HPLC 法测定银杏叶提取物中总银杏酸量的文献报道较多,而测定银杏叶中总银杏酸量不多见。本研究参考《中国药典》2005 年版银杏叶提取物中总银杏酸的检测方法,以供试品溶液中与 5 种银杏酸对照品相应色谱峰的峰面积之和,对白果新酸对照品峰面积,用外标法计算总银杏酸量,方法学研究结果表明,本法操作简便、重现性好、精密度高,可用于银杏叶中总银杏酸量限度的检测。

3.3 供试品制备方法的确定:根据银杏酸的理化性质,在供试品制备过程中,比较了甲醇回流、甲醇超声、石油醚回流 3 种提取方法,根据所拟色谱条件,测得总银杏酸峰面积,表明甲醇提取量明显高于石油醚提取,而甲醇超声和回流没有明显差异,为了操作方便,选择甲醇超声作为最适宜的提取方法。另比较了不同提取时间对总银杏酸量的影响,结果以甲醇超声提取 30、45、60、90、120 min 银杏叶中总银杏酸的量分别为 0.173%、0.180%、0.177%、0.179%、0.177%,表明超声提取 45 min 即可把银杏酸提取完全,故选择超声提取时间为 45 min。

参考文献:

[1] Jaggy H, Koch E. Chemistry and biology of alkylphenols from *Ginkgo biloba* L. [J]. *Pharmaze*, 1997, 52(10): 735-738.
[2] 仰榴青,吴向阳,杨克迪,等. 银杏酸分析方法研究进展[J]. 药物分析杂志,2003,23(3):241-244.
[3] 中国药典[S]. 一部. 2005.
[4] 杨小明,夏 磊,张秀丽,等. RP-HPLC 测定微乳剂中银杏酸同系物含量[J]. 中国中药杂志,2008,33(2):207-208.
[5] 鞠建明,钱士辉,钱大玮,等. 银杏半同胞家系种质资源质量的分析与评价[J]. 林业科技开发,2007,21(6):31-33.

RP-HPLC 法测定菊花中 3,5-O-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸

沈 智[1],张文婷[2],黄琴伟[2],陈丽珏[1],赵维良[2]*

(浙江中医药大学药学院,浙江 杭州 310053; 2. 浙江省食品药品检验所,浙江 杭州 310004)

摘 要:**目的** 建立菊花中 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷、绿原酸 3 种成分定量测定的方法,并对 4 种菊花 3 种成分的量进行比较。**方法** 采用高效液相色谱法在同一色谱条件(色谱柱为 Shimadzu VP-ODS 250 mm×4.6 mm,5 μm;流动相:乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱;体积流量:1.0 mL/min;柱温:30 ℃)下对菊花中 3 种成分同时进行定量测定。**结果** 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷、绿原酸分别在 0.039 1～0.781 0 μg(r = 1.000 0),0.013 2～0.396 0 μg(r = 1.000 0),0.017 0～0.510 0 μg(r = 0.999 3)线性关系良好。3 者的平均回收率分别为 97.7%(RSD = 2.7%),101.7%(RSD = 1.5%),98.0%(RSD = 1.2%)。**结论** 所建立的方法可在同一色谱条件下检测出 3 个成分,4 种菊花的 3 种成分量有不同程度的差别。

关键词:菊花;3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸;木犀草苷;绿原酸;HPLC

中图分类号:R282.6 **文献标识码**:A **文章编号**:0253-2670(2010)02-0307-04

菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 为常用中药,具有散风清热,平肝明目之功效。用于治疗风热感冒,头痛眩晕,目赤肿痛,眼目昏花。《中国药典》2005 年版菊花项下收载了亳菊、滁菊、杭菊和贡菊 4 个品种,并设定了绿原酸定量测定项目[1]。目前国内对菊花定量测定的报道有:用 RP-HPLC 对木犀草苷以及芹菜苷和金合欢苷进行测定[2,3];用 GC 对菊花中的挥发油进行测定[4];用薄层扫描法对菊花中的木犀草素进行测定[5]。菊花中黄酮类成分量较高,其中木犀草苷临床和药理作用明显[6],另外,菊花中的 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸具有抗呼吸道病毒活性[7,8],因此两者均可作为菊花质量控制的指标。本实验用 RP-HPLC 对《中国药典》收载的 4 种菊花中的 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸 3 个指标成分同时进行了测定,目前未见同时测定这 3 种成分的相关报道。该研究为全面控制菊花的质量提供了依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器:岛津高效液相色谱仪 LC-20AT(DGU-20AS 在线脱气机,SIL-10AT 自动进样器,SPD-M20A 二极管阵列检测器,CTO-20AT 柱温箱),色谱工作站 LC Solution。KQ-300VDB 型双频数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

* **收稿日期**:2009-04-20
作者简介:沈 智(1983-),男,浙江桐乡人,硕士研究生,研究方向为中药有效成分及质量标准研究和药物分析。
Tel:15868486360 E-mail:sz831104@126.com
*通讯作者 赵维良 Tel:(0571)86452373 E-mail:zwl@zjyj.org.cn

1.2 材料：菊花 28 批（编号 001—028），购于各地中药饮片厂或药店，由浙江省食品药品检验所郭增喜鉴定。3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸对照品（购于 Delta 公司，质量分数 > 98 %）。木犀草苷对照品（批号为 111720-200501，定量测定用）、绿原酸对照品（批号为 110753-200413，定量测定用）由中国药品生物制品检定所提供。乙腈为色谱纯，水为重蒸水，其余为分析纯。

2 方法与结果

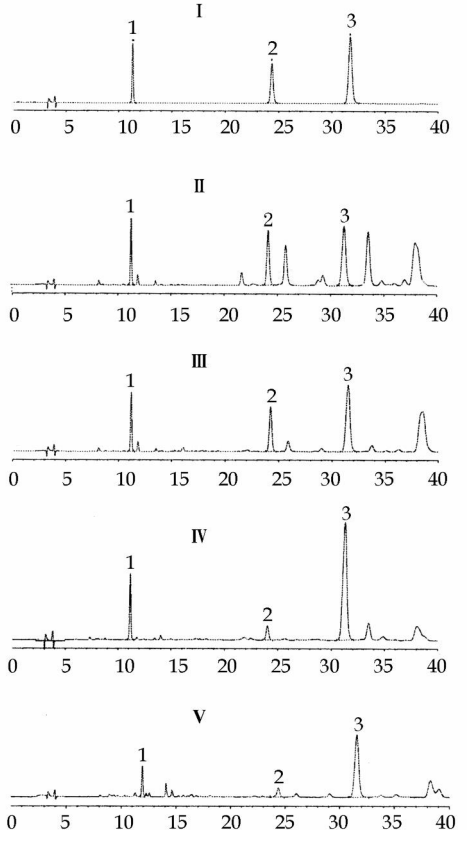
2.1 色谱条件：色谱柱为（Shimadzu VP-ODS 250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相 A 为乙腈，流动相 B 为 0.1 %磷酸溶液，梯度洗脱：0～11 min，A 为 10 %→18 %；11～30 min，A 为 18 %→20 %；30～40 min，A 为 20 %；体积流量：1.0 mL/min；柱温：30 ℃；检测波长 348 nm；进样量：5 μL。

2.2 供试品溶液制备：取菊花粉末（过 1 号筛）约 0.25 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 70 %甲醇 25 mL，密塞，称定质量，超声（45 kHz，300 W）处理 40 min，放冷，再称定质量，用 70 %甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.3 对照品溶液制备：精密称取 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸对照品，木犀草苷对照品以及绿原酸对照品适量，置棕色量瓶中，加 70 %甲醇制成含 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 80 μg/mL、木犀草苷 25 μg/mL、绿原酸 35 μg/mL 的混合溶液，即得（10 ℃以下保存）。

2.4 系统适应性试验：在上述色谱条件下测定，结果表明理论塔板数以 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸计大于 7 000，以木犀草苷计大于 9 000，以绿原酸计大于 8 000，分离度均大于 1.5，色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察：精密吸取混合对照品（3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 78.1 μg/mL，木犀草苷 26.4 μg/mL，绿原酸 34.0 μg/mL 的混合溶液）溶液 0.5、1.2、3、5、10、15 μL 注入高效液相色谱仪，按上述色谱条件测定峰面积，以峰面积积分值为纵坐标，分别以 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷、绿原酸质量为横坐标，绘制标准曲线，计算得到回归方程：$Y = 2\,381.612\,2\,X - 4.107\,6$ ($r = 1.000\,0$)；($Y = 3\,192.904\,5\,X - 2.966\,1$ ($r = 1.000\,0$)，$Y = 1\,734.700\,0\,X - 6.479\,9$ ($r = 0.999\,3$)。结果表明：3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸在 0.039 1～1.171 5 μg 线性关系良好，木犀草苷在 0.013 2～0.396 0 μg 线性关系良好；绿原酸在 0.017 0～0.510 0 μg 线性关系良好。



I-对照品（1-绿原酸 2-木犀草苷 3-3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸） II-杭菊 III-贡菊 IV-亳菊 V-滁菊

I-reference substance (1-chlorogenic acid 2-lutelin-7-*O*-β-*D*-glucoside 3-3,5-*O*-discaffeoylquinc acid) II-Hangju III-Gongju IV-Boju V-Chuju

图 1 菊花中成分测定色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of constituents in Flos Chrysanthemi

2.6 精密度试验：精密吸取同一混合对照品溶液，按上述色谱条件，重复进样 6 次，测定 3 者的面积，结果 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸 RSD 为 0.5 %、木犀草苷 RSD 为 0.7 %、绿原酸 RSD 为 0.3 %。

2.7 重现性试验：取同一批样品（编号：024，贡菊）6 份，分别精密称定，按上述方法测定峰面积。结果 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸的质量分数为 0.83 %（RSD 为 1.5 %），木犀草苷的质量分数为 0.27 %（RSD 为 1.6 %），绿原酸的质量分数为 0.32 %（RSD 为 1.1 %），表明样品的重现性良好。

2.8 稳定性试验：精密吸取供试品溶液，按上述色谱条件，分别于 0、2、6、12、24、48 h 进样，测定 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷、绿原酸的量，RSD 值分别为 0.6 %、2.7 %、0.0 %。表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.9 回收率试验：精密称取同一批样品（编号：024，

贡菊)0.125 g,分别精密加入一定量的 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸对照品、木犀草苷对照品、绿原酸对照品,按供试品溶液制备项下的方法操作,平行操作 9 份,按上述色谱条件测定,计算回收率。3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸的平均回收率分别为 97.7%(RSD 为 2.7%)、101.7%(RSD 为 1.5%)和 98.0%(RSD 为 1.2%)。

2.10 样品测定:按上述测定方法对 28 批菊花样品进行测定,并以外标一点法分别计算 3 成分的量(以干燥品计),结果见表 1。

对 28 批菊花样品依法测定其 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸的量。从测定结果看,杭菊中 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸的量范围分别为 0.77%～1.13%、0.21%～0.56%、0.23%～0.58%,3 者的平均量分别为 0.92%、0.37%、0.39%;滁菊中 3 者的量范围分别为 0.85%～1.51%、0.06%～0.12%、0.17%～0.40%,3 者的平均量分别为 1.15%、0.08%、0.29%;亳菊中 3 者的量分别为 1.56%～2.43%、0.10%～0.15%、0.38%～0.58%,3 者的平均量分别为 1.96%、0.13%、0.45%;贡菊中 3 者的量分别为 0.78%～1.10%、0.20%～0.34%、0.27%～0.39%,平均量分别为 0.93%、0.27%、0.33%。杭菊和贡菊各成分量相近,而亳菊和滁菊中木犀草苷量较低,其中亳菊中 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸量较高,各品种中 3 者的量差别比较大。

表 1 样品测定结果(n=2)

Table 1 Determination of constituents in sample (n=2)

品 种	产 地	3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸/%	RSD/%	木犀草苷/%	RSD/%	绿原酸/%	RSD/%
杭菊 001	浙江桐乡	0.84	0.1	0.38	0.3	0.40	0.2
杭菊 002	浙江桐乡	0.85	0.8	0.56	1.1	0.35	2.2
杭菊 003	浙江桐乡	0.81	0.0	0.40	0.5	0.44	0.3
杭菊 004	浙江桐乡	0.80	0.3	0.50	1.0	0.37	0.1
杭菊 005	浙江桐乡	1.13	0.0	0.46	0.0	0.56	0.1
杭菊 006	浙江桐乡	1.11	0.5	0.49	0.2	0.53	0.2
杭菊 007	浙江桐乡	0.95	0.9	0.43	0.1	0.37	0.6
杭菊 008	浙江桐乡	0.92	0.3	0.21	0.1	0.35	0.0
杭菊 009	浙江桐乡	0.77	0.2	0.23	0.6	0.23	0.2
杭菊 010	浙江桐乡	0.92	0.0	0.24	1.1	0.23	0.1
杭菊 011	浙江桐乡	1.07	0.3	0.39	0.6	0.58	0.2
杭菊 012	浙江桐乡	0.85	0.5	0.21	0.2	0.27	0.2
杭菊 013	浙江桐乡	1.01	0.4	0.29	0.2	0.38	0.4
滁菊 014	安徽滁州	0.85	1.6	0.07	0.0	0.17	1.6
滁菊 015	安徽滁州	1.08	0.1	0.12	0.4	0.29	0.3
滁菊 016	安徽滁州	1.51	2.5	0.06	0.4	0.40	1.4
亳菊 017	安徽亳州	1.98	0.8	0.12	1.9	0.45	0.2
亳菊 018	安徽亳州	2.24	1.4	0.15	1.5	0.38	0.1
亳菊 019	安徽亳州	1.56	0.3	0.12	0.6	0.40	0.2
亳菊 020	安徽亳州	1.72	2.0	0.10	1.4	0.41	1.1
亳菊 021	安徽亳州	1.93	1.1	0.14	0.7	0.49	1.0
亳菊 022	安徽亳州	2.34	1.1	0.13	0.1	0.58	0.6
贡菊 023	安徽	0.78	1.0	0.29	1.4	0.27	1.3
贡菊 024	安徽	0.95	0.3	0.30	0.3	0.36	0.3
贡菊 025	安徽黄山	0.96	0.2	0.34	0.3	0.34	0.5
贡菊 026	安徽黄山	0.88	0.8	0.20	0.0	0.33	0.5
贡菊 027	安徽黄山	1.10	1.3	0.22	1.4	0.39	1.3
贡菊 028	安徽黄山	0.90	0.1	0.26	0.7	0.31	0.3

3 讨论

3.1 本实验考察了回流、超声等提取方法,回流中曾分别比较了 1、2、3、4、5、6 h 6 个水平,用 70%甲醇回流提取 3 个指标成分的量,结果表明样品中绿原酸量保持稳定,但木犀草苷的量随回流时间呈上升的趋势,同时 3,5-*O*-双咖啡酰基奎宁酸的量在不断下降,可能样品在加热回流过程中内部发生了物质转化,故不宜用回流作为提取方法,而采用超声作为提取方法。此外,通过对溶媒种类(甲醇,50%甲醇,70%甲醇,乙醇,50%乙醇)、超声时间、溶液量等因素进行考察,最后确定样品的制备选择取 0.25 g 样品加 25 mL 70%甲醇超声提取 40 min 为宜,该方法操作简便易行。

3.2 本实验中,结合 3 种成分的化学性质,比较甲

醇-磷酸溶液和乙腈-磷酸溶液两种流动相,通过实验发现乙腈-磷酸溶液作为流动相进行梯度洗脱分离度较好,同时又比较了 0.05%磷酸、0.1%磷酸、0.2%磷酸 3 种缓冲液,不同酸度对 3 者的量影响未见显著差异;比较 Shimadzu VP-ODS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Agilent Zorbax SB-C_{18} 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),Ultimate™ XB-C_{18}(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)3 个牌子的色谱柱,调整流动相比例后均能良好分离 3 个成分,且对 3 成分的量影响未见显著差异;还分别比较了 25、30、40 ℃ 3 个温度,结果表明柱温变化对 3 者量影响未见显著差异;又分别比较了 HP1100 和岛津 LC—20AT 2 种液相色谱仪,结果表明这 2 个牌子的仪器对 3 者量的影响也未见显著差异。

3.3 检测波长选定:为了选择合适的检测波长,本实验采用 DAD 检测器。综合考虑了各对照品的吸收系数,检测灵敏度,样品中对照品量的高低差异以及本品中杂质的干扰情况,为使 3 个对照品均有吸收,且杂质干扰较少,故最终选择 348 nm 为检测波长。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.

[2] 刘金旗,吴德林. 菊花中木犀草素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷的含量测定[J]. 中成药,2001,21(3):52-53.

[3] 刘金旗,吴德林,王 兰,等. 菊花中黄酮苷的含量分析[J]. 中草药,2001,32(4):308-310.

[4] 刘吉金,王晓炜,黄服喜,等. 气相色谱法测定菊花挥发油中桉油精、樟脑、龙脑、醋酸龙脑酯[J]. 中草药,2006(9):76-77.

[5] 谷彦杰,彭广芳,钟方晓,等. 我国 8 种主流菊花商品药材中木犀草素含量测定[J]. 山东中医药大学学报,2000(1):66.

[6] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1986.

[7] 胡立宏,陈仲良. 杭白菊的化学成分研究:两个新三萜酯的结构测定[J]. 植物学报,1997,39(1):181-184.

[8] 马双成,毕培曦,黄荣春,等. 金银花药材中抗呼吸道病毒感染的咖啡酰奎宁酸类成分的定量研究[J]. 药物分析杂志,2005,25(7):751-755.

液体硬胶囊技术研讨会在广东省潮州市举办

由潮州市强基制药厂、天津药物研究院共同发起,潮州市强基制药厂组织的“液体硬胶囊技术研讨会”于 2010 年 1 月 8 - 10 日在广东省潮州市举办。会议对液体硬胶囊技术现状、应用范围、存在的优缺点、需要完善的内容进行了研讨。出席本次研讨会的专家有中国工程院院士、天津药物研究院名誉院长刘昌孝研究员北京,大学药学院张强教授,四川大学华西药学院张志荣教授,沈阳药科大学药学院潘卫三教授,中国药科大学药学院周建平教授,中国药科大学中药学院孔令义教授,广州中医药大学中药学院李卫民教授,广东省药品检验所李泳雪主任药师,天津药物研究院王春龙研究员、李桂龙助理研究员,中国医药报社经营管理中心华南办事处陈海荣博士。出席本次会议的领导有潮州市政府雷健民副市长和李加海董事长、李煜龙厂长等企业领导。会议在潮州市政府的大力支持下和与会专家的共同努力下达到预期的目的。

与会专家听取了潮州市强基制药厂和天津药物研究院代表所作的液体硬胶囊技术研究和应用的报告,并参观了研究开发生产现场,就该技术研究、专利设备和应用范围等进行了研讨。与会专家一致认为,液体硬胶囊有别于普通胶囊剂、软胶囊剂。液体硬胶囊在药品研发、生产、临床应用等方面均具有独特的优势,与软胶囊不同。软胶囊目前主要为胃溶明胶软胶囊,由于使用上存在缺陷,如物质迁移较严重、稳定性较差、对明胶有影响的药物不适合、生产周期长等。而目前液体硬胶囊选用的空心胶囊囊材可以是明胶,也可以是植物材料,物质迁移较少,稳定性高;既可以制成胃溶制剂,也可以制成普通肠溶或结肠溶的靶向给药制剂,可以解决明胶软胶囊难以解决的问题,液体硬胶囊的这些优势应多加宣传、推广、介绍,让更多的专业人员及药品监督管理部门有关人员有进一步的认识了解,有利于液体硬胶囊作为胶囊剂的亚剂型进入国家标准,有利于液体硬胶囊新品种的创新开发。

与会专家认真地对液体硬胶囊生产技术涉及的有关问题进行研讨,认为潮州市强基制药厂液体硬胶囊生产技术成熟,生产周期较短,生产设备配套及产能可适应产业化生产,成品质量指标能符合现有标准的要求。随着液体硬胶囊技术的广泛应用,将促进液体硬胶囊新剂型的发展和相关新药品种的开发,让更多有特色、更安全、更有效的液体硬胶囊新药品种能够尽快上市,满足老百姓的用药需求。同时对其技术现状、应用范围以及推广应用需要完善的技术问题提出了建设性的意见。

刘昌孝院士总结发言指出:1. 定位:液体胶囊技术产品应定位明确,以明确该技术的应用范围,提出现有胶囊技术不能解决的制剂问题的独到之处;2. 质量:制定质量控制指标,通过对比研究提出质量控制的指标;3. 数据:积累实验数据,选择几个产品,通过应用现有胶囊技术和液体硬胶囊技术生产的对比试验提出科学数据,证明该技术的优势和特点;4. 认可:进行技术鉴定,在产品定位、质量研究、科学数据比较的基础上,对液体硬胶囊生产技术和生产设备进行技术鉴定,进而申报省市和国家科技进步奖励,为推广应用和列入国家药典标准奠定了基础。 [本刊讯]