

不同产地加工方法对野菊花中二咖啡酰奎尼酸类成分含量的影响[△]

吴明侠*, 许 闽, 崔永霞, 王丽果(河南中医学院, 郑州 450046)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4090-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.20

摘要 目的:建立测定野菊花中二咖啡酰奎尼酸类成分含量的方法,并比较不同产地加工方法对其含量的影响,为确定其较佳加工方法提供依据。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.1%磷酸溶液-甲醇(梯度洗脱),检测波长为326 nm,柱温为25 ℃,流速为0.8 ml/min。结果:3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸的进样量分别在87.36~873.60、65.81~658.10、32.00~320.00 ng范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(r 分别为0.999 9、0.999 9、0.999 8);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;平均加样回收率分别为99.59%、99.65%、99.50%,RSD分别为1.53%、1.78%、2.27%(n 均为6)。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于野菊花中二咖啡酰奎尼酸类成分的含量测定。野菊花中二咖啡酰奎尼酸类成分的含量除与温度有关外,还与烘晒时间长短有一定的关系。

关键词 高效液相色谱法;野菊花;3,4-二咖啡酰奎尼酸;3,5-二咖啡酰奎尼酸;4,5-二咖啡酰奎尼酸;含量测定;产地加工

Effects of Different Producing Area Processing on the Content of Dicafeoylquinic Acid in *Chrysanthemum indicum*

WU Ming-xia, XU Min, CUI Yong-xia, WANG Li-guo(Henan College of TCM, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of dicafeoylquinic acid in *Chrysanthemum indicum* and compare the effects of different producing area processing on the content of dicafeoylquinic acid, and to provide reference for determining the optimal processing technology. METHODS: HPLC method was used. The separation was performed on Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)column with mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid-methanol (gradient elution) at flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 326 nm and column temperature was 25 ℃. RESULTS: The linear ranges were 87.36-873.60 ng ($r=0.999 9$) for 3, 4-*O*-dicafeoylquinic acid, 65.81-658.10 ng ($r=0.999 9$) for 3, 5-*O*-dicafeoylquinic acid and 32.00-320.00 ng ($r=0.999 8$) for 4, 5-*O*-dicafeoylquinic acid. The RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 3%. Average recoveries were 99.59% (RSD=1.53%, $n=6$), 99.65% (RSD=1.78%, $n=6$) and 99.50% (RSD=2.27%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and it is suitable for the content determination of dicafeoylquinic acid in *C. indicum*. The content of dicafeoylquinic acid in *C. indicum* is related with temperature and also associated with drying time.

KEY WORDS HPLC; *Chrysanthemum indicum*; 3,4-*O*-dicafeoylquinic acid; 3,5-*O*-dicafeoylquinic acid; 4,5-*O*-dicafeoylquinic acid; Content determination; Producing area processing

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L.的干燥头状花序,具有清热解毒之功效,用于治疗疔疮痈肿、目赤肿痛、头痛眩晕等证^[1]。野菊花富含多种化学成分,主要有效成分为有机酸类和黄酮类^[2-3]。目前,关于野菊花中黄酮类成分的研究较多^[4],而有机酸类成分的研究相对较少,且多是测定其中绿原酸、咖啡酸的含量^[5-7]。研究表明,咖啡酰奎尼酸类成分具有抗炎、抗病毒等多种药理活性^[8],而野菊花中咖啡酰奎尼酸类成分的研究鲜有报道,关于其中3,4-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸的测定未见报道。因此,笔者建立了以高效液相色谱(HPLC)法同时测定野菊花中3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸和4,5-二咖啡酰奎尼酸含量的方法,并比较了不同产地加工方法对野菊花中二咖啡酰奎尼酸

类成分含量的影响。

1 材料

1.1 仪器

SUMMIT 680型HPLC仪(美国Dionex公司)。

1.2 试剂

3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号分别为MUST-09061602、MUST-09061601、MUST-09041001,纯度均≥98%);甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为娃哈哈纯净水。

1.3 药材

野菊花药材采自河南临颖县,经河南中医学院董诚明教授鉴定为菊科植物野菊 *C. indicum* L.的干燥头状花序。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1%磷酸溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~20 min, 17% B→34% B; >20~45 min, 34% B→35% B; >45~60 min, 35% B

[△] 基金项目:河南省高等学校青年骨干教师资助计划项目(No.2011GGJS-090);河南省教育厅科学技术研究重点项目(No.12B360012);河南中医学院“博士科研基金”项目(No.BSJJ2009-11)

* 副教授,博士。研究方向:中药质量控制及药效物质基础。
E-mail: mxwu711@163.com

保持 15 min; >60~70 min, 35% B→55% B); 检测波长: 326 nm; 柱温: 25 °C; 流速: 0.8 ml/min。 色谱见图 1。

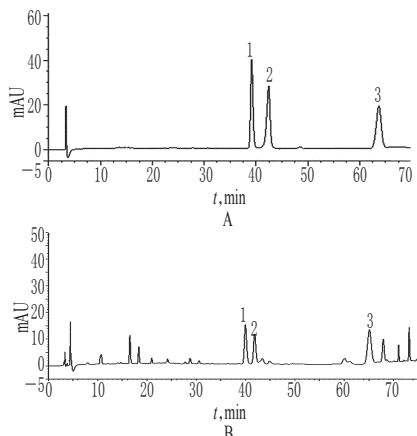


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品; B. 供试品; 1. 3, 4-二咖啡酰奎尼酸; 2. 3, 5-二咖啡酰奎尼酸; 3. 4, 5-二咖啡酰奎尼酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed control; B. test sample; 1, 3, 4-*O*-dicafeoylquinic acid; 2, 3, 5-*O*-dicafeoylquinic acid; 3, 4, 5-*O*-dicafeoylquinic acid

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取 3 种对照品各适量, 加 70% 乙醇溶解并稀释制成 3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸和 4, 5-二咖啡酰奎尼酸质量浓度分别为 87.36、65.81、32.00 μg/ml 的混合对照品溶液, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取野菊花粉末约 0.5 g, 精密称定, 加 70% 乙醇 70 ml, 称定质量, 80 °C 回流 2 h, 放冷, 再次称定质量, 用 70% 乙醇补足缺失的质量, 滤过, 精密吸取续滤液 35 ml, 置 50 ml 量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 线性关系的考察

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液 1、2、4、6、8、10 ml, 以甲醇定容至 10 ml, 制备成系列对照溶液。吸取各溶液 10 μl, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以峰面积积分值(*y*)为纵坐标, 进样量(*x*)为横坐标, 绘制标准曲线, 得 3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸、4, 5-二咖啡酰奎尼酸的回归方程分别为 $y=0.572 8x-8.242 7$ ($r=0.999 9, n=6$)、 $y=0.643 9x-1.006 0$ ($r=0.999 9, n=6$)、 $y=0.531 5x-0.941 8$ ($r=0.999 8, n=6$)。结果表明, 3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸和 4, 5-二咖啡酰奎尼酸的进样量分别在 87.36~873.60、65.81~658.10、32.00~320.00 ng 范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取同一混合对照品溶液 10 μl, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积。结果显示, 3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸和 4, 5-二咖啡酰奎尼酸的 RSD 分别为 0.61%、0.75%、0.49% (n 均为 6), 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 10 μl, 分别于 0、3、6、9、12 h 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果显示, 3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸和 4, 5-二咖啡酰奎尼酸的 RSD 分别为 1.05%、1.67%、1.25% (n 均为 5), 表明供试品溶液

在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验

精密称取野菊花样品粉末适量, 共 6 份, 分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 每次进样 10 μl, 记录峰面积, 测定样品含量。结果显示, 样品中 3, 4-二咖啡酰奎尼酸、3, 5-二咖啡酰奎尼酸和 4, 5-二咖啡酰奎尼酸的平均含量分别为 2.861、5.075、1.492 mg/g, RSD 分别为 0.82%、1.73%、1.55% (n 均为 6), 表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取于 60 °C 烘干的野菊花样品粉末 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别精密加入一定量的 3 种对照品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 每次进样 10 μl, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 1 Results for recovery tests ($n=6$)

成分	序号	称样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
3,4-二咖啡酰奎尼酸	1	0.250 4	0.779 0	0.752 0	1.513 2	97.63		
	2	0.249 8	0.777 1	0.752 0	1.521 4	98.98		
	3	0.250 2	0.778 4	0.752 0	1.519 6	98.56	99.59	1.53
	4	0.250 1	0.778 1	0.752 0	1.543 6	101.80		
	5	0.250 3	0.778 7	0.752 0	1.529 6	99.85		
	6	0.249 7	0.776 8	0.752 0	1.534 4	100.74		
3,5-二咖啡酰奎尼酸	1	0.250 4	1.399 5	1.206 0	2.626 4	101.73		
	2	0.249 8	1.396 1	1.206 0	2.568 9	97.25		
	3	0.250 2	1.398 4	1.206 0	2.596 1	99.31	99.65	1.78
	4	0.250 1	1.397 8	1.206 0	2.624 4	102.62		
	5	0.250 3	1.398 9	1.206 0	2.587 8	98.58		
	6	0.249 7	1.395 6	1.206 0	2.593 5	99.33		
4,5-二咖啡酰奎尼酸	1	0.250 4	0.490 5	0.518 0	1.022 9	102.78		
	2	0.249 8	0.489 4	0.518 0	0.994 8	97.57		
	3	0.250 2	0.490 1	0.518 0	1.004 8	99.36	99.50	2.27
	4	0.250 1	0.489 9	0.518 0	1.016 6	101.68		
	5	0.250 3	0.490 3	0.518 0	0.999 5	98.30		
	6	0.249 7	0.489 2	0.518 0	0.993 3	97.32		

2.9 样品含量测定

称取不同产地加工的野菊花样品, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别按“2.3”项下方法制成供试品溶液。分别吸取各供试品溶液 10 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积计算各样品中 3 种二咖啡酰奎尼酸类成分的含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果

Tab 2 Results of content determination of samples

不同产地加工样品	3,4-二咖啡酰奎尼酸, mg/g	3,5-二咖啡酰奎尼酸, mg/g	4,5-二咖啡酰奎尼酸, mg/g
40 °C 烘干	2.886	2.966	1.199
晾干	3.017	5.834	1.689
锅底温度 110 °C	2.961	4.833	1.437
锅底温度 130 °C	3.502	7.487	3.383
锅底温度 160 °C	3.371	7.693	3.361
炒炭	3.504	7.602	3.921
蒸后烘干	5.105	2.917	4.639
60 °C 烘干	3.111	5.589	1.959
晒干	2.862	3.420	1.420

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

本试验选用了甲醇、乙醇、水、70% 甲醇、70% 乙醇作为样

HPLC法同时测定红花注射液中腺苷和羟基红花黄色素A的含量^Δ

黄燕萍*(北海食品药品检验所,广西北海 536000)

中图分类号 R283.611;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4092-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.21

摘要 目的:建立同时测定红花注射液中腺苷和羟基红花黄色素A含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-乙腈-0.7%磷酸溶液(梯度洗脱),柱温为30℃,流速为0.8 ml/min,检测波长为260 nm(0~14 min)和403 nm(>14~35 min)。结果:腺苷和羟基红花黄色素A的质量浓度分别在1.194~71.640、2.070~82.800 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系(*r*均为0.999 9);精密度、重复性、稳定性试验的RSD<1%;平均加样回收率分别为101.18%和100.56%,RSD分别为1.33%和1.13%(*n*均为9)。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于红花注射液的质量控制。

关键词 红花注射液;高效液相色谱法;腺苷;羟基红花黄色素A;含量测定

Content Determination of Adenosine and Hydroxysafflor Yellow A in Honghua Injections by HPLC

HUANG Yan-ping(Beihai Institute for Food and Drug Control, Guangxi Beihai 536000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the content determination of adenosine and hydroxysafflor yellow A in Honghua injection. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm)with mobile phase composed of methanol-acetonitrile-0.7% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was 30 °C. The detection wavelength was set at 260 nm within 0-14 min and 403 nm within 14-35 min. RESULTS: The linear ranges of adenosine and hydroxysafflor yellow A were 1.194-71.640 μg/ml(*r*=0.999 9) and 2.070-82.800 μg/ml(*r*=0.999 9). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 1%. The average recoveries were 101.18% (RSD=1.33%, *n*=9) and 100.56% (RSD=1.13%, *n*=9). CONCLUSIONS: The methods is simple, accurate and repeatable, and it is suitable for the quality control of Honghua injections.

KEY WORDS Honghua injections; HPLC; Adenosine; Hydroxysafflor yellow A; Content determination

品提取溶剂进行比较,发现用70%乙醇作为提取溶剂所得的成分含量远远高于其他溶剂提取结果,且乙醇无毒、无污染,故选其作为提取溶剂。通过正交试验,最终选择用70%乙醇、80℃回流提取2h。

3.2 检测波长的选择

由于同时测定不同波长的成分,通过全波长扫描发现326 nm波长下3种二咖啡酰奎尼酸类成分的响应值相对最大,因此选择326 nm作为检测波长。

4 结论

本试验研究了不同产地加工方法对野菊花中二咖啡酰奎尼酸类成分含量的影响,结果表明40℃烘干品种中3种二咖啡酰奎尼酸类成分的含量最低,晒干品种次之,炒炭品种成分含量总体相对较高。随着锅底温度的升高,3种二咖啡酰奎尼酸类成分的含量有增大趋势,蒸后烘干品种中3,4-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸含量明显高于其他炮制品。由此可见,野菊花中二咖啡酰奎尼酸类成分的含量除与温度有关外,还与烘晒时间长短有一定的关系。

本方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于野菊花中

二咖啡酰奎尼酸类成分的含量测定。本试验结果可为规范野菊花产地加工方法、控制其质量提供依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:295.
- [2] 王丹.药用植物野菊花的研究现状及发展前景[J].现代中药研究与实践,2007,21(4):59.
- [3] 涂兴明,刘淦华,刘承萍,等.不同来源野菊花的质量研究[J].中药新药与临床药理,2010,21(4):425.
- [4] 张沂,凌云,蔡清宇,等.浓缩型咽炎颗粒(无糖型)质量标准研究[J].中国药房,2009,20(6):438.
- [5] 符玲,潘成学,蒋莹,等.不同产地市售野菊花中绿原酸的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):68.
- [6] 郭巧生,房海灵,申海进.不同产地野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量[J].中国中药杂志,2010,35(9):1160.
- [7] 林丽美,王永炎,许招懂,等.反相高效液相色谱法同步测定野菊花中绿原酸、木犀草素-7-O-β-D葡萄糖苷和蒙花苷含量[J].中南药学,2009,7(8):574.
- [8] 赵昱,赵军,李湘萍,等.咖啡酰奎尼酸类化合物研究进展[J].中国中药杂志,2006,31(11):869.

(收稿日期:2012-10-17 修回日期:2013-02-04)

Δ 基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目(No.桂科攻10124001A-66)

* 副主任药师。研究方向:食品与药品检验。电话:0779-6803508。E-mail:huangyanping500@163.com