

[20] 黄玉玲, 马丽英, 荣先国, 等. 海洋真菌 *Aspergillus* sp. 中的苯甲醛衍生物研究[J]. 中草药, 2012, 43(5): 837-840.

[21] Kim K S, Cui X, Lee D S, *et al.* Inhibitory effects of benzaldehyde derivatives from the marine fungus *Eurotium* sp. SF-5989 on inflammatory mediators *via* the induction of heme oxygenase-1 in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 23749-23765.

[22] 计长柱. 灰绿曲霉 *Aspergillus glaucus* HB1-19 的次级代谢产物研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.

[23] Shi J, Liu J X, Kang D D, *et al.* Isolation and characterization of benzaldehyde derivatives with anti-inflammatory activities from *Eurotium cristatum*, the dominant fungi species in Fuzhuan brick tea[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(4): 6630-6636.

[24] Zhang P P, Jia C X, Deng Y L, *et al.* Anti-inflammatory prenylbenzaldehyde derivatives isolated from *Eurotium cristatum* [J]. *Phytochemistry*, 2019, 158: 120-125.

## UHPLC 法同时测定马兰草中 10 种成分

黄 雯<sup>1,2</sup>, 洪 静<sup>3</sup>, 刘亚平<sup>1</sup>, 叶喜德<sup>1\*</sup>, 彭玲珍<sup>3\*</sup>

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 上海市奉贤区中心医院, 上海 201400; 3. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330004)

**摘要:** **目的** 建立 UHPLC 法同时测定马兰草 *Kalimeris indica* L. 中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、木犀草素-7-*O*-芸香糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、大波斯菊苷、异绿原酸 C、木犀草素的含量。**方法** 马兰草 70% 甲醇提取物的分析采用 Welch-C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈-0.3% 冰醋酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 ℃; 检测波长 326 nm。**结果** 10 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $r>0.999\ 0$ ), 平均加样回收率 98.20%~101.00%, RSD 0.41%~2.13%。**结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于马兰草的质量控制。

**关键词:** 马兰草; 化学成分; UHPLC

中图分类号: R284.1      文献标志码: A      文章编号: 1001-1528(2021)06-1509-04  
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2021.06.022

## Simultaneous determination of ten constituents in *Kalimeris indica* by UHPLC

HUANG Wen<sup>1,2</sup>, HONG Jing<sup>3</sup>, LIU Ya-ping<sup>1</sup>, YE Xi-de<sup>1\*</sup>, PENG Ling-zhen<sup>3\*</sup>

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 201400, China; 3. Hospital Affiliated to Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish a UHPLC method for the simultaneous content determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, luteoloside, luteolin-7-*O*-rutinoside, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, apigenin-7-*O*-β-*D*-glucoside, isochlorogenic acid C and luteolin in *Kalimeris indica* L. **METHODS** The analysis of 70% methyl extract of *K. indica* was performed on a 40 ℃ thermostatic Welch-C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.3% acetic acid flowing at 0.3 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 326 nm. **RESULTS** Ten constituents showed good linear relationships within their own ranges ( $r>0.999\ 0$ ), whose average recoveries were 98.20%–101.00% with the RSDs of 0.41%–2.13%. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *K. indica*.

**KEY WORDS:** *Kalimeris indica* L.; chemical constituents; UHPLC

收稿日期: 2020-07-16

基金项目: 江西省学位与研究生教育教学改革研究项目 (JXYJG-2019-122); 江西中医药大学 2019 年校级教改招标专项课题 (2019)

作者简介: 黄 雯 (1985—), 女, 硕士, 从事临床药学研究。Tel: 18018820447, E-mail: 969071927@qq.com

\* 通信作者: 叶喜德 (1977—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药质量标准研究。Tel: 18942214278, E-mail: 552376722@qq.com

彭玲珍 (1986—), 女, 硕士, 主治医师, 从事临床药学研究。Tel: 13767005098, E-mail: 150214636@qq.com

马兰草 *Kalimeris indica* L. 为菊科马兰属植物，全草可入药，在我国大部地区均有分布，尤其是在贵州，民间又名田边菊、路边菊、鸡儿肠、鱼鳅串等<sup>[1]</sup>，富含多种维生素、矿物质、氨基酸等，营养价值较高，具有清热利湿、理气消食、解毒消肿的功效，水煎剂可用于治疗胃脘胀痛、感冒咳嗽等疾病<sup>[2]</sup>，其成分包括三萜类鞣质类、酚酸类、黄酮类、甾体类等<sup>[3-5]</sup>，具有抗炎、抗氧化等作用<sup>[6-7]</sup>。目前，有部分中成药（如马兰感寒胶囊、感清糖浆等）以马兰草为原料生产，在 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》中其质量控制方法比较简单，无含量测定项，一定程度上限制了其应用推广。目前，相关报道大多数停留在单一成分或某一类成分的测定<sup>[8-12]</sup>，而多成分含量测定的盛行对控制药材及其相关产品起导向性作用<sup>[13-16]</sup>。因此，本实验建立 UHPLC 法同时测定马兰草中 10 种成分，以期为该药材质量控制及应用推广提供参考。

1 材料

LC-30AD 型高效液相色谱仪、AUW220D 型电子天平（十万分之一，日本岛津公司）；BS-224S 型电子天平（万分之一，德国 Sartorius 公司）；KQ250-DB 型数控超声波清洗器（巩义市予华仪器有限责任公司）；KQ-5200 型水浴锅（昆山市超声仪器有限公司）。

绿原酸（批号 110753-201817，纯度 96.8%）、木犀草苷（批号 111720-201810，纯度 93.5%）、木犀草素（批号 111520-202006，纯度 94.4%）对照品均购于中国食品药品检定研究院。新绿原酸（批号 20180911，纯度 98.7%）、隐绿原酸（批号 20170611，纯度 99.2%）、木犀草素-7-*O*-芸香糖苷（批号 20171031，纯度 98.6%）、异绿原酸 A（批号 20180921，纯度 99.5%）、异绿原酸 B（批号 20181123，纯度 99.8%）、异绿原酸 C（批号 20180511，纯度 99.5%）、大波斯菊苷（批号 20180313，纯度 98.5%）对照品均购于成都曼思特生物科技有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯；水为超纯水；其余试剂均为分析纯。马兰草共 24 批，由江西中医药大学中药鉴定教研室胡生福副教授鉴定为正品，具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备 取药材粉末（过 4 号筛）1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 25 mL 70% 甲醇，称定质量，回流提取 30 min，冷

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	来源	采集时间	编号	来源	采集时间
S1	贵州安顺	2017. 06. 12	S13	安徽亳州	2017. 11. 09
S2	贵州安顺	2017. 07. 03	S14	安徽亳州	2017. 11. 18
S3	贵州安顺	2017. 07. 13	S15	安徽亳州	2017. 11. 29
S4	贵州安顺	2017. 07. 27	S16	安徽亳州	2017. 12. 03
S5	贵州安顺	2017. 08. 04	S17	湖北恩施	2018. 01. 08
S6	贵州安顺	2017. 08. 13	S18	湖北恩施	2018. 01. 14
S7	贵州安顺	2017. 08. 26	S19	湖北恩施	2018. 01. 28
S8	湖南张家界	2017. 09. 03	S20	湖北恩施	2018. 03. 08
S9	湖南张家界	2017. 09. 17	S21	湖北恩施	2018. 03. 18
S10	湖南张家界	2017. 09. 30	S22	湖北恩施	2018. 03. 31
S11	湖南张家界	2017. 10. 11	S23	湖北恩施	2018. 04. 05
S12	安徽亳州	2017. 11. 02	S24	湖北恩施	2018. 04. 27

却，70% 甲醇补足减失的质量，滤过，滤液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量，加甲醇制备成每 1 mL 分别含新绿原酸 0.013 8 mg、绿原酸 0.091 2 mg、隐绿原酸 0.018 0 mg、木犀草苷 0.027 6 mg、木犀草素-7-*O*-芸香糖苷 0.018 0 mg、异绿原酸 B 0.028 8 mg、异绿原酸 A 0.109 8 mg、大波斯菊苷 0.027 6 mg、异绿原酸 C 0.048 0 mg、木犀草素 0.002 4 mg 的溶液，即得。

2.3 色谱条件 Welch-C<sub>18</sub> 色谱柱（100 mm × 2.1 mm，1.7 μm）；流动相乙腈（A）-0.3% 冰醋酸（B），梯度洗脱（0~6 min，3%~15% A；6~13 min，15% A；13~15 min，15%~17% A；15~18 min，17%~18% A；18~22 min，18%~19% A；22~25 min，19% A；25~30 min，19%~29% A；30~35 min，29%~49% A；35~36 min，49%~80% A；36~38 min，80% A；38~39 min，80%~3% A；39~41 min，3% A；体积流量 0.3 mL/min；柱温 40 ℃；检测波长 326 nm；进样量 4 μL。色谱图见图 1。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品溶液，溶剂稀释至不同倍数后在“2.3”项条件下分析。以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）进行回归，结果见表 2，表明各成分在各自范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 取对照品溶液，在“2.3”项条件下进样 6 次，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、木犀草素-7-*O*-芸香糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、大波斯菊苷、异绿原酸 C、木犀草素峰面积 RSD 分别为 0.46%、1.01%、0.45%、1.20%、1.13%、0.76%、0.42%、1.50%、1.04%、1.42%，表明仪器精密度良好。

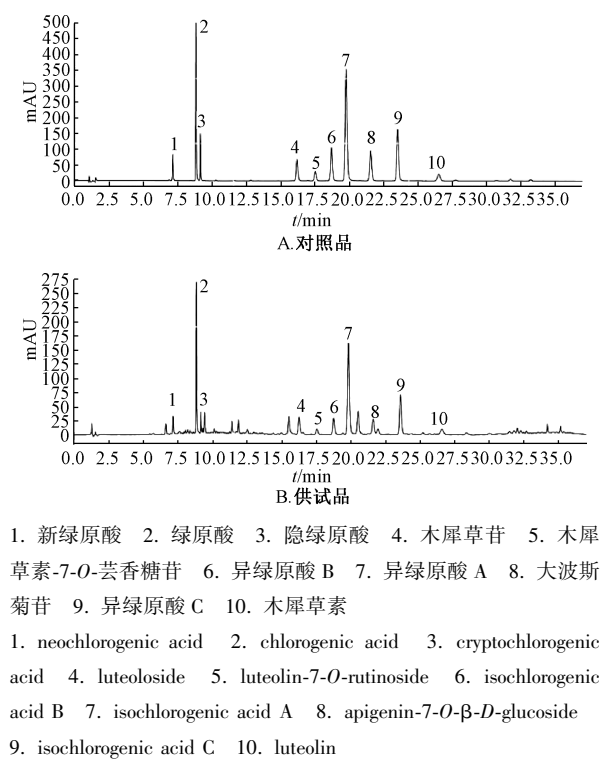


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of various constituents

表 2 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> )
新绿原酸	Y=29 430.426 5X+967.701 8	0.999 2	0.23~13.8
绿原酸	Y=2 700.658 3X-643.510 5	0.999 9	1.52~91.2
隐绿原酸	Y=82 222.960 1X+2 410.903 7	0.999 8	0.3~18.0
木犀草苷	Y=5 416.971 6X-846.428 7	0.999 9	0.46~27.6
木犀草素-7-O-芸香糖苷	Y=37 707.918 8X-2 481.116 0	0.999 8	0.3~18.0
异绿原酸 B	Y=4 585.402 4X+390.793 2	0.999 7	0.48~28.8
异绿原酸 A	Y=2 242.923 0X+709.508 0	0.999 4	1.83~109.8
大波斯菊苷	Y=4 954.369 3X-430.182 8	0.999 9	0.46~27.6
异绿原酸 C	Y=8 463.136 0X+1 841.586 5	0.999 3	0.8~48.0
木犀草素	Y=186 106.982 7X+424.499 5	0.999 6	0.04~2.4

“2.3”项条件下进样，计算回收率。结果，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、木犀草素-7-O-芸香糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、大波斯菊苷、异绿原酸 C、木犀草素回收率（RSD）分别为 98.20%（1.61%）、99.20%（0.51%）、99.25%（2.13%）、99.71%（0.58%）、99.95%（0.77%）、99.65%（0.57%）、99.61%（0.41%）、100.35%（1.22%）、99.91%（0.53%）、101.00%（0.78%）。

2.9 样品含量测定 取 24 批样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下分析，计算含量，结果见表 3。

3 讨论

本研究根据前期预实验发现，甙体类（如 α-

2.6 稳定性试验 取样品（S12），按“2.1”项下方法制备供试品溶液，于室温 0、2、4、8、12、24 h 在“2.3”项条件下进样，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、木犀草素-7-O-芸香糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、大波斯菊苷、异绿原酸 C、木犀草素峰面积 RSD 分别为 0.32%、1.31%、0.29%、1.24%、1.17%、0.56%、1.82%、0.72%、1.48%、1.60%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取样品（S2），按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.3”项条件下进样，测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、木犀草苷、木犀草素-7-O-芸香糖苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、大波斯菊苷、异绿原酸 C、木犀草素峰面积 RSD 分别为 1.43%、1.67%、1.42%、1.29%、1.01%、1.26%、1.04%、1.47%、1.62%、1.58%，表明该方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的样品 0.5 g，共 6 份，按 100% 水平加入各对照品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在

蒽甙醇-3-O-β-D-葡萄糖苷）和生物碱类（如金色酰胺醇）成分，采用液相色谱方法进行定量发现，色谱峰未出现目标化合物，可能由于单一成分含量过低或者由于样品处理方法、流动相选择而导致无法检测。本研究采用 UHPLC 法对马兰草多成分含量进行测定，该方法简单、准确性好。同时对不同来源的样品进行含量测定，在测定的 10 种成分中，发现总酚酸的含量要高于总黄酮，且单成分异绿原酸 A 的含量，在所有批次中平均含量最高，其次为绿原酸。马兰草是一种药食两用植物，具有抗炎抗氧化等作用，酚酸和黄酮类化合物往往都具有此功效，测定马兰草中酚酸和黄酮化合物的含量，以期对于日后评价量效关系，进一步拓展和推广马兰

表 3 各成分含量测定结果 (mg/g)

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

样品	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	木犀草苷	木犀草素-7-O- 芸香糖苷	异绿原 酸 B	异绿原 酸 A	大波斯 菊苷	异绿原 酸 C	木犀 草素	总酚酸 含量	总黄酮 含量
S1	0.194	0.852	0.106	0.707	0.532	0.410	2.776	0.414	1.201	0.182	5.538	1.834
S2	0.174	0.685	0.075	0.599	0.484	0.161	1.241	0.322	0.419	0.178	2.754	1.583
S3	0.126	0.451	0.060	0.427	0.198	0.085	0.469	0.282	0.161	0.072	1.353	0.979
S4	0.110	0.303	0.053	0.213	0.313	0.051	0.220	0.149	0.110	0.123	0.847	0.797
S5	0.161	0.997	0.117	0.984	0.360	0.313	1.476	0.255	0.974	0.176	4.037	1.776
S6	0.164	0.585	0.100	0.174	0.271	0.163	0.700	0.174	0.355	0.070	2.068	0.688
S7	0.110	0.499	0.077	0.541	0.384	0.171	0.728	0.201	0.514	0.161	2.099	1.287
S8	0.071	0.182	0.035	0.259	0.288	0.066	0.264	0.098	0.130	0.319	0.748	0.964
S9	0.066	0.302	0.062	0.295	0.259	0.156	0.334	0.077	0.277	0.121	1.197	0.752
S10	0.075	0.556	0.069	0.394	0.271	0.175	0.538	0.257	0.337	0.131	1.749	1.054
S11	0.297	2.096	0.129	0.507	0.277	0.332	3.661	0.391	1.179	0.080	7.694	1.255
S12	0.229	1.269	0.136	0.880	0.256	0.345	2.117	0.312	0.863	0.167	4.959	1.616
S13	0.084	0.214	0.047	0.146	0.201	0.089	0.306	0.090	0.161	0.127	0.900	0.564
S14	0.130	0.871	0.097	0.656	0.277	0.359	1.353	0.147	0.649	0.213	3.461	1.293
S15	0.110	0.460	0.080	0.199	0.376	0.127	0.498	0.110	0.276	0.164	1.550	0.848
S16	0.109	0.701	0.106	0.078	0.242	0.415	0.971	0.055	0.724	0.093	3.027	0.467
S17	0.165	1.910	0.147	0.924	0.228	0.429	1.431	0.330	0.815	0.063	4.897	1.545
S18	0.090	0.687	0.079	0.313	0.288	0.184	0.533	0.119	0.352	0.128	1.924	0.848
S19	0.106	1.151	0.119	0.440	0.339	0.420	0.985	0.076	0.673	0.191	3.454	1.046
S20	0.146	0.846	0.103	0.368	0.231	0.355	1.091	0.152	0.600	0.188	3.141	0.939
S21	0.106	1.133	0.115	0.297	0.347	0.407	1.032	0.050	0.669	0.211	3.462	0.904
S22	0.135	1.371	0.106	0.590	0.259	0.312	1.832	0.278	0.727	0.109	4.484	1.236
S23	0.108	1.179	0.117	0.302	0.344	0.408	1.059	0.049	0.681	0.214	3.551	0.908
S24	0.136	2.050	0.160	0.370	0.397	0.726	1.537	0.068	1.147	0.217	5.756	1.052
平均值	0.133	0.890	0.096	0.444	0.309	0.277	1.131	0.186	0.583	0.154	3.110	1.093

草的使用提供参考。

参考文献:

[ 1 ] 《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 886-889.

[ 2 ] 张 美, 周小伟, 张雨馨, 等. 中药马兰化学成分与药理作用的研究进展[J]. 中国医药导报, 2018, 15(31): 47-52.

[ 3 ] 龚小见, 王道平, 周 欣, 等. 马兰茎和根的挥发性化学成分研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2112-2115.

[ 4 ] 王国凯, 刘劲松, 张聪仞, 等. 马兰化学成分研究[J]. 中药材, 2015, 38(1): 81-84.

[ 5 ] 张玉梅, 宋启示, 冯 峰. 马兰的化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1551-1552.

[ 6 ] 许文清, 龚小见, 周 欣, 等. 马兰化学成分及生物活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23): 3172-3174.

[ 7 ] 徐 菁, 高鸿悦, 马淑丽, 等. 马兰化学成分及生物活性研究[J]. 中草药, 2014, 45(22): 3246-3250.

[ 8 ] 龚小见, 赵 超, 周 欣. 黔产马兰草总皂苷含量测定研究[J]. 贵州师范大学学报 (自然科学版), 2020, 38(2):

55-58.

[ 9 ] 贤景春, 李志旭. 马兰草总生物碱提取工艺的优化[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(2): 162-164.

[10] 陈华国, 周 欣, 赵 超, 等. 马兰草抗炎活性部位量效关系及高效液相色谱-效关系研究[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(14): 1190-1193.

[11] 陈华国, 蒋荣斌, 龚小见, 等. 马兰草高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 医药导报, 2013, 32(1): 71-75.

[12] 蒋荣彬, 周 欣. 马兰的薄层色谱研究[J]. 贵州师范大学学报 (自然科学版), 2012, 30(3): 1-3.

[13] 刘 雯, 郭海姣, 刘进宝, 等. HPLC 法同时测定外感风痧颗粒中 9 种成分[J]. 中成药, 2020, 42(8): 1987-1991.

[14] 陈 莹, 黄锦芳, 林 娜, 等. HPLC 法同时测定金线莲中 6 种成分[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2222-2227.

[15] 延春霞, 周 健, 金 城, 等. 基于多指标成分多波长测定的防暑喷雾剂质量评价方法研究[J]. 中成药, 2013, 35(4): 713-717.

[16] 王 进, 张 平, 唐海涛, 等. HPLC 法同时测定生脉注射液 中 9 种成分[J]. 中成药, 2013, 35(3): 508-512.