

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.12.07

超高效液相色谱法测定紫锥菊根末中 单咖啡酰酒石酸和菊苣酸的含量

魏秀丽^{1,2}, 张志民^{1,2}, 张传津^{1,2*}, 李有志^{1,2}, 李美娣³

(1. 山东省兽药质量检验所, 济南 250022; 2. 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 济南 250022;

3. 广州华农大实验兽药有限公司, 广州 510642)

[收稿日期] 2019-09-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019)12-0031-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了快速测定紫锥菊根末中主成分单咖啡酰酒石酸和菊苣酸的含量建立了超高效液相色谱法(UPLC)。采用 ACQUITY UPLC™ C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)为分离柱, 柱温: 35 ℃; 以乙腈-0.4% 磷酸水溶液进行梯度洗脱; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 1 μL; 检测波长 330 nm。通过光谱图、保留时间和峰面积参数对单咖啡酰酒石酸和菊苣酸进行定性定量检测。单咖啡酰酒石酸在 0.5 ~ 25 μg/mL 的范围内线性关系良好($R^2 > 0.999$); 方法检出限为 0.5 μg/mL, 定量限为 1 μg/mL; 菊苣酸在 1 ~ 50 μg/mL 的范围内线性良好($R^2 > 0.999$); 检出限为 1 μg/mL, 定量限为 2 μg/mL, 完全满足检测需求。该方法色谱分离较好, 分析速度较快, 前处理简单, 适用于紫锥菊根末中单咖啡酰酒石酸和菊苣酸的定性定量检测。

[关键词] 紫锥菊根末; 单咖啡酰酒石酸; 菊苣酸; 超高效液相色谱法

Determination of Caftaric Acid and Chicoric acid in *Echinacea* Root Powder by UPLC

WEI Xiu-li^{1,2}, ZHANG Zhi-min^{1,2}, ZHANG Chuan-jin^{1,2*}, LI You-zhi^{1,2}, LI Mei-di³

(1. Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China;

2. Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Monitoring and Risk Assessment for Animal Products, Jinan 250022, China;

3. Guangzhou Hua Nong Da Experimental Veterinary Drug, Co., LTD., Guangzhou, 510642, China)

Corresponding author: ZHANG Chuan-jin, E-mail: 1153702137@qq.com

Abstract: An ultra high performance liquid chromatography (UPLC) method was established for the rapid determination of monicoyl tartaric acid and chicory acid in *Echinacea* root powder. ACQUITY UPLC™ C₁₈ chromatographic column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was used as the separation column, column temperature 35 ℃; gradient elution was performed with acetonitrile - 0.4% phosphoric acid solution as mobile phase; the

基金项目: 2018 年山东省重点研发计划“家禽健康养殖天然药物的研制与开发”(2018GNC111010)

作者简介: 魏秀丽, 高级兽医师, 从事兽药和畜禽产品质量监督检验及新兽药研发工作。

通讯作者: 张传津。E-mail: 1153702137@qq.com

flow rate is 0.35 mL/min, the injection volume is 1 μ L, and the wavelength is 330 nm. In this paper, the quantitative and qualitative determination of caftaric acid and chicoric acid was carried out by spectrogram, retention time and peak area parameters. In the range of 0.5 ~ 25 μ g/mL of caftaric acid, the linear relationship is good ($R^2 > 0.999$); the limit of detection is 0.5 μ g/mL, and the limit of quantitation is 1 μ g/mL; in the range of 1 ~ 50 μ g/mL of chicoric acid, the linear relationship is good ($R^2 > 0.999$); the limit of detection is 1 μ g/mL ($S/N > 3$), and the limit of quantitation is 2 μ g/mL ($S/N > 10$), which fully meet the requirements. The test method is suitable for the qualitative and quantitative determination of caftaric acid and chicoric acid in *Echinacea* root powder for its good separation, quick analysis and easy sample treatment performance.

Key words: *Echinacea* root powder; caftaric acid; chicoric acid; ultra high performance liquid chromatography method

紫锥菊 (*Echinacea purpurea*) 是原产美洲的一类菊科植物,因其具有显著的免疫刺激功效,是目前国际上普遍关注的一种免疫促进剂和免疫调节剂。紫锥菊根末为国家二类新中兽药,是由紫锥菊的根,经拣选洗净干燥粉碎过筛制备的粉末,药理研究表明,其活性物质主要包括咖啡酸衍生物、多糖、烷基酰胺类成分,根据新兽药相关技术要求对其进行了药学、药理毒理和临床研究^[1-3],证明其安全、有效,在提高猪、鸡免疫功能方面具有显著的临床效果^[4-6],并对肉质和口感具有一定的改善作用。紫锥菊根末中活性成分主要包括单咖啡酰酒石酸、菊苣酸,还有少量的绿原酸和咖啡酸,在猪、鸡临床上经饲料拌匀的方式给药,安全有效。美国、英国、欧洲药典和农业农村部 2171 号公告关于紫锥菊根末含量测定均采用普通高效液相色谱方法^[1,7-11],检测时间长。本实验进行了超高效液相色谱-紫外检测法测定紫锥菊根末中单咖啡酰酒石酸和菊苣酸含量的方法学研究。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂 菊苣酸对照品,批号 11152-201703,含量 97.6%,中国食品药品检定研究院。单咖啡酰酒石酸对照品,批号 18101022,含量 98%,上海同田生物技术有限公司。乙腈、磷酸均为色谱纯;乙醇分析纯;超纯水。紫锥菊根末,产地来自广东、云南、河北,分别作为样品 1、样品 2、样品 3,除去药材中残留的泥沙、叶子、茎等,水洗至无杂物,40 $^{\circ}$ C 以下干燥至含水量低于 6%,粉碎过 5 号筛,置 V 型混合机中混合 10 min,分装。

1.2 仪器 分析天平:感量 0.00001 g; Waters AcquityTM Ultra performance LC 超高效液相色谱仪; waters2695 高效液相色谱仪。

1.3 方法

1.3.1 供试品溶液制备 取本品粉末(过 5 号筛)约 0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 25 mL,称定重量,加热回流 15 min,取出,放冷,再称定重量,用 70% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.3.2 标准储备液的制备 精密称取单咖啡酰酒石酸对照品、菊苣酸对照品适量,精密称定,加 70% 乙醇分别制成每 1 mL 含单咖啡酰酒石酸 400 μ g、菊苣酸 100 μ g 的溶液,即得。

1.3.3 标准工作液的制备 取 4 mL 菊苣酸储备液和 0.5 mL 单咖啡酰酒石酸储备液,加 3.5 mL 70% 乙醇,制成每 1 mL 含单咖啡酰酒石酸 25 μ g、菊苣酸 50 μ g 的混合标准工作液。

依次倍比稀释得一系列标准曲线工作液: 20 μ g/mL 单咖啡酰酒石酸 40 μ g/mL 菊苣酸、10 μ g/mL 单咖啡酰酒石酸 20 μ g/mL 菊苣酸、5 μ g/mL 单咖啡酰酒石酸 10 μ g/mL 菊苣酸、2 μ g/mL 单咖啡酰酒石酸 4 μ g/mL 菊苣酸、1 μ g/mL 单咖啡酰酒石酸 2 μ g/mL 菊苣酸、0.5 μ g/mL 单咖啡酰酒石酸 1 μ g/mL 菊苣酸。

1.3.4 色谱操作条件及参数 色谱柱: C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m); 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 0.4% 磷酸水溶液, 进行梯度洗脱; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 1 μ L; 柱温: 35 $^{\circ}$ C, 进样室温

度 10 ℃。二极管阵列检测器,检测波长为 330 nm。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件表

Tab 1 Gradient elution condition

时间/min	流动相 A% (乙腈)	流动相 B% (0.4% 磷酸水溶液)	曲线
0	9	91	
0~4.5	9→12	91→88	6
4.5~5	12→18	88→82	6
5~9	18	82	6
9.0~10	18→50	82→50	6
10~11	50→9	50→91	6
11~12	9	91	6

1.3.5 重复性试验和精密度试验 精密吸取单咖啡酰酒石酸对照品溶液和菊苣酸对照品溶液,制成每 1 mL 含单咖啡酰酒石酸 10 μg、菊苣酸 20 μg 的混合对照品溶液,重复配置 6 份,进样,计算单咖啡酰酒石酸、菊苣酸峰面积 RSD。精密吸取单咖啡酰酒石酸对照品溶液和菊苣酸对照品溶液,制成每 1 mL 含单咖啡酰酒石酸 10 μg、菊苣酸 20 μg 的混合对照品溶液,重复进样 6 次,计算单咖啡酰酒石酸、菊苣酸峰面积 RSD。

1.3.6 检测限和定量限的测定 对单咖啡酰酒石酸、菊苣酸的标准工作液,进行 UPLC 的分析,并逐级降低其浓度,以溶液检测时的信噪比(S/N)分别大于等于 3 和 10 作为药物的检测限和定量限。

1.3.7 不同色谱条件样品检测比较 使用高效液相色谱仪和超高效液相色谱仪在不同的色谱条件下运行,对同一样品中两主成分单咖啡酰酒石酸、菊苣酸的含量和出峰时间分别进行比较。

1.3.8 稳定性试验 进样室温度设置到 10 ℃。取“1.3.5”项下 10 μg/mL 单咖啡酰酒石酸 20 μg/mL 菊苣酸溶液,在 10 ℃放置 3、6、12、24 h,各进样 1 μL,计算单咖啡酰酒石酸、菊苣酸各自的峰面积 RSD。

2 结果与分析

2.1 色谱分离 在优化的色谱条件下,测得单咖

啡酰酒石酸、菊苣酸色谱峰峰形良好,且均达到基线分离,在 1.3.4 项条件下,菊苣酸、单咖啡酰酒石酸对照品和紫锥菊根末样品待测液,色谱保留时间为 2.02 min、6.92 min 左右,分离度均满足要求。

2.2 线性 在选定色谱条件下,使用梯度洗脱方法,可以有效分离目的峰,单咖啡酰酒石酸在 0.5~25 μg/mL 范围内的标准曲线: $y = 8.392668e2 + 8.83837e3, R^2 > 0.999$ 。菊苣酸在 1~50 μg/mL 范围内的标准曲线: $y = 1.938706e3 + 1.281296e4, R^2 > 0.999$ 。校正曲线结果见图 1 和图 2。理论塔板数:菊苣酸 83000~87000,单咖啡酰酒石酸 51000~54000,分离度 3.9~4.8,对称因子 1.18~1.27,拖尾因子 1.10~1.13。

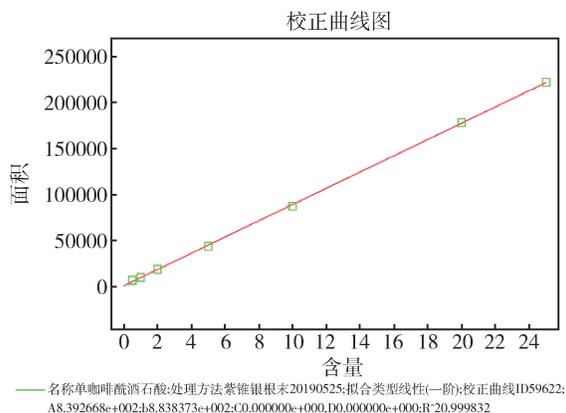


图 1 单咖啡酰酒石酸校正曲线

Fig 1 Caftaric acid correction curve

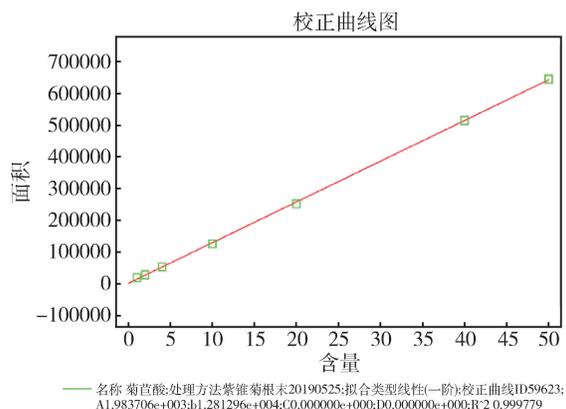


图 2 菊苣酸校正曲线

Fig 2 Chicoric acid correction curve

2.3 重复性试验和精密度试验 配制 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单咖啡酰酒石酸 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菊苣酸对照品溶液,重复配置 6 份,进样,计算单咖啡酰酒石酸、菊苣酸峰面积 RSD 为 0.73%、0.66%,满足实验要求。

取 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单咖啡酰酒石酸 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菊苣酸对照品溶液,重复进样 6 次,计算落单咖啡酰酒石酸、菊苣酸峰面积 RSD 分别为 0.33%、0.29%,满足实验要求。

2.4 检测限和定量限 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单咖啡酰酒石酸 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菊苣酸对照品溶液 $S/N \geq 3$ 为检出限,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单咖啡酰酒石酸 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菊苣酸对照品溶液 $S/N \geq 10$ 为定量限。

2.5 不同色谱条件样品检测结果比较 使用 waters 超高效液相色谱仪和高效液相色谱仪,对同一样品中两主成分单咖啡酰酒石酸、菊苣酸的含量分别进行了比较,结果见表 2。

表 2 不同色谱条件检测结果表 ($n=6$)

Tab 2 Test results using different chromatographic method ($n=6$)

检测项	样品 1	样品 2	样品 3				
水分	8.8%	7.4%	8.0%				
平行样	样品 1-1	样品 1-2	样品 2-1	样品 2-2	样品 3-1	样品 3-2	
称样量/g	0.2504	0.2518	0.2491	0.2503	0.2506	0.2466	
Waters 高效液相色谱仪 (色谱条件见文献[1]*)	单咖啡酰酒石酸	0.676	0.677	0.402	0.406	0.120	0.121
	菊苣酸	0.197	0.198	0.123	0.123	0.054	0.056
	总和	0.873	0.875	0.525	0.529	0.174	0.177
Waters 超高效液相色谱仪 (色谱条件见表 1)	单咖啡酰酒石酸	0.673	0.669	0.412	0.412	0.134	0.136
	菊苣酸	0.198	0.192	0.124	0.123	0.050	0.051
	总和	0.871	0.861	0.536	0.535	0.184	0.187

*: 高效液相色谱运行条件按照中华人民共和国农业部公告第 2171 号紫锥菊根末质量标准进行检测^[1], 流速: 1.5 mL/min; 进样量: 10 μL

由于两种色谱方法均已通过其方法学验证,均可以准确控制其指标成分。从检测效率上看,优选超高效法(UPLC)色谱图见图 3-图 10。从样品噪音和峰形分离度等方面来看,优选超高效液相色谱仪条件,背景更干净,与杂质峰的分度度更好。

2.6 稳定性试验 按照实验方法,将对照品溶液贮存一段时间后,进样,所得到的图谱中单咖啡酰酒石酸、菊苣酸峰面积 RSD 分别为 0.47%、0.58%,说明样品稳定,满足实验要求。

3 讨论与小结

3.1 检测波长的选择 本研究将单咖啡酰酒石酸、菊苣酸的对照溶液利用 PDA 检测器采集其光谱图,在波长 190~400 nm 范围内进行扫描,发现单咖啡酰酒石酸在 330 nm 处有最大吸收,菊苣酸在 331 nm 处有最大吸收,参考农业部公告 2171 号紫锥菊根含量测定项中选用的波长 330 nm,在本实

验中选择 330 nm 作为紫锥菊根末的检测波长。光谱图见图 11-图 13。

3.2 流动相流速的比较 超高效液相流动相的流速为 0.35 mL/min,需要运行 12 min,每针运行需要 4.2 mL 流动相;普通高效液相色谱仪流速为 1.5 mL/min,运行时间 35 min,每针运行需要 52.5 mL 流动相。超高效液相色谱更节约实验耗材溶剂等,每运行一针流动相节省 38.3 mL。在废液处理高成本的今天,超高效液相色谱方法更有优势,更经济和快捷。

3.3 原药材主成分含量参差不齐 本实验选择了三个产地的紫锥菊根末进行含量测定,紫锥菊根末总含量随原料产地变化,含量有一定波动,以及有效期内含量变化,不同时期不同部位的菊苣酸含量存在差异,各部位菊苣酸含量在盛花期达最大值,紫锥菊采收期影响菊苣酸含量;而且一年生紫锥菊

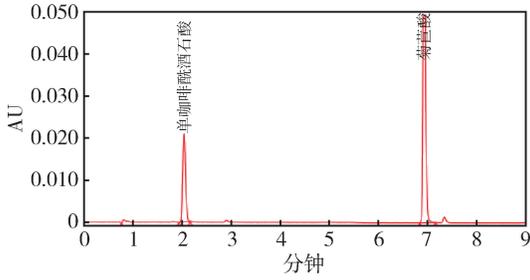


图 3 10 µg/mL 单咖啡酰酒石酸 20 µg/mL 菊苣酸
对照品 UPLC 色谱图

Fig 3 Chromatogram of reference solution of
10 µg/mL caftaric acid and 20 µg/mL chichoric acid

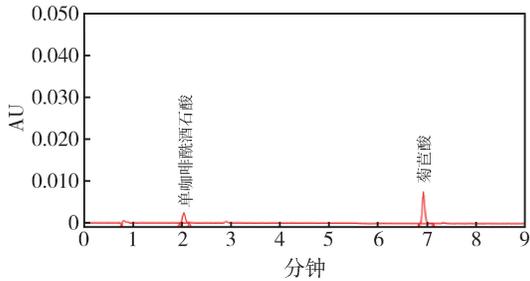


图 4 1 µg/mL 单咖啡酰酒石酸 2 µg/mL 菊苣酸
对照品 UPLC 色谱图

Fig 4 UPLC chromatogram of reference solution of
1 µg/mL caftaric acid and 2 µg/mL chichoric acid

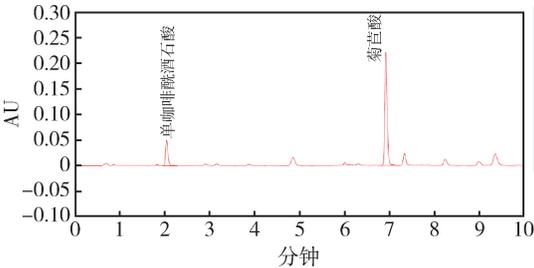


图 5 样品 1 UPLC 色谱图

Fig 5 UPLC chromatogram of sample 1

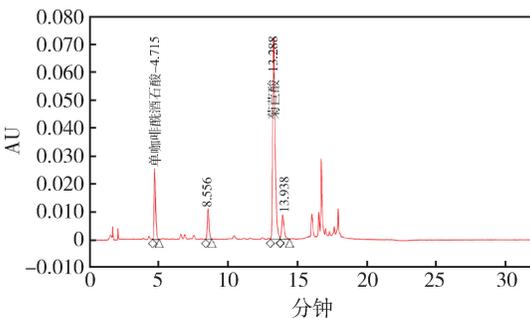


图 6 样品 1 HPLC 色谱图

Fig 6 HPLC chromatogram of sample 1

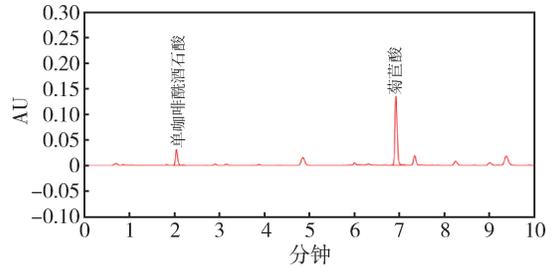


图 7 样品 2 UPLC 色谱图

Fig 7 UPLC chromatogram of sample 2

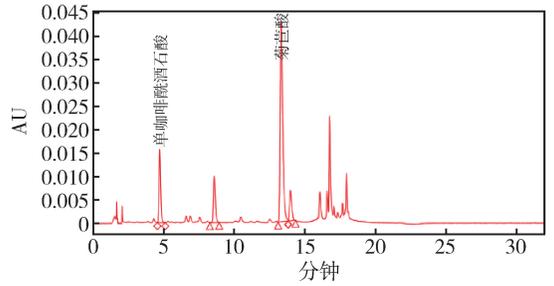


图 8 样品 2 HPLC 色谱图

Fig 8 HPLC chromatogram of sample 2

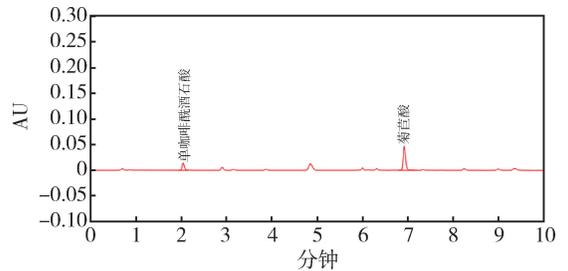


图 9 样品 3 UPLC 色谱图

Fig 9 UPLC chromatogram of sample 3

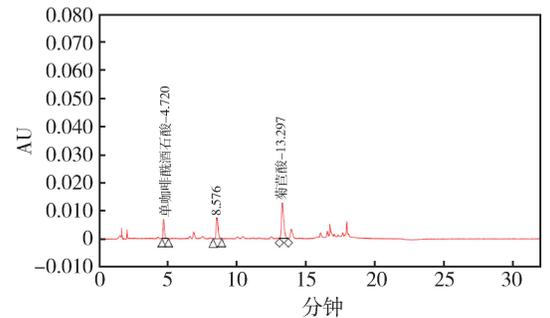


图 10 样品 3 HPLC 色谱图

Fig 10 HPLC chromatogram of sample 3

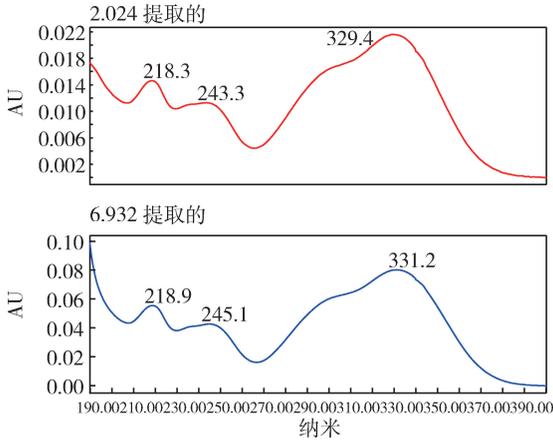


图 11 单咖啡酰酒石酸菊苣酸混合对照品光谱图

Fig 11 Chromatogram of caftaric acid and chicoric acid mixture

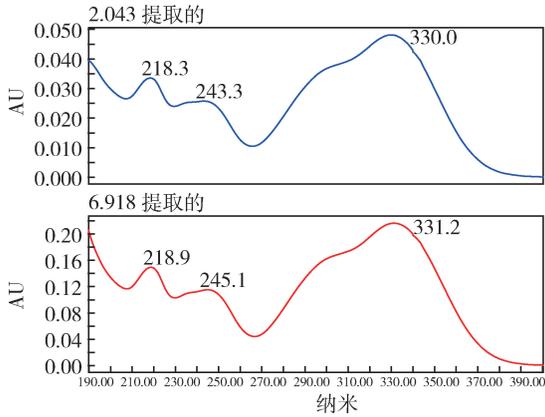


图 12 样品 1 光谱图

Fig 12 Chromatogram of sample 1

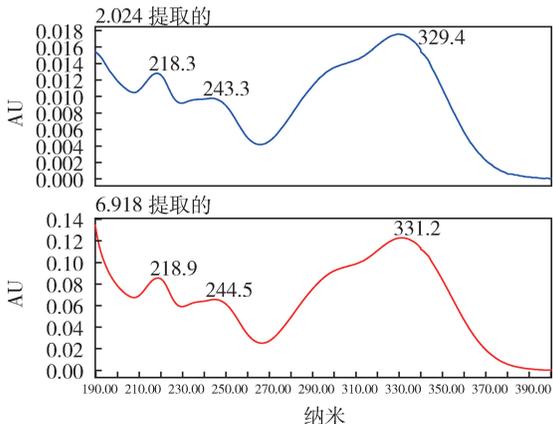


图 13 样品 2 光谱图

Fig 13 Chromatogram of sample 2

10 月上旬(即秋季)盛花期采收的药材对动物机体的免疫增强作用优于其它采收期的药材。并考虑大生产实际中药材产地、采收时间、加工炮制等因素的影响,含量结果相差很远^[12-14],药效也存在很大差异。根据批准的新兽药紫锥菊根末标准,本品按干燥品计算,含单咖啡酰酒石酸和菊苣酸的总量不得少于 0.50%,河北产地的药材含主成分 0.186%,不合格不能投入生产和使用,广东和云南药材含量均合格。所以,制定快速的筛选方法还是非常必要的。

综上所述,使用超高效液相色谱法,对紫锥菊根末中单咖啡酰酒石酸和菊苣酸进行定性和定量测定,方法快速,可以作为企业内控标准方法,在原药材供应商的试验过程中,具备精准快捷、经济环保的特点,有效控制紫锥菊根末的质量。

参考文献:

[1] 中华人民共和国农业部公告 2171 号紫锥菊根末质量标准[S]. Announcement No. 2171 of the Ministry of Agriculture of the people's Republic of China on the quality Standard of *Echinacea* Root end [S].

[2] 冯善祥. 复方紫锥菊对鸡免疫增强作用试验[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(9): 27-28. Feng S X. Effect of compound *Eupatorium adenophorum* on immune enhancement of chickens [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2010, 46 (9): 27-28.

[3] 张伟, 石达友, 吕伟杰, 等. 紫锥菊根末的安全药理学研究[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(9): 34-36. Zhang W, Shi D Y, Lv W J, et al. study on safety pharmacology of *Eupatorium adenophorum* roots [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2013, 47 (9): 34-36.

[4] 晏升勇, 简沫, 范才良. 紫锥菊在动物防病治病中的运用[J]. 中兽医学杂志, 2016(4): 94-95. Yan S Y, Jian M, Fan C L. Application of *Eupatorium adenophorum* in animal disease prevention and treatment [J]. Journal of Chinese Animal Medicine, 2016 (4): 94-95.

[5] 李旭, 陈阳, 章玲玲, 等. 紫锥菊主要功能及其在鸡疾病防治上的研究进展[J]. 中国饲料, 2011(23): 10-12, 16. Li X, Chen Y, Zhang L L, et al. Main functions of *Eupatorium adenophorum* and its research progress in disease prevention and control of chickens [J]. Chinese Feed, 2011 (23): 10-12, 16.

- [6] 余殷兴. 紫锥菊根末药效学研究及其对犬免疫效果的影响 [D]. 华南农业大学, 2016.
- Yu Y X. Study on pharmacodynamics of *Echinacea* root end and its effect on immune effect in dogs [D]. South China Agricultural University, 2016.
- [7] 李健, 张爱均, 刘雯, 等. 紫锥菊地上部分 4 种酚酸类成分的 HPLC 法测定研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44 (9): 1935 - 1937.
- [8] 王彦彦, 孙玉滨, 王怀生, 等. HPLC 法测定紫锥菊不同药用部位中菊苣酸的含量 [J]. 人参研究, 2016, 28 (2): 23 - 25.
- Wang Y Y, Sun Y B, Wang H S, *et al.* Determination of chicoric acid in different medicinal parts of *Eupatorium adenophorum* by HPLC method [J]. Ginseng Study, 2016, 28 (2): 23 - 25.
- [9] 甘春丽, 孙大威, 谢华, 等. HPLC 法测定紫锥菊中 3 种酚酸含量 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2016, 50 (3): 192 - 195.
- Gan C L, Sun D W, Xie H, *et al.* HPLC method for the determination of three phenolic acids in *Eupatorium adenophorum* [J]. Journal of Harbin Medical University, 2016, 50 (3): 192 - 195.
- [10] 伏健, 史若男, 李婉, 等. 紫锥菊提取工艺研究及有效成分含量测定 [J]. 中兽医医药杂志, 2015, 34 (3): 54 - 56.
- Fu J, Shi R N, Li W, *et al.* Study on extraction process and determination of effective components of *Echinacea* [J]. Journal of Chinese Veterinary Medicine, 2015, 34 (3): 54 - 56.
- [11] 苏婷婷, 吴翠礼, 覃淑仪, 等. 紫锥菊单咖啡酰酒石酸和菊苣酸提取工艺优化 [J]. 亚热带植物科学, 2016, 45 (4): 321 - 324.
- Su T T, Wu C L, Qin S Y, *et al.* Optimization of extraction process of *Euphorbia pulcherrima* monoacyltartaric acid and chicoric acid [J]. Subtropical Plant Science, 2016, 45 (4): 321 - 324.
- [12] 钟英杰, 张会梅, 付海宁, 等. 紫锥菊的生药学研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27 (2): 321 - 327.
- Zhong Y J, Zhang H M, Fu H N, *et al.* Studies on pharmacognosy of *Echinacea* [J]. Research and Development of Natural Products, 2015, 27 (2): 321 - 327.
- [13] 钟英杰, 付海宁, 庞云露, 等. 不同采收期紫锥菊原药材主要药效学作用研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014 (15): 24 - 27.
- Zhong Y J, Fu H N, Pang Y L, *et al.* Study on the main pharmacodynamics of *Euphorbia pulcherrima* at different harvesting stages [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Surgeons, 2014 (15): 24 - 27.
- [14] 孙俊英. 引种紫锥菊形态学与有效成分动态积累的初步研究 [D]. 山东中医药大学, 2011.
- Sun J Y. A preliminary study on morphology and dynamic accumulation of active components in introduced *Echinacea* [D]. Shandong University of traditional Chinese Medicine, 2011.

(编辑:李文平)