

表2 三七提取液中皂苷含量

Tab. 2 Saponin contents in the extract of Notoginseng Radix et Rhizoma

提取时间/ h	三七皂苷 R ₂ (S)/ mg·g ⁻¹	七叶胆苷 XVII/ mg·g ⁻¹	人参皂苷 F ₂ / mg·g ⁻¹
0.5	0.078	0.051	0.006
1	0.118	0.075	0.011
2	0.156	0.093	0.015
3	0.181	0.101	0.018
4	0.206	0.107	0.021
5	0.222	0.111	0.023
6.5	0.232	0.111	0.025
8	0.252	0.118	0.028

3 结论

本研究建立了三七提取液中三七皂苷 R₂(S)、七叶胆苷 XVII 以及人参皂苷 F₂ 的含量测定方法, 该方法简单易行, 准确可靠, 重现性好, 可用于监测三七提取液中上述 3 种皂苷成分的含量变化。

REFERENCES

[1] 时圣明, 李巍, 曹家庆, 等. 三七果化学成分的研究[J]. 中草药, 2010, 30(8): 1249-1251.

[2] WAN X Q, CHEN S H, PENG Y S, et al. Comparative of Notoginseng Radix et Rhizome and its processed products on enriching blood and supplementing Qi of rats with blood-deficiency [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(6): 696-699.

[3] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 450-451.

[4] 黄凤. 三七叶皂苷成分及其单体提取分离研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(6): 999-1005.

[5] 李庆. 三七的化学成分及其对冠心病的药理作用分析[J]. 中国保健营养, 2013, 24(7): 2098-2099.

[6] CUI H M, ZHANG C G, LIN H, et al. Determination of effective components in different position of *Panax notoginseng* by HPLC [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2009, 32(12): 1810-1813.

[7] WAN X Q, XIA B H, LOU Z H, et al. Determination of saponnins in different processed products of *Panax notoginseng* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2011, 26(4): 841-843.

[8] 周家明, 叶祖光, 崔秀明, 等. 三七皂苷 R₁、R₂ 和人参皂苷 Rb₁ 药效学研究[J]. 中成药, 2010, 32(9): 1494-1497.

[9] HONG X Y. Research of extraction, separation, purification and antioxidant effection of Gypenosides [D]. Guangdong: South China University of Technology, 2012.

[10] LEE S J, KO W G, KIM J H, et al. Induction of apoptosis by a novel intestinal metabolite of ginseng saponin via cytochrome c-mediated activation of caspase-3 protease [J]. Biochem Pharmacol, 2000(60): 677-685.

[11] CHEN Q. Study on the preparative methods and the anti-tumor effect of ginsenoside F₂ [D]. Jilin: Jilin Agricultural University, 2008.

收稿日期: 2014-10-28

HPLC 同时测定野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的含量

沈亚芬¹, 杜伟锋^{2*}, 郑敏霞¹, 葛卫红² (1.浙江省中医院, 杭州 310006; 2.浙江中医药大学中药炮制技术研究中心, 杭州 311401)

摘要: 目的 建立同时测定野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷含量的方法。方法 采用高效液相色谱法, 应用 Agilent Eclipse C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 二极管阵列检测器(DAD), 以甲醇-乙腈-0.2%乙酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长为 334 nm。结果 绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的峰面积与浓度的线性关系良好 ($r>0.9993$), 平均加样回收率分别为 99.5%, 100.4%, 100.4%。结论 该方法简单、准确、重复性好, 可为全面评价和控制野菊花的质量提供依据。

关键词: 野菊花; 绿原酸; 咖啡酸; 蒙花苷; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)09-1117-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.022

基金项目: 浙江省中医药学会医院中药科研专项基金——华东专项(2013109)

作者简介: 沈亚芬, 女, 主管中药师 Tel: (0571)87071657 E-mail: 2855224757@qq.com *通信作者: 杜伟锋, 男, 博士, 副教授 Tel: (0571)85369163 E-mail: 2855224757@qq.com

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Caffeic Acid and Linarin in *Chrysanthemi Indici Flos* by HPLC

SHEN Yafen¹, DU Weifeng^{2*}, ZHENG Minxia¹, GE Weihong²(1.Traditional Chinese Medical Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310006, China; 2.Traditional Chinese Medicine Processing Technology Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311401, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To simultaneously determine the content of chlorogenic acid, caffeic acid and linarin in *Chrysanthemi Indici Flos*. **METHODS** The HPLC method with DAD was used in the assay. All separations were carried out on an Agilent Eclipse C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm). A linear gradient elution of methanol-acetonitrile-0.2% aqueous acetic acid was used to run the separation. The solvent flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was maintained at 30 °C. The detection wavelength was 334 nm. **RESULTS** Excellent linear behavior over the investigated concentration range was observed, with $r>0.999\ 3$ for all the analytes. The average recovery values of chlorogenic acid, caffeic acid and linarin were 99.5%, 100.4%, 100.4%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate and reproducible, contributing to quality evaluation and control of *Chrysanthemi Indici Flos*.

KEY WORDS: *Chrysanthemi Indici Flos*; chlorogenic acid; caffeic acid; linarin; HPLC

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L.的干燥头状花序, 功效为清热解毒、泻火平肝, 临床上主要用于治疗疔疮痈肿、目赤肿痛、头痛眩晕。中国药典 2010 年版规定以蒙花苷为检测指标^[1-2], 但是单一指标很难整体控制野菊花药材的质量。已有学者把绿原酸^[3-5]、木犀草苷^[6]作为检测指标, 并进行了多成分检测^[7-11]。文献[7]选择测定了野菊花中绿原酸、咖啡酸、蒙花苷 3 个成分的含量, 但不是同时测定, 较为繁琐。本试验选取绿原酸、咖啡酸、蒙花苷 3 种主要成分作为质控指标, 采用 HPLC 进行了同时测定, 节省了分析时间, 可快速、全面地控制野菊花的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent-1260 高效液相色谱仪, 配有 G1311B 快速液相色谱四元泵及脱气机、G1329B 自动进样器、G1316C 高性能柱温箱、G4212B DAD 检测器, M8301AA OpenLAB CDS ChemStation 软件工作站(美国 Agilent 仪器公司); AL-204 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; KQ-500E 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

绿原酸(批号: 110753-201314, 纯度: 96.6%)、咖啡酸(批号: 110885-200102, 纯度: 100.0%)、和蒙花苷对照品(批号: 111528-201107, 纯度: 98%)均购自中国药品生物制品鉴定所; 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 冰乙酸为分析纯; 水为去离子水。

1.3 药材

野菊花采自浙江丽水、遂昌、金华、杭州、桐乡等地, 经浙江省中医院郑敏霞主任中药师鉴定为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L.的干燥头状花序。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取本品粉末(过 3 号筛)约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 100 mL, 称定重量, 加热回流 3 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 对照品溶液的制备

取绿原酸、咖啡酸、蒙花苷等对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解, 制成绿原酸、咖啡酸、蒙花苷浓度分别为 0.048, 0.064, 0.052 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件

Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相 A 为乙腈, B 为甲醇, C 为 0.2%的乙酸水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, A 4%→10%, B 8%→20%, C 88%→70%, 维持 10 min; 30~35 min, A 10%→20%, B 20%→70, C 70%→10%, 维持 10 min; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μL, 检测波长: 334 nm。

2.4 方法学考察

2.4.1 标准曲线绘制 精密吸取混合对照品溶液适量, 加甲醇稀释得到 6 个系列对照品溶液, 即绿原酸系列对照品溶液为 0.009 6, 0.019 2, 0.024 0, 0.028 8, 0.038 4, 0.048 0 mg·mL⁻¹, 咖

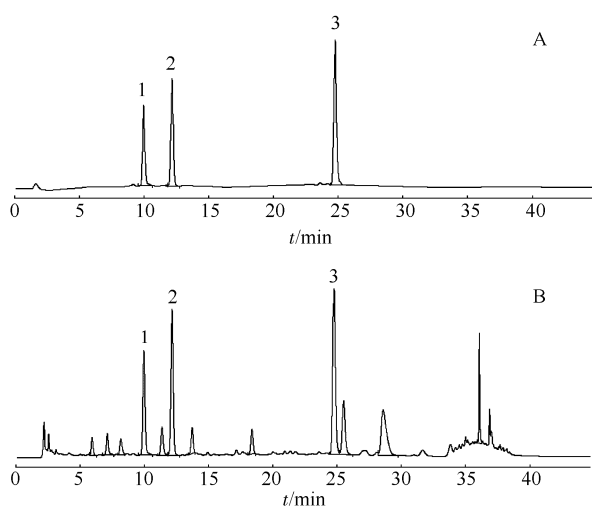


图1 高效液相色谱图

A-混合对照品溶液; B-供试品溶液; 1-绿原酸; 2-咖啡酸; 3-蒙花苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed control; B-sample; 1-chlorogenic acid; 2-caffeic acid; 3-linarin.

啡酸系列对照品溶液为 0.012 8, 0.025 6, 0.032 0, 0.038 4, 0.051 2, 0.064 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 蒙花苷系列对照品溶液为 0.010 4, 0.020 8, 0.026 0, 0.031 2, 0.041 6, 0.052 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 将 6 个系列混合对照品溶液吸取 10 μL 注入色谱仪, 以浓度($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。得到绿原酸的线性方程为 $y=26\,092x-9.742\,9$, $r=0.999\,3$, 在 0.009 6~0.048 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好; 咖啡酸的线性方程为 $y=23\,240x+14.371$, $r=0.999\,3$, 在 0.012 8~0.064 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好; 蒙花苷的线性方程为 $y=25\,231x+9.557\,1$, $r=0.999\,7$, 在 0.010 4~0.052 0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.4.2 仪器精密度试验 精密吸取混标溶液, 连续进样 6 次, 结果绿原酸、咖啡酸、蒙花苷的峰面积 RSD 分别为 1.2%, 1.3%, 1.6%。可见该方法仪器精密度良好。

2.4.3 重复性试验 精密取同一批号野菊花样品 6 份, 同法制成供试品溶液 6 份, 分别进样, 绿原酸、咖啡酸、蒙花苷含量的 RSD 分别为 2.3%, 3.1%, 2.8%, 可见重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一批号野菊花样品供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样, 绿原酸、咖啡酸、蒙花苷峰面积的 RSD 分别为 1.52%, 1.54%, 2.01%, 可见样品在 12 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的同一批号野菊花样品约 0.125 g, 共 6 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入绿原酸、咖啡酸、蒙

花苷对照品适量, 按“2.1”项下方法制备样品溶液, 进样分析, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果见表 1。

表1 3个成分的加样回收率

Tab. 1 Recoveries of the three components

成分	样品量/ g	样品中 含量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
绿原酸	0.125 2	1.25	1.25	2.53	102.08	99.5	2.63
	0.125 3	1.25	1.25	2.51	100.32		
	0.125 2	1.25	1.25	2.49	98.88		
	0.125 4	1.25	1.25	2.48	97.77		
	0.125 3	1.25	1.25	2.45	95.45		
	0.125 1	1.25	1.25	2.53	102.24		
咖啡酸	0.125 2	1.43	1.43	2.85	99.68	100.4	2.70
	0.125 3	1.43	1.43	2.89	102.32		
	0.125 2	1.43	1.43	2.89	102.48		
	0.125 4	1.43	1.43	2.82	97.26		
	0.125 3	1.43	1.43	2.82	97.34		
	0.125 1	1.43	1.43	2.90	103.35		
蒙花苷	0.125 2	1.18	1.18	2.39	103.08	100.4	2.03
	0.125 3	1.18	1.18	2.33	97.82		
	0.125 4	1.18	1.18	2.34	98.59		
	0.125 2	1.18	1.18	2.37	101.38		
	0.125 4	1.18	1.18	2.38	101.91		
	0.125 1	1.18	1.18	2.35	99.84		

2.5 样品测定

精密吸取供试品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 用标准曲线法分别计算野菊花样品中绿原酸、咖啡酸、蒙花苷的含量, 结果见表 2。

表2 野菊花样品中绿原酸、咖啡酸、蒙花苷的含量

Tab. 2 Content of chlorogenic acid, caffeic acid and linarin in Chrysanthemi Indici Flos

序号	批次	绿原酸/%	咖啡酸/%	蒙花苷/%
1	2012070101	0.93	1.24	1.04
2	2012070201	0.93	1.16	1.05
3	2012070601	0.87	1.15	1.11
4	2012070602	1.12	1.20	0.89
5	2012080901	1.10	1.15	0.98
6	2012090801	1.00	1.14	0.94
7	2012090802	0.90	1.13	0.91
8	2012090803	0.95	1.12	1.04
9	2012090804	0.86	1.11	1.02
10	2012090805	0.91	1.09	0.99
11	2012090806	0.96	1.07	0.96
12	2012090807	0.87	1.07	1.10

3 讨论

在条件考察过程中,重点考察了不同色谱柱、不同柱温、不同流动相、不同检测波长对该分析方法的影响。考察了 Agilent Eclipse-C₁₈、Acclaim-C₁₈ 和 Zorbax SB C₁₈ 等不同的色谱柱,结果优选了 Eclipse-C₁₈ 色谱柱,色谱峰分离最好;考察了 25, 30, 35, 40 ℃ 等不同的柱温,根据分离效果,选择柱温为 30 ℃;考察了乙腈-0.2%乙酸、甲醇-0.2%乙酸、乙腈-甲醇-0.2%乙酸等不同流动相,结果选择乙腈-甲醇-0.2%乙酸为流动相时,色谱峰分离效果最好;考察了 240, 280, 334, 350 nm 等不同检测波长,结果检测波长为 334 nm 时色谱峰大小较合理。

本实验建立了在同一液相条件下测定野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷 3 种主要有效成分的方法,为野菊花的质量控制提供有效手段。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 295.
- [2] ZHU X Y, WANG F. Comparative study on the content of linarin in *Chrysanthemum indicum* L. from different producing areas [J]. J Anhui Agr Sci(安徽农业科学), 2008, 36(34): 15045.
- [3] HE X Z, HE D X, ZHOU J, et al. Determination of chlorogenic acid from leaves and flowers of *Chrysanthemum indicum* L. by RP-HPLC [J]. Chin Med J Res Pract(现代中药研究与实践), 2012, 26(3): 26-28.
- [4] FU L, PAN C X, JIANG Y, et al. Determination on the contents of chlorogenic acid in *Chrysanthemum indicum* L. from different commercial regions [J]. Chin J Exper Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(5): 68-69.
- [5] ZHU L Y, SONG Y F, LI X L, et al. Determination on the contents of chlorogenic acid in *Chrysanthemum indicum* L. by HPLC [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(2): 32-33.
- [6] QIAN P F, GE B, WANG D G. Content determination of luteolin in wild chrysanthemum flower by HPLC [J]. Chin Pharm(中国药房), 2005, 16(22): 1741-1742.
- [7] GUO Q S, FANG H L, SHEN H J. Determination of chlorogenic acid, caffeic acid and linarin in Flos Chrysanthemi Indici from different places by RP-HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 35(9): 1160-1162.
- [8] HE X Z, HE D X, YU C Y, et al. Determination of chlorogenic acid and luteolin-7-O-glycoside in the leaf of Flos Chrysanthemi Indici [J]. J Univ South Chin(Sci Tech)(南华大学学报: 自然科学版), 2010, 24(4): 95-98.
- [9] WU M X, WANG J J, ZHANG G J. Determination of the seven active components in water extraction of Chrysanthemi Indici Flos [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2011, 33(2): 300-304.
- [10] ZHANG T, ZHANG X S, LIN D J. Determination the contents of luteolin-7-O-glucoside and buddleoside in *Chrysanthemum indicum* L. by RP-HPLC [J]. Chin Pharm(中国药师), 2007, 10(11): 1091-1093.
- [11] DAI S, ZHANG M, CHENG W M, et al. Simultaneous determination of eight active components in *Chrysanthemum indicum* by HPLC [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(12): 1961-1965.

收稿日期: 2014-12-17

UPLC-MS/MS 测定血浆中伊伐布雷定及其活性代谢产物的含量

黄成珂, 周伶俐, 孙未, 王哲, 陈瑞杰, 蒋硕民^{*} (温州医科大学附属第二医院, 浙江 温州 325027)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定人血浆中伊伐布雷定及其活性代谢产物(*N*-去甲伊伐布雷定)的含量。方法 选用 Waters Acquity BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱, 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱; 流速为 0.4 mL·min⁻¹; 电喷雾离子源, 多反应监测。伊伐布雷定: [M+H]⁺, *m/z* 469.3→177.2, *N*-去甲伊伐布雷定: [M+H]⁺, *m/z* 455.2→262.2, 卡马西平: [M+H]⁺, *m/z* 237.1→194.2。结果 伊伐布雷定线性范围为 0.2~100 ng·mL⁻¹(*r*=0.998 1), *N*-去甲伊伐布雷定线性范围为 0.05~25 ng·mL⁻¹(*r*=0.993 1); 两者日间、日内精密度均<15%, 方法回收率>90%, 稳定性较好。结论 该方法快速、灵敏、重复性好, 适用于血浆中伊伐布雷定及其代谢产物含量测定。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 伊伐布雷定; 代谢产物; 血药浓度

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)09-1120-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.023

基金项目: 温州市科技计划项目(Y20140224)

作者简介: 黄成珂, 男, 硕士, 主管药师 Tel: 13867729960
Tel: 13700658166 E-mail: jiangshuomin@sina.com

E-mail: huangchk@163.com

^{*}通信作者: 蒋硕民, 男, 主管药师