

分散固相萃取-HPLC 法测定金银花及其成药连花清瘟胶囊中的环烯醚萜苷类成分

陈静娴^{1,2}, 张敏敏², 崔莉¹, 赵志国¹, 王岱杰¹, 闫慧娇¹, 耿岩玲¹, 赵恒强^{1*}, 王晓^{1*}

1. 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东省科学院中药过程控制研究中心, 山东省分析测试中心, 山东 济南 250014

2. 山东师范大学生命科学学院, 山东 济南 250014

摘要: **目的** 建立分散固相萃取-高效液相色谱(DSPE-HPLC)联用技术应用于金银花及其相关中成药连花清瘟胶囊(LQC)中环烯醚萜苷类成分(马钱酸、莫诺苷、马钱苷、当药苷、断氧化马钱子苷、开联番木鳖苷二甲基乙缩醛)的快速提取、净化和测定的方法。**方法** 分别采用超声提取法对金银花及相关中成药 LQC 进行提取, 采用不同净化材料进行快速净化, 采用 HPLC 法测定环烯醚萜苷类成分。**结果** 采用硅藻土作为净化剂, 金银花提取物净化效果较好; 采用硅藻土-活性炭(80:20)的复合净化剂时, LQC 提取物净化效果较好; 且该提取方法操作简单、快速、样品用量少、净化效率高, 结合 HPLC 技术实现了金银花及相关中成药 LQC 中环烯醚萜苷类成分的快速提取、净化和测定。**结论** 拓展了 DSPE 技术在复杂基质中药材及中成药中活性成分提取、净化中的应用, 为复杂基质中药材及中成药中活性成分的提取净化及分析研究提供了方法和数据支持。

关键词: 分散固相萃取; 环烯醚萜苷; 金银花; 连花清瘟胶囊; 马钱酸; 莫诺苷; 马钱苷; 当药苷; 断氧化马钱子苷; 开联番木鳖苷二甲基乙缩醛; 超声提取法; 硅藻土; 活性炭

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)16-2850-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.012

Determination of iridoid glycosides in *Lonicerae Japonicae Flos* and its patent medicine Lianhua Qingwen Capsule by dispersive solid phase extraction-HPLC

CHEN Jing-xian^{1,2}, ZHANG Min-min², CUI Li¹, ZHAO Zhi-guo¹, WANG Dai-jie¹, YAN Hui-jiao¹, GENG Yan-ling¹, ZHAO Heng-qiang¹, WANG Xiao¹

1. Shandong Laboratory of TCM Quality Control Technology, Process Control Research Center of TCM, Shandong Academy of Sciences, Shandong Analysis and Test Center, Jinan 250014, China

2. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To develop a new method based on dispersive solid phase extraction-high performance liquid chromatography (DSPE-HPLC) for the rapid extraction, cleansing, and determination of iridoid glycosides (loganic acid, morroniside, loganin, sweroside, secoxyloganin, and secologain dimethyl acetal) in *Lonicerae Japonicae Flos* (LJF) and the related traditional Chinese patent medicine (TCPM) Lianhua Qingwen Capsule (LQC). **Methods** Ultrasonic extraction was used for the extraction, different purification material was investigated for the rapid purification, and HPLC method was used for the determination of the content of iridoid glycosides. **Results** The purification effect of LJF extract was much better by using diatomite as the purification material; The purification of LQC extract was much better by using diatomite-active carbon 80:20. This method was simple and rapid, and has high efficiency. It could be used for the extraction, cleaning, and determination of iridoid glycosides in LJF and related prescription combined with HPLC. **Conclusion** This study expands the application of DSPE in the extraction and purification of complex matrix traditional Chinese material medicine (TCMM) and TCPM, and supplies the new method and data support for the extraction and purification of bioactive compounds from complex matrix TCMM and TCPM.

收稿日期: 2016-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473298); 山东省攻关计划(2014GSF119031); 山东省科学院青年基金(青基合字 2014 第 5 号)

作者简介: 陈静娴(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物活性成分研究。Tel: (0531)82605319 E-mail: cjx1991jn@163.com

*通信作者 赵恒强, 男, 副研究员, 研究方向为中药分析与质量控制。Tel: (0531)82605319 E-mail: hqzhao2007@163.com

王晓, 男, 研究员, 研究方向为中药质量控制。Tel: (0531)82605319 E-mail: wxjn1998@126.com

Key words: dispersive solid phase extraction; iridoid glycosides; *Lonicerae Japonicae Flos*; Lianhua Qingwen Capsule; loganic acid; morroniside; loganin; sweroside; secoxyloganin; secologain dimethyl acetal; ultrasonic extraction; diatomite; activated carbon

金银花 *Lonicerae Japonicae Flos* 为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或初开的花^[1]。其味甘、性寒，归肺、心、胃经，具有清热解毒、疏散风热的功能^[2]。金银花及相关中成药在清热解毒、抗病毒等方面疗效显著，在临床上得到广泛应用^[3-4]。环烯醚萜苷是金银花中的一类重要化学成分^[5-6]。近年来研究发现，环烯醚萜苷类成分具有抗病毒、抗菌、抗氧化、保肝利胆、抗肿瘤、抗炎、增强免疫等多种活性^[6-7]。《中国药典》2015 年版仅以绿原酸和木犀草苷作为金银花药材的质量控制指标^[2]，对环烯醚萜苷类成分的定量测定和限量标准未做说明。开展金银花药材及相关中成药中环烯醚萜苷类成分的高效提取和分析方法研究，对进一步研究其作用机制、建立质量标准，提高药材及相关成药质量控制水平，指导临床应用具有重要意义。

金银花中所含化学成分种类较多、极性差异大，包含黄酮、有机酸、环烯醚萜苷、皂苷等多种化学成分；同时，金银花提取物中还存在色素、糖等干扰成分，基质复杂。而含有金银花的相关中成药中所含中药种类更多，且加工过程中药用辅料的使用，造成其化学成分更为复杂。环烯醚萜苷类化合物在金银花中属于量相对较低且极性较强的一类成分，采用单一的回流或超声提取技术易造成提取物组成复杂，分离难度大。因此，结合环烯醚萜苷类成分的结构特点，发展适合金银花药材及其相关中成药中环烯醚萜苷类成分的快速、高效的提取、净化和分析方法亟待解决。

分散固相萃取 (dispersive solid-phase extraction, DSPE) 法是美国农业部于 2003 年提出的一种用于食品样品中多种类、多残留农药快速提取和净化的一种样品前处理技术^[8]。该技术将固相萃取吸附剂分散在样品的提取液中，可以有效去除样品中杂质，达到净化效果^[9]，具有回收率高、前处理时间短、溶剂用量少、操作简便、装置简单，所需空间小等优点^[10]。目前，DSPE 法在食品安全^[10-15]、环境分析^[16]、生物分析^[17-18]等领域得到广泛应用，但在中药、中成药等复杂样品分析中的应用鲜有报道。

本研究发展了一种基于 DSPE 技术的金银花药材及其相关中成药莲花清瘟胶囊 (LQC) 中环烯醚

萜苷类成分的提取、净化和分析技术，为中药中环烯醚萜苷类成分的提取、纯化和分析研究提供方法和技术支持。

1 仪器与材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪，配有四元梯度泵，DAD 检测器，自动进样器等，美国 Agilent 公司；KQ2400KDE 型高功率数控超声波仪，昆山市超声仪器有限公司；R201 型旋转蒸发器，上海申生科技有限公司；BSA1245-CW 型精密天平，德国 Sartorius 公司；Milli-Q (18.2 MΩ) 超纯水处理系统，美国 Millipore 公司。

甲醇 (色谱纯) 购于美国 Tedia 公司；乙腈 (色谱纯) 购于德国 Merck 公司；甲酸 (色谱纯) 购于德国 Riedel 公司；其余试剂均为分析纯，实验用水为 Milli-Q 超纯水 (18.2 MΩ)。硅藻土 (分析纯) 购置于天津大茂化学试剂厂；弗洛里硅土 (60~100 目，色谱用)、聚酰胺 (30~60 目，柱色谱)、中性氧化铝 (100~200 目，色谱用)、碱性氧化铝 (100~200 目，色谱用) 均购于国药集团化学试剂有限公司。本实验所采用的金银花药材 (忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.) 及 LQC (批号 130844、130911、130847，石家庄以岭药业股份有限公司) 均购于山东省济南市漱玉平民大药房，经山东省分析测试中心王晓研究员鉴定。6 种环烯醚萜苷化合物对照品 (马钱酸、莫诺苷、马钱苷、当药苷、断氧化马钱子苷、开联番木鳖苷二甲基乙缩醛) 均由实验室分离制备，结构经过波谱数据鉴定，峰面积归一化法质量分数均大于 98%。

2 方法与结果

2.1 金银花中环烯醚萜苷的提取条件优化

DSPE 法分为提取和净化 2 个环节，本研究分别对 2 个环节的主要参数进行优化。超声提取技术具有高效、快速、使用方便等特点，本研究采用超声提取技术用于金银花药材中环烯醚萜苷的提取，并对提取条件进行了考察。

提取溶剂、提取时间和料液比是影响超声提取效率的关键因素。考察了不同超声提取条件 (提取溶剂: 30%、50%、70%、90%乙醇; 提取时间: 5、10、15、20、25 min; 料液比: 1:25、1:50、1:100、1:150) 对各环烯醚萜苷类成分质量分数的影

响。从表 1 中可以看出, 采用 50%乙醇作为提取溶剂时, 金银花中各环烯醚萜苷类成分质量分数较高。增加提取时间, 各环烯醚萜苷类成分质量分数有增加趋势, 当提取时间超过 15 min 时, 质量分数逐渐降低, 这可能是由于长时间的超声条件下, 环烯醚

萜苷类成分会发生分解或转化, 因此选择提取时间为 15 min。增加料液比有利于活性成分的提取, 但同时会消耗大量的试剂, 综合考虑, 本研究选择 1:100 作为金银花中环烯醚萜苷类成分超声提取的料液比。

表 1 提取溶剂、时间和料液比对金银花中环烯醚萜苷的影响

Table 1 Effect of extraction solvents, extracting time, and ratio of material to solvent on iridoid glycosides in LJJF

提取条件		质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
		马钱酸	莫诺苷	马钱苷	当药苷	断氧化马钱子苷	开联番木鳖苷二甲基乙缩醛
提取溶剂	30%乙醇	499.30	208.84	94.00	213.33	1 454.01	31.06
	50%乙醇	629.28	218.26	116.53	207.75	1 522.95	49.79
	70%乙醇	554.36	218.83	93.24	196.24	1 339.76	86.07
	90%乙醇	126.31	278.43	32.78	115.58	759.10	9.39
提取时间/min	5	258.90	89.00	41.74	129.41	875.91	23.65
	10	365.55	172.18	80.30	154.05	1 127.77	49.00
	15	505.15	223.43	118.35	172.50	1 409.98	84.93
	20	477.19	198.83	105.90	196.89	1 335.06	42.66
	25	494.63	198.55	103.26	203.55	1 366.63	46.31
料液比	1:25	380.74	256.49	41.43	121.50	1 393.52	34.08
	1:50	388.84	286.50	34.88	133.15	1 539.85	42.92
	1:100	445.36	266.67	31.37	136.50	1 530.31	43.05
	1:150	451.69	278.73	67.80	154.05	1 651.53	68.98

2.2 金银花中环烯醚萜苷类成分的净化条件优化

2.2.1 净化剂类型 净化剂类型是影响 DSPE 的重要参数, 考察了不同类型净化剂(如弗洛里硅土、聚酰胺、中性氧化铝、碱性氧化铝、硅藻土)对金银花提取物的净化效果(表 2)。结果表明, 采用硅藻土作为净化剂时各目标成分质量分数较高, 样品溶液颜色较浅, 因此选择硅藻土用于进一步研究。

2.2.2 净化剂用量 增加净化剂的用量可以减少色素、基质及其他共存成分对目标物的影响, 但同时也可能会对目标物产生一定的吸附。本研究考察了净化剂用量(10、30、50、100、150 mg)对提取率的影响(表 2), 结果表明, 各目标成分质量分数随着净化剂用量增加呈现出各具特色的变化趋势, 但当净化剂用量为 100 mg 时, 各目标成分质量分数均相对较高, 因此, 选择净化剂用量为 100 mg 用于后续研究。

2.2.3 净化时间 在优化的净化剂类型和用量条件下, 进一步考察了净化时间(0.5、1、2、5、10、30 min)对各目标成分测定结果的影响(表 2)。从表中可以看出, 随着净化时间增加, 各环烯醚萜苷

类成分质量分数有降低趋势。为了保证净化效果, 同时又不损失目标峰回收率, 本研究选择净化时间为 1 min。

2.3 金银花供试品溶液制备

综合上述实验, 可以确定金银花中环烯醚萜苷的提取净化方法, 具体如下: 准确称取粉碎并过 20~40 目筛的金银花药材 0.3 g 置于三角烧瓶中, 加入 50%乙醇 30 mL, 超声提取 15 min, 取 2 mL 上清液, 加净化剂硅藻土 100 mg, 涡流振荡 1 min, 过 0.22 μm 滤膜后, 取 3 μL 供 HPLC 分析。

2.4 LQC 中环烯醚萜苷类成分的提取条件优化

环烯醚萜苷类成分是一类极性较强的成分, 考虑到中成药中存在多种类型化学成分, 极性差异大, 采用单一的净化剂难以实现中成药中环烯醚萜苷类成分的净化和富集。

在前期实验基础上, 考察了混合净化剂对中成药中环烯醚萜苷类成分的提取和富集效果: 硅藻土-硅藻土-活性炭(90:10)、硅藻土-活性炭(80:20)、硅藻土-活性炭(50:50)(表 3)。结果表明, 当采用硅藻土-活性炭(80:20)时, 多数环烯醚萜苷类

成分占总峰面积百分含量相对较高(表 3),富集效果较好。进一步考察了净化剂用量(10、30、50、100、150 mg)和净化时间(0.5、1、2、5、10、30

min)的影响,结果表明,采用 100 mg 净化剂提取净化 1 min 时,各环烯醚萜苷类成分富集净化效果较好,可用于进一步研究。

表 2 不同净化条件下各化合物质量分数对比

Table 2 Contrast of mass fraction for each compound in different cleaning conditions

净化条件		质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
		马钱酸	莫诺昔	马钱昔	当药昔	断氧化马钱子昔	开联番木鳖昔二甲基乙缩醛
净化剂类型	弗洛里硅土	331.79	292.39	69.12	180.05	1 123.09	50.80
	聚酰胺	350.30	304.42	80.04	183.25	1 167.92	43.43
	中性氧化铝	266.30	272.36	44.48	151.56	1 006.55	28.06
	碱性氧化铝	252.62	245.51	36.35	163.31	965.24	26.14
	硅藻土	385.46	364.92	64.80	177.20	1 319.05	47.28
净化剂用量/mg	10	300.39	191.22	12.98	183.97	801.95	33.83
	30	257.72	252.12	46.26	155.48	971.01	24.86
	50	257.72	260.14	60.23	163.31	944.11	6.93
	100	270.33	278.77	61.50	192.34	1 063.22	4.37
	150	247.79	257.33	39.65	196.79	941.55	4.07
净化时间/min	0.5	496.03	151.75	84.11	235.78	1 341.46	91.14
	1	422.23	153.47	50.58	233.11	1 321.29	50.48
	2	382.78	153.47	50.07	227.24	1 323.21	39.59
	5	358.62	129.71	51.85	231.15	1 307.52	44.71
	10	419.81	168.18	65.06	246.29	1 321.93	37.67
	30	331.79	292.39	69.12	180.05	1 123.09	50.80

表 3 净化剂类型的影响

Table 3 Effect of purifying agent types

净化剂类型	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)					
	马钱酸	莫诺昔	马钱昔	当药昔	断氧化马钱子昔	开联番木鳖昔二甲基乙缩醛
硅藻土	448.32	18.54	29.78	196.73	447.32	24.85
硅藻土-活性炭(90:10)	348.16	44.51	48.17	177.36	428.36	39.84
硅藻土-活性炭(80:20)	364.69	47.72	32.42	187.12	414.15	68.86
硅藻土-活性炭(50:50)	415.15	29.92	15.86	180.64	401.47	7.51

净化剂类型	目标峰占总样品峰比例/%					
	马钱酸	莫诺昔	马钱昔	当药昔	断氧化马钱子昔	开联番木鳖昔二甲基乙缩醛
硅藻土	5.06	0.40	0.39	2.66	3.43	6.11
硅藻土-活性炭(90:10)	4.14	0.86	0.68	2.87	3.93	10.07
硅藻土-活性炭(80:20)	4.36	0.91	0.51	3.05	3.84	15.68
硅藻土-活性炭(50:50)	4.59	0.60	0.28	2.74	3.46	9.08

2.5 LQC 供试品溶液制备

综合上述实验,可以确定 LQC 中环烯醚萜苷的提取净化条件,具体如下:准确称取 1.0 g LQC 样品置于三角烧瓶中,加入 50%乙醇 40 mL,提取 1 min,取 2 mL 上清液,加净化剂硅藻土-活性炭(80:

20) 100 mg, 涡流振荡 1 min, 过 0.22 μm 滤膜后,取 3 μL 供 HPLC 分析。

2.6 对照品溶液的制备

分别精密称取马钱酸、莫诺昔、马钱昔、当药昔、断氧化马钱子昔、开联番木鳖昔二甲基乙缩醛

对照品适量置 10 mL 棕色量瓶中,加 50%甲醇溶解,定容至刻度,摇匀,制成质量浓度分别为 333.33、333.33、366.67、300.00、333.33、333.33 μg/mL 混合储备液。使用时,按一定比例稀释制成标准溶液(具体稀释倍数分别为 2、4、20、40、200、400、2 000 倍),待用。

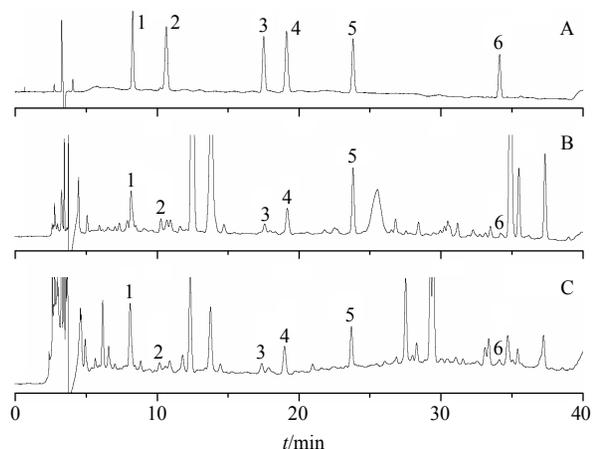
2.7 色谱条件

Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.4%甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱程序: 0~15 min, 10%~14%乙腈; 15~35 min, 14%~25%乙腈; 35~45 min, 25%~50%乙腈; 45~50 min, 50%~100%乙腈; 50~65 min, 100%乙腈; 检测波长 240 nm; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 3 μL; 柱温 25 °C。在本研究优化的色谱条件下金银花及其其中成药中环烯醚萜苷类成分的色谱图如图 1 所示。

2.8 方法学考察

按“2.7”色谱条件进样分析,测定各不同质量浓度的混合对照品溶液中各化合物的峰面积,以各化合物质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,并求得回归方程(表 4)。将标准溶液稀释至低浓度进样,以 3 倍信噪比计算各

成分的检测限,以 10 倍信噪比计算定量限,结果见表 4^[11-14]。



1-马钱酸 2-莫诺苷 3-马钱苷 4-当药苷 5-断氧化马钱子苷
6-开联番木鳖苷二甲基乙缩醛
1-loganic acid 2-morroniside 3-loganin 4-swersoside
5-secoxyloganin 6-secologain dimethyl acetal

图 1 混合对照品 (A)、金银花提取物 (B)、LJC 提取物 (C) 的 HPLC-DAD 图

Fig. 1 HPLC-DAD of mixed reference substances (A), extract of LJC (B), and extract of LJC (C)

表 4 HPLC-DAD 分析环烯醚萜苷类成分的回归方程、线性范围及检测限、定量限

Table 4 Regression curves, linear range, and detection and quantitation limits of iridoid glycosides determined by HPLC-DAD

名称	回归曲线	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
马钱酸	Y=18.63 X+16.58	0.999 7	0.17~83.33	0.057	0.17
莫诺苷	Y=24.95 X+9.33	0.999 3	0.17~83.33	0.026	0.17
马钱苷	Y=19.68 X+5.79	0.999 5	0.18~91.67	0.055	0.18
当药苷	Y=28.08 X-0.91	0.999 4	0.15~75.00	0.045	0.15
断氧化马钱子苷	Y=19.06 X-0.04	0.999 6	0.17~83.33	0.051	0.17
开联番木鳖苷二甲基乙缩醛	Y=15.83 X-0.24	0.999 7	0.17~83.33	0.051	0.17

在本研究优化的色谱条件下,以金银花提取物中各环烯醚萜苷类成分的保留时间和峰面积为考察指标,对该分析方法的精密度、重复性、稳定性和加标回收率分别进行了考察^[11-14]。精密度试验结果表明各环烯醚萜苷类成分保留时间的 RSD 值均低于 0.95%,峰面积的 RSD 值均低于 1.51%,结果表明仪器精密度良好。6 次重复性试验结果表明,各环烯醚萜苷类成分保留时间的 RSD 值均低于 1.23%,峰面积的 RSD 值均低于 4.21%,结果表明该方法的重复性良好。24 h 内稳定性试验表明,各环烯醚萜苷类成分保留时间的 RSD 值在 0.08%~0.65%,峰面积的 RSD 值在 0.85%~1.74%,表明供

试品溶液在 24 h 内基本稳定。精密称取已知各目标化合物量的金银花样品 0.30 g,分别准确加入对照品适量,按照供试品溶液制备方法处理 6 份,按“2.7”项色谱条件进样分析,测定各目标化合物峰面积,计算平均加样回收率,结果表明,各目标成分加标回收率在 90.5%~102.1%,RSD 值在 0.67%~2.27%。以上数据说明,该方法具有较好的精密度、稳定性和重现性,可以用于金银花中环烯醚萜苷类成分的准确测定。

采用相同的方法对 HPLC 法测定 LJC 中环烯醚萜苷的方法学进行了考察。精密度试验表明,各环烯醚萜苷类成分保留时间的 RSD 值在 0.45%~

0.87%，峰面积的 RSD 值在 0.71%~1.68%。重复性试验表明，各环烯醚萜苷类成分保留时间的 RSD 值均低于 0.91%，峰面积的 RSD 值均低于 3.93%。24 h 内稳定性试验表明，各环烯醚萜苷类成分保留时间的 RSD 值均低于 0.95%，峰面积的 RSD 值均低于 3.67%。加样回收率试验表明，各环烯醚萜苷类成分加样回收率在 92.7%~98.5%，RSD 值在 0.85%~1.91%。

2.9 样品测定

分别采用“2.3”和“2.5”项样品溶液制备方法制备样品溶液，采用“2.7”项色谱条件分别进样分析，获得 3 批金银花和 3 批 LQC 样品中环烯醚萜苷

类成分的色谱峰面积，将测得结果带入表 4 线性回归方程，计算金银花和 LQC 中环烯醚萜苷类成分的量（表 5）。从表 5 可以看出，金银花中 6 种环烯醚萜苷类成分总量在 1 269.22~2 135.48 μg/g，总量平均值为 1 683.72 μg/g；其中，质量分数较高的成分主要是马钱酸、当药苷和断氧化马钱子苷，其质量分数平均值分别为 460.86、406.89、594.88 μg/g。

LQC 中 6 种环烯醚萜苷类成分的总质量分数在 1 147.97~1 327.68 μg/g，总量平均值为 1 219.65 μg/g；其中，质量分数较高的成分主要是马钱酸、当药苷和断氧化马钱子苷，其质量分数平均值分别为 461.49、229.26、335.93 μg/g。

表 5 样品中环烯醚萜苷的测定结果 (n = 3)
Table 5 Contents of iridoid glycosides of samples (n = 3)

样品	质量分数/(μg·g ⁻¹)					
	马钱酸	莫诺苷	马钱苷	当药苷	断氧化马钱子苷	开联番木鳖苷二甲基乙缩醛
金银花 1	635.46	151.25	45.78	310.34	452.64	51.00
金银花 2	543.59	135.95	57.22	536.72	786.15	75.85
金银花 3	203.54	28.74	32.57	373.61	545.86	84.90
LQC 4	518.67	28.97	100.83	242.32	355.17	81.72
LQC 5	427.74	22.88	100.02	224.52	328.94	79.19
LQC 6	438.05	18.55	66.28	220.95	323.69	80.45

3 讨论

金银花中多种类型化学成分共存，色谱条件的优化对实现环烯醚萜苷类化合物的成功分析显得尤为重要。本研究考察了 4 根不同类型色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Waters XSELECTTM HSS T3 (150 mm×3.0 mm, 3.5 μm) 的分析效果。结果表明，采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱时，金银花及方剂提取物中各环烯醚萜苷类成分分离度高、峰形较好，可用于进一步分析研究。对比了甲醇-水和乙腈-水作为流动相时的洗脱效果，结果表明，采用乙腈-水作为流动相，梯度洗脱时各环烯醚萜苷类成分分离较好。

由于环烯醚萜苷类成分含有多羟基，可与色谱柱残留硅羟基反应造成色谱峰拖尾现象，考察了水相中加入不同体积分数 (0.2%、0.4%、0.6%) 甲酸对峰形的影响，结果表明，当水相中加入 0.4% 甲酸时，各环烯醚萜苷类成分峰形对称性较好，可以用于进一步分离研究。经二极管阵列检测器考察各环

烯醚萜苷类成分在不同波长 (190~640 nm) 下的紫外吸收波长，结果表明，在 240 nm 下各环烯醚萜苷类成分具有最大吸收，且各化合物具有较好的分离度和灵敏度，因此选择 240 nm 作为环烯醚萜苷类成分的检测波长。

本研究建立了 DSPE-HPLC 法提取、净化和测定金银花及相关方剂中环烯醚萜苷类成分的方法。该方法操作简单、样品净化效果好，可减少复杂基质和多成分中药提取物色谱分离难度，避免死吸附现象发生，且目标物回收率较高。用于金银花及 LQC 中环烯醚萜苷类成分的提取和分析研究，效果较好。研究结果为中药及方剂等复杂基质中化学成分的提取、净化和分析研究提供了新思路，并拓展了 DSPE 技术在中药、中成药等复杂基质样品分析及质量控制中的应用。

参考文献

- [1] 张守平, 辛宁, 王柳萍. 金银花化学成分及质量控制研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(3): 84-86.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

- [3] 王仁杰, 李 淼, 闫 明, 等. 信息熵理论在热毒宁口服制剂中金银花与栀子提取工艺优选中的应用 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 683-687.
- [4] 白丽红, 邹 宇. 金银花的药理分析及应用 [J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(4): 159-160.
- [5] 夏 远, 李弟灶, 裴振昭, 等. 金银花化学成分的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(4): 26-32.
- [6] 宋亚玲, 倪付勇, 赵祜武, 等. 金银花化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(24): 3656-3664.
- [7] 纪瑞锋, 刘素香, 王文倩, 等. 忍冬属植物环烯醚萜苷类成分研究概况 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1226-1232.
- [8] Anastassiades M, Katerina M, Steven J L. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1015(1/2): 163-184.
- [9] 王 丽, 金 芬, 李敏洁, 等. 分散固相萃取-气相色谱-串联质谱法测定蔬菜中多环芳烃及卤代多环芳烃 [J]. 分析化学, 2013, 41(6): 869-875.
- [10] 郑文慧, 叶江雷, 王秀彬, 等. 分散固相萃取法在农药残留检测中应用的进展 [J]. 分析仪器, 2011(4): 23-27.
- [11] 郭伟华, 周金慧, 黄京平, 等. 分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中生物碱 [J]. 分析化学, 2014, 42(10): 1453-1458.
- [12] 邓 莉, 郝学财. 分散固相萃取技术分析油脂类食品中塑化剂含量 [J]. 分析化学, 2013, 41(7): 1037-1043.
- [13] 曹 鹏, 牟 妍, 高 飞, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测火锅食材中 11 种喹诺酮类药物 [J]. 色谱, 2013, 31(9): 862-868.
- [14] 李 婷, 汤 智, 洪武兴. 分散固相萃取-气相色谱-质谱法测定含油脂食品中 17 种邻苯二甲酸酯 [J]. 分析化学, 2012, 40(3): 391-396.
- [15] Zhao P Y, Wang L, Zhou L, *et al.* Multi-walled carbon nanotubes as alternative reversed-dispersive solid phase extraction materials in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS method [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1225(1588): 17-25.
- [16] Wu X L, Hong H J, Liu X T, *et al.* Graphene-dispersive solid-phase extraction of phthalate acid esters from environmental water [J]. *Sci Total Environ*, 2013, 444(2): 224-230.
- [17] 郭 伟, 刘 永, 刘 宁, 等. 超高效液相色谱串联质谱分析牛乳中 24 种磺胺类药物残留 [J]. 分析化学, 2009, 37(11): 1638-1644.
- [18] 洪 萍, 李 颖, 李 峰, 等. 改良 QuEChERS-气相色谱法快速检测血中有机磷农药的方法研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(6): 1296-1298.