

UPLC 同时测定野菊花中蒙花苷和绿原酸含量

韩永成, 龚海燕, 刘伟*, 陈宁, 崔永霞, 吴明侠, 王丽果, 茹凡书
(河南中医学院分析测试中心, 郑州 450008)

[摘要] 目的:建立 UPLC 同时测定不同产地野菊花中蒙花苷和绿原酸含量的分析方法。方法:采用超高效液相色谱系统, C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水, 以 0.2 mL·min⁻¹ 的流速进行梯度洗脱, 检测波长 326 nm, 柱温 25 ℃。结果:蒙花苷在 3.0~120.0 mg·L⁻¹ 线性关系良好($r=1.000\ 0$), 平均回收率 99.43%, RSD 1.54% ($n=6$); 绿原酸在 0.48~19.2 mg·L⁻¹ 线性关系良好($r=1.000\ 0$), 平均回收率 98.67%, RSD 2.13% ($n=6$)。结论:UPLC 法分析速度快, 重复性好, 结果准确且高效、简便, 可用于野菊花中蒙花苷和绿原酸含量的测定。

[关键词] 野菊花; 超高效液相色谱; 蒙花苷; 绿原酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0088-03

[doi] 10.11653/syfyj2013200088

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Buddleoside
in Chrysanthemi Indici Flos by UPLC

HAN Yong-cheng, GONG Hai-yan, LIU Wei*, CHEN Ning, CUI Yong-xia,
WU Ming-xia, WANG Li-guo, RU Fan-shu
(Center of Analysis and Measurement, Henan University of
Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a UPLC method for simultaneous determination of buddleoside and chlorogenic acid in Chrysanthemi Indici Flos from different areas. **Method:** UPLC was used. The chromatographic separation was performed on a C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) column with gradient elute. The flow rate was 0.2 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 326 nm and column temperature was maintained at 25 ℃. **Result:** Good linear relationship between the peak area and content of buddleoside and chlorogenic acid was achieved when the amount was within 3.0-120.0, 0.48-19.20 mg·L⁻¹; the recoveries were 99.43% and 98.67%; RSDs were 1.54% and 2.13% respectively ($n=6$). **Conclusion:** The UPLC analysis is speed, reproducible, accurate, efficient and convenient, which can detect the content of buddleoside and chlorogenic acid in Chrysanthemi Indici Flos.

[Key words] Chrysanthemi Indici Flos; UPLC; buddleoside; chlorogenic acid

野菊花为菊科植物野菊的干燥头状花序^[1],

秋、冬二季花初开放时采摘,晒干,或蒸后晒干,其味
苦、性微寒,归肝、心经,具有清热解毒、泻火平肝之
功效^[2]。野菊花中的活性成分主要有黄酮类、有机
酸类、萜类、挥发油等,蒙花苷、绿原酸分别是野菊
花中黄酮类、有机酸类的代表性成分,现代药理学
研究表明二者是野菊花抗菌抗病毒、抗炎、免疫、
保护心血管系统、神经保护、保肝和抗肿瘤等药理
作用的有效成分^[3-7]。目前,多是采用 HPLC 对野
菊花药材中蒙花苷或绿原酸含量测定的研究报

[收稿日期] 20130201(016)
[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目
(2010A360016)
[第一作者] 韩永成, 硕士研究生, 从事药物分析研究, Tel:
0371-65575838, E-mail: hyc. ok. hi@ 163. com
[通讯作者] * 刘伟, 教授, 硕士研究生导师, 从事中药质量标
准和仪器分析方法的研究, Tel: 0371-65575838, E-
mail: hnliuwei2088@ sina. com

道,同时测定蒙花苷和绿原酸的报道较少。本实验采用 UPLC 同时测定不同产地野菊花中蒙花苷和绿原酸的含量,为野菊花药材的质量控制研究提供新的分析方法和科学依据。

1 材料

Agilent1290 型 UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),色谱乙腈(美国天地试剂公司),娃哈哈纯净水,甲醇、乙醇、醋酸、磷酸等试剂均为分析纯。蒙花苷(含量≥98%)对照品(批号 111520-200201),绿原酸(含量≥98%)对照品(批号 0753-200111)购自中国药品生物制品检定所。实验所需药材,购自于各个不同产地的野菊花药材,经河南中医学院药学院董诚明教授鉴定为野菊花 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性试验 色谱柱为 Agilent ZORBAX RH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm),流动相 0.1% 磷酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~3.0 min,13% B;3.0~3.1 min,13.0%~25.0% B;3.1~8.0 min,25% B;8.0~12.0 min,25%~70% B),流速 0.2 mL·min⁻¹,检测波长 326 nm,柱温 25℃,进样量 1.0 μL。理论塔板数按蒙花苷峰及绿原酸峰计算分别不低于 3 000,1 000。分离度不低于 1.5。

2.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取蒙花苷、绿原酸对照品适量于 50 mL 量瓶中,70% 甲醇定容,制成蒙花苷、绿原酸分别为 30.0,4.8 mg·L⁻¹ 溶液,存放于 4℃ 冰箱中备用,临用时 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取野菊花粉末约 0.5 g,精密称定,置具塞 250 mL 锥形瓶中,精密加 70% 甲醇 100 mL,称定质量,加热回流 1.5 h,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减少的质量,摇匀,滤过,即得。存放于 4℃ 冰箱中备用,临用时 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 取 2.2 项下的混合对照品溶液,分别以 0.1,0.2,1.0,1.5,2.0,4.0 μL 进样量,按 2.1 项下色谱条件测定峰面积。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程,蒙花苷 $Y = 21.473X - 11.363 (r = 1.000 0)$,绿原酸 $Y = 68.394X - 11.354 (r = 1.000 0)$ 。结果表明蒙花苷和绿原酸分别在 3.0~120.0,0.48~19.2 mg·L⁻¹ 线性关系较好。

2.5 精密度试验 取 2.2 项下混合对照品溶液,按

2.1 项下方法进样,以 1.0 μL 进样量,连续进样 6 次,计算得蒙花苷、绿原酸峰面积的 RSD 分别为 0.13%,0.15%,结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取野菊花(河南灵宝)样品,按 2.3 项下制备供试品溶液,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样,按 2.1 项下方法进样测定峰面积,蒙花苷和绿原酸峰面积的 RSD 分别为 0.33%,1.05%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验 取同一批野菊花样品(河南灵宝)6 份,约 0.5 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下方法分别进样,测定样品中蒙花苷、绿原酸的含量,采用外标法计算,蒙花苷、绿原酸质量分数的 RSD 分别为 1.15%,1.86%,结果表明重复性良好。

2.8 加样回收率试验 取已知含量的野菊花(河南灵宝)6 份,每份约 0.25 g,精密称定,精密加入一定量蒙花苷和绿原酸对照组分,其余按 2.3 项下方法制备,按 2.1 项下方法测定,结果见表 1。

表 1 野菊花样品中蒙花苷、绿原酸的加样回收率试验

成分	称样量 /g	样品 含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
蒙花苷	0.250 4	4.066 5	4.032	8.146 6	101.19	99.43	1.54
	0.250 3	4.064 9	4.032	8.151 6	101.36		
	0.249 7	4.055 1	4.032	8.013 0	98.16		
	0.250 1	4.061 6	4.032	8.001 4	97.71		
	0.249 9	4.058 4	4.032	8.044 4	98.86		
	0.250 1	4.061 6	4.032	8.065 8	99.31		
绿原酸	0.250 4	0.222 3	0.220	0.436 4	97.32	98.67	2.13
	0.250 3	0.222 2	0.220	0.434 8	96.64		
	0.249 7	0.221 7	0.220	0.434 8	96.86		
	0.2501	0.222 0	0.220	0.445 7	101.68		
	0.249 9	0.221 9	0.220	0.439 5	98.91		
	0.250 1	0.222 0	0.220	0.443 3	100.59		

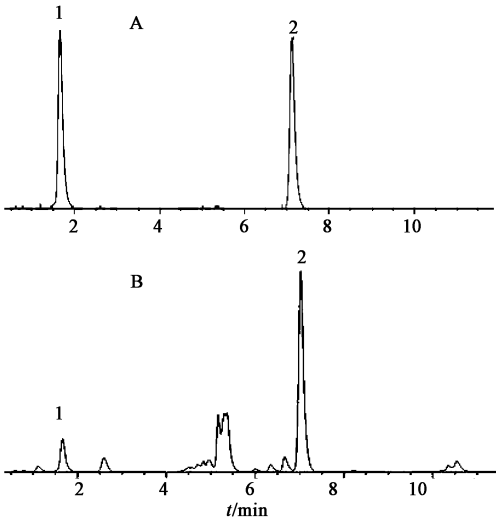
2.9 样品测定 取各个不同产地野菊花样品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样 1.0 μL,按 2.1 项下色谱条件测定,用外标法计算各样品中蒙花苷和绿原酸的含量,结果见表 2,图 1。

3 讨论

对于药材中蒙花苷和绿原酸的提取,2010 年版《中国药典》蒙花苷采用甲醇进行提取^[8],绿原酸则采用 50% 的甲醇进行提取,本试验选用了甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇作为提取溶剂进行比较,发现采用 70% 甲醇作为提取溶剂,提取的蒙花苷和绿原酸含量总体效果较好。同时考察加热回流和超声 2 种提取方法对提取结果的影响,结果表明回流提取蒙

表 2 野菊花 2 种成分含量测定 (n=3) mg·g⁻¹

产地来源	蒙花苷	绿原酸
河南灵宝	16.24	0.89
河南漯河	11.26	0.55
河南焦作	16.28	2.48
安徽黄山	12.07	0.55
安徽亳州	16.37	1.70
浙江杭州	9.36	1.08
浙江金华	16.37	1.70
广州佛山	9.85	0.76



A. 对照品;B 样品;1. 绿原酸;2 蒙花苷

图 1 野菊花 UPLC

花苷和绿原酸的总体含量明显高于超声提取的含量。因此选择选用 100 mL 70% 甲醇加热回流 1.5 h 进行供试品提取。

分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 醋酸水、乙腈-0.1% 磷酸水不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱,表明等度洗脱分离度不好而梯度洗脱分离度较好,使用酸水溶液的峰型明显较好(磷酸优于醋酸),因此使用乙腈-0.1% 磷酸水进行梯度洗脱,各色谱峰保留时间适中,峰形和分离均较好。

UPLC 与 HPLC 比较,峰容量、分析效率、灵敏度和分辨率都有了很大的提高。采用 UPLC,在 12 min 内完成对野菊花中蒙花苷和绿原酸含量测定,而

HPLC 则需要 60 min 内完成测试^[9]。采用 UPLC 代替 HPLC 测定野菊花中蒙花苷和绿原酸的含量,在保证测定结果准确的前提下,提高了分析效率,节约 80% 的分析时间^[10],减少了溶剂的消耗,降低分析成本。但色谱柱的成本,超高效液相远远高于高效液相。

由测定结果可以看出,不同产地蒙花苷和绿原酸含量相差较大,蒙花苷以安徽亳州产地含量相对较高,而浙江杭州的含量比较低;绿原酸以河南焦作产地含量较高,而河南漯河的含量较低。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:295.
[2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:801.
[3] 吴钉红,杨立伟,苏薇薇. 野菊花化学成分及药理研究进展[J]. 中药材,2002,27(2):142.
[4] 戴敏,刘青云,刘道中,等. 菊花解热、降压作用的物质基础研究[J]. 中药材,2001,24(7):505.
[5] 金沈锐,祝彼得,秦旭华. 野菊花注射液对人肿瘤细胞 SMMC7721、PC3、HL60 增殖的影响[J]. 中药药理与临床,2005,21(3):39.
[6] 王志东,梁容瑞,李宗芳,等. 中药野菊花的药理作用研究进展[J]. 中医中药,2009,15(6):906.
[7] 刘建萍. 中药野菊花的研究概况[J]. 天津药学,2007,19(4):66.
[8] 宋宏刚,裴彩云,赵韶华,等. 不同产地野菊花药材中蒙花苷及总黄酮含量测定[J]. 中成药,2008,30(4):556.
[9] 郭美兰,敬应春,蔡国琴. RP-HPLC 同时测定野菊花中绿原酸、木犀草苷和蒙花苷的含量[J]. 中国现代中药,2012,14(4):10.
[10] 韩燕全,洪燕,夏伦祝,等. UHPLC-ELSD 法同时测定重楼中重楼皂苷 I、II、VI、VII[J]. 中草药,2012,43(2):305.

[责任编辑 顾雪竹]