 33: 78-82.
- 12 Yang L(杨柳), Su ZJ(苏芝军), Xu SJ(许舜军), et al. Simultaneous determination of 4 phenolic acids in Cangerzi by ultra-performance liquid chromatography. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2010, 45: 1537-1540.
- 13 Qin SL(秦泗涟), Ma LH(马利华), Wang ZZ(王振中), et al. UPLC determination of five kinds of phenolic acids. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2012, 34: 1393-1395.
- 14 Hong Y(洪燕), Han YQ(韩燕全), Xia LZ(夏伦祝), et al. Simultaneous determination of nine phenolic acid components in *Xanthium Fructus*. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2013, 48: 1109-1112.
- 15 Tong TJ(仝俊太), Xu SQ(徐圣秋), Li WD(李伟东), et al. Determination of chlorogenic acid in *Xanthium herba* by HPLC. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2011, 31: 1739-1740.
- 16 Ming QL(明乾良), Gao X(高翔), Zhang H(张宏), et al. Determination of chlorogenic acid in three species of cocklebur fruits from different regions of China by HPLC method. *Pharm Care Res*(药学服务与研究), 2008, 8: 258-260.
- 17 Wang H(王虹), He GX(何桂霞), Tao Y(姚颖). Determination of total anthraquinones in *Xanthium Fructus*. *Chin J Mod Drug Appl*(中国现代药物应用), 2009, 3: 89-90.
- 18 Liu JX(刘娟秀), Luo YY(罗益远), Liu XH(刘训红), et al. Simultaneous determination of seven phenolic acids from *Xanthium Herba* and *Xanthium Fructus* by HPCE. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2015, 50: 366-370.
- 19 Su J(苏建), Yuan ZF(袁志芳), Zhang LT(张兰桐), et al. Determination of stilbeneglycoside and anthraquinone in *Polygonum multiflorum* Thunb by RP-HPLC. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2007, 38: 278-281.
- 20 Wang MY(王明月), Luo JH(罗金辉), Li JG(李建国). Determination of polyphenols in *Areca catechu* by HPLC. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2011, 23: 101-104.