UPLC 同时测定野菊花药材中 10 个黄酮和有机酸的含量^{*}

戴胜, 秦亚东, 梁枫

(安徽中医药高等专科学校, 芜湖 240001)

摘要 目的: 建立 UPLC 同时测定野菊花药材中绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、蒙花苷及芹菜素 10 个成分含量的方法。**方法:** 采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μ m); 以甲醇 (A)-0.3% 磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.4 mL · min⁻¹; 检测波长 326 nm; 柱温 25 $^{\circ}$ C。**结果:** 10 个成分在 38 min 内均达到基线分离, 线性关系良好 ($r > 0.999\ 2$, $n=6$); 平均回收率均在 96.4%~103.2% (RSD<2.0%, $n=6$); 测定的 6 批样品中上述 10 个成分含量范围分别为 1.018~3.430、0.079~0.365、0~0.269、1.198~2.754、0.185~0.765、1.135~6.659、0.587~2.808、0.103~1.663、0.495~13.050、0.214~0.933 mg · g⁻¹。**结论:** 本方法操作简单, 准确性和重复性良好。可用于野菊花药材的多成分同步测定, 为野菊花的全面质量评价和质量控制提供科学依据。

关键词: 野菊花; 超高效液相色谱法; 黄酮; 有机酸; 咖啡酰奎宁酸; 含量测定; 质量标准; 多组分同时测定

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 03-0451-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.03.12

Simultaneous determination of flavonoids and organic acids in *Chrysanthemum indicum* by UPLC^{*}

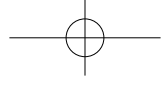
DAI Sheng, QIN Ya-dong, LIANG Feng

(Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Wuhu 240001, China)

Abstract Objective: To establish a ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method for the simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid, 1,3-dicaffeoylquinic acid, luteolin-7-O- β -D-glucoside, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, luteolin, linarin and apigenin in *Chrysanthemum indicum*. **Methods:** The separation was carried out on an Agilent Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μ m) column eluted with methanol (A) and 0.3% phosphoric acid (B) with gradient mode at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹. The column temperature was 25 $^{\circ}$ C and the detection wavelength was set at 326 nm. **Results:** Good separation of chlorogenic acid, caffeic acid,

* 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目 (gxyq2017209); 安徽中医药高专校级自然科学重点项目 (ZRKX1701)

第一作者 Tel: (0553) 4836123; E-mail: daisheng2019@163.com



1,3-dicaffeoylquinic acid, luteolin-7-*O*- β -*D*-glucoside, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, luteolin, linarin and apigenin was achieved within 38 min. Calibration curves of the ten components showed good linear relationship ($r>0.9992$, $n=6$). The average recoveries were within 96.4%–103.2% ($RSD<2.0\%$, $n=6$). The content ranges of the above mentioned 10 components in 6 batches of samples were 1.018–3.430, 0.079–0.365, 0–0.269, 1.198–2.754, 0.185–0.765, 1.135–6.659, 0.587–2.808, 0.103–1.663, 0.495–13.050 and 0.214–0.933 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and repeatable and can be used for simultaneous determination of multi-components in *Chrysanthemum indicum*, which provides scientific base for comprehensive evaluation and quality control of the herb.

Keywords: *Chrysanthemum indicum*; UPLC; flavonoids; organic acids; caffeoylquinic acid; quantification; quality standard; simultaneous determination of multi-components

野菊花为菊科植物野菊 (*Chrysanthemum indicum* L.) 的干燥头状花序, 性凉, 味苦、辛, 归肺肝经, 具有清热解毒、疏风平肝的功效, 主治疮痈肿、目赤肿痛、头痛眩晕等病症。现代药理学研究表明野菊花具有抗菌消炎、免疫调节、抗氧化、降压、保肝等多种药理作用^[1-4]。野菊花生物活性多样, 药源广泛, 我国各地均产, 且安全低毒^[5], 具有较好的临床应用价值和潜力。野菊花中富含黄酮、酚酸、挥发油、萜等类化学成分^[6-8]。药理学研究表明野菊花中黄酮类成分和咖啡酰奎宁酸类成分具有较好的抗炎、抗氧化、抗菌等作用^[9-11], 与野菊花的药理活性相一致。目前, 已有报道对野菊花中的单一或几个成分进行定量分析, 且方法多为 HPLC^[12-14], 但作者采用 UPLC 同时测定野菊花中 10 个黄酮类和有机酸类成分 (绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、蒙花苷及芹菜素) 尚属首次。本研究对不同产地野菊花药材中 10 个有效成分进行含量分析, 为完善野菊花药材及其提取物质量控制方法提供了实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1290 超高效液相色谱仪 (Agilent 公司); Discovery DV215CD 分析天平 (奥豪斯公司); 摩尔纯水机基因型 1850A (重庆摩尔水处理设备有限公司); KH3200B 型超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司, 功率 150 W, 频率 40 kHz); Sigma 2-16KL 高速冷冻离心机 (Sigma 公司); AP-01P 真空泵 (天津奥特赛恩斯仪器有限公

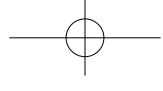
司); XL-130 多功能粉碎机 (永康市小宝电器有限公司)。

1.2 试剂 对照品绿原酸 (批号 161110)、咖啡酸 (批号 161113)、1,3-二咖啡酰奎宁酸 (批号 161220)、木犀草素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (批号 161218)、3,4-二咖啡酰奎宁酸 (批号 161220)、3,5-二咖啡酰奎宁酸 (批号 161204)、4,5-二咖啡酰奎宁酸 (批号 161220)、木犀草素 (批号 161216)、蒙花苷 (批号 161114)、芹菜素 (批号 161010) 均购自北京北纳创联生物技术研究院, 纯度均大于 98.0%。甲醇、乙腈为色谱纯购自 TEDIA 公司, 醋酸、磷酸为分析纯。

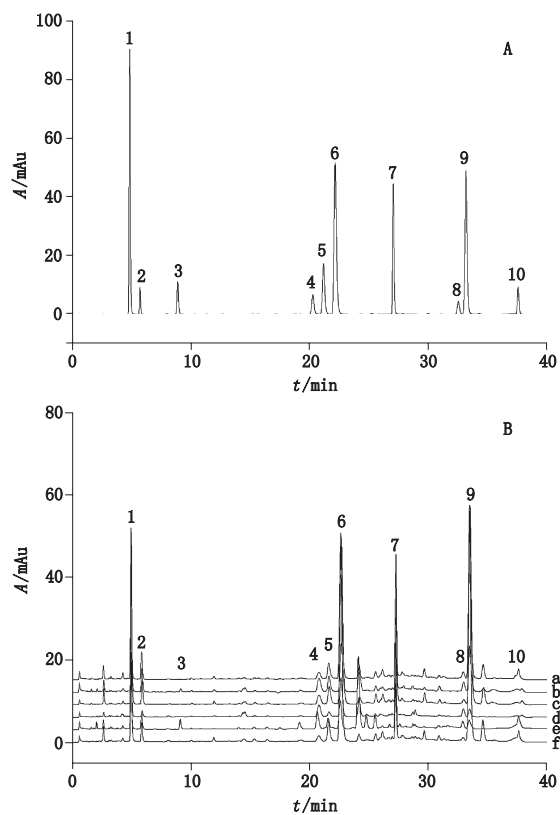
6 批野菊花药材分别购于合肥市新同和新特药商店、安徽亳州千草国药股份有限公司、芜湖市千家惠大药房、安徽元初药房连锁有限公司、芜湖千方百剂大药房和芜湖张恒春大药房, 其产地分别为湖北、浙江、安徽、河南, 经安徽中医药高等专科学校汪荣斌副教授鉴定为 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C_{18} 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm); 流动相 A 为甲醇, B 为 0.3% 磷酸水溶液, 梯度洗脱 (0~3 min, 85%B $\rightarrow$ 80%B; 3~6 min, 80%B; 6~9 min, 80%B $\rightarrow$ 73%B; 9~20 min, 73%B $\rightarrow$ 69.7%B; 20~22 min, 69.7%B $\rightarrow$ 68.7%B; 22~27 min, 68.7%B $\rightarrow$ 57%B; 27~33 min, 57%B $\rightarrow$ 56.8%B; 33~35 min, 56.8%B $\rightarrow$ 56.5%B; 35~36 min, 56.5%B $\rightarrow$ 45%B; 36~37 min, 45%B $\rightarrow$ 85%B; 37~40 min, 85%B); 流速 0.4 mL $\cdot$ min⁻¹; 检测波长 326 nm; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进



样量 2 μL 。在上述色谱条件下 10 个成分与其他共存峰得到很好的分离,分离度均大于 1.5,理论塔板数均大于 10 000。见图 1。



1. 绿原酸 (chlorogenic acid) 2. 咖啡酸 (caffeic acid) 3. 1,3-二咖啡酰奎宁酸 (1,3-dicaffeoylquinic acid) 4. 木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷 (luteolin-7-O- β -D-glucoside) 5. 3,4-二咖啡酰奎宁酸 (3,4-dicaffeoylquinic acid) 6. 3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid) 7. 4,5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-dicaffeoylquinic acid) 8. 木犀草素 (luteolin) 9. 蒙花苷 (linarin) 10. 芹菜素 (apigenin)

a. 浙江 (Zhejiang) b. 湖北 (Hubei) c. 安徽千方百剂大药店 (Qianfang Baiji Pharmacy Store, Anhui) d. 安徽元初药房 (Yuanchu Pharmacy, Anhui) e. 安徽亳州 (Maozhou, Anhui) f. 河南 (Henan)

图 1 对照品 (A) 和野菊花样品 (B) UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of reference substances (A) and sample of *Chrysanthemum indicum* (B)

2.2 混合对照品溶液配制 精密称取绿原酸 3.00 mg, 咖啡酸 1.98 mg, 1,3-二咖啡酰奎宁酸 2.03 mg, 木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷 3.06 mg, 3,4-二咖啡酰奎宁酸 2.10 mg, 3,5-二咖啡酰奎宁酸 3.01 mg, 4,5-二咖啡酰奎宁酸 1.98 mg, 木犀草素 2.10 mg, 蒙花苷 3.07 mg, 芹菜素 1.07 mg, 分别置 5 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 即得绿原酸 $0.600 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 咖啡酸 $0.396 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 1,3-二咖啡酰奎宁酸 $0.406 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷 $0.612 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,

3,4-二咖啡酰奎宁酸 $0.420 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 3,5-二咖啡酰奎宁酸 $0.602 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 4,5-二咖啡酰奎宁酸 $0.396 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 木犀草素 $0.420 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蒙花苷 $0.614 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 芹菜素 $0.214 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品储备液。分别精密量取绿原酸 0.5 mL, 咖啡酸 0.125 mL, 3-二咖啡酰奎宁酸 0.3 mL, 木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷 0.4 mL, 3,4-二咖啡酰奎宁酸 0.3 mL, 3,5-二咖啡酰奎宁酸 0.6 mL, 4,5-二咖啡酰奎宁酸 0.6 mL, 木犀草素 0.35 mL, 蒙花苷 1.2 mL 及芹菜素 0.375 mL 对照品溶液, 置同 5 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得。

2.3 供试品溶液的配制 称取野菊花药材粉末 (过 60 目筛) 0.4 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 按 100 倍药材质量的比例加入 50% 甲醇水 40 mL, 称定质量, 30 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 1 h, 放至室温, 再次称定质量, 用 50% 甲醇水补足减失的量, 摇匀, 室温离心 10 min ($12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液适量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 线性关系的考察 将“2.2”项下配制的混合对照品溶液, 用甲醇逐级稀释成 1、2、4、8、16、20 倍浓度的溶液, 分别进样 2 μL , 以峰面积为纵坐标, 以对照品质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 绘制标准曲线, 得到回归方程和相关系数, 见表 1。

2.5 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 2 μL , 依“2.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算 10 个成分峰面积的 RSD, 结果绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、蒙花苷及芹菜素的 RSD 分别为 0.59%、0.63%、0.56%、0.55%、0.58%、0.56%、0.58%、0.78%、0.65%、1.2%, 表明精密度良好。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于配制后 0、3、6、9、12、24 h 进样 2 μL , 记录峰面积, 计算 10 个成分峰面积的 RSD, 结果绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、蒙花苷及芹菜素的 RSD 分别为 0.60%、0.61%、1.0%、0.92%、1.5%、0.53%、0.45%、1.3%、0.91%、2.0%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.6 重复性试验 精密称取同一产地野菊花样品 6 份, 按“2.3”项下方法配制供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 根据当天随行标准曲线, 计算样品各成分含量。

表 1 10 个成分的线性方程、相关系数和线性范围 ($n=6$)

Tab. 1 Linear equations, correlation coefficients and linear ranges of ten components

成分 (component)	线性方程 (linear equation)	r	线性范围 (linear range)/ μg
绿原酸 (chlorogenic acid)	$Y=9.556X-1.657$	0.999 9	0.006 0~0.120 0
咖啡酸 (caffeic acid)	$Y=15.00X-0.378 2$	0.999 9	0.001 0~0.019 8
1,3-二咖啡酰奎宁酸 (1,3-dicaffeoylquinic acid)	$Y=8.207 9X-0.818$	0.999 9	0.002 4~0.048 7
木犀草素-7- O - β - D -葡萄糖苷 (luteolin-7- O - β - D -glucoside)	$Y=2.32X-0.655 1$	0.999 9	0.004 9~0.097 9
3,4-二咖啡酰奎宁酸 (3,4-dicaffeoylquinic acid)	$Y=9.434X-2.423$	0.999 7	0.002 5~0.050 4
3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid)	$Y=9.601X-8.317$	0.999 7	0.007 2~0.144 5
4,5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-dicaffeoylquinic acid)	$Y=10.731X-5.760 2$	0.999 7	0.004 8~0.095 0
木犀草素 (luteolin)	$Y=2.026X-2.096 9$	0.999 2	0.002 9~0.058 8
蒙花苷 (linarin)	$Y=5.565 2X-1.420 7$	0.999 9	0.014 7~0.294 7
芹菜素 (apigenin)	$Y=6.369 6X-4.960 9$	0.999 3	0.001 6~0.032 1

结果绿原酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7- O - β - D -葡萄糖苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、蒙花苷及芹菜素的平均含量分别为 1.243、0.214、0.264、2.721、0.420、1.171、0.901、1.305、0.665、0.937 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.16%、0.25%、1.3%、0.71%、0.66%、0.37%、0.53%、1.4%、1.3%、2.0%, 表明该实验的重复性良好。

2.7 加样回收率试验 取已知含量的野菊花样品 (安徽, 元初药房购入) 粉末 6 份, 每份约 0.2 g, 精密称定, 分别置 50 mL 量瓶中, 精密加入绿原酸、咖啡

酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素-7- O - β - D -葡萄糖苷、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、蒙花苷及芹菜素对照品储备液 0.415、0.100、0.125、0.880、0.215、0.380、0.430、0.620、0.210、0.890 mL, 按“2.3”项下方法制成加样供试溶液, 依“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算各成分的平均加样回收率和 RSD, 结果见表 2。10 个药效成分的平均回收率均在 96.4%~103.2%, RSD 均小于 2.0% ($n=6$)。结果表明本法的准确性良好。

表 2 野菊花中 10 个成分的加样回收率试验 ($n=6$)Tab. 2 Recovery of ten components in *Chrysanthemum indicum*

成分 (component)	称样量 (mass of sample)/g	样品中量 (contented)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (found)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
绿原酸 (chlorogenic acid)	0.200 2	0.25	0.25	0.49	96.3	96.4	1.0
	0.200 8	0.25	0.25	0.48	95.2		
	0.200 7	0.25	0.25	0.49	96.1		
	0.199 8	0.25	0.25	0.49	97.1		
	0.199 9	0.25	0.25	0.49	95.9		
	0.200 6	0.25	0.25	0.49	98.0		
咖啡酸 (caffeic acid)	0.200 2	0.04	0.04	0.08	104.0	103.2	1.3
	0.200 8	0.04	0.04	0.08	101.8		
	0.200 7	0.04	0.04	0.09	104.8		
	0.199 8	0.04	0.04	0.08	102.1		
	0.199 9	0.04	0.04	0.08	104.4		
	0.200 6	0.04	0.04	0.08	102.1		
1,3-二咖啡酰奎宁酸 (1,3-dicaffeoylquinic acid)	0.200 2	0.05	0.05	0.10	101.7	102.0	1.6
	0.200 8	0.05	0.05	0.10	100.9		
	0.200 7	0.05	0.05	0.11	103.4		
	0.199 8	0.05	0.05	0.11	102.7		
	0.199 9	0.05	0.05	0.10	99.3		
	0.200 6	0.05	0.05	0.11	103.7		

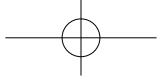


表 2(续)

成分 (component)	称样量 (mass of sample)/g	样品中量 (contented)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (found)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/%
木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷 (luteolin-7-O- β -D-glucoside)	0.200 2	0.53	0.54	1.06	97.8	98.1	2.0
	0.200 8	0.54	0.54	1.05	95.7		
	0.200 7	0.54	0.54	1.09	101.7		
	0.199 8	0.53	0.54	1.06	98.1		
	0.199 9	0.53	0.54	1.06	97.7		
	0.200 6	0.54	0.54	1.06	97.5		
3,4-二咖啡酰奎宁酸 (3,4-dicaffeoylquinic acid)	0.200 2	0.09	0.09	0.17	95.5	97.4	1.9
	0.200 8	0.09	0.09	0.17	97.4		
	0.200 7	0.09	0.09	0.17	95.7		
	0.199 8	0.09	0.09	0.17	99.7		
	0.199 9	0.09	0.09	0.17	96.8		
	0.200 6	0.09	0.09	0.17	99.4		
3,5-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-dicaffeoylquinic acid)	0.200 2	0.23	0.23	0.45	97.5	97.5	1.6
	0.200 8	0.23	0.23	0.45	96.0		
	0.200 7	0.23	0.23	0.46	99.8		
	0.199 8	0.23	0.23	0.45	98.6		
	0.199 9	0.23	0.23	0.45	95.8		
	0.200 6	0.23	0.23	0.45	97.4		
4,5-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-dicaffeoylquinic acid)	0.200 2	0.17	0.17	0.35	102.0	101.7	1.7
	0.200 8	0.17	0.17	0.35	101.0		
	0.200 7	0.17	0.17	0.35	101.2		
	0.199 8	0.17	0.17	0.35	104.9		
	0.199 9	0.17	0.17	0.34	100.5		
	0.200 6	0.17	0.17	0.34	100.6		
木犀草素(luteolin)	0.200 2	0.26	0.26	0.51	96.1	97.3	1.9
	0.200 8	0.26	0.26	0.51	95.7		
	0.200 7	0.26	0.26	0.52	98.9		
	0.199 8	0.26	0.26	0.52	100.1		
	0.199 9	0.26	0.26	0.51	96.8		
	0.200 6	0.26	0.26	0.51	96.0		
蒙花苷(linarin)	0.200 2	0.13	0.13	0.26	98.2	96.7	1.6
	0.200 8	0.13	0.13	0.26	95.3		
	0.200 7	0.13	0.13	0.26	95.4		
	0.199 8	0.13	0.13	0.26	95.3		
	0.199 9	0.13	0.13	0.26	98.1		
	0.200 6	0.13	0.13	0.26	98.1		
芹菜素(apigenin)	0.200 2	0.19	0.19	0.37	97.3	97.2	1.6
	0.200 8	0.19	0.19	0.37	95.4		
	0.200 7	0.19	0.19	0.37	98.3		
	0.199 8	0.19	0.19	0.37	97.5		
	0.199 9	0.19	0.19	0.38	99.4		
	0.200 6	0.19	0.19	0.37	95.6		

2.8 样品含量测定 精密称取 6 个产地野菊花粉末,按“2.3”项方法制成供试品溶液,依“2.1”项下色谱条件进行测定,测定结果见表 3。

表 3 不同产地野菊花中 10 个成分含量测定结果 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=3$)

Tab. 3 The contents of ten constituents in *Chrysanthemum indicum* from different areas

成分 (component)	湖北 (Hubei)	浙江 (Zhejiang)	安徽亳州 (Bozhou Anhui)	安徽 (元初) (Yuchu, Anhui)	安徽 (千方百剂) (Qianfang Baiji, Anhui)	河南 (Henan)
绿原酸 (chlorogenic acid)	1.018	2.203	3.430	1.229	2.734	1.755
咖啡酸 (caffeic acid)	0.079	0.365	0.252	0.216	0.326	0.316
1, 3- 二咖啡酰奎宁酸 (1, 3-dicaffeoylquinic acid)	/	/	/	0.269	/	/
木犀草素 -7-O- β -D- 葡萄糖苷 (luteolin-7-O- β -D-glucoside)	2.335	1.323	1.198	2.671	1.935	2.754
3, 4- 二咖啡酰奎宁酸 (3, 4-dicaffeoylquinic acid)	0.185	0.567	0.765	0.426	0.735	0.609
3, 5- 二咖啡酰奎宁酸 (3, 5-dicaffeoylquinic acid)	1.556	5.628	6.445	1.135	6.659	1.950
4, 5- 二咖啡酰奎宁酸 (4, 5-dicaffeoylquinic acid)	0.587	1.872	1.721	0.867	2.808	1.324
木犀草素 (luteolin)	1.476	1.233	0.103	1.289	0.883	1.663
蒙花苷 (linarin)	0.495	10.958	13.050	0.657	12.385	2.967
芹菜素 (apigenin)	0.359	0.663	0.493	0.933	0.243	0.214

3 讨论

3.1 测定指标的选择

野菊花中富含黄酮和酚酸类化合物,通过课题组前期抗氧化活性筛选,发现其中有机酸类化合物和黄酮类化合物都是野菊花中重要的药效成分之一^[15]。目前野菊花药材一般以总黄酮或单一黄酮类成分,或以绿原酸作为控制质量的指标^[16]。本研究对野菊花中 10 个黄酮类和有机酸类成分进行了含量测定,测定结果表明除咖啡酸和 1, 3- 二咖啡酰奎宁酸的含量较低之外,其他 8 个成分均可以作为含量测定的指标,改善了指标成分单一性的缺点,为野菊花药材质量控制标准的建立提供方法和思路。

3.2 供试品溶液配制方法的选择

本实验以待测 10 个成分作为指标,选用甲醇 - 水作为提取溶剂比较了回流提取与超声提取 2 种提取方法,发现 2 种方法得到的待测物峰面积并没有明显差异,考虑到实验操作的简便易行,故选用了超声提取的方法。在此基础上,考察了溶剂用量、浓度及提取时间对实验结果的影响,结果表明 50% 甲醇 - 水超声提取,100 倍量,提取 1 h 即可将药材中 10 个成分提取完全。

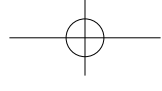
3.3 高效液相色谱条件的建立

用紫外分光光度计测定 6 个有机酸类成分的最大吸收波长均为 (326 ± 2) nm,而参考相关文献^[17],发现另外 4 个黄酮成分的最大吸收波长分别为木犀

草素 -7-O- β -D- 葡萄糖苷 348 nm、蒙花苷 326 nm 和木犀草素 346 nm、芹菜素 336 nm,考虑到《中华人民共和国药典》2015 年版中野菊花的指标性成分是蒙花苷,故最终选择以 326 nm 作为检测波长。在流动相系统的选择中,先后试用了 4 种流动相系统: 乙腈 - 水 -0.3% 磷酸、乙腈 - 水 -2.5% 醋酸, 甲醇 - 水 -2.5% 醋酸、甲醇 - 水 -0.3% 磷酸,结果表明,使用乙腈 - 水 -0.3% 磷酸、乙腈 - 水 -2.5% 醋酸、甲醇 - 水 -2.5% 醋酸系统时,10 个成分尤其是木犀草素和蒙花苷难以达到基线分离,而使用甲醇 - 水 -0.3% 磷酸系统,混合对照品和样品中 10 个成分均达到了基线分离,通过不同比例的摸索,最终确定甲醇 - 水 -0.3% 磷酸梯度洗脱,10 个成分均能获得较好的分离效果。

3.4 含量测定结果分析

含量测定结果表明,10 个成分在不同产地的野菊花药材中的含量差异显著,其内在质量差异较为明显。2015 年版《中华人民共和国药典》中野菊花的指标性成分为蒙花苷,其在部分产地之间的含量差异甚至可以达到几十倍,且湖北、河南、安徽 (元初药房购买) 产地野菊花药材中蒙花苷含量均未达到 2015 年版《中华人民共和国药典》要求。表明市售野菊花药材可能由于产地、加工炮制方法等因素导致其内在质量出现差异,其市售药材质量有待进一步加强质控,而对野菊花中的多种成分进行同步测定可以更加



全面地反映野菊花的内在质量。

野菊花作为常用中药应用广泛,本实验建立了超高效液相色谱同时测定野菊花药材中 10 个成分含量的方法,并且从中选取 8 个含量较高的成分作为野菊花质量控制的指标成分。该方法简便、快速,具有较好的准确度和精密度,与 HPLC 相比节约了分析时间,节省了溶剂,能简单有效地评价野菊花中主要的黄酮和有机酸类成分,有助于实现现代中药的多维质量控制,为进一步完善野菊花药材的质量控制标准提供参考依据。

参考文献

- [1] 王志东,梁容瑞,李宗芳. 中药野菊花的药理作用研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(6): 906
WANG ZD, LIANG RR, LI ZF. Development in pharmacological research of *Chrysanthemum indicum* [J]. Med Recapit, 2009, 15(6): 906
- [2] 张骏艳,张磊,李俊,等. 野菊花总黄酮对佐剂性关节炎大鼠氧自由基代谢的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(3): 344
ZHANG JY, ZHANG L, LI J, et al. Effects of total flavonoids of *Chrysanthemum indicum* on free radical in adjuvant arthritic rats [J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(3): 344
- [3] 吴钉红,杨立伟,苏薇薇,等. 野菊花化学成分及药理研究进展[J]. 中药材, 2004, 27(2): 143
WU DH, YANG LW, SU WW, et al. Advances in study on chemical constituents and pharmacological effects of *Chrysanthemum indicum* [J]. J Chin Med Mater, 2004, 27(2): 143
- [4] 陈传千,沈艳平,屈跃丹,等. 野菊花提取物药理作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2010, 31(3): 175
CHEN CQ, SHEN YP, QU YD, et al. Study progress of pharmacological actions of *Chrysanthemum indicum* extract [J]. J Jilin Med Coll, 2010, 31(3): 175
- [5] 宋立人,洪恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1968
SONG LR, HONG X, DING XL, et al. Comprehensive Dictionary of Modern Traditional Chinese Medicine [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 1968
- [6] 陈耕夫,郭晓玲,孟青. 野菊花化学成分分析[J]. 中药材, 2002, 25(2): 103
CHEN GF, GUO XL, MENG Q. Studie on chemical constituents of *Chrysanthemum indicum* [J]. J Chin Med Mater, 2002, 25(2): 103
- [7] 吴雪松,许凌,张铁军,等. 野菊的化学成分及质量评价研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(3): 43
WU XS, XU J, ZHANG TJ, et al. Research progress in chemical constituents of *Chrysanthemum indicum* and their quality assessment [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(3): 443
- [8] 裴姗姗,毕跃峰,田野,等. 野菊花的研究进展[J]. 河南中医学院学报, 2007, 22(6): 83
PEI SS, BI YF, TIAN Y, et al. Investigation advancement of the wild *Chrysanthemum* [J]. J Henan Univ Chin Med, 2007, 22(6): 83
- [9] 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
ZHAO Y, ZHAO J, LI XP, et al. Advances in caffeoylquinic acid research [J]. China J Chin Mater Med, 2006, 31(11): 869
- [10] 万玉珊,高雅婷,张莹,等. D-奎尼酸研究进展[J]. 黑龙江医药, 2013, 26(5): 819
WANG YS, GAO YT, ZHANG Y, et al. Progress in researches for D-quinic acid [J]. Heilongjiang Med J, 2013, 26(5): 819
- [11] 夏伯候,周亚敏,谢家驰,等. UPLC 法测定野菊花中 5 种抗氧化活性成分的含量[J]. 中药材, 2016, 39(2): 348
XIA BH, ZHOU YM, XIE JC, et al. Determination dients contents of Flos *Chrysanthemi Indici* by UPLC [J]. J Chin Med Mater, 2016, 39(2): 348
- [12] 吴明侠,王晶娟,张贵君. 野菊花水煎剂中 7 种药效组分的含量测定[J]. 中成药, 2011, 33(2): 300
WU MX, WANG JJ, ZHANG GJ. Determination of the seven active components in water extraction of *Chrysanthemi Indici* Flos [J]. Chin Tradit Pat Med, 2011, 33(2): 300
- [13] 沈亚芬,杜伟锋,郑敏霞,等. HPLC 同时测定野菊花中绿原酸、咖啡酸和蒙花苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1117
SHEN YF, DU WF, ZHENG MX, et al. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and linarin in *Chrysanthemi Indici* Flos by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2015, 32(9): 1117
- [14] 申海进,郭巧生,房海灵,等. RP-HPLC 测定野菊花中槲皮素、木犀草素、芹菜素和刺槐素[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 191
SHEN HJ, GUO QS, FANG HL, et al. Determination of quercetin, luteolin, apigenin and acacetin in Flos *Chrysanthemi Indici* by RP-HPLC [J]. China J Chin Mater Med, 2010, 35(2): 191
- [15] 张明. 野菊花抗氧化活性成分分离、鉴定及初步分析的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011
ZHANG M. Isolation, Identification and Analysis of Antioxidant Constituents in *Chrysanthemum indicum* L. [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2011
- [16] 符玲,潘成学,蒋莹,等. 不同产地的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
FU L, PAN CX, JIANG Y, et al. Determination of chlorogenic acid in *Chrysanthemum indicum* in different habitats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2010, 16(5): 68
- [17] 刘菲,杨洋,谭晓杰,等. RP-HPLC 同时测定野菊花中 6 种黄酮的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2067
LIU F, YANG Y, TANG XJ, et al. Simultaneous determination of six flavonoids in Flos *Chrysanthemi Indici* by RP-HPLC [J]. China J Chin Mater Med, 2009, 34(16): 2067

(本文于 2018 年 11 月 22 日修改回)