

HPLC-PDA同时测定地笋中7种酚酸的含量

黄小兰^{1,2}, 何旭峰², 杨勤³, 郭冬琴^{1*}, 王骞¹, 周浓^{1*}

(1. 重庆三峡学院生物与食品工程学院 三峡库区道地药材绿色种植与深加工重庆市工程实验室, 重庆 404000; 2. 重庆市万州食品药品检验所, 重庆 404000; 3. 重庆三峡医药高等专科学校 中医学院, 重庆 404120)

[摘要] 目的:建立同时测定地笋中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸7种酚酸的高效液相色谱-二极管阵列检测法(HPLC-PDA),并对不同产地地笋中酚酸类成分进行分析评价。方法:样品采用80%甲醇超声提取,采用资生堂CAPCELL PAK C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相甲醇-0.02%甲酸水溶液(pH 3.0)梯度洗脱;检测波长279, 324 nm;柱温30℃;流速1.0 mL·min⁻¹;进样体积20 μL。结果:7种酚酸成分在各自的质量浓度范围内线性关系良好($r \geq 0.9999$),平均回收率96.49%~103.45%, RSD 0.5%~2.8%,检出限(S/N=3)0.008~0.046 mg·L⁻¹,定量限(S/N=10)0.027~0.154 mg·L⁻¹。不同产地地笋均检出7种酚酸类成分,总质量分数5 811.01~11 747.23 μg·g⁻¹,平均质量分数7 421.05 μg·g⁻¹,不同种酚酸类化合物含量存在较大差异,其中各产地均以迷迭香酸含量最高,平均值7 111.19 μg·g⁻¹,占酚酸总量的95.8%,为地笋酚酸的主要成分;主成分分析和聚类分析结果均显示产地为山东菏泽的地笋质量较优,其次为重庆万州。结论:该方法操作简便、灵敏度高、准确性好、实用可靠,适用于地笋酚酸的含量测定,以期在地笋药材质量标准和产品开发提供参考。

[关键词] 地笋; 酚酸; 高效液相色谱-二极管阵列检测法; 迷迭香酸; 主成分分析; 聚类分析

[中图分类号] R284.1; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0156-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201615

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200609.0935.002.html>

[网络出版日期] 2020-6-9 11:46

Simultaneous Determination of 7 Phenolic Acids in *Lycopus lucidus* var. *hirtus* Rhizome by HPLC-PDA

HUANG Xiao-lan^{1,2}, HE Xu-feng², YANG Qin³, GUO Dong-qin^{1*}, WANG Qian¹, ZHOU Nong^{1*}

(1. College of Biological and Food Engineering, The Chongqing Engineering Laboratory for Green Cultivation and Deep Processing of The Three Gorges Reservoir Area's Medicinal Herbs, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404000, China; 2. Chongqing Wanzhou Food and Drug Inspection Institute, Chongqing 404000, China; 3. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China)

[Abstract] **Objective:** A high performance liquid chromatography-photo-diode array (HPLC-PDA) method for the simultaneous determination of the 7 phenolic acids including danshensu, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid and rosemary acid in *Lycopus lucidus* var. *hirtus* rhizome, analyzing and evaluating the phenolic acids in *L. lucidus* var. *hirtus* rhizome collected from different habitats, is reported here. **Method:** The sample was extracted by ultrasonic with 80% methanol

[收稿日期] 20191212(003)

[基金项目] 重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxmX0770);重庆市恒物通农业开发有限公司委托项目

[第一作者] 黄小兰,在读硕士,工程师,从事药用植物资源的开发与利用研究,E-mail:534832723@qq.com

[通信作者] *郭冬琴,博士,副教授,从事药用植物栽培与质量控制研究,Tel:023-58102130,E-mail:guodongqin1997@163.com;

*周浓,硕士,教授,从事药用植物栽培与质量控制研究,Tel:023-58576130,E-mail:erhaizn@126.com

solution, 7 kinds of phenolic acids were separated on a CAPCELL PAK C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μ m) with a mobile phase consisting of methanol-0.02% formic acid aqueous (pH 3.10) by gradient elution, The detection wavelength was at 279, 324 nm, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C with 20 μ L injection volume and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **Result:** The 7 Phenolic acids had a good linear relationship ($r \geq 0.999\ 9$) within their respective mass concentration ranges, the average recovery was 96.49%-103.45% and the RSD was 0.5%-2.8%, the limit of determination was 0.008-0.046 mg·L⁻¹ and the limit of quantification was 0.027-0.154 mg·L⁻¹. The 7 kinds of phenolic acids were all detected in *L. lucidus* var. *hirtus* rhizome and the total amount was between 5 811.01 and 11 747.23 μ g·g⁻¹, the average amount was 7 421.05 μ g·g⁻¹. The content of 7 phenolic acids was different and the rosemary acid was the highest in all the samples with an average of 7 111.19 μ g·g⁻¹ the ratio to the total phenolic acids was 95.8%. The results of principal component analysis and cluster analysis showed that the quality of *L. lucidus* var. *hirtus* rhizome from Heze city in Shandong province was better, followed by Wanzhou district in Chongqing. **Conclusion:** The method was simple, sensitive, accurate, practical and reliable, and is suitable for the content determination of phenolic acid in *L. lucidus* var. *hirtus* rhizome. It is expected to provide a reference for the improvement of quality standard and a new idea for the development and utilization of *L. lucidus* var. *hirtus* rhizome.

[**Key words**] *Lycopus lucidus* var. *hirtus* rhizome; phenolic acids; high performance liquid chromatography-photo-diode array (HPLC-PDA); rosemary acid; principal component analysis; cluster analysis

地笋为唇形科地笋属植物毛叶地瓜苗的干燥根茎,又名地参、虫草参、硬毛地笋,其性平味甘,具有化瘀止血、益气利水之功效^[1]。地笋的药用价值在历代本草均有记载,《本草拾遗》记载具有利九窍、通血脉、排脓、治血等功效;《嘉佑本草》记载可主治一切血病;《四川常用中草药》记载具有调和气血、补精髓、治头晕的功效^[2]。地笋不仅具有较高的药用价值,还颇具较高的营养价值,其饱满脆嫩的根茎因营养丰富、味道鲜美享有“蔬菜珍品”之美誉,是一种传统的药食兼用佳品^[3-4]。

地笋作为中药材被2009年版《湖南省中药材标准》^[5]收入,但仅以性状鉴别等为指标进行质量控制,并未收载其定性定量标准。研究发现,地笋主要含有多酚类、三萜类、挥发油等活性成分^[6-8],其中酚酸类成分具有良好的抗氧化^[8-9]、保肝^[10]、抗DNA损伤^[11]、清除亚硝酸盐^[12]、抑制 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶活性^[13-14]等生物活性,是地笋发挥临床疗效的重要成分,可作为地笋质量优劣的评价指标。

关于地笋中酚酸类成分的测定已有文献报道,黄菊华^[8]以甲醇-乙酸水溶液作为流动相体系,采用HPLC法测定了地参中原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸和阿魏酸的含量及其抗氧化性;SLUSARCZYK等^[9]采用HPLC测定了地笋中咖啡酸和迷迭香酸2种化合物及抗氧化性研究;REN等^[15]采用HPLC-MS/MS法定性了地笋中丹参素、原儿茶醛、原儿茶酸、阿魏

酸、迷迭香酸5种酚酸类化合物;LU等^[16]采用HPLC法测定了不同采收时期地笋中咖啡酸、迷迭香酸、原儿茶酸、原儿茶醛、丹参等5种酚酸类化合物的含量变化以及对DNA损伤保护的影响,但都偏重于酚酸类物质抗氧化活性方面的研究,对于不同产区地笋中酚酸类化合物的组成及含量比较却鲜有报道。

本实验以6个产区的地笋作为研究对象,采用HPLC-PDA波长切换法^[17-18]同时检测丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸7种酚酸类成分的含量,并采用主成分和聚类分析手段进行差异性分析,确定主要活性成分,从而更充分了解地笋的功能性成分,以期地为地笋药材质量标准的完善提供参考,地笋产品的开发利用提供新思路。

1 材料

地笋自采或委托采集于广西玉林(S1),云南大理州(S2),重庆万州(S3),江苏徐州(S4),云南腾冲(S5),山东菏泽(S6)6个地笋栽培基地,重庆三峡学院生物与食品工程学院周游博士鉴定为唇形科地笋属植物毛叶地瓜苗 *Lycopus lucidus* var. *hirtus* 的干燥根茎。

对照品丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸(成都德思特生物技术有限公司,批号分别为DST170420-015, DST180428-081,

DST180228-80, DST180504-21, DST180317-013, DST180105-027, 纯度均>98%), 阿魏酸(中国食品药品检定研究院, 批号 110773-201012, 纯度>99.6%); 色谱纯甲醇(迪马科技); 色谱纯甲酸(成都科龙试剂化工厂); 实验室用水为自制超纯水。

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司, 配二极管阵列检测器 PDA); Milli-Q Advantage A10 型超纯水机(美国 Millipore 公司); GT10-1 型高速台式离心机(北京时代北利离心机有限公司); IKA MS3 型涡旋混合器(德国 IKA 公司); ME204T/02 型 1/1 万分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KH-2000DB 型超声波清洗机(昆山禾创超声仪器有限公司, 超声功率 2 000 W, 频率 40 kHz)。

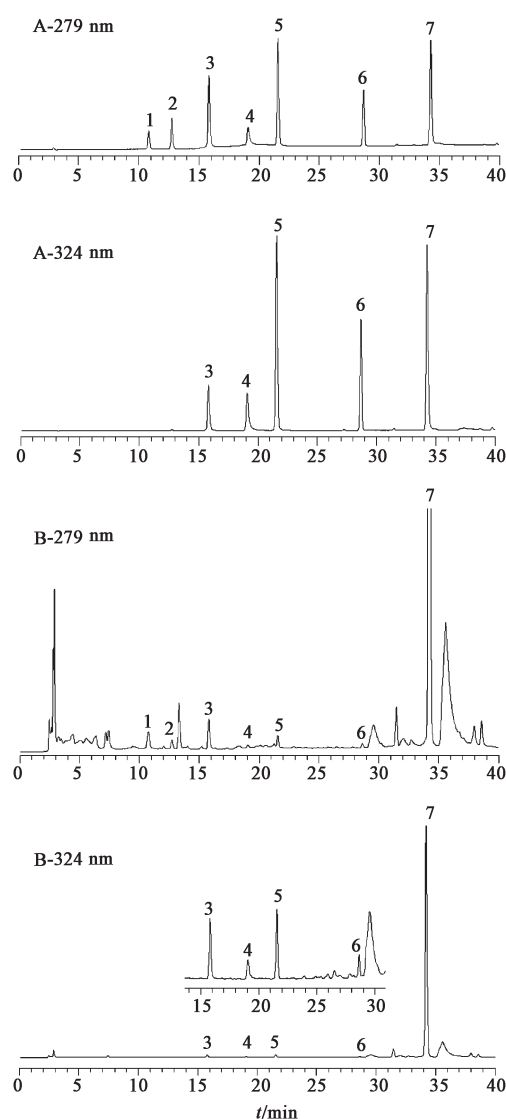
2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取减压干燥至恒重的丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸对照品适量, 加 80% 甲醇水溶液溶解并制成质量浓度分别为 0.908 0, 0.474 0, 0.664 0, 0.472 0, 0.494 0, 0.462 0, 4.980 0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品贮备液, 分别吸取上述对照品贮备液 2.0, 1.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.4, 5.0 mL 于 20 mL 量瓶中, 以 80% 甲醇水溶液定容至刻度, 得混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取地笋粉末(过 30 目筛) 2 g, 置 50 mL 具塞离心管中, 加 80% 甲醇水溶液 40 mL, 涡旋 1 min, 超声提取 60 min, 转速 7 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液 50 mL 于棕色量瓶中, 滤渣中再次加入 80% 甲醇水溶液 10 mL 复提 1 次, 合并上清液, 以 80% 甲醇水溶液定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3 色谱条件 采用资生堂 CAPCELL PAK C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 进样量 20 μL ; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 279, 324 nm; 流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 流动相甲醇(A)-0.02% 甲酸水溶液(pH 3.0, B), 梯度洗脱(0~0.5 min, 10%A; 0.5~40 min, 10%~60%A; 40~42 min, 60%A; 42~42.1 min, 60%~10%A; 42.1~50 min, 10%A)。本试验条件下色谱峰尖锐且呈正态分布, 分离效果良好, 结果见图 1。

2.4 标准曲线的制作、检出限和定量限 精密吸取 2.1 项下混合对照品溶液 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀, 制得不同质量浓度的混合对照品工作液, 按照 2.3 项下色谱条件进样分析, 以各对照品的峰面积(Y)与其相应的质量浓度(X)绘制标准曲线, 根据信噪比计算检出限($S/N=3$)和定量限($S/N=$



1. 丹参素; 2. 原儿茶酸; 3. 原儿茶醛; 4. 绿原酸; 5. 咖啡酸; 6. 阿魏酸; 7. 迷迭香酸

图 1 混合对照品(A)和样品(B)HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC spectra of 7 phenolic acids in *Lycopus lucidus* var. *hirtus* rhizome

10)。7 种酚酸成分线性关系良好($r \geq 0.999 9$), 检出限为 0.008~0.046 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 定量限 0.027~0.154 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 灵敏度高。见表 1。

2.5 精密度试验 取 2.4 项下同一混合对照品溶液 20 μL 按照 2.3 项下色谱条件重复进样 6 次, 测定各酚酸成分峰面积, 计算得丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸及迷迭香酸 RSD 分别为 0.2%, 0.1%, 0.3%, 0.4%, 0.2%, 1.0%, 0.7%, 均<3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一地笋(S1)供试品溶液 20 μL 按照 2.3 项下的色谱条件分别在 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样, 测定各酚酸组分峰面积, 计算得丹参

表1 7种酚酸成分的标准曲线、相关系数、线性范围、检出限(LOD)及定量限(LOQ)

Table 1 Calibration curve, correlation coefficient, linear range, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 7 phenolic acids by HPLC

成分	标准曲线方程	线性范围 /mg·L ⁻¹	LOD /mg·L ⁻¹	LOQ /mg·L ⁻¹
丹参素	$Y=13\,394.6X-295.7$	1.816 ~ 36.320	0.046	0.154
原儿茶酸	$Y=32\,745.0X-755.6$	0.474 ~ 9.480	0.020	0.066
原儿茶醛	$Y=89\,223.3X-536.8$	0.066 ~ 1.328	0.008	0.028
绿原酸	$Y=27\,447.8X-2\,618.3$	0.094 ~ 1.888	0.042	0.140
咖啡酸	$Y=62\,805.8X-446.4$	0.198 ~ 3.952	0.011	0.037
阿魏酸	$Y=121\,762X-123.4$	0.185 ~ 3.696	0.008	0.027
迷迭香酸	$Y=61\,130.3X-64\,990.0$	24.90 ~ 498.00	0.017	0.037

注:r均为0.999 9。

素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸及迷迭香酸 RSD 分别为 1.4%, 0.4%, 2.8%, 2.4%, 0.5%, 1.5%, 0.7%, 均<3.0%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性试验 取同一地笋(S1)样品,按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,按 2.3 项下色谱条件测定,得样品中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸及迷迭香酸的质量分数分别为 152.50, 48.06, 3.51, 12.90, 11.96, 17.10, 5 564.98 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 2.2%, 0.6%, 2.6%, 1.6%, 2.7%, 2.2%, 1.8%, 表明试验方法的重复性良好。

2.8 加标回收试验 根据本试验方法,分别精密称取 6 份已知含量的地笋粉末 1 g(S1),精密加入 7 种酚酸对照品溶液适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,分别计算各成分的回收率和 RSD,见表 2。7 种酚酸成分的平均回收率为 96.49%~103.45%,RSD 为 0.5%~2.8%,表明该方法回收率高、准确度好,可用于地笋中酚酸成分的含量测定。

2.9 样品测定 取 6 个地笋样品按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,每组样品平行制备 3 份,按 2.3 项下色谱条件进行测定,计算出 7 种酚酸的含量,以平均值表示,结果见表 3。

2.10 地笋样品中 7 种酚酸的主成分分析

2.10.1 主成分筛选及贡献率 由于地笋中各酚酸类成分含量在量纲上存在较大差异,为了保障分析结果的客观准确,利用 SPSS 20.0 对原始数据进

行标准化处理后,再进行主成分分析,得到主成分特征值及贡献率。结果表明,从 7 种酚酸成分中提取出了 3 个主成分(特征值>1),主成分 1 的特征值为 3.383,特征贡献率为 48.3%,主要影响因子表现为原儿茶酸和原儿茶醛;主成分 2 的特征值为 1.887,特征贡献率为 27.0%,主要影响因子为咖啡酸和迷迭香酸;主成分 3 的特征值为 1.472,特征贡献率为 21.0%,主要影响因子为阿魏酸和丹参素,3 个主成分的累积贡献率为 96.3%。见表 4。

2.10.2 综合主成分分析 将系数向量值与标准化后的数据相乘,计算每个主成分得分,根据每个主成分所对应的特征值占所提取主成分总特征值之和的比例作为权重得到综合主成分表达式为 $F=0.502F_1+0.280F_2+0.218F_3$,并进行排序,综合得分排序由高到低为山东菏泽(S6)>重庆万州(S3)>广西玉林(S1)>云南腾冲(S5)>江苏徐州(S4)>云南大理(S2)。不同产地地笋的 F 值为 -0.592~1.021,表明不同产地地笋间酚酸含量差异明显。见表 5。

2.11 聚类分析 采用 SPSS 20.0 对 6 份样品进行聚类分析,结果见图 2。当欧式距离为 15 时,全部样品被分成 3 大类,其中山东菏泽的为第 I 类,重庆万州为第 II 类,其余 4 组为第 III 类,与主成分分析的结果一致。聚类分析结果较好地体现了不同产地间酚酸含量的差异性,为地笋的药用开发提供理论指导。

3 讨论

3.1 样品提取条件的确定 本研究采用单因素试验分别考察了提取溶剂(35%, 50%, 65%, 80%, 100% 甲醇溶液以及 35%, 50%, 65%, 80%, 100% 乙醇溶液);料液比(1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25 g:mL);超声功率(60, 120, 180, 240, 300 W);提取时间(15, 30, 45, 60 min)以及提取次数(1, 2, 3 次)对地笋中 7 种酚酸提取的影响。最终确定了最佳提取条件,提取溶剂为 80% 的甲醇溶液,料液比为 1:20,超声功率为 180 W,提取时间为 45 min,提取次数 2 次。

3.2 波长的确定 取 2.4 项下的混合对照品溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪中进行紫外区间全波段(190~400 nm)扫描,结果显示,丹参素在 259 nm 处有吸收,原儿茶醛、原儿茶酸均在 279 nm 处有吸收峰,绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸均在 324 nm 处有特征吸收;同时取 2.2 项下的供试品溶液进行全波段扫描,发现当波长为 324 nm 时杂质干扰较少,且出峰时间较晚的酚酸(绿原酸、咖啡酸、阿魏

表2 地笋中7个酚酸成分的加样回收试验($n=6$)

Table 2 Recovery test of 7 phenolic acids in *Lycopus lucidus* var. *hirtus* rhizome($n=6$)

成分	称样量/g	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%	成分	称样量/g	样品中量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
丹参素	1.002 0	152.81	136.20	295.82	105.00	103.45	1.9	咖啡酸	1.002 0	11.98	14.82	26.23	96.13	96.54	0.5
	1.002 2	152.84	136.20	293.49	103.27				1.002 2	11.99	14.82	26.29	96.49		
	1.003 1	152.97	136.20	295.78	104.85				1.003 1	12.00	14.82	26.31	96.60		
	1.002 8	152.93	136.20	296.30	105.27				1.002 8	11.99	14.82	26.45	97.52		
	1.003 4	153.02	136.20	291.41	101.61				1.003 4	12.00	14.82	26.24	96.09		
	1.004 0	153.11	136.20	290.29	100.72				1.004 0	12.01	14.82	26.30	96.43		
原儿茶酸	1.002 0	48.16	35.50	83.61	99.86	100.14	1.5	阿魏酸	1.002 0	17.13	13.86	31.02	100.18	98.64	2.8
	1.002 2	48.17	35.50	83.22	98.73				1.002 2	17.14	13.86	30.51	96.46		
	1.003 1	48.21	35.50	84.16	101.27				1.003 1	17.15	13.86	30.20	94.17		
	1.002 8	48.19	35.50	84.59	102.53				1.002 8	17.15	13.86	31.23	101.58		
	1.003 4	48.22	35.50	83.37	99.02				1.003 4	17.16	13.86	30.92	99.30		
	1.004 0	48.25	35.50	83.55	99.44				1.004 0	17.17	13.86	31.05	100.16		
原儿茶醛	1.002 0	3.52	9.96	13.17	96.89	98.90	1.4	迷迭香酸	1.002 0	5 576.11	5 478.00	11 098.48	100.81	101.38	1.2
	1.002 2	3.52	9.96	13.32	98.39				1.002 2	5 577.22	5 478.00	11 065.08	100.18		
	1.003 1	3.52	9.96	13.52	100.40				1.003 1	5 582.23	5 478.00	11 087.62	100.50		
	1.002 8	3.52	9.96	13.52	100.40				1.002 8	5 580.56	5 478.00	11 231.67	103.16		
	1.003 4	3.52	9.96	13.32	98.39				1.003 4	5 583.90	5 478.00	11 198.85	102.50		
	1.004 0	3.52	9.96	13.37	98.90				1.004 0	5 587.24	5 478.00	11 125.50	101.10		
绿原酸	1.002 0	12.93	7.08	19.87	98.08	96.49	1.5								
	1.002 2	12.93	7.08	19.75	96.31										
	1.003 1	12.94	7.08	19.71	95.60										
	1.002 8	12.94	7.08	19.85	97.60										
	1.003 4	12.94	7.08	19.82	97.10										
	1.004 0	12.95	7.08	19.62	94.22										

表3 不同产地地笋中7种酚酸类成分测定($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Content of 7 phenolic acids in *Lycopus lucidus* var. *hirtus* rhizome from different habitats($\bar{x}\pm s, n=3$)

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

编号	丹参素	原儿茶酸	原儿茶醛	绿原酸	咖啡酸	阿魏酸	迷迭香酸	总量
S1	152.50±2.38	48.06±0.56	3.51±0.21	12.90±0.26	11.96±0.16	17.10±2.00	5 564.98±106.48	5 811.01
S2	84.51±1.13	71.23±1.68	2.05±0.06	—	8.19±0.22	8.04±0.22	5 768.09±104.36	5 942.11
S3	181.12±1.68	60.71±0.42	6.93±0.23	4.19±0.12	31.75±0.53	13.39±0.61	11 449.14±65.51	11 747.23
S4	67.28±0.53	77.57±1.18	2.81±0.13	4.95±0.14	21.13±0.17	8.91±1.86	6 278.73±72.97	6 461.38
S5	188.36±1.58	45.31±0.47	4.21±0.10	8.11±0.12	7.43±0.03	12.03±0.34	5 602.91±44.36	5 868.36
S6	533.27±5.67	124.17±0.62	14.07±0.61	—	11.12±0.30	9.67±0.07	8 003.90±65.98	8 696.20

注:—表示低于检出限。

酸、迷迭香酸)分离度更好。综合上述各种因素,最终确定丹参素、原儿茶醛、原儿茶酸波长为279 nm,绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸波长为324 nm。

3.3 流动相体系的选择 由于酚酸类化合物在水中发生弱电离,呈弱酸性,调节流动相的pH至弱酸

性更有利7种物质的分离。本研究以甲醇-水系统为基础,分别用甲酸调节流动相的pH为2.5,3.0,3.5,4.0,4.5考察了对目标物峰形的影响。结果显示,当甲酸水溶液pH为3.0时,色谱峰尖锐且呈正态分布,通过梯度洗脱目标物实现了良好分离。

表4 主成分的特征值及方差贡献率

Table 4 Eigenvalues and variance contribution of principle components

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	3.383	48.3	48.3
2	1.887	27.0	75.3
3	1.472	21.0	96.3

表5 地笋样品主成分得分、综合得分及其排序

Table 5 Principal component scores, comprehensive scores and ranking of *Lycopus lucidus* var. *hirtus* rhizome

采集地	F1	F2	F3	F合	排序
广西玉林(S1)	-1.105	0.399	1.249	-0.171	3
云南大理(S2)	-0.107	-1.187	-0.947	-0.592	6
重庆万州(S3)	-0.270	1.759	-0.777	0.459	2
江苏徐州(S4)	-0.206	-0.240	-0.932	-0.374	5
云南腾冲(S5)	-0.649	-0.451	0.504	-0.342	4
山东菏泽(S6)	1.797	-0.280	0.903	1.021	1

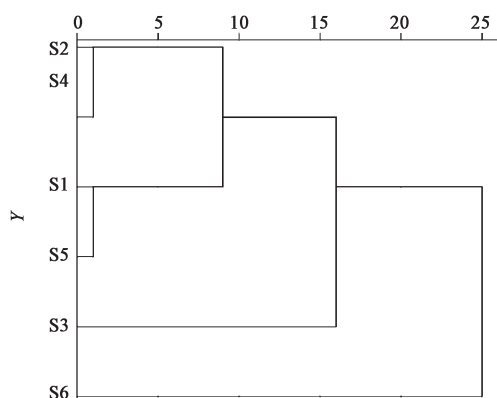


图2 地笋样品的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of *Lycopus lucidus* var. *hirtus* rhizome

3.4 含量测定结果分析 6个不同产地地笋中均含有丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸等7种酚酸,但7种酚酸类成分在药材中的含量表现出了较大差异性。从样品的测定结果来看,地笋中总酚酸质量分数为5 811.01~11 747.23 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,平均质量分数为7 421.05 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;在这7种酚酸类成分中,迷迭香酸和丹参素两种成分质量分数较高,分别为7 111.19,201.17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,占酚酸总量的95.8%和2.71%,为地笋中主要的酚酸类化合物,这与REN等^[15]对地笋中酚酸的测定结果一致,其次是原儿茶酸和咖啡酸,最低的绿原酸,平均值仅为5.03 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。另外,从6批地笋的测定结果也可以看出不同产地的地笋中7种酚酸成分含量相差也较大,如重庆万州产地笋中迷迭香酸含量高达

11 449.14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,而广西玉林产地仅为5 564.98 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;丹参素在山东菏泽和江苏徐州达到最大值(533.27 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)和最小值(67.28 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$),说明不同生态环境对地笋酚酸类化合物累积影响较大。迷迭香酸作为地笋中主要的酚酸类物质,是一种天然抗氧化剂,有着良好的抗氧化、抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗血栓、免疫调节以及细胞保护作用^[19-20],可能是地笋中起主要药理作用的功能性成分之一,有待进一步深入研究证实。

准确定量分析是开展地笋品质评价及功能性产品开发必备的技术基础,本研究优化了地笋中酚酸的提取方法,建立了同时测定地笋中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸含量的HPLC-PDA法,能同时得到所测组分的色谱和紫外光谱信息,对酚酸化合物的定性更加准确。线性关系良好,重复性好、稳定性优、加样回收率符合要求,定量准确,可用于精确测定具有功能性的地笋酚酸类成分的含量,为完善地笋的质控标准以及后续特色功能性产品的研制开发提供基础数据。

[参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典:上册[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:1122.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第7卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:76-77.
- [3] 王文净,高春燕. 地参的研究发展现状[J]. 农产品加工,2017(7):60-62.
- [4] 朱苗,李刚凤,谢勇,等. 地参研究进展[J]. 广州化工,2016,44(17):20-21,46.
- [5] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准(2009年版)[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2010:57.
- [6] 杨保成,彭涛,康文艺. 地笋属植物化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(4):346-350.
- [7] LU Y H, HUANG J H, LI Y C, et al. Variation in nutritional compositions, antioxidant activity and microstructure of *Lycopus lucidus* Turcz. root at different harvest times [J]. Food Chem, 2015, 183: 91-100.
- [8] 黄菊华. 地参多酚的组成及其抗氧化活性研究[D]. 大理:大理学院,2015.
- [9] SLUSARCZYK S, HAJNOS M, SKALICKA-Wozniak K, et al. Antioxidant activity of polyphenols from *Lycopus lucidus* Turcz[J]. Food Chem, 2008, 113(1): 134-138.

- [10] LU Y H, TIAN C R, GAO C Y, et al. Protective effect of free phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. root on carbon tetrachloride-induced liver injury *in vivo* and *in vitro*[J]. Food Nutr Res. ,2018,62:1-10.
- [11] 郭琦,高春燕. 硬毛地笋酚类化合物对DNA损伤的保护作用[J]. 食品科学,2018,39(23):54-59.
- [12] 郭琦,高春燕. 地参酚类化合物对亚硝酸盐的清除作用[J]. 食品工业科技,2017,38(19):57-62.
- [13] 杨文艺,高春燕. 地参结合酚提取物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用[J]. 食品工业科技,2018,39(23):111-116.
- [14] 孔霄,高春燕. 地参游离酚对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用研究[J]. 中国预防医学杂志,2018,19(8):564-568.
- [15] REN Q, DING L, SUN S S, et al. Chemical identification and quality evaluation of *Lycopus lucidus* Turcz by UHPLC-Q-TOF-MS and HPLC-MS/MS and hierarchical clustering analysis [J]. Biomed Chromatogr BMC,2017,31(5):3867-3869.
- [16] LU Y H, TIAN C R, GAO C Y, et al. Nutritional profiles, phenolics, and DNA damage protective effect of *Lycopus lucidus* Turcz. root at different harvest times [J]. Int J Food Prop,2018,20(S3):S3062-S3077.
- [17] 许艺凡,刘普,刘佩佩,等. HPLC-DAD法测定迷迭香茎和叶中11种抗氧化活性成分[J]. 中草药,2018,49(9):2153-2157.
- [18] 王琿,张振秋. HPLC波长切换法同时测定迷迭香中咖啡酸、阿魏酸和迷迭香酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(5):116-118.
- [19] 邓渝,陈友生,王茜,等. HPLC法同时测定连钱草中4个酚酸类成分的含量[J]. 药物分析杂志,2018,38(4):643-647.
- [20] 程贤,毕良武,赵振东,等. 迷迭香酸的提取纯化及生物活性研究进展[J]. 林产化学与工业,2015,35(4):151-158.

[责任编辑 顾雪竹]