

高效液相色谱法测定蒲公英中 5 种成分的含量

Determination of five components in Pugongying by HPLC

李文静 王艳萍 刘荣宏 侯玉娇 洪博*

(齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江 齐齐哈尔, 161006)

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2024) 06-0016-05 证型: 炎症¹气^G

【摘要】目的: 本研究采用高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 建立了蒲公英药材中绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、菊苣酸、木犀草素 5 种成分的含量测定方法, 完善和提高蒲公英的质量控制方法。方法: 蒲公英药材样品经过超声法提取, 分离与检测采用 Waters ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 以乙腈 (B) - 0.4% 磷酸水溶液 (A) 为流动相, 梯度洗脱; 检测波长为 320 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 柱温: 35 °C。通过专属性考察、线性关系考察、精密度考察、重复性考察、稳定性考察和加样回收率试验来验证方法学。结果: 绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、菊苣酸和木犀草素的质量浓度范围分别为 60 ~ 1 920 μg/mL、3.22 ~ 103 μg/mL、3.22 ~ 103 μg/mL、68.125 ~ 2 180 μg/mL 和 3.31 ~ 106 μg/mL, 以各成分的质量浓度 (X) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归分析, 呈良好的线性关系 ($r > 0.998 7$), 平均加样回收率为 98.62% ~ 101.43%, RSD 为 0.68% ~ 1.86%, 仪器精密度、方法重复性和方法的稳定性良好 (RSD 均 < 2%)。结论: 该方法分离度好, 精密度、稳定性、重复性均良好, 加样回收率高, 可作为蒲公英的质量控制方法, 为蒲公英其他方面的研究奠定基础。

【关键词】 蒲公英; 高效液相色谱; 成分; 含量测定

【Abstract】 Objective: In this study, the determination method of chlorogenic acid, caffeic acid, galuteolin, cichoric acid and luteolin in Pugongying (*Taraxacum mongolicum*) was established by HPLC, and the quality control method of Pugongying was improved and promoted. Methods: The samples of Pugongying herb were extracted by ultrasonic method, and then separated and detected by Waters ACQUITY BEH C₁₈ chromatographic column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). Acetonitrile (B) and 0.4% phosphoric acid aqueous solution (A) were used as mobile phase with gradient elution. The detection wavelength was 320 nm. Flow rate: 1.0 mL/min; Injection volume: 20 μL. Column temperature: 35 °C. The methodology was validated by exclusive inspection, linear relationship test, precision test, repeatability test, stability test and recovery test. Results: The concentrations of chlorogenic acid, caffeic acid, galuteolin, cichoric acid and luteolin ranged from 60 to 1 920 μg/mL, 3.22 to 103 μg/mL, 3.22 to 103 μg/mL, 68.125 to 2 180 μg/mL and 3.31 to 106 μg/mL, respectively. Linear regression equation was carried out with the concentration (X) of each component as the abscissa and the peak area (Y) as the ordinate, showing a good linear relationship ($r > 0.998 7$), and the average recovery was 98.62%-101.43%. The RSD range was 0.68%-1.86%. The instrument precision, method repeatability and method stability were good (RSD < 2%). Conclusion: The method has good separation, precision, stability, repeatability and high recovery rate. It can be used as a quality control method of Pugongying and lays a foundation for other research of Pugongying.

【Keywords】 Pugongying; HPLC; Component; Content determination

doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2024.06.003

蒲公英别称婆婆丁、黄花草、华花郎等, 为菊科植物蒲公英、碱地蒲公英或同属数种植物的干燥全草^[1]。蒲公英作为最常见的野生蔬菜和中草药, 在我国具有悠久的药用历史和非常高的中医药学价值^[2], 始载于唐代《新修本草》, 在《本草纲目》《本草求真》《本草正义》等著作中也有相关记载^[3]。蒲公英分布范围较广且适应能力极强, 广泛生长于中、低海拔地区的山坡、草地等, 极易采集。蒲公英化学成

分复杂, 国内外研究表明, 蒲公英中含有多种活性成分, 包括有机酸类、黄酮类、酚酸类、生物碱类、三萜类等^[4-6]。蒲公英味甘、苦, 性寒, 无毒, 入胃经、肝经, 具有良好的清热泻火、免疫调节、抑菌抗炎、利胆护肝、降血糖、利湿通淋、消痈散结等药理作用, 在化妆品、保健品、食品等领域广受欢迎^[7-9], 古籍中记载最多的是用其治疗妇人乳痈, 即乳腺炎。其使用方式记载最多的为内服, 如捣烂水

煮汁饮之，或者和热酒服；外用给药有少量记载，如捣烂贴敷。其治疗毒疮及诸疮疔毒疾病时的使用方式为外用，即鲜蒲公英茎断处有白汁，取浓汁涂，或者直接将蒲公英捣烂贴敷^[10]。现代研究中，蒲公英被开发成多种剂型应用于临床，如复方蒲公英注射液用于治疗呼吸系统感染，蒲公英胶囊用于治疗孕妇急性上呼吸道感染有显著疗效，且无明显不良反应。以蒲公英为主制成的生化公英回乳汤、公英三麦饮、公英当归芍药散三个药方，用于回乳、更年期综合征、腹痛等妇科疾病，取得了良好的临床疗效。通过临床观察，蒲公英在治疗妇科疾病方面具有显著疗效，并且未发现不良反应，由于其价格低廉且一年四季均可找到，为女性乳腺炎患者带来福音，适宜推广。国内文献报道鲜蒲公英还可以治疗血栓性外痔、腱鞘囊肿、化脓性中耳炎、丹毒、女性淋证、带下等疾病^[11]。有报道称黄酮类和酚酸类化合物是蒲公英的有效成分，具有多种药理活性，蒲公英的清热解毒、利尿通淋、抑菌、抗炎等作用都与蒲公英中黄酮和酚酸类成分有关^[12-16]。

蒲公英是中国药典规定的主流品种，2020年版《中华人民共和国药典》选用菊苣酸作为蒲公英含量测定的指标成分^[17]，规定本品按干燥品计算，含菊苣酸不得少于 0.45%。但单一成分不能反映药材的整体质量，目前鲜有研究应用高效液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）同时对蒲公英中的 5 种活性成分绿原酸、咖啡酸、菊苣酸、木犀草素、木犀草苷（为蒲公英药材中酚酸类和黄酮类化合物的代表物质）进行含量测定。因此，本实验应用 HPLC，采用梯度洗脱法对这 5 种活性成分进行含量测定，为以后蒲公英质量标准的建立及其作用机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

绿原酸（批号：191110）、咖啡酸（批号：190503）、木犀草苷（批号：190721）、菊苣酸（批号：210309）、木犀草素（批号：190711）对照品购自北京世纪奥科生物技术有限公司；蒲公英药材购自齐齐哈尔鑫金龙中药房；甲醇、乙腈为色谱纯

（美国 Fairfield 试剂有限公司）；磷酸为分析纯（批号：20160629），购自天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 仪器

LC-1000D 高效液相色谱仪（山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司）；PS-20AL 超声波清洗机（深圳市科洁超声科技有限公司）；XS105METTLERLETOLEDO 精密天平（梅特勒-托利多上海有限公司）；Sartorius BT 25S 电子天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）。

1.3 溶液的配制

1.3.1 对照品溶液的配制

精密称取绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、菊苣酸、木犀草素对照品各适量，加甲醇制成绿原酸 1.92 mg/mL、咖啡酸 0.103 mg/mL、木犀草苷 0.103 mg/mL、菊苣酸 2.18 mg/mL、木犀草素 0.106 mg/mL 的混合对照品溶液，摇匀，即得。

1.3.2 供试品溶液的配制

精密称取蒲公英全草（过 2 号筛）5 g，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，加 60% 甲醇溶液 50 mL，密塞，摇匀，称定质量，浸泡过夜，超声（60 ℃，功率 100 W，60 min），放冷，用 60% 甲醇补足失重，摇匀，滤过至 50 mL 烧瓶中，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液。

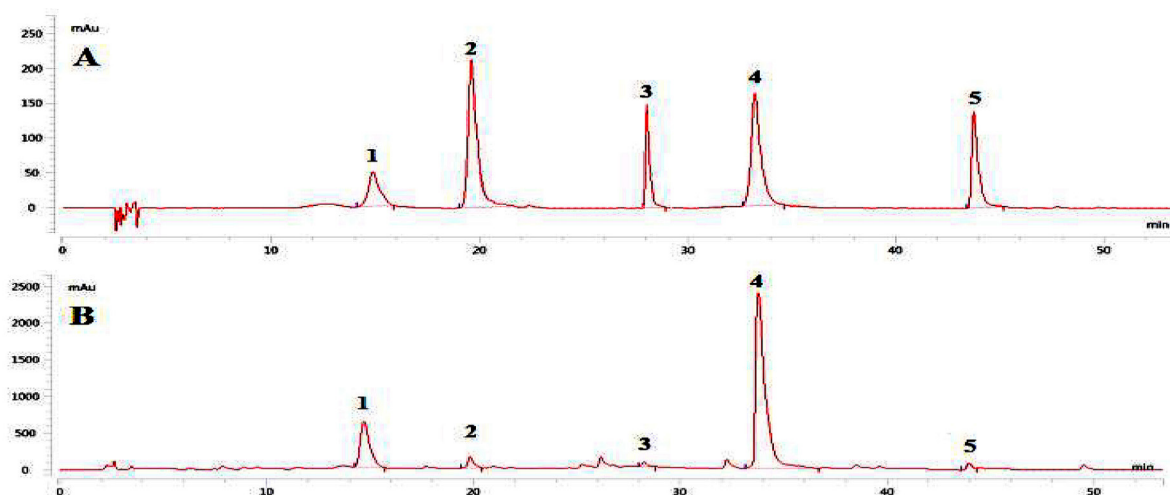
1.4 色谱条件

采用 Waters ACQUITY BEHC₁₈ 色谱柱（2.1 mm × 100 mm，1.8 μm），以乙腈（B）-0.4% 磷酸水溶液（A）为流动相，梯度洗脱（0~10 min，10%~12% B；10~15 min，12%~16% B；15~20 min，16%~19% B；20~24 min，19%~25% B；24~31 min，25%~25% B；31~36 min，25%~29% B；36~60 min，29%~50% B）；检测波长：320 nm；流速：1.0 mL/min；进样量：20 μL；柱温：35 ℃。

2 方法学验证

2.1 专属性考察

精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL，按色谱条件进样测定，记录色谱图（图 1）。结果显示，理论塔板数按咖啡酸峰计算不低于 3 000，5 种活性成分色谱峰的分离度均大于 1.5，拖尾因子为 0.95 ~ 1.05。



注: A 为混合对照品; B 为蒲公英药材供试品溶液。1- 绿原酸; 2- 咖啡酸; 3- 木犀草苷; 4- 菊苣酸; 5- 木犀草素。

图1 混合对照品和蒲公英药材供试品溶液的高效液相色谱图

2.2 线性关系考察

混合对照品溶液, 用甲醇稀释成绿原酸质量浓度为 1 920、960、480、240、120、60 $\mu\text{g/mL}$; 咖啡酸质量浓度为 103、51.50、25.75、12.88、6.44、3.22 $\mu\text{g/mL}$; 木犀草苷质量浓度为 103、51.50、25.75、12.88、6.44、3.22 $\mu\text{g/mL}$; 菊苣酸质量浓度为 2 180、

1 090、545、272.5、136.25、68.125 $\mu\text{g/mL}$; 木犀草素质量浓度为 106、53、26.5、13.25、6.62、3.31 $\mu\text{g/mL}$ 的梯度浓度混合对照品溶液。取上述各梯度浓度混合对照品溶液, 按色谱条件进样测定, 记录色谱图。以各成分的质量浓度 (X) 为横坐标、峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归分析, 结果见表 1。

表1 蒲公英药材中5种活性成分的线性关系考察结果

成分	线性范围 / ($\mu\text{g/mL}$)	回归方程	r 值
绿原酸	60.00 ~ 1 920	$Y=0.6892X-0.097 7$	0.999 6
咖啡酸	3.22 ~ 103	$Y=2.2067X-0.902 3$	0.998 7
木犀草苷	3.22 ~ 103	$Y=0.6245X-0.326 1$	0.998 9
菊苣酸	68.125 ~ 2 180	$Y=1.6036X+0.143 2$	0.999 7
木犀草素	3.31 ~ 106	$Y=0.9364X-0.128 2$	0.999 3

2.3 精密度考察

取混合对照品溶液, 按色谱条件连续进样 6 次, 分析, 记录色谱图, 结果提示 5 种待测成分峰面积的相对标准偏差 (Relative Standard Deviation, RSD) 均小于 1.90% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.4 重复性考察

取样品粉末适量, 共 6 份, 按供试品溶液制备项下操作制备供试品溶液, 再按色谱条件进行测定, 记录色谱峰面积并按标准曲线法计算样品中 5 种成分的含量。结果提示 5 种成分含量的 RSD 值均小于 1.80% ($n=6$), 表明该方法重复性好。

2.5 稳定性考察

取样品粉末适量, 按供试品制备项下操作制备供试品溶液, 于常温条件放置 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、

24 h, 按色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果提示 5 种成分峰面积的 RSD 均小于 1.86% ($n=6$), 表明供试品溶液在常温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.6 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品粉末 1 g, 共 6 份, 加入等量的对照品, 按照供试品项下操作制备供试品溶液, 再按色谱条件方法进样测定, 记录色谱峰面积, 根据标准曲线算得样品中 5 种成分的含量并计算加样回收率。结果见表 2, 样品中绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、菊苣酸、木犀草素的平均加样回收率分别为 98.62%、101.43%、99.88%、99.11%、101.27%, RSD 分别为 1.14%、1.70%、1.86%、1.56%、0.68% ($n=6$), 表明该方法准确度良好。

表2 蒲公英药材中5种活性成分加样回收率试验结果

成分	已知含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率	平均回收率	相对标准偏差
绿原酸	4.713	4.70	9.410	99.94%	98.62%	1.14%
	4.713	4.70	9.320	98.02%		
	4.713	4.70	9.310	97.81%		
	4.713	4.70	9.280	97.17%		
	4.713	4.70	9.400	99.72%		
	4.713	4.70	9.370	99.08%		
咖啡酸	0.234	0.23	0.469	102.17%	101.43%	1.70%
	0.234	0.23	0.463	99.56%		
	0.234	0.23	0.470	102.61%		
	0.234	0.23	0.472	103.48%		
	0.234	0.23	0.468	101.65%		
	0.234	0.23	0.462	99.13%		
木犀草苷	0.295	0.30	0.589	98.03%	99.88%	1.86%
	0.295	0.30	0.590	98.26%		
	0.295	0.30	0.590	98.33%		
	0.295	0.30	0.601	102.04%		
	0.295	0.30	0.599	101.37%		
	0.295	0.30	0.599	101.33%		
菊苣酸	7.834	7.80	15.460	97.77%	99.11%	1.56%
	7.834	7.80	15.670	100.46%		
	7.834	7.80	15.720	101.10%		
	7.834	7.80	15.490	98.15%		
	7.834	7.80	15.620	99.82%		
	7.834	7.80	15.430	97.38%		
木犀草素	0.118	0.12	0.239	100.83%	101.27%	0.68%
	0.118	0.12	0.239	100.83%		
	0.118	0.12	0.241	102.51%		
	0.118	0.12	0.239	100.83%		
	0.118	0.12	0.239	100.95%		
	0.118	0.12	0.240	101.67%		

2.7 样品测定

取蒲公英样品,按照供试品溶液项下操作制备供试品溶液,再按色谱条件进样测定,记录色谱图,平行制备3份,取均值。结果:蒲公英药材中绿原

酸、咖啡酸、木犀草苷、菊苣酸、木犀草素的含量为0.471%、0.023%、0.029%、0.783%、0.012%,说明此方法可用于测定绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、菊苣酸、木犀草素的含量,且较为准确、可靠。

3 讨论

流动相的选择: 参照《中华人民共和国药典》中蒲公英药材项下含量测定方法, 首先以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相进行试验, 发现5种成分分离度较差, 与相邻峰未达到基线分离, 多次试验后, 本研究将流动相体系确定为乙腈-0.4%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 最终使5种待测成分的分度大大改善, 药材中其他色谱峰无干扰。

波长的选择: 绿原酸、咖啡酸、木犀草苷、菊苣酸、木犀草素等5种对照品的混合对照品溶液及蒲公英全草中提取的供试品溶液分别在254 nm、260 nm、325 nm、280 nm、320 nm等波长下, 在已确定好的流动相及梯度洗脱参数下进行检测, 经对比, 这5种成分均在320 nm波长下有较好的吸收, 且与邻峰分离效果好。

提取溶媒及方式的筛选: 本实验预先用不同浓度(40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%)的乙醇作为溶媒, 采用回流提取法提取后进行测定, 结果表明60%乙醇提取效果好, 又对比了60%乙醇超声提取及不同浓度(60%、80%、100%)的甲醇超声提取(包括减压浓缩和不减压浓缩), 结果表明采用60%甲醇超声提取(不减压浓缩)的方法所测得的含量较高。

参考文献:

- [1]牟彦军,马晓玲,黎志辉.蒲公英种植栽培技术与管理研究[J].农业灾害研究,2021,11(10):10-11.
- [2]付晨青,何立威,王秀萍,等.药食同源蒲公英的开发应用研究现状与展望[J].陕西农业科学,2021,67(5):86-88.
- [3]曹辉,左红娟,王峰,等.不同产地的蒲公英品种生长差异分析[J].陕西农业科学,2021,67(12):46-48.
- [4]任汉书,朱文卿,郑媛媛,等.蒲公英的功能性成分及生物活性研究进展[J].食品与药品,2022,24(2):193-201.
- [5]邬丹,高洋,崔贺铭,等.蒲公英化学成分及其治疗前列腺疾病的研究进展[J].长春中医药大学学报,2020,36(5):1084-1087.
- [6]孟然,薛志忠,鲁雪林,等.蒲公英的功效成分与药理作用研究进展[J].江苏农业科学,2021,49(9):36-43.
- [7]齐婧婧,马铭一,宋胜强.蒲公英抗菌抗病毒作用及临床应用研究进展[J].山东化工,2022,51(13):76-79.
- [8]赵欣,王莹,李春亭,等.蒲公英粗取物对LPS诱导小鼠乳腺炎的减轻效应及其机制分析[J].畜牧兽医学报,2022,53(8):2773-2781.
- [9]赵佳琪,宋玉国,孟桂先,等.蒲公英抗白血病作用机制及其临床应用[J].吉林医药学院学报,2021,42(2):148-150.
- [10]张亚楠,惠香香,秦格,等.鲜蒲公英的文献考证及现代临床应用[J].中华中医药杂志,2022,37(8):4599-4603.

基金项目:

齐齐哈尔市社会发展科技攻关项目(LSFGG-2022048)。

作者简介:

洪博, 通讯作者, 女, 副教授, 硕士生导师, 从事中药质量标准研究。