

# HPLC同时检测狭叶松果菊中松果菊苷和绿原酸的含量\*

闫晓慧<sup>1</sup>, 胡世俊<sup>1</sup>, 谢峻<sup>2</sup>, 冯巍<sup>2</sup>, 谈锋<sup>2</sup>

(1. 西南林业大学 林学院 云南省森林火灾预警与控制重点实验室, 昆明 650224;

2. 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715)

**摘要:**采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)的方法对狭叶松果菊组培苗不同部位、愈伤组织以及不同株系毛状根中的松果菊苷和绿原酸进行了含量测定,建立同时测定狭叶松果菊组织培养物中松果菊苷和绿原酸含量的高效液相色谱方法;实验采用 Kromasil ODS C18 柱,流动相为乙腈:甲醇:0.1%磷酸溶液(10:15:75);检测波长为 330 nm。结果表明松果菊苷和绿原酸在 0~25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围线性关系良好;平均回收率方面松果菊苷为 97.6% ( $RSD=0.83\%$ ),绿原酸为 98.5% ( $RSD=0.91\%$ )。该法简便、准确,可作为狭叶松果菊组织培养物中松果菊苷和绿原酸的定量分析方法。

**关键词:**高效液相色谱;狭叶松果菊;次生代谢产物;松果菊苷;绿原酸

**中图分类号:**Q94.334;Q946

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-6693(2013)03-0127-03

狭叶松果菊(*Echinacea angustifolia* DC)也称松果菊,是菊科(Compositae)松果菊属(*Echinacea*)植物,原产美洲,是印地安人的传统草药,被用作治疗外伤、蛇咬、头痛及感冒已有上百年的历史<sup>[1]</sup>。研究表明松果菊提取物具有抗氧化、抗衰老、调控细胞凋亡、抗肿瘤等作用<sup>[2-3]</sup>,且疗效得到了越来越多的临床肯定,是国际市场上需求量最大的植物药品之一。据报道,松果菊的有效成分为酚酸类物质和多糖,主要包括松果菊苷、菊苣酸、咖啡酸、绿原酸等咖啡酸衍生物以及4-O-甲基葡萄糖醛-阿拉伯糖-木聚糖、阿拉伯糖-鼠李半乳糖等多糖。这些活性成分通过增加细胞的数量提高非特异免疫,是国际市场最受欢迎的免疫调节剂<sup>[4]</sup>。目前北京、沈阳、山东等地已成功引种松果菊<sup>[5]</sup>。由于狭叶松果菊的深度休眠性种子萌发率极低,从而给松果菊的发展带来很大困难。笔者所在研究团队曾以种子为材料进行组织培养,实现了狭叶松果菊的离体快繁<sup>[6]</sup>。

绿原酸和松果菊苷是狭叶松果菊中咖啡酸衍生物的主要代表。绿原酸具有抗脂质过氧化、抗菌、抗诱变剂等作用<sup>[7]</sup>;松果菊苷具有抗氧化、抗肿瘤、调控细胞凋亡、抗衰老、神经保护等作用<sup>[8-10]</sup>。本研究以适用于小分子物质含量分析的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)<sup>[11-13]</sup>对狭叶松果菊组培苗根、茎叶、愈伤组织以及不同株系毛状根中绿原酸和松果菊苷的含量进行

测定。为采用生物技术进一步开发利用狭叶松果菊提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

研究所用主要仪器为:Waters液相色谱系统;UV-2487紫外检测器;Empower色谱数据工作站;十万分之一分析天平;旋转蒸发仪;索式提取器;真空抽滤系统;0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜,烘箱。主要试剂为:HPLC用甲醇、乙腈(均为色谱纯);95%乙醇、磷酸(均为分析纯);实验用超纯水。此外,松果菊苷对照品购自加拿大ChromaDex公司,纯度95%;绿原酸对照品购自中国药品生物制品检测所,纯度95%。

## 2 方法

### 2.1 HPLC 色谱条件

色谱柱为Kromasil C18(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100 A);流动相为乙腈:甲醇:0.1%磷酸溶液(10:15:75);流速为1.0 mL/min;柱温为室温;进样量为20  $\mu\text{L}$ ;检测波长在330 nm。理论板数按绿原酸计不低于6 000,按松果菊苷计不低于4 000,两组分与相邻色谱峰均达到基线分离,并经二极管阵列检测器检测,证明它们为纯峰(图1加星号处标注为检测的目标峰,依次对应绿原酸和松果菊苷)。

### 2.2 样品制备

\* 收稿日期:2012-12-30 修回日期:2013-03-11 网络出版时间:2013-05-20 18:04

资助项目:国家自然科学基金(No. 31200265);云南省教育厅重点项目(No. 50117015);西南林业大学校级重点基金项目(No. 111123)

作者简介:闫晓慧,女,讲师,博士,研究方向为植物化学成分及生物活性研究;通讯作者:谈锋,E-mail:tanfeng@swu.edu.cn

网络出版地址:[http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20130520.1804.201303.127\\_025.html](http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20130520.1804.201303.127_025.html)

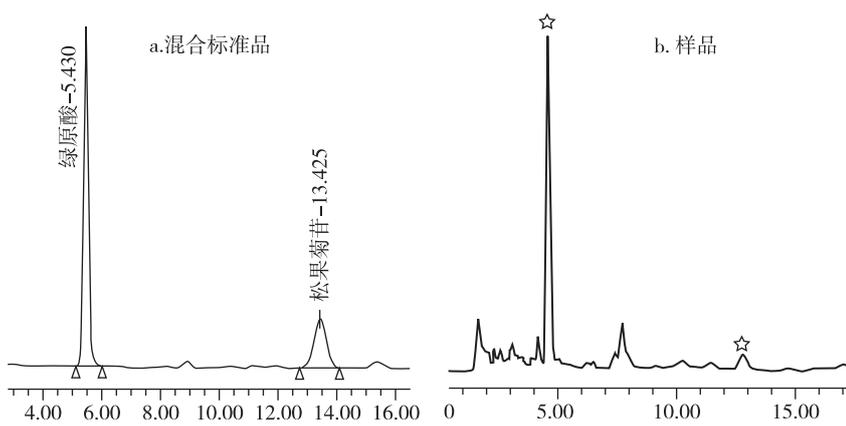


图 1 绿原酸和松果菊苷的 HPLC 谱图

试验材料 40 °C 烘干,粉碎后过 20 目筛,采用 95% 乙醇回流提取 3 次。减压浓缩至干后用流动相定容后过 0.22 μm 微孔滤膜上 HPLC 检测。

### 2.3 对照品溶液配制

精密称取绿原酸和松果菊苷两种对照品,用上述流动相配成 100 μg/mL 的储备液。于 -20 °C 中保存备用。

### 2.4 标准曲线绘制

分别取绿原酸和松果菊苷对照品储备液,依次稀释成 0、1、5、10、15、20、25 μg/mL 不同的浓度梯度,用 HPLC 检测得到两种对照品的回归方程,其中松果菊苷的为  $y=24\ 400x+1\ 421.9$  ( $R^2=0.999\ 3$ );绿原酸的为  $y=64\ 525x+478.3$  ( $R^2=0.999\ 6$ )。测定结果表明在 0~25 μg/mL 的浓度范围内两种对照品均具有良好的线性关系。

### 2.5 精密度试验

精密吸取对照品混合溶液 20 μL,注入液相色谱仪,连续进样 6 次,记录峰面积。6 次测定两成分峰面积的 RSD 分别为 0.83%、0.94%,说明精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 10 μL,分别于 0、3、6、9、12 h 进样,测定峰面积。结果绿原酸峰面积的 RSD 为 1.23%;松果菊苷峰面积的 RSD 为 1.46%。说明供试品溶液至少在 12 h 内稳定性良好。

### 2.7 重复性试验

精密称取同一批研究材料的根样品 6 份,按上述 2.3 部分的方法制备供试品溶液,分别测定松果菊苷和绿原酸的含量。结果绿原酸和松果菊苷的平均含量分别为 0.74 和 0.15 mg/g,而 RSD 分别为 1.2%、1.4%。

### 2.8 加样回收率试验

分别精密称取 6 份已测定含量研究材料的根样品 0.2 g,精密加入松果菊苷 0.1 mg、绿原酸 0.5 mg 的混合对照品溶液,按上述方法制备供试品溶液,测定后计算加样回收率。松果菊苷的平均加样回收率为

97.6% (RSD 为 0.83%);绿原酸的平均加样回收率为 98.5% (RSD 为 0.94%)。

### 2.9 样品测定

分别称取不同的狭叶松果菊组织培养物即愈伤组织、组培苗根、茎叶、不同株系毛状根等样品适量,按 2.3 部分的方法制备供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,按 2.2 部分的色谱条件测定,以外标一点法分别计算上述两个成分的平均含量(以干燥品计),具体结果见表 1。

表 1 狭叶松果菊组织培养物中松果菊苷和绿原酸的含量

样品	松果菊苷含量	绿原酸含量
愈伤组织	0.02	0.07
组培苗枝叶	0.04	0.52
组培苗根	0.15	0.68
A4-1	0.06	0.39
A4-2	0.16	0.82
R1000-1	0.08	0.51
R1000-2	0.06	0.94

注:A4-1、A4-2、R1000-1 和 R1000-2 为狭叶松果菊的 4 个单克隆毛状根株系。

## 3 讨论

测定的结果表明,狭叶松果菊组培苗各部分均含有绿原酸和松果菊苷,组培苗根中的绿原酸及松果菊苷的积累均最高,其次为组培苗地上部分,愈伤组织中两种化合物的积累均最低,各部位含量差异表明次生代谢产物的积累有组织的特异性(表 1)。分别检测了 A4-1、A4-2、R1000-1、R1000-2 等 4 个单克隆毛状根培养系株系中松果菊苷和绿原酸的含量。与自然根相比,毛状根 A4-2 培养系的松果菊苷和绿原酸含量均有所提高,分别是自然根的 1.1 倍和 1.2 倍;R1000-2 培养系的绿原酸含量高于自然根,为后者的 1.4 倍,但其中松果菊苷含量仅为自然根的 40%。A4-1 和 R1000-1 两个培养系中松果菊苷和绿原酸的含量较低,A4-1 中松果菊苷和绿原酸分别相当于自然根的 40% 和 57%,而 R1000-1 中松果菊苷和绿原酸的含量分别相当于自然根的 50% 和 64%。该结果表明毛状根不同株系中此生代谢产物的含量差异较大,为此有必要筛选高产的株系来进行悬浮培养,增加次生代谢产物。总之,本研究所建立的 HPLC 检测方法快速准确,可作为狭叶松果菊组培物中次生代谢物松果菊苷和绿原酸的定量

测定方法。

### 参考文献:

- [1] Hostettmann K. History of a plant; the example of *Echinacea* [J]. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 2003, 10(1):9-12.
- [2] Barrett B. Medicinal properties of *Echinacea*; a critical review[J]. *Phytomedicine*. 2003, 10(1):66-86.
- [3] Bauer R. *Echinacea* drugs—effects and active ingredients [J]. *Z Arztl Fortbild*, 1996, 90(2):111-115.
- [4] 闫晓慧, 谈锋. 3种松果菊属植物的鉴别、活性成分及生物技术研究进展[J]. *中草药*, 2006, 37(2):300-303.  
Yan X H, Tan F. Progress in identification of three plants of *Echinacea* Moench. and their active constituents and biotechnology[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2006, 37(2):300-303.
- [5] 马小军, 王雅玲, 屠鹏飞, 等. 紫锥菊在北京地区的引种[J]. *中国中药杂志*, 1999, 24(10):590-592.  
Ma X J, Wang Y L, Tu P F, et al. Introduction of *Echinacea Purpurea* in Beijing area[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1999, 24(10):590-592.
- [6] 闫晓慧, 谈锋, 胡凯, 等. 狭叶松果菊的组织培养和植株再生[J]. *西南师范大学学报:自然科学版*, 2006, 31(3):148-153.  
Yan X H, Tan F, Hu K, et al. Tissue cultivation and plants regeneration of *E. angustifolia* [J]. *Journal of Southwest China Normal University: Natural Science Edition*, 2006, 31(3):148-153.
- [7] 张鞅灵, 马琼, 高锦明, 等. 绿原酸及其类似物与生物活性[J]. *中草药*, 2001, 32(2):173-176.  
Zhang A L, Ma Qi, Gao J M, et al. Studies on bioactivities of chlorogenic acid and its analogues[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2001, 32(2):173-176.
- [8] 何文君, 方泰惠, 屠鹏飞. 松果菊苷的药理研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(4):476-479.  
He W J, Fang T H, Tu P F. Research progress on pharmacological activities of echinacoside[J]. *China Journal of Chinese Material Medica*, 2009, 34(4):476-479.
- [9] Geng X, Tian X, Tu P, et al. Neuroprotective effects of echinacoside In the mouse MPlm Model of Parkinson'S disease [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 564(1/2/3):66-74.
- [10] Deng M, Zhao J Y, Tu P F, et al. Echinacoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from TNFQ-induced apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 505(1/2/3):11-18.
- [11] 杨清林, 傅亚. 痰热清注射液固形物中焦谷氨酸组分的RP-HPLC法测定[J]. *重庆师范大学学报:自然科学版*, 2012, 29(5):67-70.  
Yang Q L, Fu Y. Determination of P-Glu content in solid substance of tanreqing injection by RP-HPLC[J]. *Journal of Chongqing Normal University: Natural Science*, 2012, 29(5):67-70.
- [12] 彭全材, 杨占南, 胡继伟, 等. 高效液相色谱法同时测定鱼腥草中7黄酮的含量[J]. *江西师范大学学报:自然科学版*, 2008, 32(6):645-648.  
Peng Q C, Yang Z N, Hu J W, et al. Determination of contents of seven flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb by HPLC[J]. *Journal of Jiangxi Normal University: Natural Science*, 2008, 32(6):645-648.
- [13] 范开, 马雪丰, 谢敏, 等. RP-HPLC法测定血浆中聚乙二醇尿酸酶浓度的方法[J]. *重庆理工大学学报:自然科学*, 2010, 24(5):29-32.  
Fan K, Ma X F, Xie M, et al. Determination of PEG-Uricase concentration in plasma by RP-HPLC[J]. *Journal of Chongqing University of Technology: Natural Science*, 2010, 24(5):29-32.

## Simultaneous Determination of Echinacoside and Chlorogenic Acid in *Echinacea angustifolia* by HPLC

YAN Xiao-hui<sup>1</sup>, HU Shi-jun<sup>1</sup>, XIE Jun<sup>2</sup>, FENG Wei<sup>2</sup>, TAN Feng<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control of Yunnan Province, College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224; 2. School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was developed to determine the contents of chlorogenic acid and echinacoside in *Echinacea angustifolia*. The separation was performed on an Kromasil ODS C18 column (150 mm×4.6 mm, 5 μm) operated at normal temperature with the gradient elution by three mobile phases including methanol (A), acetonitrile (B) and water (C including 0.1% phosphate (v/v)) at a flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was set at 330 nm. The calibration curve was linear over the concentration range of 1.0~25 ug/mL. The relative recoveries of echinacoside and chlorogenic acid were 97.6% (RSD=0.83%) and 98.5% (RSD=0.91%) respectively. This method is simple, rapid and highly sensitive. It is suitable for the simultaneous determination of chlorogenic acid and echinacoside in tissues of *E. angustifolia*.

**Key words:** high performance liquid chromatography (HPLC); *Echinacea angustifolia*; secondary metabolites; echinacoside; chlorogenic acid