

牛蒡根药材的质量标准研究^Δ

田荣*,隋忠国,曹玉,韩彦骏,王春波,仲伟珍[#](青岛大学医学院,山东青岛 266071)

中图分类号 R284.1;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2934-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.20

摘要 目的:建立牛蒡根药材的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对牛蒡根中的齐墩果酸进行定性鉴别;对药材的水分、总灰分、浸出物进行测定。采用高效液相色谱(HPLC)法测定牛蒡根药材中绿原酸的含量:色谱柱为Alltima C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.4%磷酸水溶液(13:87, V/V),流速为1 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为327 nm。结果:TLC鉴别中,供试品在对照品、对照药材色谱相应位置上显示相同颜色的荧光斑点;对药材水分、总灰分、浸出物含量进行了限定;绿原酸进样量在0.140 8~1.056 0 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.999 9$),平均加样回收率为99.48%(RSD=1.34%, $n=6$)。结论:该方法专属性强,能准确进行定性和定量检测,可用于牛蒡根药材的质量控制。

关键词 牛蒡根;绿原酸;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

Study on Quality Standard of *Arctium lappa*

TIAN Rong, SUI Zhong-guo, CAO Yu, HAN Yan-tao, WANG Chun-bo, ZHONG Wei-zhen (Medical College of Qingdao University, Shandong Qingdao 266071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the quality standard of *Arctium lappa*. METHODS: TLC was used to qualitatively identify oleanolic acid in *A. lappa*. The contents of moisture, total ash, extract were determined. HPLC was used to determine the content of chlorogenic acid in *A. lappa*. The determination was performed on Alltima C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.4% phosphoric acid (13:87, V/V) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 327 nm, and column temperature was 30 ℃. RESULTS: The test samples had same color TLC spots to substance control and reference substance on the same position. The contents of moisture, total ash and extract in *A. lappa* were defined. The linear range of chlorogenic acid were 0.140 8-1.056 0 μg ($r=0.999 9$) with an average recovery of 99.48% (RSD=1.34%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is specific and can be used for qualitative detection and quantitative detection. It also can be used for the quality control of *A. lappa*.

KEYWORDS *Arctium lappa*; Chlorogenic acid; TLC; HPLC; Quality standard

作。同样,参照文献^[8]用石油醚浸渍法进行提取,分离出挥发性物质较少,且所得物质沸点均在200 ℃以上,低沸点物质几乎没有,原因可能是采用冷凝回流浓缩时低沸点物质已被挥发掉。另外,所得峰中含大量溶剂中杂质形成的杂质峰,对试验结果造成干扰。SPME技术对挥发油提取较充分,所以最终选择本方法提取葎草花中的挥发油成分。

本试验从贵阳地区葎草鲜品雄、雌花和干品雄、雌花挥发油中分别分离并鉴定出55、41、51、32个组分。结果显示,雄花与雌花相比,雄花中挥发油成分比雌花多;干品与鲜品相比,成分相差不大,但鲜品略多。《贵州省中药材、民族药材质量标准》^[1]是以雌性花穗入药,贵州民间用药以葎草全草花或是雌、雄性花穗混合入药,不同药用部位化学成分有何差异,是否对药效有影响均有待进一步研究与分析。

参考文献

^Δ 基金项目:山东省科技发展计划项目(No.2010GNC10924);青岛市民生计划项目(No.13-1-3-99-nsh)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学。E-mail: 1528062097@qq.com

[#] 通信作者:高级实验师,硕士。研究方向:抗衰老药物、心血管药理。电话:0532-83780062。E-mail: shdzwz@126.com

- [1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].2003年版.贵阳:贵州科技出版社,2003:358.
- [2] 何顺志,徐文芬.贵州中草药资源研究[M].贵阳:贵州科技出版社,2007:2 291.
- [3] 尹海波,王颖,郑太坤,等.中国葎草属植物的研究进展[J].辽宁中医学院学报,2001,3(1):602.
- [4] 陈伟光,盛静.葎草叶总黄酮的测定及最佳采收期研究[J].中草药,2008,39(1):1 202.
- [5] 杨再波,毛海立,龙成梅,等.微波辅助顶空固相微萃取法分析葎草[J].精细化工,2010,27(11):1 064.
- [6] 石磊,王金梅,康文艺.HS-SPME-GC-MS分析2种木兰属植物的挥发性成分[J].中国中药杂志,2008,33(12):1 429.
- [7] 康文艺,王金梅,姬志强,等.迎春挥发性成分HS-SPME-GC-MS分析[J].天然产物研究与开发,2009,21(1):84.
- [8] 殷献华,李天磊,潘卫东,等.葎草挥发性化学成分分析及其抑菌作用研究[J].山地农业生物学报,2010,29(5):415.

(收稿日期:2013-07-21 修回日期:2013-09-11)

牛蒡根为菊科植物牛蒡的根,又名恶实根、鼠粘根、牛菜^[1-2],主要功能是疏风散热、解毒消肿。经常食用牛蒡根有促进血液循环、清除肠胃垃圾、防止人体过早衰老、润泽肌肤、防止中风和高血压、清肠排毒、降低胆固醇和血糖的作用,并适合糖尿病患者长期食用。文献报道,牛蒡根中含有氨基酸、矿物质、黄酮、多糖^[3]和挥发油等化学成分^[4]。关于牛蒡根的现代应用也有较多报道。药理实验证明,牛蒡根有抗菌、抗突变、抗氧化、抗衰老等多种药理活性。可见,牛蒡根有较高的药食同源价值。近几年,牛蒡根在我国山东等沿海地区有广泛栽种,并且出口到日本及欧洲国家。但是,多年以来,关于牛蒡根药材的研究报道多涉及临床用药及化学成分的研究,没有药材鉴别和资源研究。为确立牛蒡根药材的质量标准,本试验重点对牛蒡根药材中有效成分齐墩果酸的薄层色谱(TLC)鉴别和绿原酸的高效液相色谱(HPLC)测定进行了研究^[5-6]。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括600色谱泵、2487紫外检测器、717自动进样器(美国Waters公司);AE240型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);SB3200型超声波清洗器(上海Branson公司)。

1.2 试剂

绿原酸、齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110753-200413、110709-200704);甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

牛蒡根药材从山东青岛、潍坊、烟台种植基地采集,共计10批,经山东省医学科学院中药研究室孙敬勇研究员鉴定为牛蒡 *Arctium Lappa* L.的根;牛蒡根对照药材(青岛吴田食品有限公司,批号:20120427)。

2 方法与结果

2.1 TLC鉴别^[7]

取牛蒡根粉末3g,加醋酸乙酯15ml,超声(功率:500W,频率:40kHz)提取20min,取出,滤过,滤液浓缩至干,残渣加甲醇0.5ml使溶解,作为供试品溶液;另取牛蒡根对照药材3g,同法制成对照药材溶液;取齐墩果酸对照品,加甲醇制成每1ml含0.5mg的溶液,作为对照品溶液。照TLC法^[4],分别吸取上述溶液10、10、2μl点样于同一自制硅胶G薄层板(厚度0.3~0.4mm)上,以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(20:4:0.5,V/V/V)为展开剂,于温度25℃、相对湿度70%条件下展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃加热至斑点显色清晰,分别置于日光和紫外光灯(365nm)下检视。结果显示,供试品色谱中,在与对照药材及对照品色谱相应位置上,分别显示相同颜色的斑点和荧光斑点。牛蒡根的TLC图见图1、图2。

2.2 检查

为了全面控制牛蒡根药材质量,依据2010年版《中国药典》(一部)附录各项测定法^[4]对其水分、总灰分、浸出物检查项进行了考察,并根据10批样品的测定结果制定了限度。规定水分不得过20%,总灰分不得过8%,水溶性浸出物不得少于50%。

2.3 含量测定^[8]

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验^[9] 色谱柱:Alltima C₁₈(250mm×4.6mm,5μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸水溶液(13:87,V/V);流速:1ml/min;柱温:30℃;检测波长:327nm。理论

板数按绿原酸峰计算应不低于2000。色谱见图3。

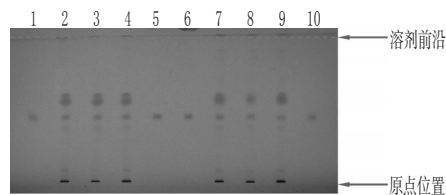


图1 牛蒡根的TLC图(日光)

1、5、6、10.齐墩果酸对照品;2~3、7~9.牛蒡根样品;4.牛蒡根对照药材

Fig 1 TLC of *A. lappa* (daylight)

1, 5, 6, 10. oleanolic acid control; 2-3, 7-9. *A. lappa* samples; 4. *Arctii Fructus* reference substance

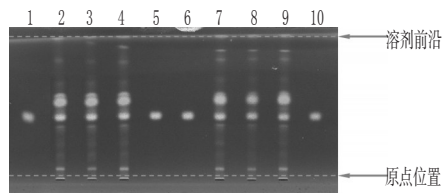


图2 牛蒡根的TLC图(紫外光灯,365nm)

1、5、6、10.齐墩果酸对照品;2~3、7~9.牛蒡根样品;4.牛蒡根对照药材

Fig 2 TLC chromatogram of *A. lappa* (UV lamp at 365 nm)

1, 5, 6, 10. oleanolic acid control; 2-3, 7-9. *A. lappa* samples; 4. *Arctii Fructus* reference substance

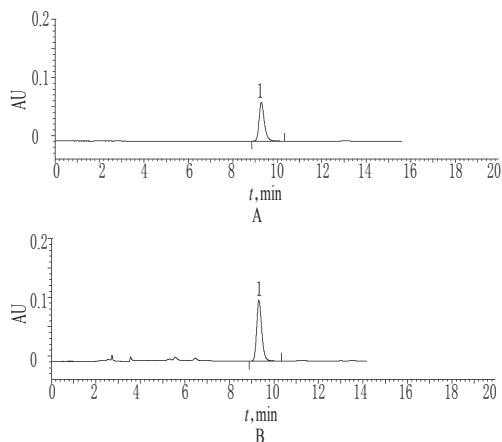


图3 高效液相色谱图

A.绿原酸对照品;B.牛蒡根药材;1.绿原酸

Fig 3 HPLC chromatograms

A. chlorogenic control; B. *A. lappa*; 1. chlorogenic

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品8.8mg,加50%甲醇溶解并稀释至10ml,摇匀,作为对照品贮备液(质量浓度为0.88mg/ml)。精密量取对照品贮备液1ml,加50%甲醇稀释至25ml,摇匀,即得(质量浓度为0.0352mg/ml)。

2.3.3 供试品溶液的制备 取药材粉末约1g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入5%甲醇50ml,密塞,称定质量,超声处理(功率:150W,频率:40kHz)30min,取出,再称定质量,用50%甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液4、8、12、16、20、30μl,依次注入HPLC仪,测定峰面积。以绿原酸对照品进样量(x,μg)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $y=3156924.9x-26397.4$ ($r=0.9999$, $n=6$)。结果表明,绿原酸进样量在0.1408~1.0560μg范围内与

峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μl ,按上述色谱条件重复进样测定 6 次, $\text{RSD}=0.23\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μl ,分别在 0、2、4、6、8、10 h 进样测定,共进样 6 次, $\text{RSD}=0.37\%$ ($n=6$),表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好,能够满足测定需要。

2.3.7 重复性试验 按照供试品溶液的制备方法,平行制备 6 份样品,按上述方法和条件进行测定。结果显示,样品中的绿原酸质量分数为 8.91%, $\text{RSD}=1.21\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率试验 称取已知含量的样品(含量:0.891 mg/g) 6 份,精密称定,分别置具塞锥形瓶中,各精密加入对照品贮备液(质量浓度为 0.88 mg/ml) 0.5 ml,再分别精密加入 50% 甲醇 50 ml,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,并进行测定(供试品溶液体积为 50.5 ml),计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

编号	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
1	0.501 2	0.446 6	0.440 0	0.874 6	97.27		
2	0.517 9	0.461 4	0.440 0	0.895 1	98.57		
3	0.508 5	0.453 1	0.440 0	0.894 3	100.27	98.48	1.33
4	0.499 5	0.445 1	0.440 0	0.883 3	99.59		
5	0.503 4	0.448 5	0.440 0	0.874 6	96.84		
6	0.514 4	0.458 3	0.440 0	0.891 0	98.34		

2.3.9 样品含量测定 取 10 批样品各适量,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱进样测定。结果,10 批样品中的绿原酸含量分别为 0.63、0.88、0.77、0.69、0.60、0.83、0.96、1.47、1.44、1.58 mg/g,最低含量为 0.60 mg/g。按照下浮 30% 计算,规定本品绿原酸含量不得少于 0.40 mg/g,即本品按干燥品计算,每 1 g 含绿原酸($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_9$)不得少于 0.40 mg。

3 讨论

牛蒡根在全国分布较广,本试验药材主要来自山东青岛、潍坊、烟台,质量均一,均符合《中华本草》对其的描述,即呈纺锤状,肉质而直,粗壮,长度 40~100 cm,直径 0.5~2.0 cm;皮部黑褐色,有须根,内呈黄白色,味微苦而性凉。

在测定绿原酸含量时,供试品溶液制备时通过对提取方法(超声、回流)、提取溶剂(甲醇、50% 甲醇、水)、提取时间(20、30、40、60 min)、提取用量(0.5、1.0、1.5 g)的考察,优化为采用 1 g 药材,使用 50% 的甲醇,超声处理 30 min 来制备。

牛蒡根主要成分为丁二酸、齐墩果酸、熊果酸、 β -D-谷甾醇和胡萝卜苷。在前期化学成分研究中,笔者从牛蒡根药材中分离并鉴定了绿原酸和 1,5-二-O-咖啡酰奎宁酸,因 1,5-二-O-咖啡酰奎宁酸暂无法定的对照品来源,不容易获得,笔者选择

较容易获得的齐墩果酸做定性鉴别。笔者曾尝试鉴别和测定牛蒡根中的牛蒡苷,因为其含量太低,几乎无鉴别和测定价值,未获成功。在后期化学成分研究中,笔者从牛蒡根药材中分离并鉴定了齐墩果酸和绿原酸。绿原酸为牛蒡根中有效成分之一,是一种多酚类物质,属于苯丙素类化合物,具有抗氧化、抗病毒、抗致畸、抗过敏作用,这与牛蒡根的功效直接相关。因此,本研究增加了以齐墩果酸为对照品和以牛蒡根为对照药材的鉴别项;增加了以绿原酸为对照品的含量测定项,并以此来制定牛蒡根药材的质量标准。

目前,牛蒡根已列入山东省新增药材。本研究首次采用 TLC 法鉴别了牛蒡根中的齐墩果酸,并采用 HPLC 法测定了牛蒡根中绿原酸的含量^[10-11],方法重复性好、结果准确,用于药材质量的控制具有可行性和可信性。本研究通过对山东牛蒡根药材进行研究,旨在为确立牛蒡根全国药材质量标准打基础,为合理开发利用牛蒡根药材资源提供理论依据。

(致谢:本试验的完成得到了孙敬勇老师的悉心指导。)

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1977:429.
- [2] 徐传芬,孙隆儒.牛蒡的研究现状[J].天然产物研究与开发,2005,17(6):818.
- [3] 胡喜兰,王国卫,高英.牛蒡根中活性成分的研究[J].食品科学,2007,28(11):113.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:66、附录 34、附录 52、附录 53、附录 62.
- [5] 陈吉炎,陈黎,安志斌.中药材质量标准的研究思路[J].中药材,2002,25(10):748.
- [6] 刘华钢,雷欣潮,刘进修.中药质量标准的研究进展[J].广西科学院学报,2011,27(1):44.
- [7] 何洋,黄敬聪,叶奕芬,等.车前草药材的质量标准研究[J].安徽农业科学,2011,39(6):3 332.
- [8] 胥秀英,易中宏,郑一敏,等.茯苓药材质量标准研究[J].中药材,2008,31(4):597.
- [9] 苏亦用,郭巧玲,田素英.金樱根质量标准研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(15):109.
- [10] 谢培山.中药质量控制模式的发展趋势[J].中药新药与临床药理,2001,12(3):188.
- [11] 蒋晗,杨晶晶,葛健.中药质量标准现代化研究发展趋势[J].商情,2011(34):73.

(收稿日期:2013-08-02 修回日期:2013-09-27)