

# RP-HPLC 同时测定野菊花中 绿原酸、木犀草苷和蒙花苷的含量<sup>△</sup>

郭美兰, 敬应春, 蔡国琴\*

(上海市中药研究所, 上海 201401)

**[摘要]** 目的: 建立同时测定野菊花中绿原酸、木犀草苷和蒙花苷 3 个主要活性成分含量的方法。方法: 采用 RP-HPLC 法, 选用 Kromasil-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm,) 色谱柱; 以乙腈-0.05% 磷酸溶液为流动相(梯度洗脱); 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 334 nm; 柱温为 30℃。结果: 绿原酸、木犀草苷和蒙花苷分别在 40.44 ~ 647.04 ng( $r=0.9998$ )、19.50 ~ 311.92 ng( $r=0.9997$ ) 和 253.62 ~ 405 7.82 ng( $r=0.9999$ ) 范围内线性关系良好; 平均回收率分别为 100.96%、99.99% 和 98.94%, RSD 均 < 2.0%。22 批野菊花药材中绿原酸含量为 0.108% ~ 0.545%, 木犀草苷含量为 0.029% ~ 0.393%, 蒙花苷含量为 0.028% ~ 3.518%。结论: 本方法简便准确、稳定可靠, 可以用于野菊花药材的含量测定。

**[关键词]** 野菊花; RP-HPLC 法; 绿原酸; 木犀草苷; 蒙花苷

野菊花药材为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序, 其味苦、辛, 微寒, 具有清热解毒, 泻火平肝的功能。用于疮痍肿痛, 目赤肿痛, 头痛眩晕<sup>[1]</sup>。野菊花中含有萜类、挥发油、黄酮类、酚酸类等化学成分<sup>[2-3]</sup>。黄酮类化合物是野菊花中重要的药效成分, 木犀草苷和蒙花苷则是其代表性活性成分; 而酚酸类化合物的代表性成分则是绿原酸, 它们是野菊花抗炎、抗毒、抗菌、降血压等作用的有效成分<sup>[4-5]</sup>。因此, 建立能准确测定野菊花中活性成分的方法, 对于控制其质量和确保疗效具有重要的意义。

目前, 有关野菊花的定量分析, 多是单指标活性成分或双指标黄酮类成分测定<sup>[6-9]</sup>。本文选择绿原酸、木犀草苷和蒙花苷为指标成分, 采用 RP-HPLC 法同时测定三者野菊花中的含量, 并对商品药材进行质量评价, 为野菊花药材的质量控制提供可靠的方法和依据。

## 1 仪器与试剂

Agilent1200 高效液相色谱仪 (VMD 检测器)、Agilent1100 高效液相色谱仪 (DAD 检测器)、ChemStation B.03.01 色谱工作站 (安捷伦科技); 岛

津 LC-10AT<sub>VP</sub> 高效液相色谱仪 (SPD 检测器); Milli-Q 超纯水机 (Milli-Pore); CQ-250 超声波清洗器 (上海新超超声波仪器有限公司); BS224S 电子天平 (Sartorius)。

绿原酸 (批号: 110753-200413)、木犀草苷 (批号: 111720-200905)、蒙花苷 (批号: 111528-200606), 均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯, Merck; 超纯水为实验室自制; 其余试剂均为分析纯。

野菊花药材, 2010 年 11 月于产地收集, 经上海雷允上药业有限公司测试中心按《中国药典》2010 版一部鉴定, 均为正品。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液制备 取野菊花药材细粉 0.25 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入 50% 甲醇溶液 50 mL, 称定重量, 80℃ 回流 2 h, 冷至室温, 加 50% 甲醇溶液补足减失重量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 取绿原酸、木犀草苷、蒙花苷对照品置五氧化二磷干燥器中真空干燥 24 h;

<sup>△</sup> [基金项目] 上海市科学技术委员会中药现代化专项(09DZ1977300)

\* [通讯作者] 蔡国琴, Tel: (021) 37565589-116, E-mail: caigq19@126.com

取绿原酸对照品约 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 的容量瓶中, 加甲醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 作为绿原酸储备液。取木犀草苷对照品约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 的容量瓶中, 加甲醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 作为木犀草苷储备液。取蒙花苷对照品约 10 mg, 精密称定, 置 250 mL 的容量瓶中, 精密加入绿原酸储备液、木犀草苷储备液各 25 mL, 再加适量甲醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备液(含绿原酸  $21.74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、木犀草苷  $10.27 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、蒙花苷  $42.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

精密量取 5.0 mL 混合对照品储备液, 置 10 mL 容量瓶中, 加水至近刻度, 冷至室温, 重新定容, 摇匀, 作为对照品溶液(含绿原酸  $10.87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、木犀草苷  $5.13 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、蒙花苷  $21.47 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

## 2.2 色谱条件与系统适用性实验

色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 相为乙腈, B 相为 0.05% 磷酸水溶液, 线性梯度洗脱: 0 ~ 5 min, A 相从 10% ~ 15%, 5 ~ 25 min, A 相从 15% ~ 20%, 25 ~ 40 min, A 相从 20% ~ 30%, 40 ~ 50 min, A 相从 30% ~ 70%, 50 ~ 60 min, A 相为 30%; 流速:  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 柱温: 30 °C; 检测波长: 334 nm; 进样量: 20 μL。以绿原酸、木犀草苷和蒙花苷的色谱峰计算, 三者的分离度均不低于 2.0, 理论塔板数均不低于 20 000。对照品溶液和供试品溶液图谱见图 1。

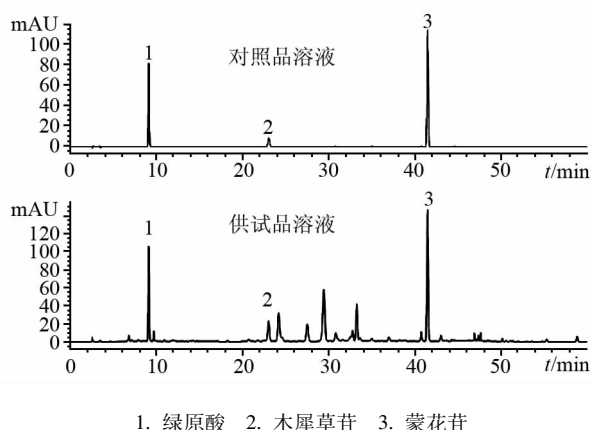


图 1 对照品溶液和野菊花供试品溶液的 HPLC 图

## 2.3 方法验证

2.3.1 线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液(含绿原酸  $8.088 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、木犀草苷  $3.899 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、蒙花苷  $50.723 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 5, 10, 20, 40, 80 μL 注

入液相色谱仪, 依 2.2 项下色谱条件测定。以各指标成分进样量(μg)为横坐标, 峰面积(mAU \* S)为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程、相关系数以及线性范围。结果如下: 绿原酸回归方程为:  $Y = 4.0456X + 2.1376$ ,  $r = 0.9998$ , 在 40.44 ~ 647.04 ng 线性关系良好。木犀草苷回归方程为:  $Y = 2.5179X - 1.1706$ ,  $r = 0.9997$ , 在 19.50 ~ 311.92 ng 线性关系良好。蒙花苷回归方程为:  $Y = 2.3279X + 5.3347$ ,  $r = 0.9999$ , 在 253.62 ~ 4057.82 ng 线性关系良好。

2.3.2 仪器精密度试验 取 2.3.1 项下混合对照品溶液, 按 2.2 项下色谱条件, 重复测定 6 次, 进样量 20 μL, 以各指标成分色谱峰的峰面积计算 RSD 值。结果表明, 绿原酸、木犀草苷和蒙花苷的 RSD 值分别为 0.28%, 0.18% 和 0.08%。仪器精密度符合规定。

2.3.3 重复性试验 取同一批野菊花药材(批号: 20111111)粉末, 按 2.1.1 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.2 项下色谱条件测定, 按外标一点法计算药材中各指标成分含量及其 RSD 值。结果表明, 绿原酸、木犀草苷和蒙花苷的含量的 RSD 值分别为 0.42%, 1.72% 和 0.47%。方法的重复性良好。

2.3.4 中间精密度试验 取同一批野菊花药材(批号: 20111111)粉末, 按 2.1.1 项下方法制备供试品溶液, 在 2.2 项下色谱条件测定, 并按外标一点法计算药材中各指标成分含量, 考察不同人员、不同时间、不同仪器测定结果的精密度, 计算 RSD 值。结果表明, 不同时间、不同人员、不同仪器下所得各指标成分含量测定结果的 RSD 值均小于 1.5%, 该方法的中间精密度符合规定。

2.3.5 回收率试验 取野菊花药材(批号: 20111111)粉末 0.125 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入 2.1.2 中混合对照品储备液 25 mL, 再精密加入水 25 mL、50% 甲醇 1.7 mL(甲醇和水混合后的体积补偿), 称定重量, 80 °C 水浴回流提取 2 h, 冷至室温, 加 50% 甲醇溶液补足减失重量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。平行制备 6 份供试品溶液, 在 2.2 项下色谱条件下测定, 按外标一点法计算各指标成分回收率及其 RSD 值。结果表明, 各指标成分回收率 RSD 值均小于 2.0%, 该方法的准确度符合规定。相关数据见表 1 ~ 3。

表1 绿原酸回收率

样品编号	样品中 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD/%
1	0.356 4	0.543 5	0.908 1	101.50	100.96	0.57
2	0.357 3	0.543 5	0.906 3	101.02		
3	0.356 7	0.543 5	0.909 3	101.67		
4	0.356 2	0.543 5	0.900 9	100.22		
5	0.357 0	0.543 5	0.902 7	100.40		
6	0.356 4	0.543 5	0.905 1	100.95		

表2 木犀草苷回收率

样品编号	样品中 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD/%
1	0.189 4	0.256 7	0.445 0	99.58	99.99	0.59
2	0.189 8	0.256 7	0.447 6	100.41		
3	0.189 5	0.256 7	0.447 5	100.51		
4	0.189 2	0.256 7	0.447 3	100.55		
5	0.189 7	0.256 7	0.444 1	99.12		
6	0.189 4	0.256 7	0.445 5	99.77		

表3 蒙花苷回收率

样品编号	样品中 量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD/%
1	0.913 4	1.073 4	1.982 7	99.62	98.94	1.02
2	0.915 6	1.073 4	1.976 0	98.79		
3	0.914 1	1.073 4	1.984 7	99.74		
4	0.912 7	1.073 4	1.953 7	96.99		
5	0.914 9	1.073 4	1.980 8	99.31		
6	0.913 4	1.073 4	1.978 2	99.20		

## 2.4 样品测定

取22批不同来源野菊花药材,按2.1.1项下方法制备供试品溶液,每批药材平行制备两份,每份进两针,按外标一点法计算药材中绿原酸、木犀草苷、蒙花苷等指标成分的含量。药材含量测定结果见表4。

## 3 讨论

### 3.1 指标性成分的选择

本项目还检测了野菊花药材中酚酸类的咖啡酸和黄酮类的木犀草素,但是咖啡酸与绿原酸极性相近,木犀草素与蒙花苷极性相近。而绿原酸、木犀草苷和蒙花苷3种活性成分,其分子结构、极性和光谱特征均存在明显差异,作为指控指标成分具有较

表4 不同来源22批野菊花药材含量测定

批号	产地	绿原酸	木犀草苷	蒙花苷	/%
20101101	安徽岳西县	0.431 5	0.393 3	0.028 3	
20101102	安徽全椒县	0.305 2	0.058 1	1.507 4	
20101103	湖北罗田县	0.446 1	0.085 7	2.351 1	
20101104	湖北罗田县	0.497 3	0.112 3	2.832 1	
20101105	湖北老河口	0.267 5	0.149 2	0.045 0	
20101106	湖北枣阳市	0.375 4	0.070 5	2.006 5	
20101107	湖北广水市	0.140 0	0.028 8	3.429 0	
20101108	湖北随州市	0.266 8	0.138 6	0.417 0	
20101109	湖北随州市	0.108 1	0.035 2	3.518 3	
20101110	湖北随州市	0.299 9	0.138 4	0.902 9	
20101111	湖北随州市	0.320 9	0.171 3	0.807 0	
20101112	湖北随州市	0.430 8	0.125 1	0.656 6	
20101113	湖北孝感市	0.545 4	0.089 0	3.145 2	
20101114	河南桐柏市	0.376 3	0.152 3	0.597 7	
20101115	河南桐柏市	0.342 8	0.131 8	1.063 1	
20101116	河南西峡市	0.357 3	0.178 4	0.389 2	
20101117	河南信阳市	0.270 0	0.102 3	1.521 8	
20101118	河南罗山市	0.234 0	0.155 5	0.194 6	
20101119	河南南阳市	0.284 3	0.166 7	0.055 8	
20101120	河南商城市	0.168 1	0.123 0	0.604 4	
20101121	湖北随州县	0.453 5	0.085 0	2.813 7	
20101123	湖北麻城市	0.538 1	0.158 5	1.393 9	

好的代表性。又兼顾检测成本,本文选绿原酸、木犀草苷和蒙花苷3种活性成分,作为野菊花药材质量分析的指标成分。

### 3.2 检测波长的选择

根据绿原酸、木犀草苷和蒙花苷3种成分紫外光谱特征,以及野菊花供试品DAD全波长三维图谱,认为334 nm下得到的色谱图基线平稳,并可兼顾3种成分的检测灵敏度。因此,选334 nm为三者同时测定的检测波长。

### 3.3 提取条件的选择

参考文献<sup>[10]</sup>考察了乙醇、甲醇、50%甲醇和70%甲醇溶剂的提取效果,结果表明50%甲醇和70%甲醇的提取效率最高,但是70%甲醇提取液在含量分析时,溶剂效应较强,故选择50%甲醇为提取溶剂。同时还考察了回流和超声两种提取方式,发现回流提取效率较高,且回流提取2 h最佳。

### 3.4 流动相的选择

考察了乙腈-水-磷酸体系和甲醇-水-磷酸体系,结果表明前者峰型及分离度都优于后者。同时还对酸度进行了考察,结果乙腈-0.05%磷酸水体系分离效果最好。

### 3.5 质量分析评价

野菊花为应用较为广泛的药材,《中国药典》2010年版一部采用HPLC方法测定蒙花苷的含量,并以其作为野菊花质量控制的标准<sup>[1]</sup>。本文建立了HPLC同时测定野菊花中绿原酸、木犀草苷和蒙花苷3种活性成分含量的方法,方法精密度高,重现性好,稳定可靠,为建立更加完善可靠的野菊花质量标准提供了科学的方法和依据。

22批野菊花药材含量测定结果表明,药材中绿原酸、木犀草苷和蒙花苷含量波动较大,在一定程度上反映出野菊花药材商品质量不稳定,认为主要与野菊花药材为野生品有关。应进一步积累样品和数据,以制定更科学合理的含量限度。

### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京:中国医

药科技出版社,2010:295.

- [2] 张聪,秦民坚,王玉. 野菊花的化学成分[J]. 药学与临床研究,2009,17(1):39-41.
- [3] 周雅萍. 谈谈野菊花[J]. 中国现代实用医学杂志,2008,7(7):28,32-33.
- [4] 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,2004,27(2):142-144.
- [5] 陈耕夫,郭晓玲,孟青. 野菊花化学成分分析[J]. 中药材,2002,25(2):103-104.
- [6] 王伯涛,王锋,张同波,等. 反相高效液相色谱法测定野菊花中蒙花苷的含量[J]. 时珍国医国药,2009,20(1):166-169.
- [7] 袁学勤,迟静波,胥云. HPLC测定野菊花中绿原酸的含量[J]. 中成药,2005,27(4):493-494.
- [8] 毕跃峰,符玲,裴珊珊,等. 不同野菊花提取物种蒙花苷和木犀草素的含量测定比较[J]. 药物分析杂志,2008,28(11):1797-1799.
- [9] 吴明侠,张贵君. HPLC测定野菊花中两种黄酮类药效组分的含量[J]. 中国现代中药,2008,10(2):20-22.
- [10] 刘婷婷,朱恩圆,俞桂新,等. 野菊花高效液相色谱指纹图谱及质量评价方法的建立[J]. 时珍国医国药,2009,20(4):823-825.

## RP-HPLC Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside and Linarin in Chrysanthemi Indici Flos

GUO Mei-lan, JING Ying-chun, CAI Guo-qin

(Shanghai Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai 201401, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of three active ingredients, chlorogenic acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside, and Linarin in Flos Chrysanthemi Indici. **Methods:** A Kromasil -C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used with the mobile phase (gradient elution) being acetonitrile-0.05% phosphate acid, flow rate being 1.0 mL/min, detecting wavelength being 334 nm, the column temperature being 30 °C. **Results:** The linear response range from 40.44 ~ 647.04 ng ( $r = 0.9998, n = 5$ ) of chlorogenic acid, 19.50 ~ 311.92 ng ( $r = 0.9997, n = 5$ ) of luteolin-7-O-β-D-glucoside, 253.62 ~ 4057.82 ng ( $r = 0.9999, n = 5$ ) of Linarin. The average recoveries ( $n = 6$ ) chlorogenic acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside, and Linarin were 100.96%, 99.99%, and 98.94% respectively. The average recoveries of chlorogenic acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside, and Linarin were 100.96%, 99.99%, and 98.94% with RSD less than 2.0%. **Conclusion:** The method is simple, accurate, reproducible and stable, and can be used for the quality control of Flos Chrysanthemi Indici.

[Key words] *Chrysanthemi Indici Flos*; RP-HPLC; Chlorogenic acid; *Luteolin-7-O-β-D-glucoside*; Linarin

(收稿日期 2011-12-14)