

## 中药研究

## HPLC 法测定药用菊花中 10 个主要化学成分的含量

王月茹<sup>1</sup> 谢伟<sup>2</sup>

(1 陕西国际商贸学院, 咸阳, 712046; 2 陕西步长制药有限公司, 咸阳, 712000)

**摘要** 目的:建立 HPLC 法测定菊花药材中 10 个主要化学成分的含量,包括 5 个咖啡酰奎宁酸类成分和 5 个黄酮类成分。方法:采用 DiamonsilTM C<sub>18</sub> (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为乙腈-0.05% 甲酸,流速 1.0 mL/min,检测波长 335 nm,柱温 40 ℃。结果:10 个化合物在一定范围内与峰面积呈良好的线性关系, r 值均大于 0.999 5;平均加样回收率(n=6)范围为 95.6%~100.3%, RSD 为 0.66%~1.95%。结论:本文所建立含量测定方法可作为中药菊花的质量控制的有效方法,为明确不同品种菊花的基原关系和品种鉴定研究提供了数据基础。

**关键词** 菊花药材;黄酮;咖啡酰奎宁酸;高效液相色谱法;含量测定

## Quantification of 10 Key Contents in Chrysanthemum Flower by HPLC

Wang Yueru<sup>1</sup>, Xie Wei<sup>2</sup>

(1 Shaanxi Institute of International Trade &amp; Commerce, Shaanxi, Xianyang 712046, China;

2 Shaanxi Buchang Pharmaceutical Co., Ltd., Xianyang 712000, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method for simultaneous determination of 10 contents including 5 caffeoylquinic acids and 5 flavones in Chrysanthemum Flower. **Methods:** HPLC separation was carried out with an DiamonsilTM C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using acetonitrile-0.05% Formic acid as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 335 nm and the column temperature was maintained at 40 ℃. **Results:** Good linear relationships were observed between the masses and the peak areas of the 10 contents; The average recovery rates were between 95.6 and 100.3%, RSD was between 0.66 and 1.95%. **Conclusion:** The content determination method can be used as an effective method for the quality control of Chrysanthemum Flower, which provides the data base for the research on the relationships between different contents of Chrysanthemum Flower.

**Key Words** Chrysanthemum Flower; Flavones; Caffeoylquinic acids; HPLC; Quantification method

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.066

药用菊花是菊科菊属植物菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 的干燥头状花序。具有散风清热,平肝明目等功效,用于治疗风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花<sup>[1]</sup>。菊花在中国已有 2000 多年的栽培历史,我国主要产于浙江、安徽、河南、河北、江苏、湖北等省。在长期的栽培过程中,不同产地根据其当地的地理气候特点采取了不同加工方式,这就形成了道地药材菊花的不同类型。其中,中国药典收录的药用菊花品种有“亳菊”“滁菊”“贡菊”“杭菊”<sup>[1]</sup>,然而,目前我国各大药材市场上的药用菊花还包括“怀菊”“祁菊”“济菊”和“川菊”四个品种,这些共同构成了我国药用菊花的八大主流品种。经查阅文献和古代医药书籍发现,这 8 种菊花的药用

已有悠久的历史渊源,并形成了各具特色的药材<sup>[2-7]</sup>。

黄酮类成分普遍存在于菊属植物中,主要包括黄酮及其苷、黄酮醇及其苷、二氢黄酮及其苷,咖啡酰奎宁酸类化合物 (Caffeoylquinic Acids) 是药用菊花中的另一类主要成分<sup>[8-17]</sup>,这两类成分具有多种生理活性,是药用菊花中的主要有效成分。中国药典只收录了亳菊、滁菊、贡菊和杭菊四个品种,祁菊、黄菊、济菊、怀菊因具有悠久的药用历史和良好的药效也为人们沿用至今,因此有必要对药材市场上常见的菊花品种进行全面评价和鉴别,文献记载区分和鉴别菊花品种方法多从形态学的角度或显微鉴定的角度,尚未有文献记载以化学分类学的方法

基金项目:陕西省中医药管理局攻关项目(编号:15-Zy033)

作者简介:王月茹(1985.01—),女,硕士,讲师,研究方向:中药资源开发与利用研究, E-mail:379544542@qq.com

通信作者:谢伟(1984.09—),男,硕士,主管药师,研究方向:中医药知识产权保护研究, E-mail:x-w8485@163.com

对菊花不同品种加以区分,本研究采用 HPLC-DAD 法建立了菊花药材中 5 个咖啡酰奎宁酸类成分和 5 个黄酮类成分的含量测定方法。通过对菊花多成分含量测定的方法研究,以期达到鉴别菊花品种和评价药材质量的目的。结果表明该方法简便、快速、准确,为建立菊花质量评价方法提供科学依据。

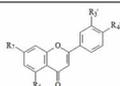
### 1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20AD<sub>XR</sub> 液相色谱系统: LC-20AD<sub>XR</sub> 高压泵, SPD-20AV 紫外检测器, SPD-M20A 光电二极管阵列检测器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, SIL-20AC 自动进样器, DGU-20A5 自动脱气机, LC solution 工作站。

1.2 试剂 色谱级甲醇、乙腈购自天津赛孚世纪科技发展有限公司;分析纯无水乙醇、正丁醇、甲醇购自北京化工厂;甲酸购自国药集团化学试剂有限公司;水为超纯水;色谱柱为 DiamonsilTM C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 10 个对照品: 5-咖啡酰奎宁酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、木犀草苷、香叶木素、金合欢素、蒙花苷购自中国生物制品检验所, 结构见图 1。



No.	Name	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
1	5-CQA	H	H	H	C
2	4-CQA	H	H	C	H
4	1,5-DCQA	C	H	H	C
5	3,5-DCQA	H	C	H	C
6	4,5-DCQA	H	H	C	C



No.	Name	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
3	luteolin-7-O-glucoside	OH	O-glucose	OH	OH
7	linarin	OH	O-rutinoside	H	OCH <sub>3</sub>
8	luteolin	OH	OH	OH	OH
9	diosmetin	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
10	acacetin	OH	OH	H	OCH <sub>3</sub>

图 1 10 个化合物的化学结构

1.3 分析样品 17 批菊花药材购自各地药材市场的 9 个品种, 经鉴定为菊科植物菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 和野菊 (*Chrysanthemum indicum* L.) 的干燥花序。

### 2 试验方法

2.1 对照品溶液 分别精密称取 10 个对照品适量, 用甲醇溶解制得 5-咖啡酰奎宁酸、4-咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、木犀草苷、香叶木素、金合欢素、蒙花苷对照品溶液。

2.2 供试品溶液 取上述 17 份药材粉末(过 40 目筛)1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)30 min, 放冷后称定重量, 用甲醇补足减失的重量。滤过, 经 0.22 μm 滤膜滤过, 即得。

2.3 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 DiamonsilTM C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相为 A(水, 0.05% 甲酸)和 B(乙腈, 0.05% 甲酸), 梯度洗脱条件如下: 0→15 min, 88% A→80% A; 15→55 min, 80% A→79% A; 55→60 min, 79% A→75% A; 60→80 min, 75% A→66% A; 80→100 min, 66% A→60% A; 100→110 min, 60% A→40% A; 110→120 min, 40% A→0% A。流速 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL, 柱温为 40 °C, 检测波长为 335 nm。在此色谱条件下, 药材中待测化合物的分离度良好, 理论塔板数大于 10 000, 峰形尖锐, 基线平稳, 适合进行样品含量测定。菊花药材的色谱图如图 2。

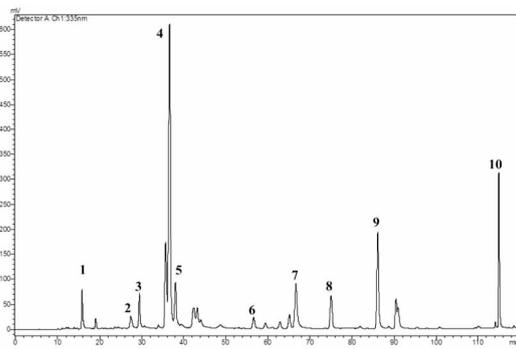


图 2 菊花药材的 HPLC 图

注: 1: 5-咖啡酰奎宁酸(5-CQA); 2: 4-咖啡酰奎宁酸(4-CQA); 3: 木犀草苷(luteolin-7-O-glucoside); 4: 1,5-二咖啡酰奎宁酸(1,5-DCQA); 5: 3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-DCQA); 6: 4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-DCQA); 7: 蒙花苷(linarin); 8: 木犀草素(luteolin); 9: 香叶木素(diosmetin); 10: 金合欢素(acacetin)。

2.4 线性关系考察 取“2.1”项下混合对照品溶液, 分别进样 1、3、5、7、9 μL, 注入液相色谱仪, 重复进样测定 3 次, 记录峰面积。以进样量 X(μg) 为横坐标, 峰面积平均值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算, 10 个化合物对照品线性关系良好, 回归方程、线性范围、相关系数见表 1。

2.5 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 8 次, 测定峰面积。结果表明, 10 个色谱峰 RSD 为 0.13% ~ 1.28%。说明精密度良好。

2.6 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24、48、72 h 进样测定各成分峰面积值。结果 10 个色谱峰峰面积的 RSD(n=8) 为 0.51% ~

1. 33% ,表明供试品溶液在 72 h 内稳定。
- 2.7 重复性试验 精密称取同一样品共 5 份,按照供试品溶液制备方法制得供试品溶液,进样 10  $\mu$ L,每份样品测定 3 次,记录峰面积,计算 RSD 值,结果表明,5 份样品重复性试验中,供试品中 10 个化合物的 RSD 值为 0.66% ~ 1.95% ,说明该方法重复性良好。
- 2.8 加样回收率试验 取已知含量的菊花药材粉碎成细粉,过 40 目筛。精密称取 0.5 g,平行称取 5 份,置于具塞锥形瓶中,分别精密加样 10 个对照品

或对照品溶液适量,挥去溶剂,精密加入 50 mL 甲醇,称定重量,超声提取(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,静置放冷后称定重量,用甲醇补足减失的重量,滤过,使用前经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,即得加样供试品溶液。结果表明,平均加样回收率( $n=6$ )为 95.6% ~ 100.3% 之间,RSD 为 1.05% ~ 2.78% ,说明加样回收率良好,符合要求。

2.9 样品测定 本研究对菊花中共 12 个化合物进行了含量测定,包括 5 个咖啡酰奎宁酸类成分和 12 个黄酮类成分,17 份菊花药材的含量测定结果见表 2。

表 1 10 个化合物的线性关系

序号 No.	化合物 (Compound)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/ $\mu$ g
1	5-咖啡酰奎宁酸(5-CQA)	$Y = 3.521 \times 10^6 X - 1.332 \times 10^5$	0.9995	0.12 ~ 2.19
2	4-咖啡酰奎宁酸(4-CQA)	$Y = 2.735 \times 10^6 X - 4.092 \times 10^5$	0.9998	0.025 ~ 0.25
3	木犀草苷(luteolin-7-O-glucoside)	$Y = 1.101 \times 10^6 X - 1.283 \times 10^4$	0.9998	0.03 ~ 0.32
4	1,5-二咖啡酰奎宁酸(1,5-DCQA)	$Y = 2.235 \times 10^6 X - 6.765 \times 10^5$	0.9998	0.51 ~ 4.64
5	3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-DCQA)	$Y = 1.276 \times 10^6 X - 2.345 \times 10^5$	0.9999	0.37 ~ 3.34
6	4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-DCQA)	$Y = 2.515 \times 10^6 X - 1.473 \times 10^4$	0.9998	0.03 ~ 0.27
7	蒙花苷(linarin)	$Y = 1.673 \times 10^7 X - 1.704 \times 10^4$	0.9997	0.01 ~ 0.10
8	木犀草素(luteolin)	$Y = 4.692 \times 10^6 X - 1.301 \times 10^3$	0.9998	0.10 ~ 0.92
9	香叶木素(diosmetin)	$Y = 3.367 \times 10^5 X - 5.295 \times 10^2$	0.9998	0.03 ~ 0.29
10	金合欢素(acacetin)	$Y = 2.495 \times 10^6 X - 1.899 \times 10^5$	0.9999	0.22 ~ 2.05

表 2 17 批药材中 10 个化合物的含量测定结果(% , $n=3$ )

No.	产地	品种	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	河北	祁菊	1.56	—	0.31	16.15	7.56	1.32	0.13	2.20	0.12	4.66
2	河北	祁菊	1.76	—	0.46	14.48	7.59	1.63	0.15	2.49	0.22	3.64
3	湖北	野菊花	1.84	—	1.33	11.73	0.29	0.61	—	—	1.31	4.72
4	湖北	野菊花	1.98	—	1.24	10.74	0.86	1.09	—	—	0.93	3.69
5	山东	济菊	2.62	—	0.37	12.36	10.11	1.82	—	1.68	—	5.23
6	浙江	黄菊	0.96	0.48	1.11	5.87	3.45	1.05	0.03	0.16	0.09	0.32
7	浙江	黄菊	1.19	0.57	1.60	6.10	3.03	1.22	0.01	0.28	0.38	0.57
8	河南	怀菊	1.65	—	1.22	8.63	8.09	1.46	—	—	1.11	4.84
9	河南	怀菊	1.36	—	0.89	5.15	6.56	1.22	—	—	1.32	3.27
10	浙江	杭白菊	2.76	0.82	2.41	7.28	3.38	3.23	0.26	0.12	0.30	—
11	浙江	杭白菊	2.87	0.99	1.37	5.13	4.64	1.96	0.05	0.09	0.22	—
12	安徽	贡菊	0.90	0.59	0.50	4.23	3.15	1.65	0.01	1.13	0.10	—
13	安徽	贡菊	0.87	0.51	1.35	4.04	3.55	1.92	0.12	1.08	0.24	—
14	安徽	滁菊	2.03	0.54	0.79	13.99	5.14	0.87	0.12	1.52	—	0.58
15	安徽	滁菊	1.67	0.49	0.6	10.67	4.64	0.93	0.07	1.27	—	0.74
16	安徽	亳菊	2.97	0.47	3.01	11.43	9.31	2.33	—	—	0.60	—
17	安徽	亳菊	2.78	0.59	2.68	13.56	10.79	1.35	—	—	0.47	—

注:1:5-咖啡酰奎宁酸(5-CQA);2:4-咖啡酰奎宁酸(4-CQA);3:木犀草苷(luteolin-7-O-glucoside);4:1,5-二咖啡酰奎宁酸(1,5-DCQA);5:3,5-二咖啡酰奎宁酸(3,5-DCQA);6:4,5-二咖啡酰奎宁酸(4,5-DCQA);7:蒙花苷(linarin);8:木犀草素(luteolin);9:香叶木素(diosmetin);10:金合欢素(acacetin);“—”表示未检出。

### 3 讨论

本实验分别考察了乙腈-水、乙腈-甲酸溶液等多个流动相,流动相中加入适量甲酸溶液对改善峰型具有明显的效果,故选择乙腈-0.05% 的甲酸溶液

作为流动相。还考察了柱温(20  $^{\circ}$ C、30  $^{\circ}$ C、40  $^{\circ}$ C)对色谱分离的影响,结果表明:柱温在 40  $^{\circ}$ C 时色谱图基线平稳且分离度较好,本文选择 40  $^{\circ}$ C 作为分析温度。

本研究分别考察了不同提取溶剂(30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、纯甲醇),不同提取方法(超声、回流、索氏提取),结果表明,纯甲醇超声提取的提取率最高,且省时,操作简单,故选择超声提取法对菊花药材进行提取。考察了超声时间(15 min、30 min、45 min)、提取容积体积(25 mL、50 mL、100 mL)和提取次数对样品的提取效果,最终确定了本文的提取方法。

木犀草苷,5-CQA,4,5-DCQA,3,5-DCQA,1,5-DCQA 是9种菊花的共有成分,咖啡酰奎宁酸类成分是菊花中主要成分;芹菜素在祁菊、野菊花、怀菊、济菊中含量较高;木犀草素在祁菊、济菊、贡菊和滁菊中含量较高,这为9个品种的菊花质量评价提供依据。有文献研究结果表明<sup>[18]</sup>,咖啡酰奎宁酸类化合物和黄酮类化合物是菊花中的抗氧化活性成分,并且是菊花中的主要成分,咖啡酰奎宁酸类化合物的总抗氧化活性贡献率更高,是主要的抗氧化活性物质基础。含量测定结果表明祁菊、济菊、滁菊、亳菊中咖啡酰奎宁酸类化合物总含量较高,因此,以抗氧化活性为评价指标,这4种菊花品质较好。含量测定结果表明杭白菊、亳菊、贡菊、怀菊、祁菊中黄酮类化合物的含量相对较高,因此,以抗炎活性为评价指标,这5种菊花的品质较好。

中药指纹图谱已经成为被广泛认可的质控方法,然而只有当指纹图谱中谱峰的化学结构清楚及含量明确,才能使其真正的发挥质量评价的价值。近年来,有关菊花的含量测定及质量控制文献记载多以绿原酸、木犀草素、木犀草苷等单一成分或两三个成分为指标<sup>[19-21]</sup>,不能全面地体现菊花的内在品质,也不能体现菊花各道地产地的化学成分组成和特点。本研究对菊花中10个主要成分进行了多成分含量测定,丰富了该药材的化合物结构信息,为菊花的质量控制提供了准确的数据信息,为明确不同品种菊花的基原关系和品种鉴定研究提供了科学依据。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 292.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 785.
- [3] 何先元, 郭巧生, 徐文斌. 道地药材菊花形成的原因[J]. 中国中

- 医药信息杂志, 2005, 12(10): 54.
- [4] 王德群, 梁益敏, 刘守金. 中国药用菊花的品种演变[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(10): 584.
- [5] 王德群, 刘守金, 梁益敏. 中国药用菊花产地考察[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(9): 522.
- [6] 王德群, 刘守金, 梁益敏. 中国菊花药用类群研究[J]. 安徽中医学院学报, 2001, 20(1): 45.
- [7] 尚志钧, 刘晓龙, 刘大培. 中药菊花的本草考证[J]. 中国中药杂志, 1993, 23(2): 114.
- [8] 张健, 钱大玮, 李友宾, 等. 菊花的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006(18): 71-73.
- [9] 董建红, 刘瑞芝, 何平, 等. 菊花的化学成分研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(3): 375.
- [10] Lai Jia-Ping, Lim Yew Heng, Su Jin, Ong Choon Nam. Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 848(2): 215-225.
- [11] 贾连军, 孙礼富, 杨学运, 等. 杭白菊化学成分研究[J]. 现代应用药学, 1992, 9(4): 160.
- [12] 贾凌云, 孙启时, 黄顺旺. 滁菊花中黄酮类化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2003, 13(3): 159-161.
- [13] 顾瑶华, 秦民坚. 亳菊的化学成分研究[J]. 中草药, 2006, 37(12): 1784-1786.
- [14] 刘金旗, 沈其权, 刘劲松, 等. 贡菊化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(8): 547-548.
- [15] 黄帅, 周先礼, 王洪燕, 等. 万寿菊花的化学成分[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(4): 370-373.
- [16] Takahashi M, Sato T. The components of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. var. *sinense* Makino forma *esculentum* Makino. IV. Components of Mottenohoka. II[J]. Annual Report of the Tohoku College of Pharmacy, 1981(28): 89-91.
- [17] Lin LZ, & Harnly JM. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) [J]. Food Chemistry, 2010(120): 319-326.
- [18] Liu W, Xing Z, Chen Z, et al. Study on HPLC fingerprint analysis of *Chrysanthemum morifolium* Romat [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2007, 27(8): 1178-1181.
- [19] Sun Y, Cui Y, Liu W. Determination of chlorogenic acid from various species of *Chrysanthemum morifolium* by HPLC[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(24): 83-84.
- [20] Wang YJ, Yang XW, Guo QS, et al. Optimization of the Extraction Conditions and Simultaneous Quantification of Six Flavonoid Glycosides in Flos *Chrysanthemi* by RP-LC [J]. Chromatographia, 2009, 70(1): 109-116.

(2016-03-29 收稿 责任编辑: 张文婷)