

HPLC-DAD 法测定野菊花栓中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷

郭晓民, 瞿晶田, 柴士伟*

天津中医药大学第一附属医院 药剂科, 天津 300193

摘要: 目的 建立高效液相色谱法联合二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法同时测定野菊花栓中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷。方法 采用 HPLC-DAD 法, Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.05%磷酸-乙腈, 梯度洗脱; 检测波长: 327 nm; 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 35 ℃; 进样量: 10 μL。结果 绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷分别在 0.105~2.100 μg ($r=0.9999$)、0.165~3.300 μg ($r=0.9998$)、0.081~1.620 μg ($r=0.9997$)、0.060~1.200 μg ($r=0.9996$)、0.317~6.340 μg ($r=0.9995$) 与峰面积呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 99.19%、99.54%、99.34%、98.83%和 99.26%, RSD 值分别为 0.87%、1.04%、1.06%、1.29%、0.91%。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可用于野菊花栓中有机酸和黄酮类多成分的质量控制。

关键词: 野菊花栓; 绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸; 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷; 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷; HPLC-DAD

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)03-0382-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.03.005

Determination of chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside, apigenin-7-O-β-D-glucoside, and linarin in Yejuhua Suppository by HPLC-DAD

GUO Xiao-ming, QU Jing-tian, CHAI Shi-wei

Department of Pharmacy, First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-DAD method for simultaneous determination of chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside, apigenin-7-O-β-D-glucoside, and linarin in Yejuhua Suppository. **Methods** HPLC-DAD was used. Chromatographic separation was performed on a Thermo Hypersil GOLD C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase was acetonitrile - 0.05% phosphoric acid with gradient elution. The detection wavelengths were set at 327 nm, flow rate was 0.8 mL/min, the column temperature was maintained at 35 ℃, and injection volume was 10 μL. **Results** Chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside, apigenin-7-O-β-D-glucoside, and linarin had good linearity in the ranges of 0.105 — 2.100 μg ($r = 0.9999$), 0.165 — 3.300 μg ($r = 0.9998$), 0.081 — 1.620 μg ($r = 0.9997$), 0.060 — 1.200 μg ($r = 0.9996$), and 0.317 — 6.340 μg ($r = 0.9995$), respectively. The average recoveries were 99.19%, 99.54%, 99.34%, 98.83%, and 99.26%, with RSD of 0.87%, 1.04%, 1.06%, 1.29%, and 0.91%, respectively. **Conclusions** The method is convenient, accurate and reproducible which can be applied to the quality control of organic acids and flavonoids in Yejuhua Suppository.

Key words: Yejuhua Suppository; chlorogenic acid; 3,5-dicaffeoylquinic acid; luteolin-7-O-β-D-glucoside; apigenin-7-O-β-D-glucoside; linarin; HPLC-DAD

野菊花栓是将野菊花药材进行提取精制, 结合现代制剂工艺加工制成的栓剂, 通过肛门给药, 经直肠黏膜吸收, 直达病所, 显效快, 具有清热解毒、

抗菌消炎的功效, 临床上用于盆腔炎、前列腺炎以及肛窦炎、老年性便秘等肛肠疾病^[1-2]。野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状

收稿日期: 2016-11-09

作者简介: 郭晓民(1970—), 男, 主管药师, 从事药事管理和药物分析研究。Tel: (022)27432768 E-mail: 3214953882@qq.com

*通信作者 柴士伟, 主管药师。

花序，主要含有蒙花苷等黄酮类化合物以及绿原酸等有机酸类^[3]，且其有机酸和黄酮类成分是其抗菌消炎的主要活性成分^[4-6]。《中国药典》2015 年版野菊花栓测定项下仅以蒙花苷作为其质控指标。焦志海^[7]建立了 HPLC 法测定野菊花栓中绿原酸和蒙花苷，而中药的疗效往往具有多成分、多靶点、多途径协同作用的特点，因此本实验建立了 HPLC-DAD 法同时测定野菊花栓中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷和蒙花苷，为进一步完善野菊花栓的质量标准提供参考。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (G1315A 二极管阵列检测器); UP250H 型超声仪超声波清洗器 (南京熊猫技术装备有限公司); CPA225D 型十万分之一天平 (Sartorius 公司); HHS-21-6 型水浴锅 (上海百典仪器设备有限公司); DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); PHS-3C 型酸度计 (上海伟业仪器厂); RE-52A 旋转蒸发仪 (上海亚荣盛华仪器厂); WX-80A 微型旋涡混合仪 (上海沪西仪器有限公司)。

绿原酸 (批号 110751-200913)、3,5-二咖啡酰奎宁酸 (批号 110705-201217)、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (批号 110742-200907)、芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (批号 110723-201303)、蒙花苷 (批号 110518-201011) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 野菊花栓剂 (规格 2.4 g/粒, 湖北东信药业有限公司提供), 野菊花栓空白基质 (北京万辉药业集团提供); 甲醇 (分析纯, 天津康科德科技有限公司); 石油醚 (分析纯, 60~90 °C, 天津市化学试剂三厂); 乙腈 (色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 磷酸 (色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.05%磷酸 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱, 见表 1; 检测波长: 327 nm; 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸和蒙花苷对照品适量置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 分别制成含绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution conditions

t/min	A/%	B/%
0	10	90
15	10	90
24	24	76
40	55	45
50	75	25

和蒙花苷分别为 1.05、1.65、3.17 mg/mL 对照品母液。分别精密称取木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷对照品适量于 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 分别制成含木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 0.81、0.60 mg/mL 对照品母液; 分别精密移取各对照品母液 1.0 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 摇匀, 制成含绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、蒙花苷 0.105、0.165、0.081、0.060、0.317 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液及阴性样品溶液的制备

取本品 5 粒, 置 100 mL 烧杯中, 将烧杯置 50 °C 恒温水浴中加热致样品熔化, 取出并搅拌, 放置至室温后, 取出约 1.0 g, 精密称定, 置 10 mL 离心管中, 加入石油醚 6 mL, 超声 (50 °C, 功率 250 W, 频率 33 kHz) 处理 30 min, 取出, 5 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 将药渣用石油醚再次同法处理 1 次, 弃去石油醚提取液, 将药渣残留石油醚挥尽, 加适量甲醇使溶解后转移至 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 (50 °C, 功率 250 W, 频率 33 kHz) 处理 30 min, 放置至室温, 加甲醇定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。取野菊花栓的空白基质样品, 按供试品溶液的制备方法同法处理, 得阴性样品溶液。

2.4 系统适用性试验

分别吸取绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷和蒙花苷的混合对照品溶液, 供试品溶液及阴性样品溶液各适量, 进样测定, 记录色谱图, 见图 1。结果绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷和蒙花苷与其他组分峰的分度均大于 1.5, 理论塔板数均不低于 5 000, 阴性样品溶液图谱显示阴性样品无干扰。

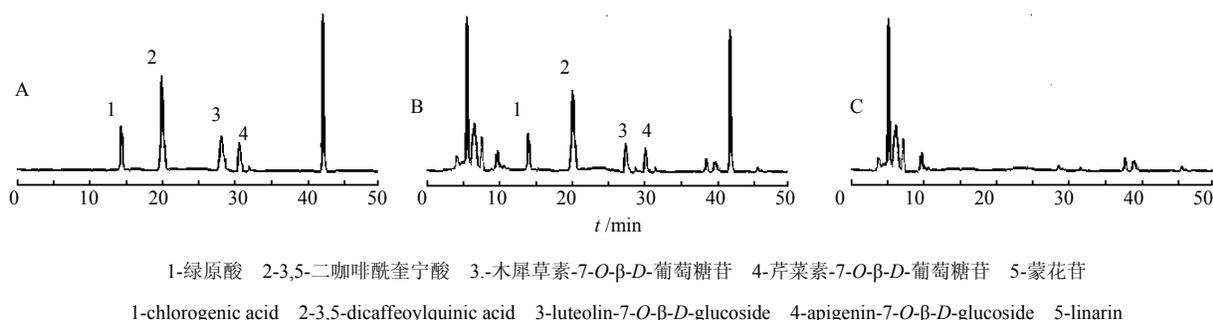


图 1 混合对照品 (A)、野菊花栓 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed of reference substances (A), Yejuhua Suppository (B) and negative sample (C)

2.5 线性关系考察

分别精密吸取绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖

苷和蒙花苷混合对照品溶液 1、2、4、8、16、20 μL, 进样分析。以质量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程, 见表 2。

表 2 5 种活性成分的线性方程、相关系数和线性范围

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, and linear range of five active components

化合物	线性方程	r	线性范围/μg
绿原酸	$Y=975.30X+517.15$	0.999 9	0.105~2.100
3,5-二咖啡酰奎宁酸	$Y=915.31X+431.23$	0.999 8	0.165~3.300
木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷	$Y=324.92X+315.31$	0.999 7	0.081~1.620
芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷	$Y=401.01X+503.21$	0.999 6	0.060~1.200
蒙花苷	$Y=189.21X+517.12$	0.999 5	0.317~6.340

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录各色谱峰峰面积, 计算得绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷峰面积的 RSD 值分别为 1.23%、1.01%、1.45%、1.07%、0.79%。

2.7 重复性试验

取批号 011105 野菊花栓剂样品 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算样品中各成分的质量分数。结果显示样品中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷质量分数的 RSD 值分别为 1.45%、1.41%、1.21%、0.95% 和 1.06%。

2.8 稳定性试验

取批号 011105 野菊花栓剂样品, 制备供试品溶液, 分别于室温下 0、2、4、8、16、24、48 h 进样分析, 记录峰面积值, 计算质量分数, 结果绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷质量分数的

RSD 值分别为 1.11%、0.81%、1.06%、1.29%、1.28%。结果显示样品溶液在室温下放置 48 h 稳定性良好。

2.9 加样回收率试验

取批号 011105 野菊花栓剂样品 (含绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷 2.61、4.22、2.05、1.98、7.21 mg/粒) 6 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 置 20 mL 具塞离心管中, 加入绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷对照品 0.540、0.860、0.440、1.480、0.540 mg, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷平均加样回收率分别为 99.19%、99.54%、99.34%、98.83%、99.26%, RSD 值分别为 0.87%、1.04%、1.06%、1.29%、0.91%。

2.10 样品测定

取各批野菊花栓剂样品各 5 粒, 制备供试品溶液, 进样测定, 以标准曲线法计算样品中有机酸和黄酮

类成分的质量分数,结果见表3。7批野菊花栓样品中蒙花苷的量均符合《中国药典》标准(5.0 mg/粒),

且各有效成分差异较低,说明药材来源、产品工艺较稳定。

表3 野菊花栓中5种活性成分的测定结果($n=3$)

Table 3 Determination of five active components in Yejuhua Suppository ($n=3$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	绿原酸	3,5-二咖啡酰奎宁酸	木犀草素-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	芹菜素-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	蒙花苷
011105	2.61	4.22	2.05	1.98	7.21
011106	2.63	4.20	2.14	1.92	7.23
021109	2.51	4.17	2.26	1.95	7.11
021409	2.55	4.30	2.11	1.85	7.13
031103	2.49	4.18	2.13	2.05	7.45
020315	2.60	4.20	2.01	2.11	7.31
020211	2.58	4.25	2.21	1.90	7.09

3 讨论

3.1 流动相的选择

比较了甲醇-冰醋酸、乙腈-冰醋酸、甲醇-磷酸等流动相体系,发现待测成分的保留时间、分离效果均不太理想,故使用乙腈-磷酸为流动相,经对乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.05%磷酸等不同酸浓度的考察,结果发现采用乙腈-0.05%磷酸系统时,各色谱峰分离度、拖尾因子等指标均符合测定要求。

3.2 供试品的制备方式选择

由于野菊花所含化学成分较复杂,将野菊花栓样品直接使用甲醇进行提取时,测定干扰较大,故先用石油醚进行脱脂;通过对石油醚提取次数、用量进行考察,发现采用石油醚提取2次,每次6 mL,可有效地去除其他成分的检测干扰。

本实验建立了HPLC-DAD法同时测定野菊花栓中绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-*O*- β -

D-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷以及蒙花苷的分析方法,该方法操作简便、结果准确且重复性好,为进一步提升野菊花栓的质量控制方法提供了实验依据。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015:1485.
- [2] 边灵杰.野菊花栓的临床应用[J].中医临床研究,2012,4(17):89.
- [3] 吴雪松,许浚,张铁军,等.野菊的化学成分及质量评价研究进展[J].中草药,2015,46(3):443-452.
- [4] 郑璐璐,张贵君,王晶娟,等.野菊花药效组分抗炎的生物效应研究[J].中草药,2011,28(3):251-253.
- [5] 张鞍灵,马琼,高锦明,等.绿原酸及其类似物与生物活性[J].天津中医药,2001,32(2):173-175.
- [6] 张俊艳,张磊,金涌,等.野菊花抗炎作用及部分机制[J].安徽医科大学学报,2005,40(5):405-408.
- [7] 焦志海.HPLC法同时测定野菊花栓中绿原酸和蒙花苷的含量[J].中医药导报,2015,21(14):49-51.