

HPLC 法同时测定鼠曲草中 7 种成分

高俊斌¹, 王 璇², 陈燕红³, 李君丽², 吕闪闪², 孙连娜^{2*}

(1. 上海上药华宇药业有限公司, 上海 200002, 2. 上海中医药大学中药学院中药炮制教研室, 上海 201203, 3. 第二军医大学上海长征医院药材科, 上海 200003)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定鼠曲草 *Gnaphalium affine* D. Don 中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、1, 5-二咖啡酰奎宁、木犀草素、芹菜素、山柰酚的含有量。方法 鼠曲草 80% 甲醇提取液的分析采用 Atlantis[®] T₃ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 以乙腈-0.2% 甲酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 288 nm; 柱温 30 ℃。结果 7 种成分在各自范围内线性关系良好 ($R^2 \geq 0.999 8$), 平均加样回收率为 98.58% ~ 103.8%, RSD 0.88% ~ 1.74%。结论 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于鼠曲草的质量控制。

关键词: 鼠曲草; 化学成分; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1116-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.023

Simultaneous determination of seven constituents in *Gnaphalium affine*

GAO Jun-bin¹, WANG Xuan², CHEN Yan-hong³, LI Jun-li², LÜ Shan-shan², SUN Lian-na^{2*}

(1. Shanghai Pharma Hua Yu Chinese Herbs Co., Ltd., Shanghai 200002, China; 2. Department of TCM Processing, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of seven constituents in *Gnaphalium affine* D. Don. **METHODS** The analysis of 80% methanol of *G. affine* was performed on a 30 ℃ Atlantis[®] T₃ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-formic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 288 nm. **RESULTS** Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($R^2 \geq 0.999 8$), whose average recoveries were 98.58% - 103.8% with the RSDs of 0.88% - 1.74%. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *G. affine*.

KEY WORDS: *Gnaphalium affine* D. Don; chemical constitutions; HPLC

鼠曲草 *Gnaphalium affine* D. Don 系菊科鼠曲草属植物鼠曲草的干燥地上部分。又名佛耳草、追骨风、清明菜、黄花曲草。全世界约有 200 种, 中国有 19 种, 主要分布在长江和珠江流域, 曾收载于《中华人民共和国药典》1977 年版一部^[1], 现收载于《山东药材地方标准》和《上海药材地方标准》。研究发现鼠曲草属植物的化学成分主要有黄酮^[2-4]和二萜^[5-7]类成分, 除此之外还含有维生素和

矿物质^[8-9], 挥发油^[10]、氨基酸^[11]和植物甾醇等化合物。其中黄酮类化合物是鼠曲草属植物中的特征性成分, 主要有查尔酮类、黄酮类、黄酮醇类、二氢黄酮类。鼠曲草中挥发油有多种生物活性^[12], 如平喘、抗菌、消炎等作用, 与鼠曲草具有的止咳、化痰、平喘的功效相符。鼠曲草中的黄酮类、酰化黄酮苷类及酚类具有良好的补体抑制活性。

目前, 对鼠曲草含有量的测定通过 HPLC 法对

收稿日期: 2017-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373954); 上海市自然科学基金项目 (13ZR1448800)

作者简介: 高俊斌 (1971—), 男, 主治医师, 从事中药材鉴定和炮制机理研究。Tel: 13321803106, E-mail: padd@163.com

* 通信作者: 孙连娜 (1973—), 女, 博士, 副教授, 从事中药资源活性评价及新药研究。Tel: (021) 81871304, E-mail: sssnmr@

其槲皮素和木犀草素进行研究^[13-14]，但是缺乏以活性物质为导向的质量控制。本实验在前期确定有效物质的基础上^[15-16]，建立 HPLC 法同时测定鼠曲草中 7 种成分的含有量，该方法具有较好的灵敏度、准确度和精密度，为更好地控制该药材提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1100 高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；ORION MODEL 828 型 PH 计（美国 Thermo 公司）；CPA225D 型十万分之一电子天平（德国 Sartorius 公司）；N-1100 型旋转蒸发仪（上海爱朗仪器有限公司）；KQ-500 超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；Sorvall LYNX6000 高速离心机（美国 Thermo 公司）。

1.2 试剂 原儿茶酸、咖啡酸、芹菜素、山柰酚、木犀草素、绿原酸、1, 5-二咖啡酰奎宁酸由前期实验制备所得，经 HPLC 检测其纯度均高于 98%。本次使用的 17 批鼠曲草药材采自不同的地方（详见表 1），由上海中医药大学中药学院中药炮制教研室孙连娜副教授鉴定为正品。Milli-Q 处理纯净水（美国 Millipore 公司）；液相用乙腈（德国 Merck 公司）为色谱纯；提取试剂乙醇、甲醇为分析纯（上海国药集团）。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	产地	采集时间	海拔高度/m
S1	重庆綦江打通镇大罗村	2012. 7	1 725
S2	重庆南川金佛山保护区	2012. 7	1 257
S3	云南马嵬坡县	2012. 7	1 870
S4	重庆南川水江镇	2012. 7	1 257
S5	云南大理永平县	2012. 7	2 425. 4
S6	云南大理苍山保护区	2012. 7	2 500
S7	浙江天目山保护区	2012. 5	480
S8	浙江杭州南高峰景区	2012. 6	243
S9	上海杨浦区第二军医大学药学院药圃	2012. 5	4. 5
S10	上海杨浦区海军医学研究所	2012. 5	4. 5
S11	山东济南市	2012. 5	156
S12	福建福州福建中医药大学时珍园	2012. 5	83. 8
S13	福建漳州师范学院	2012. 5	30
S14	安徽泾县	2012. 4	413
S15	上海浦东益大本草园植物园	2012. 6	4. 5
S16	湖南邵阳	2012. 6	248. 6
S17	上海宝山区杨行镇	2012. 6	4. 5

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Atlantis[®] T₃ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)；流动相乙腈 (A) -水 (B, 含 0.2% 甲酸)，梯度洗脱 (0 ~ 8 min, 6% ~ 15% A; 8 ~ 18 min, 15% ~ 20% A; 18 ~ 28 min, 20% ~

20% A; 28 ~ 40 min, 20% ~ 26% A; 40 ~ 51 min, 26% ~ 33% A; 51 ~ 65 min, 33% ~ 46% A; 65 ~ 75 min, 46% ~ 70% A; 75 ~ 85 min, 70% ~ 70% A; 85 ~ 90, 70% ~ 90% A)；柱温 30 ℃；体积流量 1 mL/min；检测波长 288 nm；进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液制备 取鼠曲草药材粉末 1 g，精密称定，置 100 mL 锥形瓶中，分别加入 25 mL 80% 甲醇，浸泡 8 h，超声提取 20 min，过滤，再次加入 25 mL 80% 甲醇，超声提取 20 min，过滤，合并滤液，减压浓缩后用 80% 甲醇定容至 10 mL，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，得供试品溶液。

2.3 对照品贮备液配制 分别精密称取 7 种成分适量，加 80% 甲醇制成每 1 mL 分别含原儿茶酸 260 g、绿原酸 353.6 g、咖啡酸 145 g、1, 5-二咖啡酰奎宁酸 1 644 g、木犀草素 288 g、芹菜素 135 g、山柰酚 168 g 的混合对照品溶液。

2.4 专属性考察 在“2.1”项色谱条件下，对照品、供试品及空白溶液的色谱图见图 1。由图可知，供试品在与对照品色谱图相同位置有吸收峰，空白溶液无干扰。

2.5 线性关系考察 精密量取对照品混合贮备液适量，依次逐级稀释，定容，制得 8 个浓度梯度的对照品混合溶液。在“2.1”项色谱条件下进样，以浓度为横坐标 (X)，以峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

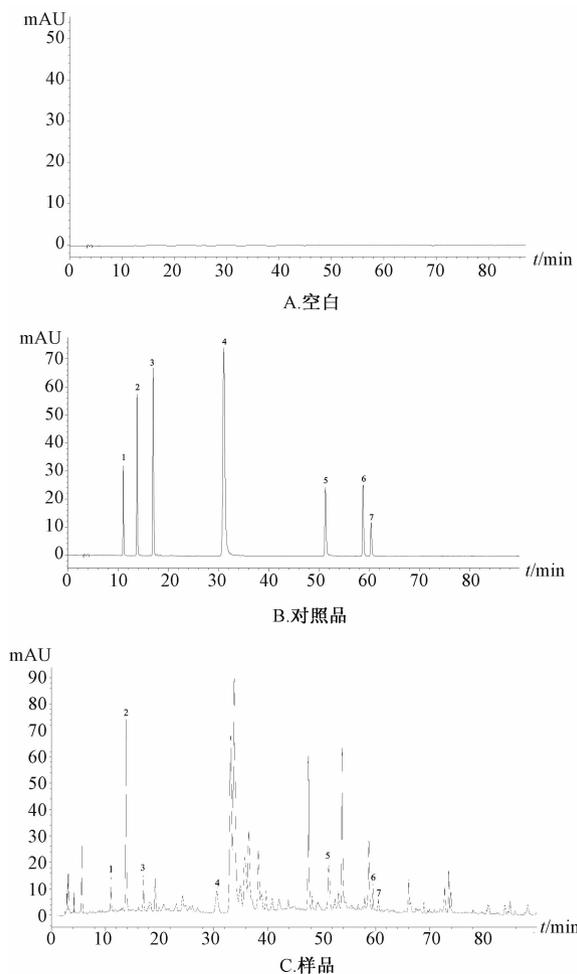
表 2 各种成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	R ²	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
原儿茶酸	Y = 17. 712X + 1. 703	0. 999 9	1. 02 ~ 260. 00
绿原酸	Y = 19. 935X + 7. 900	0. 999 8	1. 73 ~ 353. 60
咖啡酸	Y = 44. 431X + 4. 253	0. 999 9	0. 57 ~ 145. 00
1, 5-二咖啡酰奎宁酸	Y = 21. 535X - 63. 863	0. 999 9	6. 422 ~ 1 644. 00
木犀草素	Y = 20. 348X - 9. 901	0. 999 9	2. 81 ~ 288. 00
芹菜素	Y = 24. 909X - 1. 726	0. 999 8	1. 06 ~ 135. 00
山柰酚	Y = 15. 686X - 3. 571	0. 999 9	0. 41 ~ 168. 00

2.6 精密度试验 精密量取对照品溶液 10 μL，连续进样 6 次，测得原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、1, 5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、芹菜素、山柰酚峰面积 RSD 分别为 0.34%、0.26%、0.43%、0.26%、0.91%、0.403%、0.41%，表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 称取鼠曲草 (S16) 6 份，按



1. 原儿茶酸 2. 绿原酸 3. 咖啡酸 4. 1, 5-二咖啡酸奎宁酸
5. 木犀草素 6. 芹菜素 7. 山柰酚
1. protocatechuic acid 2. chlorogenic acid 3. caffeic acid 4. 1, 5-di-O-caffeoylquinic acid 5. luteolin 6. apigenin 7. kaempferol

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样，测得原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、1, 5-二咖啡酸奎宁酸、木犀草素、芹菜素、山柰酚峰面积RSD分别为2.85%、1.38%、1.99%、1.42%、2.52%、2.03%、2.38%，表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 称取鼠曲草(S16)，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，于0、4、8、12、24、36 h进样分析，测得原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、1, 5-二咖啡酸奎宁酸、木犀草素、芹菜素、山柰酚峰面积RSD分别为2.73%、2.67%、2.01%、0.67%、2.35%、2.30%、2.57%，表明供试品溶液在36 h内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验 称取鼠曲草(S16)干燥粉末1.0 g，精密称定，分别精密加入3个浓度梯度的对照品混合溶液，按“2.2”方法制备样品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样，计算回收率。原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、1, 5-二咖啡酸奎宁酸、木犀草素、芹菜素、山柰酚的平均加样回收率分别为100.15%、103.8%、98.81%、99.00%、99.14%、98.88%、98.58%，RSD分别为1.74%、1.43%、1.62%、1.34%、1.43%、0.88%、1.31%。

2.10 样品含有量测定 取不同产地样品各1.0 g，按“2.2”项下方法制备样品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样，计算含有量，结果见表3。

3 讨论

3.1 检测波长选择 对“2.1”项下对照品溶液在200~400 nm波长范围内进行扫描，发现在288 nm处各成分均有较好吸收，检测结果稳定，

表3 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=3)

编号	原儿茶酸	绿原酸	咖啡酸	1,5-二咖啡酸奎宁酸	木犀草素	芹菜素	山柰酚
S1	0.103	0.211	0.027	1.536	0.102	0.074	0.072
S2	0.083	0.348	0.041	1.964	0.219	1.995	0.052
S3	0.121	0.318	0.057	2.347	0.447	0.296	0.140
S4	0.161	0.957	0.084	4.104	0.815	0.461	0.220
S5	0.109	0.478	0.037	2.081	1.208	0.546	0.138
S6	0.086	0.545	0.031	2.779	0.372	0.256	0.114
S7	0.171	0.688	0.041	4.158	0.806	0.432	0.219
S8	0.071	0.166	0.028	1.684	0.116	0.048	0.045
S9	0.214	0.773	0.085	5.192	0.849	0.497	0.214
S10	0.339	2.722	0.275	9.826	0.770	0.411	0.188
S11	0.090	0.198	0.035	0.819	0.445	0.164	0.115
S12	0.257	1.166	0.127	8.073	0.677	0.405	0.218
S13	0.364	1.434	0.115	10.363	0.392	0.317	0.168
S14	0.294	1.429	0.135	5.579	0.444	0.282	0.208
S15	0.328	2.581	0.283	10.198	0.629	0.330	0.210
S16	0.182	0.269	0.075	2.169	0.308	0.197	0.107
S17	0.075	0.301	0.018	1.486	0.379	0.259	0.062

故选择其作为检测波长。

3.2 提取溶剂选择 本实验考察了水, 40%、60%、80%、100% 甲醇, 40%、60%、80% 乙醇, 无水乙醇作为提取溶剂, 发现 80% 甲醇提取使得各成分的峰面积明显升高, 因此选择 80% 甲醇-水作为提取溶剂。

3.3 流动相选择 黄酮和酚类化合物羟基较多, 使得色谱峰拖尾严重。本实验比较了乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.2% 甲酸、乙腈-0.1% 乙酸、乙腈-0.2% 乙酸, 结果发现乙腈-0.2% 甲酸水使分离效果、峰形较好, 故确定乙腈-0.2% 甲酸水为流动相。

3.4 结果分析 本实验采用 HPLC-UV 法建立了鼠曲草中 7 个成分含有量测定的方法, 并对 17 批鼠曲草药材进行含有量测定, 发现不同产地的鼠曲草存在含有量差异, 其中上海 (S10 和 S15) 及福建地区 (S12 和 S13) 的含有量较高, 为鼠曲草的质量控制奠定了基础, 为其资源开发利用及新药研发提供了依据。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典 (下册) [M]. 上海: 上海人民出版社, 1979: 2501.
[2] 孙 赞. 秋鼠曲草、蜂胶及灯台叶颗粒的化学成分研究 [D]. 云南: 云南中医学院, 2007.
[3] Aritomi M, Kawasaki T. Dehydro-para-asebotin, a new chalcone glucoside in the flowers of *Gnaphalium affine* D. Don[J]. *Chem Pharm Bull*, 1974, 22(8): 1800-1805.
[4] Morimoto M, Kumeda S, Komai K. Insect antifeedant fla-

vonoids from *Gnaphalium affine* D. Don [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(5): 1888-1893.
[5] Meragelmana T L, Silvaa G L, Mongelli E, et al. Ent-Pimarane type diterpenes from *Gnaphalium gaudichaudianum* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(4): 569-572.
[6] Waibel R, Achenbach H, Torrenegra R, et al. Diterpenes from *Gnaphalium pellitum* and *Gnaphalium graveolens* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(7): 2415-2418.
[7] Villagómez-Ibarra J R, Sánchez M, Espejo O, et al. Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* species. [J]. *Fütoterapia*, 2001, 72(6): 692-694.
[8] 王世宽, 潘 明, 任路遥. 大有开发前景的野生蔬菜-鼠曲草[J]. *食品研究与开发*, 2005, 26(4): 95-97, 98.
[9] 王世宽. 功能性鼠曲草清酒的研制[J]. *酿酒科技*, 2006, 11: 83-85.
[10] 黄爱芳, 林观祥, 潘晓军, 等. 鼠曲草挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. *海峡药学*, 2009, 21(7): 91-92.
[11] 王世宽, 潘 明, 任路遥. 鼠曲草的氨基酸含量的测定及营养评价[J]. *氨基酸和生物资源*, 2005, 27(1): 37-39.
[12] 吕 晴, 秦 军, 陈 桐, 等. 气相色谱-质谱法分析鼠曲草挥发油化学成分[J]. *贵州工业大学学报 (自然科学版)*, 2008, 37(5): 1-3, 10.
[13] 韦少宣, 夏爱军, 廖厚知, 等. HPLC 测定鼠曲草中槲皮素的含量[J]. *药学实践杂志*, 2012, 30(6): 451-453.
[14] 毛颐晴, 曹 玉, 王贞媛, 等. 佛耳草药材质量标准研究[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(10): 2468-2470, 25.
[15] Li J L, Huang D D, Chen W S, et al. Two new phenolic glycosides from *Gnaphalium affine* D. Don and their anti-complementary activity[J]. *Molecules*, 2013, 18(7): 7751-7760.
[16] Xi Z X, Chen W S, Wu Z J, et al. Anti-complementary activity of flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don[J]. *Food Chem*, 2012, 130(1): 165-170.