苍耳子中酚酸类化合物的鉴别及绿原酸的含量测定

杨柳[1*]，吴金雄[1]，许舜军[2]，苏芝军[1,3]，曾星[1]，黎雄[1]，陈璐璐[1]
（1. 广州中医药大学第二附属医院 广东省中医药科学院，广州 510120；
2. 澳门科技大学药物及健康应用研究所，澳门 999078；3. 陕西省府谷县人民医院，陕西 府谷 719400）

[摘要] 目的：鉴别苍耳子药材中的酚酸类化合物，比较和分析不同产地苍耳子中绿原酸的含量，建立苍耳子的质量控制方法。方法：根据化合物的紫外光谱、液相色谱保留时间及质谱数据等综合信息鉴别苍耳子药材中的酚酸类成分，采用 UPLC 对苍耳子中绿原酸的含量进行测定，流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液，检测波长为 327 nm，流速为 0.4 mL·min^{-1}，柱温35 ℃。结果：对苍耳子药材中的 9 种酚酸类成分的化学归属进行了指认，并测定了 24 批苍耳子药材中绿原酸的含量，结果绿原酸在 3.5 ~ 350 mg·L^{-1}具有良好的线性关系（R^2 = 0.999 9），平均回收率（n = 6）为 101.7%。结论：苍耳子中特征化学成分的识别可以显著增强其质量控制的准确性和专属性，而快速准确的指标成分含量测定方法，也是苍耳子质量控制的重要检测手段，定性与定量两方面结合，对于苍耳子药材及其相关产品的质量检测和控制具有重要意义。

[关键词] 苍耳子；酚酸；鉴别；含量测定；超高液相色谱
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)19-0085-05

Characterization of Phenolic Acids and Quantitative Analysis of Chlorogenic Acid Contained in Fructus Xanthii

YANG Liu[1*], *WU Jing-xiong*[1], *XU Shun-jun*[2], *SU Zhi-jun*[1,3], *ZENG Xing*[1], *LI Xiong*[1], *CHEN Lu-lu*[1]
(1. *Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou* 510120, *China*;
2. *Macau Institute for Applied Research in Medicine and Health, Macau University of Science and Technology, Macau* 999078, *China*; 3. *Fugu People's Hospital, Fugu* 719400, *China*)

[Abstract] **Objective:** To assign phenolic acids and determine the content of chlorogenic acid contained in Fructus Xanthii collected from different product areas, and establish a practical quality control method for the herbal drug. **Method:** Major phenolic acids of this herb were identified based on their UV absorption, retention time and mass fragmentation characteristics. The content of chlorogenic acid was determined using ultra-performance liquid chromatography-ultraviolet detector (UPLC-UV). The mobile phase consists of 0.1% phosphoric acid in water as solvent A and methanol as solvent B. The detection wavelength is set at 327 nm and the column temperature at 35 ℃. The mobile phase flow rate is 0.4 mL·min^{-1}. **Result:** A total of 9 major chromatographic peaks were assigned as phenolic acids, and peak area vs. content of chlorogenic acid showed a good linearity in the range of 3.5-350 mg·L^{-1} with a correlation coefficient of 0.999 9 and the average recovery was 101.7%. **Conclusion:** The established method is suitable for determining the content of chlorogenic acid contained in Fructus Xanthii and can be used to effectively control the quality of the herb; and assigning major characteristic peaks can significantly enhance specificity and accuracy in accessing the quality of herb.

[Key words] Fructus Xanthii; phenolic acid; identification; determination; UPLC

[收稿日期] 20101117(003)
[通讯作者] * 杨柳，研究员，硕士研究生导师，从事中药活性成分及质量评价研究，E-mail: yangliume@yahoo.com.cn，Tel: 020-39318778

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

苍耳子为菊科植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. ex Widd 的干燥成熟带总苞的果实，其性辛、苦、温、有毒，归肺经[1]。在临床上主要用于风寒头痛、鼻渊流涕、风疹瘙痒、湿痹拘挛的治疗，为历代治疗鼻渊及头痛的要药[2]。历版《中国药典》关于苍耳子均以性状鉴别等为指标进行质量控制，并未收载其定量标准[1]。苍耳子中含有大量的有机酸类化合物[3-4]，这类化合物被证实具有良好的抗氧化、抗炎、抗微生物、酶抑制作用、保护肝细胞、抑制血小板凝集等生物活性[5]，是苍耳子发挥临床疗效的重要药效组分。绿原酸是苍耳子中含量最大的有机酸，建立其含量测定方法，作为药材及相关产品质量评价的有效手段之一，对于促进和提升苍耳子质量控制的现有水平非常重要。本文应用液相色谱-飞行时间串联质谱分析苍耳子中化学成分，根据已知对照品、化合物的分子离子峰信息，结合紫外光谱、色谱保留时间以及参考文献共指认了 9 个有机酸类化合物，并采用 UPLC 法测定了 24 批不同产地和收集地苍耳子药材中绿原酸的含量。

1 材料

Waters Acquity UPLC（配有在线脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器），QSTAR XL 型液相色谱串联飞行时间质谱仪（美国 ABI 公司），Branson8510 超声波清洗仪（40 kHz）；1/10 万电子分析天平。甲醇购自 Fisher 公司，磷酸购自广州化学试剂厂，均为色谱级；提取用甲醇购自广州化学试剂厂，为分析纯；超纯水经过 Milli-Q 系统纯化制备。

苍耳子药材于药材主产地及各大药材集散地收集，由本院药剂科冯倩茹副主任药师鉴定，药材来源见表 1。原儿茶酸对照品（批号 809-200102）购自中国药品生物制品检定所。新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸（批号 090619，纯度按 HPLC 面积归一化法均≥98%）购自成都普瑞法科技开发有限公司。

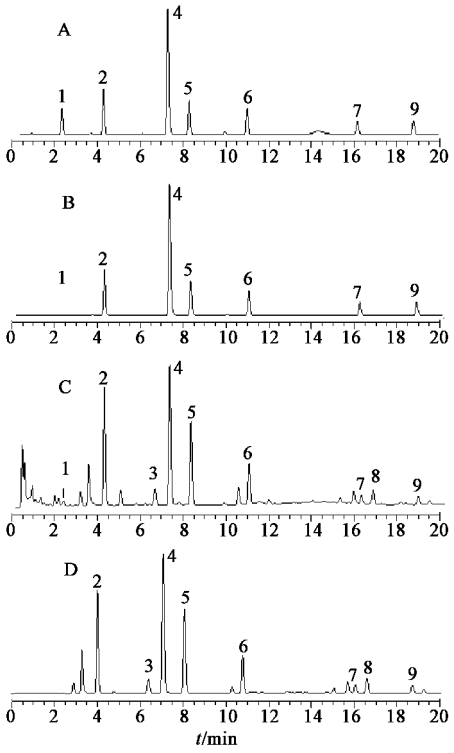
2 方法与结果

2.1 色谱分析条件 色谱柱 Agilent SB-C_{18}（2.1 mm × 50 mm，1.8 μm 批号 827700-902）；流动相 A 为 0.1% 磷酸水溶液（pH 2.3），B 为甲醇；梯度洗脱条件（0 ~ 2 min，3% ~ 5% B；2 ~ 10 min，5% ~ 17% B；10 ~ 11 min，17% ~ 20% B；11 ~ 14 min，20% ~ 28% B；14 ~ 17 min，28% ~ 30% B；17 ~ 20 min，30% ~ 35% B）。流速 0.4 mL·min^{-1}，进样量 5 μL，柱温为 35℃，检测波长 220，327 nm。理论塔板数按绿原酸计达 26 294。见图 1。

表 1 苍耳子 UPLC 特征图谱中主要酚酸类成分的指认

峰号	t_R /min	λ_{max} /nm	化合物	[M-H]$^-$
1*	2.38	217，260	原儿茶酸	153
2*	4.31	240，325	新绿原酸	353
3	6.68	240，321	咖啡酸	179
4*	7.35	240，326	绿原酸	353
5*	8.33	240，326	隐绿原酸	353
6*	11.03	242，323	1,3-二咖啡酰奎宁酸	515
7*	16.13	242，328	3,5-二咖啡酰奎宁酸	515
8	16.62	243，328	1,5-二咖啡酰奎宁酸	515
9*	18.78	243，328	4,5-二咖啡酰奎宁酸	515

* 参照化学对照品。



A. 220 nm 下对照品；B. 327 nm 下对照品；C. 220 nm 下供试品；D. 327 nm 下供试品

图 1 苍耳子药材及对照品的 UPLC 特征图谱

2.2 液质联用分析条件 液相条件参见 2.1 项，其中 0.1% 磷酸采用 0.1% 甲酸代替；柱后分流，分流比 1∶10；进样量 20 μL，柱温为 35 ℃；ESI 源，负离子检测；IS −4.0 kV；GAS1 55；GAS2 50；CUR 20；TEM

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

350 ℃;DP -60 V;FP -250 V;DP2 -15 V;CEM -2.6 Kv;TOF 扫描质量范围*m/z* 100-1 000。

2.3 供试品溶液的制备 苍耳子药材 60 ℃干燥 12 h后,粉碎,过 2 号筛。精密称取 0.5 g 置于具塞锥形瓶中,加入 50 mL 50% 甲醇,称重。超声提取 30 min,放至室温后,补足质量。精密吸取上清液适量,稀释 5 倍,离心,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 对照品溶液的制备 取原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸对照品适量,精密称定,分别置于 5 mL 量瓶中,加 20% 乙腈至刻度,摇匀,制得含 1 g·L^{-1}的对照品溶液。

2.5 有机酸类化合物的鉴别 为了尽可能多地了解苍耳子提取物中各成分的结构信息,本研究采用液相色谱串联飞行时间质谱对样品进行了分析。根据已知对照品、化合物的分子离子峰信息,结合紫外光谱、色谱保留时间等信息共指认了 9 个色谱峰的化学归属。分析和指认的结果见表 1。

峰 1,2,4,5,6,7,9 通过参照对照品的色谱保留时间、紫外光谱及结合分子量的相关信息,分别鉴定为原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸。

3 号峰的二级质谱扫描图见图 2,该化合物 $[M-H]^-$离子的 *m/z* 为 179,$[M-H]^-$离子的二级质谱中丰度较大的离子为 *m/z* 179(42) 和 135(100),紫外最大吸收波长为 242,321,295 nm 处有肩峰。根据质谱和紫外光谱的相关数据,结合文献[6],推断该成分为咖啡酸。

峰 8 与 1,3-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-二咖啡酰奎宁酸互为同分异构体,其二级质谱扫描图见图 2,该化合物 $[M-H]^-$离子的 *m/z* 为 515,$[M-H]^-$离子的二级质谱中丰度较大的离子为 *m/z* 515(18),353(100),335(4),191(28),179(3) 和 161(2)。紫外吸收谱与二级质谱与其他二咖啡酰奎宁酸类似,紫外最大吸收波长为 243,328,290 nm 处有一肩峰。根据质谱和紫外光谱的相关数据,结合文献[3],推断该组分为 1,5-二咖啡酰奎宁酸。

2.6 绿原酸的含量测定

2.6.1 线性关系考察 取绿原酸对照品溶液适量,依次稀释为 350,140,35,17.5,11.7,7,4.4,3.5 mg·L^{-1},分别进样分析,记录流出曲线。以绿原酸峰面积对样品浓度作图,得到绿原酸校正曲线为 $Y = 1.91e+004X + 5.35e+003$ ($R^2 = 0.999\ 9$),线性范围 3.5 ~ 350 mg·L^{-1}。

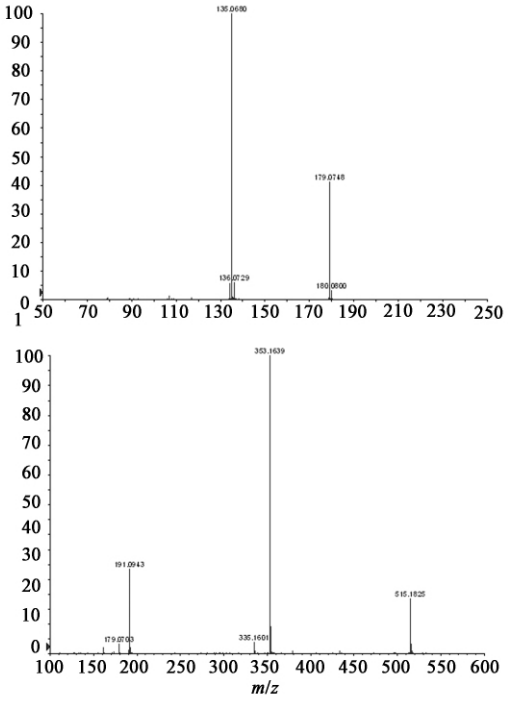


图 2 峰 3 和峰 8 的二级子离子扫描图

2.6.2 定量下限与检测下限 取绿原酸储备液用 20% 乙腈逐级稀释,按 UPLC 条件分析,记录样品每次测到的信号强度与噪音的比值。本实验条件下测得绿原酸的定量下限和检测下限分别为 2.9,1.95 pg。

2.6.3 精密度 取绿原酸中浓度质控标准品溶液进行日内和日间精密度考察。对于日内精密度,连续进样 6 次;对于日间精密度,连续 3 天同法测定,计算其含量的 RSD。绿原酸的日内和日间测定 RSD 分别为 0.36%,0.9%。

2.6.4 重复性 精密称取苍耳子药材样品 6 份,按供试品溶液制备项下提取方法配制,进样测定,峰面积 RSD 1.52%。

2.6.5 稳定性 取供试品溶液测定含量,按上述色谱条件,分别于 0,2,4,8,12,27 h 进样测定,考察其稳定性,RSD 1.41% 结果表明供试品溶液在 27 h 化学性质稳定。

2.6.6 加样回收率 取已测知含量的苍耳子样品 6 份,加入等同于药材样品含量的绿原酸。按照供

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

试品制备项下操作，依前述色谱条件进样分析，计算加样回收率 101.7%，RSD 2.93。

2.7 样品测定 依照供试品溶液制备方法，对不同产地、批次的苍耳子药材进行处理，依上述色谱条件进行测定，测得的绿原酸含量见表 2。

表 2 苍耳子药材中绿原酸的含量测定

No.	收集时间	收集地点	外观	绿原酸 /mg·g^{-1}
1	20080602	广东康美	-	2.42
2	20080630	广东康美	-	3.59
3	20080811	广东康美	-	2.93
4	20081015	广东康美	+	1.25
5	20081124	河北邯郸	-	1.48
6	20081124	河北安国	+	2.27
7	20081124	河北安国	-	1.46
8	20090122	吉林长春	-	2.46
9	20090201	陕西府谷	-	1.75
10	20090201	陕西府谷	-	2.66
11	20090320	广东清平	-	0.48
12	20090408	广西玉林	-	0.72
13	20090414	浙江义乌	-	0.25
14	20090429	湖南长沙	-	1.58
15	20090505	浙江杭州	-	1.71
16	20090507	广东康美	-	2.73
17	20090514	广西南宁	-	1.74
18	20090526	江西南昌	-	1.56
19	20090628	青海西宁	-	2.26
20	20090720	陕西西安	-	1.91
21	20090722	上海	-	2.33
22	20090819	安徽合肥	-	2.01
23	20090824	河北荷泽	-	1.95
24	20090905	江西江	-	2.15

注 “+”为有刺，“-”为去刺。

3 小结与讨论

苍耳子药材提取物中含有大量的酚酸类化合物，包括咖啡酸、单咖啡酰奎宁酸、二咖啡酰奎宁酸及三咖啡酰奎宁酸等，这类化合物采用 ESI 负离子模式检测灵敏度很高。本研究根据 ESI 负离子检测获得的准分子离子峰所提供的化合物相对分子质量及选择离子二级扫描质谱碎片信息，结合紫外光谱、液相色谱保留时间以及参考对照品，对苍耳子 UPLC 分离出的一系列酚酸化合物进行了分析和鉴定，确认了苍耳子药材提取物中 9 个酚酸的化学归属。

研究还应用 UPLC 测定了 24 批不同产地和收集地苍耳子药材中绿原酸的含量。结果显示各地药材绿原酸含量偏差较大。以在广东康美收集的批号为 20080630 的药材样品绿原酸含量最高，为 3.59 mg·g^{-1}，而从广州清平市场，广西玉林，浙江义乌收集的苍耳子，绿原酸含量均较低，其中广西玉林的药材含量只有 0.25 mg·g^{-1}，远远偏离于其他药材样品，说明各地流通的苍耳子药材质量非常不稳定。因此测定苍耳子药材中绿原酸的含量，作为评判其质量优劣的依据之一是十分必要的。

绿原酸由于其特殊的分子结构——具有酯键、不饱和双键及多元酚 3 个不稳定部分，极易受热转化为异构体，因此在提取中应尽量避免高温、强光及长时间加热。本研究在提取方法方面考察了加热回流提取法、超声提取法、索氏提取法，提取溶媒方面考察了不同比例的甲醇、乙醇、水。通过逐步优化，结果表明，采用 50% 甲醇超声振荡不仅提取效率高，还可有效避免绿原酸在提取过程中的热不稳定。

中药的质量控制是保证中药的安全、有效、质量稳定可靠的必要条件。中药的质量评价理应反映中药多成分的特色，从整体出发，系统、综合地分析中药的真伪优劣。药材中特征成分化学归属的准确识别可以明显增强质量控制的准确性和专属性，再结合快速准确的指标成分含量测定，定性鉴别结合定量分析，可提供较为全面的信息，对促进提升苍耳子药材及其相关产品的质量检测和控制水平具有重要意义。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 1011.
[2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 1071.
[3] 韩婷，李慧梁，胡园，等. 苍耳子中酚酸类化合物及不同品种和居群苍耳子中总酚酸含量的测定 [J]. 中西医结合学报，2006，4(2): 194.
[4] 杨柳，苏芝军，许舜军，等. UPLC 法同时测定苍耳子中 4 种酚酸类成分的含量 [J]. 药学学报，2010，45(12): 1537.
[5] 赵昱，赵军，李湘萍，等. 咖啡酰奎尼酸类化合物研究进展 [J]. 中国中药杂志，2006，31(11): 869.
[6] 田晨煦，徐小平，廖丽云，等. 高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定绿原酸及其相关杂质 [J]. 色谱，2007，25(4): 496.

[责任编辑 蔡仲德]

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net