



HPLC 同时测定菊花中 6 种活性成分含量

覃珊, 温学森*

(山东大学药学院生药研究所, 山东济南 250012)

[摘要] 目的:利用 HPLC 同时测定菊花中绿原酸、1, 5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷含量。方法:以 Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-0.4% 磷酸水溶液梯度洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 350 nm。结果:6 种活性成分均达到基线分离, 线性关系良好 ($r \geq 0.9997$); 平均加样回收率为 100.6% ~ 102.4%, RSD < 3%。除异绿原酸 A 外, 其他 5 种成分在蒸制样品中均显著高于直接晒干样品。蒸制后, 半开放菊花绿原酸和异绿原酸 A 含量分别比全开放菊花高 53% 和 41%。结论:本方法方法灵敏、准确、可靠、重复性好, 可用于菊花药材的质量评价。

[关键词] 菊花; 绿原酸类成分; 黄酮类成分; 高效液相色谱法

菊花散风清热, 平肝明目, 清热解毒, 临床上用于治疗风热感冒, 头痛眩晕, 目赤肿痛, 眼目昏花, 疮痍肿毒等病症^[1]。近年来, 学者们对菊花质量进行了广泛研究, 发现影响其质量的因素涉及品种、栽培条件、采收时间、产后加工、炮制和贮存等^[2]。目前在菊花质量评价中所选用的指标各不相同, 有的选用总黄酮和总挥发油^[3-5], 有的定量测定菊花中黄酮或酚酸类成分^[3-9], 有的借助指纹图谱反映了菊花质量的差异^[10]。本文首次建立了同时测定菊花中 6 种主要成分的 HPLC 测定方法, 并评价了不同开放程度和加工方法对菊花质量的影响。

1 仪器与试剂

Simadzu LC-10ATvp 高效液相色谱仪; Mettler Toledo AG135 电子分析天平; Agilent 8453 UV-可见分光光度计; KQ2200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

绿原酸(批号 090513)、异绿原酸 A(批号 081218)、异绿原酸 C(批号 090123)、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷(批号 090404) 购自四川维克奇生物科技有限公司, 1, 5-二咖啡酰奎宁酸(批号 090617) 购自成都普瑞法科技开发有限公司, 芹菜素-7-O-β-

D-葡萄糖苷(批号 090715) 购自上海永恒生物科技有限公司, 纯度均大于 98%。磷酸和甲醇为色谱纯, 购自天津科密欧化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Gemini-NX C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相为甲醇(A)-0.4% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱, 0 ~ 10 min, 38% A; 10 ~ 12 min, 38% ~ 32% A; 12 ~ 15 min, 32% ~ 38% A; 15 ~ 25 min, 38% A; 25 ~ 30 min, 38% ~ 45% A; 30 ~ 45 min, 45% ~ 70% A。流速 1 mL · min⁻¹; 柱温 20 °C; 检测波长 350 nm; 进样量 20 μL。按照上述色谱条件进行测定, 结果显示, 各待测组分得到很好的分离, 与相邻组分分离度均大于 1.5, 各成分理论塔板数不低于 3 000。对照品与代表样品的色谱图见图 1。

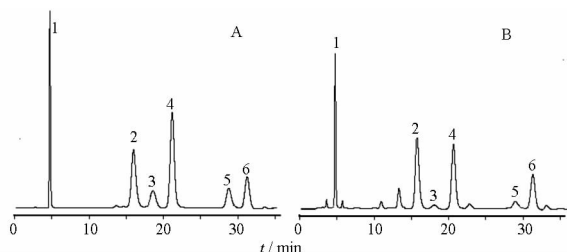
2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品绿原酸 3.39 mg, 1, 5-二咖啡酰奎宁酸 3.57 mg, 异绿原酸 A 4.49 mg, 异绿原酸 C 3.89 mg, 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷 4.23 mg, 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷 3.96 mg, 加甲醇溶解, 配成每毫升含有绿原酸 0.14 mg, 1, 5-二咖啡酰奎宁酸 0.14 mg, 异绿原酸 A 0.18 mg, 异绿原酸 C 0.16 mg, 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷 0.17 mg 和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷 0.16 mg 的对照品溶液。

2.3 样品采收加工和供试品溶液制备 本文所用菊花来自同一无性系, 引自济菊传统产区山东嘉祥, 保存和种植于山东大学药学院研究所药圃。济菊初开为黄色, 以后舌状花逐渐变白, 具托片, 根据文献

[稿件编号] 20101010004

[通信作者] * 温学森, Tel: (0531) 88382028, Fax: (0531) 88382548, E-mail: x. s. wen@163. com

[作者简介] 覃珊, 硕士研究生, E-mail: qin841124@163. com



A. 对照品; B. 样品; 1. 绿原酸; 2. 异绿原酸 A; 3. 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷; 4. 1, 5-二咖啡酰奎宁酸; 5. 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷; 6. 异绿原酸 C.

图1 对照品与样品的 HPLC 图

其应属于菊花的栽培变种毫菊^[15]。鲜花于2个不同开放程度采收,其一为半开放菊花,此时花序直径约3 cm,外层舌状花尚未变白,另一为全开放菊花,此时花序直径约5 cm,完全开放,大多数舌状花变白。所采鲜花直接晒干或蒸90 s后晒干,当失水大

于82%后4℃保存备用。

分析前取一部分样品105℃测定干物质含量,另取一部分粉碎,过20目筛。精密称取1g菊花粉末置50 mL具塞锥形瓶中,加入70%甲醇20 mL,室温下超声提取30 min,过滤,如此再重复提取2次,合并滤液,定容至100 mL,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察 分别精密量取一定体积的对照品溶液,置10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,配成混合对照品储备液。分别精密吸取混合对照品溶液1, 2, 4, 6, 8, 10 mL,用甲醇定容至10 mL,得到一系列不同浓度的混合对照品溶液。分别吸取上述混合对照品溶液20 μL进样,按上述色谱条件测定,记录峰面积,以峰面积积分值为纵坐标(Y),对照品进样量(ng)为横坐标(X)计算标准曲线回归方程,见表1。

表1 线性范围,回归方程和相关系数

| 测定成分 | 线性范围/ng | 回归方程 | r |
|-------------------|-------------|-----------------------|---------|
| 绿原酸 | 0.7 ~ 170.9 | $Y = 693.1X + 182.3$ | 0.999 9 |
| 1,5-二咖啡酰奎宁酸 | 7.4 ~ 285.6 | $Y = 663.1X + 1429.9$ | 0.999 9 |
| 异绿原酸 A | 3.6 ~ 143.7 | $Y = 878.4X + 572.3$ | 0.999 8 |
| 异绿原酸 C | 2.3 ~ 93.4 | $Y = 823.7X + 123.0$ | 0.999 9 |
| 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷 | 1.4 ~ 54.1 | $Y = 837.6X - 144.1$ | 0.999 7 |
| 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷 | 2.4 ~ 47.5 | $Y = 1013.4X - 508.0$ | 0.999 9 |

2.5 精密度试验 精密吸取同一浓度的混合对照品溶液20 μL,在2.1项下色谱条件,重复进样6次,记录峰面积。绿原酸,1,5-二咖啡酰奎宁酸,异绿原酸 A,异绿原酸 C,木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷,芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷峰面积的RSD分别为0.2%, 0.9%, 1.1%, 0.7%, 1.3%, 1.3%。

2.6 重复性试验 精密称取菊花粉末6份,每份1 g,按2.3项下操作制备供试液,进样20 μL,记录各色谱峰峰面积。绿原酸,1,5-二咖啡酰奎宁酸,异绿原酸 A,异绿原酸 C,木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷-7-O-β-D-葡萄糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷峰面积的RSD分别为1.0%, 1.0%, 0.7%, 0.9%, 1.4%, 1.5%。

2.7 稳定性试验 取菊花供试品溶液,分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h,在2.1项下色谱条件测定,并记录峰面积。绿原酸,1,5-二咖啡酰奎宁酸,异绿原酸 A,异绿原酸 C,木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和芹菜

素-7-O-β-D-葡萄糖苷峰面积的RSD分别为1.3%, 1.0%, 0.9%, 1.1%, 1.8%, 1.9%,说明供试品溶液溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称定已知含量的菊花粉末9份,每份0.5 g,分别精密加入低、中、高3种浓度的对照品溶液,按2.3项下操作制备供试液,进样20 μL,记录各色谱峰峰面积,计算平均回收率,结果见表2。

2.9 样品测定 按2.3项下操作制备供试液,进样20 μL,在上述色谱条件下测定,用回归方程计算各样品菊花中6种成分的含量(以单位干物质含量计算),结果见表3。

3 讨论

3.1 提取和测定方法 本文根据前人报道,考察了提取时间和次数,发现用20倍的70%甲醇室温超声30 min,3次即可提取完全。

本文在200 ~ 400 nm扫描,发现待测成分在



表2 6种活性成分的加样回收率

| 测定成分 | 样品含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|-------------------|---------|--------|--------|-------|---------|-------|
| 绿原酸 | 5.07 | 2.76 | 7.81 | 99.0 | 100.6 | 2.3 |
| | 5.17 | 5.22 | 10.37 | 99.5 | | |
| | 5.26 | 8.28 | 13.81 | 103.2 | | |
| 1,5-二咖啡酰奎宁酸 | 11.89 | 6.06 | 18.03 | 101.3 | 101.1 | 0.9 |
| | 11.76 | 11.64 | 23.42 | 100.1 | | |
| | 11.69 | 17.77 | 29.81 | 102.0 | | |
| | 5.48 | 2.74 | 8.36 | 105.2 | | |
| 异绿原酸 A | 5.60 | 5.52 | 11.11 | 99.9 | 102.4 | 2.6 |
| | 5.65 | 8.52 | 14.35 | 102.1 | | |
| | 2.59 | 1.58 | 4.23 | 103.3 | | |
| 异绿原酸 C | 2.42 | 2.57 | 5.04 | 102.0 | 101.5 | 2.0 |
| | 2.37 | 3.64 | 5.99 | 99.3 | | |
| | 0.58 | 0.25 | 0.83 | 99.2 | | |
| 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷 | 0.58 | 0.58 | 1.18 | 103.4 | 100.9 | 2.2 |
| | 0.57 | 0.86 | 1.44 | 99.9 | | |
| | 1.18 | 0.61 | 1.80 | 102.5 | | |
| 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷 | 1.20 | 1.19 | 2.40 | 101.0 | 101.0 | 1.4 |
| | 1.19 | 1.76 | 2.94 | 99.6 | | |
| | | | | | | |

表3 开放程度及加工方法对菊花中6种主要成分含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 开放程度 | 加工方式 | 绿原酸 | 1,5-二咖啡酰奎宁酸 | 异绿原酸 A | 异绿原酸 C | 木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷 | 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷 |
|------|------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 全开放 | 蒸后晒干 | 9.06 ± 0.24 ^b | 23.78 ± 0.63 ^a | 10.85 ± 0.34 ^c | 5.51 ± 0.06 ^a | 1.16 ± 0.01 ^a | 2.35 ± 0.02 ^a |
| | 直接晒干 | 7.26 ± 0.40 ^c | 17.46 ± 0.43 ^b | 10.20 ± 0.23 ^c | 3.65 ± 0.19 ^b | 1.00 ± 0.04 ^a | 1.94 ± 0.15 ^b |
| 半开放 | 蒸后晒干 | 13.88 ± 0.63 ^a | 22.92 ± 1.39 ^a | 15.26 ± 1.65 ^b | 5.17 ± 0.12 ^a | 1.11 ± 0.14 ^a | 2.49 ± 0.22 ^a |
| | 直接晒干 | 7.20 ± 0.60 ^c | 21.87 ± 1.24 ^a | 19.09 ± 1.52 ^a | 4.17 ± 0.53 ^b | 0.77 ± 0.14 ^b | 1.69 ± 0.15 ^b |

注:采用 Duncan's multiple range test 方法分析,同一列不同字母表示差异达到显著性($P < 0.05$)。

350 nm 均有较高的吸光值,且峰形较好,干扰少,色谱图比较理想,故选择 350 nm 作为检测波长。

2010 年版药典采用乙腈-水梯度洗脱体系,用于同时测定菊花中绿原酸和异绿原酸 C 含量^[1]。本文预实验中采用该方法未能取得满意结果,杂质峰与异绿原酸 C 不能有效分离。改用甲醇-磷酸水体系梯度洗脱后,分析结果显著改善,但通过添加对照品发现异绿原酸 C,木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷,1,5-二咖啡酰奎宁酸的色谱峰存在不同程度的重叠。为了解决这一问题,本文在 10 ~ 12 min 逐渐降低甲醇比例,再于 12 ~ 15 min 恢复,成功实现了以上 3 种成分的分离。

3.2 开放程度和加工方式对菊花质量的影响 传统上,菊花在完全开放后采收,但近年来,市场上有“胎菊”销售,为幼小菊花花序的加工品,价格为普通菊花的数倍。此外,不同产地菊花的加工方法差异很大,主要表现在干燥前处理方面,其中蒸制杀青在杭菊中常用,而山东济菊产区传统上采用直接晒

干的方法,近年来也有采用蒸后晒干的。

杨俊等发现在采收期内菊花绿原酸含量无明显变化^[4],本文直接晒干样品与其结论一致,但在蒸制样品中,半开放菊花中绿原酸和异绿原酸 A 含量显著高于全开放菊花,分别提高 53%,41%,提示加工“胎菊”具有一定的合理性。前人报道菊花中绿原酸含量为 0.159% ~ 0.655%^[2],直接晒干菊花与其上限接近。

对于黄酮含量,有人发现随采收期推迟呈下降趋势^[12],木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷在采收初期变化不明显,在后期呈下降趋势^[6],也有发现其变化与栽培类型有关,即:大部分栽培类型总黄酮含量先增后减,但有的却持续增加^[5]。梁天天等发现随开放程度增大,黄酮类成分含量增加^[12],本文测定结果未发现蒸后晒干的 2 种开放程度菊花中木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷含量存在显著差异。由于未完全开放的菊花产量低,从黄酮苷含量的角度,加工“胎菊”不尽合理。



本文结果证实蒸制前处理能有效保护绿原酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷,可能与蒸制能快速灭活各种劣变酶有关(本文预实验表明蒸制 90 s 即可灭活 PPO 和 POD)。但在全开放菊花中,蒸与不蒸处理异绿原酸 A 含量差异不显著,而在半开放菊花中,直接晒干菊花中异绿原酸 A 含量还显著高于蒸后晒干者,这可能与失水逆境诱导相关合成酶表达有关。

刘金旗等报道菊花中芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷含量为 0.012 6% ~ 0.699 7%,且存在南方样品含量高,而北方样品含量低的趋势^[9],不过本文结果比其测定的山东嘉祥样品高一个数量级。胡碧波等报道浙江桐乡 5 个不同种植基地杭白菊中木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖苷含量分别为 0.41% ~ 0.65% 和 0.77% ~ 1.34%,均显著高于本文结果,可能与品种差异有关。

1,5-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 具有显著的抗氧化等生物活性^[13],本文测定结果表明菊花中其含量较高,提示在菊花产品开发和质量评价中应予以高度重视。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:292.
[2] 覃珊,温学森.药用植物质量影响因素研究现状[S].亳州:

2010 全国知名中医院院长暨道家文化与中医养生论坛, 2010,9:26.

[3] 徐文斌,郭巧生,李彦农,等.药用菊花不同栽培类型内在质量的比较研究[J].中国中药杂志,2005,30(21):1645.
[4] 杨俊,蒋惠娣,戈震,等.杭白菊绿原酸及其他成分的含量在采摘期中的动态变化[J].中国药学杂志,2003,38(11):833.
[5] 郭巧生,汪涛,程俐陶,等.药用菊花不同栽培类型总黄酮动态积累研究[J].中国中药杂志,2008,33(11):1237.
[6] 胡碧波,蒋惠娣,杨俊,等.HPLC法测定不同采收期杭白菊中木犀草素及其苷的含量[J].浙江大学学报:医学版,2004,33(1):29.
[7] 梁迎暖,郭巧生,张重义,等.不同加工方法对杭菊品质的影响[J].中国中药杂志,2008,33(11):2314.
[8] 杨俊,蒋惠娣,戈震,等.杭白菊绿原酸及其他成分的含量在采摘期中的动态变化[J].中国药学杂志,2003,38(11):833.
[9] 刘金旗,吴德林,王兰,等.菊花中黄酮苷的含量分析[J].中草药,2011,32(4):308.
[10] 蒋惠娣,胡碧波,曾苏.杭白菊 HPLC 指纹图谱的评价[J].中国药学杂志,2005,40(8):578.
[11] 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
[12] 梁天天.杭白菊适宜采收期初探[J].中草药,2007,30(11):381.
[13] Kim H J, Lee Y S. Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities [J]. *Planta Med*, 2005, 71:871.

Simultaneous determination of 6 active components in *Chrysanthemum morifolium* by HPLC

QIN Shan, WEN Xuesen*

(Institute of Pharmacognosy, School of Pharmaceutical Science, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method quantitative method for simultaneous determination of chlorogenic acid, 1,5-dicaffeoylquinic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, luteolin-7-O-β-D-glucoside and apigenin-7-O-β-D-glucoside in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. **Method:** A Phenomenex Gemini-NX C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with CH₃OH and 0.4% H₃PO₄ as mobile phases. The flow rate was 1 mL · min⁻¹, the column temperature was 25 °C, and the detection wavelength was set at 350 nm. **Result:** The 6 active components were in baseline separation. The linearity of this method was good (r ≥ 0.999 7), and the average recoveries were 100.6% -102.4%, RSD < 3%. Except isochlorogenic acid A, the contents of the determined components in the steam-blanching flower heads were significantly higher than those non blanching. The contents of chlorogenic acid and isochlorogenic acid A in the steam-blanching semiopened flower heads were higher than fully opened ones by 53% and 41%, respectively. **Conclusion:** The method is sensitive, accurate, reliable and repeatable, which can be used for quality evaluation of *Chrysanthemum*.

[Key words] *Chrysanthemum morifolium*; caffeoylquinic acids; flavonoids; HPLC