

一测多评法测定菊苣中绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的量

朱春胜, 林志健, 牛红娟, 王雪洁, 王红坡, 孙小霞, 王 雨, 周 月, 聂安政, 肖明良, 张 冰*
北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘 要: 目的 建立菊苣 *Cichorium intybus* 中绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的一测多评方法。方法 以秦皮乙素为内参物, 分别建立绿原酸、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的相对校正因子, 并用该校正因子进行绿原酸、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 量的计算 (计算法), 实现一测多评; 同时采用外标法测定菊苣中 4 种成分的量 (实测法), 并比较计算值与实测值间的差异性, 验证所建立方法的准确性、适用性和重复性。结果 8 批菊苣中绿原酸、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 量的计算值与实测值无显著差异。实验建立的菊苣中绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的一测多评法准确性、可行性、重复性好。结论 一测多评法测定菊苣中绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的质量评价模式得到了验证, 可用于菊苣药材的质量控制。

关键词: 一测多评; 菊苣; 绿原酸; 秦皮乙素; 异绿原酸 B; 异绿原酸 A

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)04-0666-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.04.023

Simultaneous determination of chlorogenic acid, aesculetin, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid A in *Cichorii Herba* by QAMS

ZHU Chun-sheng, LIN Zhi-jian, NIU Hong-juan, WANG Xue-jie, WANG Hong-po, SUN Xiao-xia, WANG Yu, ZHOU Yue, NIE An-zheng, XIAO Ming-liang, ZHANG Bing

School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To establish the quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) method to determine the content of chlorogenic acid, aesculetin, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid A in *Cichorii Herba* (chicory). **Methods** Selecting aesculetin as the internal reference substance, the relative correction factors (RCF) of chlorogenic acid, isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid A were established respectively, and then the contents of the three constituents were calculated by RCF, to achieve the quality of chicory through QAMS. At the same time, the external standard method was used to determine the content of four constituents in chicory and compare the difference between calculated values and measured values, so as to verify the construction method for accuracy, applicability, and repeatability. **Results** No significant difference was observed in chlorogenic acid, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid A from eight batches of chicory in the quantitative results by these two methods. The validated QAMS method had good precision, reproducibility, and reliability. **Conclusion** The established QAMS method is suitable and feasible for the quality control of chicory.

Key words: quantitative analysis of multi-components by single marker; *Cichorii Herba*; chlorogenic acid; aesculetin; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid A

菊苣 *Cichorii Herba* 为菊科 (Compositae) 植物毛菊苣 *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet. 或菊苣 *C. intybus* L. 的干燥地上部分或根, 具有清肝利胆、健胃消食、利尿消肿的作用^[1]。菊苣中主要含

有酚酸、香豆素、倍半萜、三萜、多糖、生物碱类等成分^[2-3]。研究发现菊苣中香豆素类中的秦皮甲素、秦皮乙素具有保肝作用^[4-5]; 酚酸类中的绿原酸具有抗菌、抗病毒、抗诱变、抗过敏作用^[6]; 异绿

收稿日期: 2015-07-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403152); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20130013120001, 20120013130002); 北京中医药大学青年教师专项自主课题 (2013-QNJSZX008); 北京中医药大学科研创新团队 (2011-CXTD-014); 北京中医药大学自主课题项目 (2015-JYB-XS074)

作者简介: 朱春胜 (1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药防治代谢性疾病的研究。Tel: 15910387220 E-mail: zhuchunsheng6@163.com

*通信作者 张 冰, 医学博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药防治代谢性疾病的基础与临床研究, 中药药性理论实质研究, 中药不良反应与警戒理论研究。Tel: (010)64286335 E-mail: zhangbing6@263.net

原酸 B 和异绿原酸 A 具有潜在的降尿酸作用^[7]。目前《中国药典》2010 年版中对菊苣相应成分测定中还未制定标准,而上述成分在菊苣荷药材中的量较高且活性较好,具有代表性,有必要将其纳入菊苣药材质量控制和评价体系。

中药的多成分、多功效的作用特点,决定着单一成分难以表达中药的内在质量,因此,应选择多成分、多指标的测定,对与功效相关的化学成分进行全面综合的评价。但多指标质量控制面临着对照品短缺及相应的检测成本费用高等问题,为解决这一问题,中医药领域提出了一种新的评价中药内在质量模式,即一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS)。QAMS 以样品中某一成分为内参物,建立该成分与其他成分间的相对校正因子,通过相对校正因子计算其他成分量^[7]。该方法具有快速、简便并能同时实现多成分同步测定等优点^[8-10],已被《中国药典》2010 年版收录^[1]。因此本实验采用 QAMS 技术,以秦皮乙素为内参物,计算绿原酸、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的相对校正因子,建立菊苣药材的 QAMS 方法,为菊苣质量控制提供新的评价模式。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-2010AHT 高效液相色谱系统(日本岛津公司),Agilent 1100 series 液相色谱仪系统(美国 Agilent 公司),Waters 1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm),Agilent Eclipse XOB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm),日本资生堂 CAPCELL PAK-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);Sartorius BT 125D 1/10 万分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);KQ-500DE 型数控超声仪(昆山市超声仪器有限公司);DFT-100 中药粉碎机(温岭市大德中药机械有限公司)。

1.2 材料

绿原酸(批号 MFCD00003862,质量分数≥95%)购自 Sigma 公司;异绿原酸 A、异绿原酸 B、秦皮乙素(质量分数均≥99.0%)购于成都普瑞科技有限公司。

菊苣药材采收或购自新疆、辽宁、山东等地。经北京中医药大学中药学院中药鉴定教研室闫永红教授鉴定为菊科植物菊苣 *Cichorium intybus* L. 的干燥地上部分。甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,

其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 HPLC 色谱条件

Agilent Zorbax SB-C₁₈, 检测波长 254 nm, 柱温 30℃, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μL。流动相为 0.1%甲酸水(A)-甲醇(B), 梯度洗脱: 0~2 min, 23% B; 2~15 min, 23%~33% B; 15~20 min, 33%~40% B; 20~27 min, 40%~42% B; 27~40 min, 42%~60% B。在上述色谱条件下, 各组分分离度良好, 色谱图见图 1。

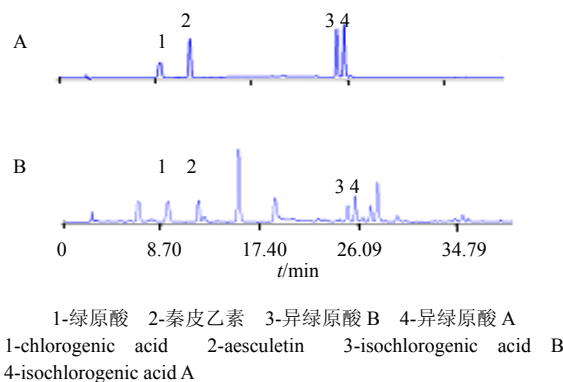


图 1 混合对照品 (A) 和菊苣样品 (B) 的 HPLC 图
Fig.1 HPLC of mixed reference substances (A) and chicory sample (B)

2.2 方法学考察

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 对照品适量,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解,定容至刻度,配制成质量浓度为绿原酸 25.5 ng/μL、秦皮乙素 32.3 ng/μL、异绿原酸 B 26.8 ng/μL、异绿原酸 A 26.8 ng/μL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称定菊苣药材粉末(过 40 目筛) 1 g, 置 25 mL 量瓶中,加入 100%甲醇 25 mL, 密塞,超声提取 30 min, 100%甲醇补足减失的质量,取上清液过 0.45 μm 滤膜,即得。

2.2.3 线性关系考察 取混合对照品溶液,精密吸取上述混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL 分别进样,以进样量对峰面积积分值进行回归处理,得到绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的标准曲线,结果见表 1。

2.2.4 菊苣中待测成分相对校正因子的计算 在“2.1”项确定的 HPLC 色谱分析条件下,精密吸取“2.2.1”项混合对照品溶液 10 μL,测定各成分的峰面积。以秦皮乙素为内参物,根据相对校正因子计算公式,分别计算绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 的相对校正因子,结果见表 2。

表 1 绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的标准曲线

Table 1 Standard curves of chlorogenic acid, aesculetin, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid A in chicory

化合物	标准曲线	R^2	线性范围/ μg
绿原酸	$Y=1\,076\,497\,X-1\,017.76$	0.999 7	0.025 5~0.510 0
秦皮乙素	$Y=1\,442\,089\,X-2\,147.73$	0.999 8	0.032 3~0.645 0
异绿原酸 B	$Y=1\,654\,120\,X-2\,359.08$	0.999 8	0.026 8~0.535 0
异绿原酸 A	$Y=1\,896\,033\,X-4\,229.39$	0.999 9	0.026 8~0.535 0

表 2 绿原酸、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的相对校正因子

Table 2 RCF of chlorogenic acid, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid A

编号	相对校正因子		
	绿原酸/秦皮乙素	异绿原酸 B/秦皮乙素	异绿原酸 A/秦皮乙素
1	1.327 2	0.869 6	0.763 8
2	1.335 9	0.873 2	0.766 7
3	1.334 6	0.874 2	0.768 3
4	1.335 3	0.871 3	0.764 1
5	1.336 3	0.872 0	0.766 1
平均值	1.333 9	0.872 1	0.765 8
RSD/%	0.25	0.18	0.22

2.2.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL 分别于配制后的 0、2、8、12、24、36 h 记录峰面积, 绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B、异绿原酸 A 的 RSD 分别为 1.25%、1.34%、1.43% 和 1.32%。表明处理后的供试品溶液在 36 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 精密称取同一菊苣药材粉末 1 g, 共 6 份, 制备供试品溶液, 依法测定, 计算绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B、异绿原酸 A 质量分数的 RSD 分别为 0.27%、4.24%、2.53%、3.10%, 表明该方法的重复性良好。

2.2.7 精密度试验 精密吸取上述混合对照品溶液 10 μL , 在上述色谱条件下, 重复进样 7 次, 测得峰面积, 计算峰面积的 RSD, 绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B、异绿原酸 A 的 RSD 分别为 0.74%、0.96%、0.51%、0.33%, 均小于 2.0%。

2.2.8 加样回收率试验 取同一批已测定的菊苣药材粉末约 0.5 g, 6 份, 精密称定, 分别精密加入一定量的绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B、异绿原酸 A 混合对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取上述供试品溶液 10 μL 。依法测定, 计算回收率, 绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B、异绿原酸 A 的平均加样回收率分别为 102.04%、96.77%、96.78%、95.94%, RSD 分

别为 0.88%、0.51%、1.42%、1.49%, 表明该方法的准确度良好。

2.3 校正因子重现性考察

2.3.1 色谱柱考察 在“2.1”项确定的 HPLC 色谱分析条件下, 精密吸取“2.2.1”项混合对照品溶液 10 μL , 采用 Shimadzu 高效液相色谱仪, 分别考察 3 种不同品牌的色谱柱对菊苣酸相对校正因子的影响, 结果见表 3, 表明不同色谱柱所得到的相对校正因子基本一致。

表 3 不同色谱柱对相对校正因子的影响

Table 3 Effect of different columns on RCF

色谱柱	相对校正因子		
	绿原酸/秦皮乙素	异绿原酸 B/秦皮乙素	异绿原酸 A/秦皮乙素
ZORBAX SB-C ₁₈	1.327 2	0.869 6	0.763 8
Eclipse XOB-C ₁₈	1.331 2	0.877 2	0.731 1
CAPCELL	1.371 4	0.898 5	0.750 6
平均值	1.343 3	0.881 8	0.748 5
RSD/%	1.82	1.70	2.20

2.3.2 高效液相色谱考察 在“2.1”项确定的 HPLC 色谱分析条件下, 精密吸取“2.2.1”项混合对照品溶液 10 μL , 考察 Shimadzu、Waters 1525 和 Agilent 1100 3 种高效液相色谱仪对相对校正因子的影响, 结果见表 4。表明在不同的液相色谱系统下所得到的相对校正因子基本一致。

表 4 不同高效液相色谱的相对校正因子

Table 4 RCF for different HPLC instruments

仪器	相对校正因子		
	绿原酸/秦皮乙素	异绿原酸 B/秦皮乙素	异绿原酸 A/秦皮乙素
Shimadzu	1.332 1	0.875 4	0.767 2
Waters 1525	1.309 2	0.900 4	0.781 4
Agilent 1100	1.263 0	0.825 0	0.714 0
平均值	1.301 4	0.866 9	0.754 2
RSD/%	4.65	4.43	4.71

2.3.3 色谱峰专属性考察 在“2.1”项下确定的 HPLC 色谱分析条件下,精密吸取“2.2.1”项混合对照品溶液 10 μ L,测定内参物秦皮乙素的相对保留时间,根据相对保留时间即可正确判断出目标峰绿原酸、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的准确峰位置,结果见表 5。由表 5 可知, $RSD \leq 5\%$,表明利用相对保留时间进行色谱峰的定位是可行的。

2.4 QAMS 法与外标法测定结果比较

分别取各产地药材制备供试品溶液。分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μ L 注入高效液相色谱仪,测定。分别采用外标法和 QAMS 法计算菊苣中绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的量,结果见表 6。采用 QAMS 法及外标法所测得的菊苣药材中绿原酸、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的量基本一致,表明 QAMS 在菊苣的多指标

表 5 不同仪器和色谱柱测得的相对保留时间

Table 5 Relative retention values measured by different instruments and columns

仪器型号	色谱柱型号	相对保留时间		
		绿原酸/秦皮乙素	异绿原酸 B/秦皮乙素	异绿原酸 A/秦皮乙素
Shimadzu	ZORBAX SB-C ₁₈	0.772 9	2.123 1	2.179 5
Shimadzu	Eclipse XOB-C ₁₈	0.724 0	2.119 7	2.166 5
Shimadzu	CAPCELL PAK-C ₁₈	0.812 0	2.095 6	2.147 0
Waters 1525	ZORBAX SB-C ₁₈	0.784 3	2.042 4	2.097 9
Agilent 1100	ZORBAX SB-C ₁₈	0.788 1	1.989 9	2.046 8
平均值		0.776 3	2.074 1	2.127 5
RSD/%		4.19	2.75	2.57

表 6 菊苣药材中绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 的测定

Table 6 Contents of chlorogenic acid, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid A in chicory

批号	秦皮乙素/%	绿原酸/%		异绿原酸 B/%		异绿原酸 A/%	
		QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法
辽宁大连	0.323 8	0.336 6	0.336 5	0.229 5	0.229 2	0.068 8	0.070 0
辽宁灯塔	0.297 6	0.432 5	0.432 1	0.234 1	0.233 7	0.051 5	0.053 0
新疆墨玉	0.262 6	0.213 1	0.213 3	0.126 5	0.126 9	0.108 1	0.108 8
内蒙古	0.226 3	0.354 6	0.354 3	0.074 9	0.075 7	0.010 2	0.012 3
河北平山	0.232 0	0.240 7	0.240 9	0.085 2	0.085 9	0.019 1	0.021 1
山东寿光	0.215 5	0.127 0	0.127 5	0.059 4	0.060 4	0.028 2	0.030 0
新疆昌吉	0.511 4	0.973 1	0.970 8	0.317 7	0.316 6	0.074 2	0.075 3
江西南昌	0.064 0	0.487 0	0.486 4	0.046 9	0.048 0	0.139 3	0.139 6

成分质量评价中应用是可行的。

3 讨论

绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B 和异绿原酸 A 在菊苣药材中相对量较大,且生物活性较高,因此将它们选为能够反映菊苣内部质量评价的指标。其中秦皮乙素化学性质稳定且廉价易得,在菊苣和毛菊苣中量较高,且对照品分离工艺比较成熟,故选其为内参物,以降低检测成本。

本实验对流动相做了初步对比,采用甲醇-甲酸和甲醇-乙酸作为流动相系统进行分析,发现甲醇-甲酸流动相,分离效果明显改善,且峰形较好。对

于检测波长的选择,本实验对 200~400 nm 进行全波长扫描,结合 4 种对照品的峰形及菊苣药材的整体峰形,发现 254 nm 条件下的 4 种对照品的色谱峰型较好,菊苣药材的整体色谱峰数目较多,峰型较好且分离度好,故本研究选择 254 nm 作为测定波长。此外,本实验还考察了不同色谱柱、不同色谱仪下对相对校正因子及相对保留时间的影响,并以 RSD 值作为指标,实验结果表明,在上述条件下相对校正因子及相对保留时间重现性良好。

本实验采用 HPLC 外标法测定了菊苣药材中秦皮乙素的量,同时测定并计算了绿原酸、异绿原酸

B、异绿原酸 A 的相对校正因子, 用相对校正因子计算得到了绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 的量, 实现了 QAMS。同时, 采用外标法测定了菊苣药材中绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 的量, 比较了其相对校正因子计算值之间的差异, 结果表明, 二者之间无显著差异。

综上所述, 本实验所建立的 QAMS 法在测定菊苣中绿原酸、秦皮乙素、异绿原酸 B、异绿原酸 A 的量时具有较高的重现性、稳定性及可信度, 丰富了菊苣药材的质量评价方法, 并为 QAMS 技术在中药质量控制中的推广和应用提供了更充分的参考和依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Street R A, Sidana J, Prinsloo G. Cichorium intybus: traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 1-13.
- [3] 周俊, 张冰, 林志健, 等. 菊苣药材质量评价的研究进展 [J]. 中医药信息, 2014, 31(3): 154-158.
- [4] 李渊. 维药毛菊苣保肝作用及有效成分含量测定 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2012.
- [5] 庞市宾, 吴发宝, 刘晓燕, 等. 毛菊苣提取物对四氯化碳诱导大鼠肝纤维化的防治作用 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 418-421.
- [6] 李玉山. 绿原酸在天然植物中的分布和提取纯化工艺研究进展 [J]. 解放军药学报, 2012, 28(4): 355-359.
- [7] Zhu C S, Zhang B, Lin Z J, *et al.* Relationship between high-performance liquid chromatography fingerprints and uric acid-Lowering activities of *Cichorium intybus* L. [J]. *Molecules*, 2015, 20(5): 9455-9467.
- [8] 蓝天凤, 王晓, 王岱杰, 等. 一测多评法测定丹参中 4 种丹参酮类成分 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2420-2423.
- [9] 陈建维, 刘圆, 刘晟楠, 等. 一测多评法测定枳实中 4 种黄酮类成分 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1374-1377.
- [10] 何兵, 刘艳, 李春红, 等. 一测多评法同时测定鱼腥草不同部位中 6 种活性成分的量 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2160-2164.