

HPLC 同时测定药用白菊花中绿原酸、木犀草素、芹菜素和金合欢素

彭贵龙, 周光明*, 秦红英

发光与实时分析教育部重点实验室, 西南大学化学化工学院, 重庆 400715

摘要: 采用高效液相色谱法(HPLC)建立同时测定药用白菊花中绿原酸、木犀草素、芹菜素和金合欢素含量的方法, 样品采用离子液体分散液相微萃法提取。采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.2% 冰醋酸溶液(65:35); 检测波长 350 nm; 柱温 35 °C; 流速 0.8 mL/min。绿原酸、木犀草素、芹菜素和金合欢素的质量浓度与峰面积分别在 0.0005 ~ 100 ($r=0.9999$)、0.00095 ~ 190 ($r=0.9999$)、0.0008 ~ 160 ($r=0.9997$)、0.00061 ~ 122 μg/mL ($r=0.9996$) 呈良好的线性关系; 回收率分别为 90.52% ~ 100.44%、90.88% ~ 98.58%、94.40% ~ 98.82%、93.68% ~ 100.54%。该方法快速, 简便, 重复性好, 适合于同时测定药用白菊花中绿原酸、木犀草素、芹菜素和金合欢素的含量。

关键词: 药用白菊花; 绿原酸; 木犀草素; 芹菜素; 金合欢素; 高效液相色谱法

中图分类号: O652.62

文献标识码: A

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid, Luteolin, Apigenin and Acacetin in Medicinal *Chrysanthemum morifolium* by HPLC

PENG Gui-long, ZHOU Guang-ming*, QIN Hong-ying

Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis (Southwest University), Ministry of Education; College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: A sensitive and specific high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to determine chlorogenic acid, luteolin, apigenin and acacetin in medicinal *Chrysanthemum morifolium*. The *C. morifolium* sample was extracted by ionic liquid based dispersive liquid phase microextraction. The chromatographic separation was carried out on a Phenomenex C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with methanol-0.2% acetic acid (65:35, v:v) as mobile phases at a flow rate of 0.8 mL/min. The UV detection wavelength was set at 350 nm, and the column temperature was set at 35 °C. The linear ranges were 0.0005 ~ 100 μg/mL for chlorogenic acid ($r=0.9999$), 0.00095 ~ 190 μg/mL for luteolin ($r=0.9999$), 0.0008 ~ 160 μg/mL for apigenin ($r=0.9997$) and 0.00061 ~ 122 μg/mL for acacetin ($r=0.9996$), respectively; The recoveries of chlorogenic acid, luteolin, apigenin and acacetin were 90.52% ~ 100.44%, 90.88% ~ 98.58%, 94.40% ~ 98.82%, 93.68% ~ 100.54%, respectively. The developed HPLC method was quick, simple and reproducible for the simultaneous determination of chlorogenic acid, luteolin, apigenin and acacetin in medicinal *Chrysanthemum morifolium*.

Key words: medicinal *Chrysanthemum morifolium*; chlorogenic acid; luteolin; apigenin; acacetin; HPLC

菊花系菊科植物 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) 的干燥头状花序, 味甘、苦, 微寒, 具有清热解毒、平肝明目之功效, 主要用于风热感冒、头痛目眩、眼目昏花、疮痍肿毒等病症^[1]。药用菊花最早分为黄菊(杭菊等)、白菊(滁菊等)、野菊三种以指

导临床应用。目前市场上的药用菊花种类繁多, 除 2010 年版中国药典收载的亳菊、杭菊、滁菊和贡菊 4 种菊花外, 还有河南的怀菊、河北的祁菊、山东的济菊等品种^[2]。2009 年菊花被卫生部列为既是食品又是药品的物品名单, 成为仅次于茶叶和咖啡的第三大饮品。药用菊花中主要含有挥发油、绿原酸、黄酮类以及萜类等成分^[3], 其中绿原酸的含量作为菊花质量的内控标准, 具有抗菌、抗病毒、抗诱变、保肝、利胆等多种药用功能^[4]; 根据国内外学者的研

究,药用菊花黄酮类成分具有抗癌、抗艾滋的活性^[5],是菊花中最重要的生物活性因子,主要包括木犀草素、芹菜素、金合欢素、槲皮素等^[6]。因此,对菊花中绿原酸、木犀草素、芹菜素和金合欢素的测定有着极其重要的意义。

目前,对菊花中化学成分含量测定的报道比较多^[7,8],这些报道主要集中在只测定菊花中某几种黄酮或其中某几种有机酸以及只测定其中总黄酮与总有机酸的含量,没有同时测定有机酸及重要黄酮含量的报道,为此,本实验建立了同时测定菊花中重要的有机酸和黄酮含量的 HPLC 方法,对于其质量控和临床使用具有重要的意义。此外,本实验在目标物的提取上也作了相应改进,之前的有关菊花中黄酮和有机酸的测定中,在样品前处理时均采用传统的有机溶剂加热回流提取,该处理方法手工操作繁冗,工作强度大,时间周期长,甚至需要使用大量有机溶剂,本实验用离子液体分散液相微萃取(Ionic liquid based dispersive liquid phase microextraction, ILDLPME)法对目标物进行提取,从而减少了大量有机溶剂的使用,该方法具有操作简单、成本低廉、环境友好等优点。有关 ILDLPME 萃取机理研究,作为中药样品前处理方法在蒽醌类有效成分测定中的应用也有报道^[9],本实验在此基础上也应用于对药用白菊花中黄酮类和有机酸类的提取,并获得了较满意的效果。

1 仪器与材料

LC-20AT 液相色谱输液泵、SPD-20A 紫外检测器、CTO-10AS 柱温箱、LC-Solution 色谱数据处理系统(日本岛津公司);KH-3200B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);TGL-16G 高速离心机

(上海安亭科学仪器厂);SZ-2 自动双重纯化水蒸馏器(上海沪西分析仪器);FA2004A 型分析天平。

绿原酸、木犀草素、芹菜素、金合欢素对照品(纯度均 $\geq 98.5\%$,上海晶纯实业有限公司);1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐(1-Hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, [HMim][PF₆],纯度97%,上海成捷化学有限公司);甲醇(分析纯,重庆川东化工有限公司化学试剂厂);乙醇(分析纯,重庆川东化工有限公司化学试剂厂);冰醋酸(分析纯,重庆川东化工有限公司化学试剂厂);磷酸(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);二次蒸馏水(实验室自制);TritonX-100(德国莫克公司);试验药用白菊花原植物材料购于当地药房,经西南大学周光明教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取绿原酸、木犀草素、芹菜素、金合欢素对照品,甲醇超声溶解,配制成绿原酸 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、木犀草素 950 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芹菜素 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、金合欢素 610 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液。再分别准确吸取四种对照品储备液适量,用流动相配制成绿原酸 0.005、0.05、0.50、5.00、50.00、100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$;木犀草素 0.0095、0.095、0.95、9.50、95.00、190.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$;芹菜素 0.008、0.08、0.80、8.00、80.00、160.00;金合欢素 0.0061、0.061、0.61、6.10、61.00、122.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液,0.45 μm 有机滤膜过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。

2.2 分散液相微萃取制备供试品溶液

称取 1.0 g 药用白菊花样品按照文献^[1]方法,对其进行处理,制备成供试品溶液,经 0.45 μm 有

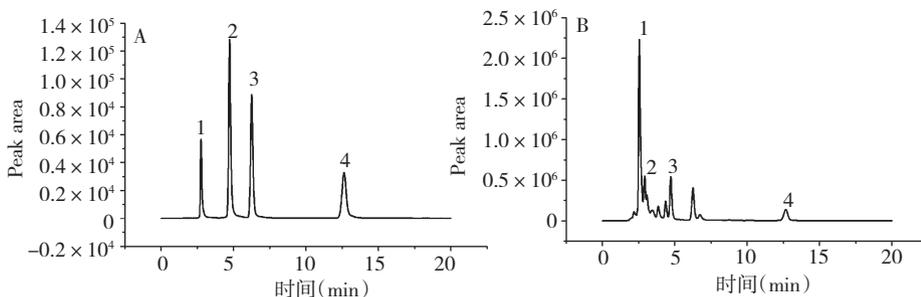


图1 混合对照品 HPLC 图(A)和菊花样品色谱图(B)

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixture standards (A) and medicinal *C. morifolium* extract (B)

1:绿原酸;2:木犀草素;3:芹菜素;4:金合欢素

1: chlorogenic acid, 2: luteolin, 3: apigenin, 4: acacetin

机滤膜过滤,4 ℃冰箱保存备用。移取 5 mL 供试品溶液到至 5 mL 带塞的尖底离心试管中,快速注入 150 μL [HMim][PF6] 萃取剂,涡漩混合 1 min,混合溶液形成分散剂/[HMim][PF6] 的乳浊液体系,在室温条件下静置 2 min,再以 3500 rpm 离心 5 min。均匀分散在甲醇中的萃取剂[HMim][PF6] 经过离心沉积至尖底试管底部,用微样移液器吸取下层沉积相,待进样。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 ~ 0.2% 醋酸 (65:35); 流速: 0.8

mL/min; 进样量: 20 μL ; 检测波长: 350 nm; 柱温: 35 ℃。保留时间在 15 min 内,在此条件下,混合标准品及菊花样品溶液的 HPLC 色谱图见图 1。

2.4 线性关系

分别精密量取“2.1”项下已配制好的不同浓度的混合对照品溶液从低浓度到高浓度,依次进样,每个浓度进样三次,每次 20 μL ,按“2.3”项下的色谱条件进行 HPLC 分析,以峰面积 (Y) 为纵坐标,对照品质量浓度 (X) 为横坐标,进行线性回归。回归方程、相关系数和线性范围以及检测限见表 1。

表 1 线性关系实验结果 ($n=3$)

Table 1 Regression equations, linear range and LODs of the four investigated compounds ($n=3$)

化合物 Compound	线性方程 Regression equation	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数 Correlation coefficient (r)	检出限 Limits of detection (ng/mL)
绿原酸 Chlorogenic acid	$Y = 40501.52 + 89626.86X$	0.0005 ~ 100	0.9999	0.040
木犀草素 Luteolin	$Y = 10578.15 + 151336.35X$	0.00095 ~ 190	0.9999	0.042
芹菜素 Apigenin	$Y = -33483.74 + 136542.51X$	0.0008 ~ 160	0.9997	0.054
金合欢素 Acacetin	$Y = -29193.56 + 121937.97X$	0.00061 ~ 122	0.9996	0.083

2.5 精密度

取同一混标溶液,按“2.3”项色谱条件测定,分别在同一天测定 6 次计算日内精密度,和连续 3 d 测定计算日间精密度,计算各色谱峰的峰面积,计算各待测物的 RSD。日内精密度:绿原酸 1.02%、木犀草素 0.81%、芹菜素 0.79%、金合欢素 1.12%; 日间精密度:绿原酸 1.39%、木犀草素 1.81%、芹菜素 2.32%、金合欢素 2.65%,说明仪器具有较高的精密度。

2.6 稳定性

对照品溶液置 4 ℃冰箱,分别在 0、1、4、8、12、24 h 后测定。绿原酸、木犀草素、芹菜素、金合欢素的峰面积的 RSD 依次为 0.61%、0.77%、1.21%、1.06%,说明对照品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7 重复性

同一批样品取 5 份,按 2.2 项制备,测定。绿原酸、木犀草素、芹菜素、金合欢素的峰面积的 RSD 依次为 1.31%、1.77%、2.21%、1.66%,表明该方法重复性良好。

2.8 加标回收率

向 0.1 g 三个批次的药用白菊花样品中分别添加 3 个不同已知质量的分析物质,按照“2.2”项下的方法制备,“2.3”项的色谱条件下测定,进行该方法的回收率实验,每种分析物的含量由表 1 中的回归方程计算而来,加标后测得量扣除加入标准品的量,得到的数据与测定样品中含量的比值即为回收率。实验结果如表 2 所示。

表 2 回收率实验结果

Table 2 Recoveries (%) of four compounds

化合物 Sample	样品含量 Sample contents (μg)	加入量 Added (μg)	测得量 Detected (μg)	回收率 Recoveries (%)	RSD (%)
绿原酸 Chlorogenic acid	2725.31	1350	4012.36	97.69	3.00
	2725.31	2750	5216.82	90.52	
	2725.31	4500	7110.69	95.79	
	2768.08	1350	4032.69	96.92	
	2768.08	2750	5513.88	99.85	

	2768.08	4500	7215.63	98.11	
	2801.62	1350	4112.66	98.61	
	2801.62	2750	5503.63	98.29	
	2801.62	4500	7313.88	100.44	
木犀草素	298.02	150	441.62	97.85	
Luteolin	298.02	300	581.66	94.51	
	298.02	450	721.26	91.02	
	306.88	150	452.52	98.58	
	306.88	300	599.63	97.64	
	306.88	450	731.63	91.77	3.28
	322.69	150	463.25	97.07	
	322.69	300	601.63	93.47	
	322.69	450	743.26	90.88	
芹菜素	294.62	150	441.11	98.81	
Apigenin	294.62	150	589.69	98.33	
	294.62	150	741.13	98.82	
	308.26	300	451.23	97.72	
	308.26	300	591.63	94.61	1.93
	308.26	300	752.32	98.07	
	316.42	450	461.66	98.5	
	316.42	450	598.69	94.4	
	316.42	450	761.62	98.48	
金合欢素	182.69	90	273.67	100.54	
Acacetin	182.69	190	373.19	100.27	
	182.69	290	472.66	99.98	
	195.69	90	283.33	98.79	
	195.69	190	386.39	100.36	2.15
	195.69	290	481.69	97.96	
	201.66	90	288.38	98.37	
	201.66	190	388.69	98.53	
	201.66	290	478.92	93.68	

2.9 样品含量测定

下方法制备,“2.3”项色谱条件下测定,样品含量测

取同一批药用白菊花样品3份,按照“2.2”项 定结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/g, n=3)

Table 3 Content determination results of samples (mg/g, n=3)

化合物 Compound	样品1 Sample 1 (RSD/%)	样品2 Sample 2 (RSD/%)	样品3 Sample 3 (RSD/%)
绿原酸 Chlorogenic acid	27.36 (2.12)	28.62 (1.32)	29.89 (1.08)
木犀草素 Luteolin	3.01 (2.54)	3.16 (1.05)	3.08 (2.35)
芹菜素 Apigenin	2.98 (1.12)	3.01 (1.27)	2.91 (1.77)
金合欢素 Acacetin	1.87 (0.46)	1.91 (0.90)	1.96 (1.26)

3 讨论

本实验分别考察了乙腈-醋酸水、甲醇-醋酸水的流动相体系,并不断调节醋酸浓度和流动相比例,乙腈和甲醇做有机相均能达到分离效果,但考虑到乙腈价格较贵且毒性较大,所以最终采用甲醇-醋酸水作为流动相,当流动相系统在甲醇-0.2%醋酸(65:35)时,峰形最佳,且此时四个组分的出峰时间均在15 min前,不但分离度好,而且每次进样分析的时间也短。通过有关文献^[10]绿原酸的紫外吸收峰为330 nm,以及文献^[6]同时测定槲皮素、木犀草素、芹菜素和刺槐素时,选择的350 nm综合考虑,选择350 nm作为本实验的检测波长,实验结果显示在此波长下的各测定成分的含量变化和峰面积响应以及线性都较好。

实验首次采用ILDLPME法对药用白菊花中有机酸和黄酮类化合物进行提取,HPLC同时测定提取物中绿原酸、木犀草素、芹菜素、金合欢素的含量,实验结果的精密性、线性关系、重复性、回收率数据均符合测定要求,从测定结果可以看出,其中绿原酸的含量均在2.0%以上,高于《中国药典》(2000年版,一部)规定的最低标准0.2%,并且每次进样分析时间只需20 min就能完成,因此,该实验方法可快速准确地为菊花的质量控制和临床使用提供重要的参考数据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 292.
- 2 Wu DL(吴德玲), Jin CS(金传山), Li Q(李琼), et al. Simultaneous determination of four flavonoids in *Chrysanthemum morifolium* by HPLC. *J Chin Med Mater* (中药材), 2011, 34: 1556-1558.

- 3 Xu WB(徐文斌), Guo QS(郭巧生), Li YN(李彦农), et al. Comparative study on internal quality of various *Chrysanthemum morifolium*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30: 1645-1648.
- 4 Guo QJ(郭秋娟), Jin BQ(金邦荃), Chen HP(陈和平). Research progress on bioactivity of chlorogenic acid and its extraction. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2009, 30: 346-348.
- 5 Guo QS(郭巧生), Wang T(汪涛), Cheng LT(程俐陶), et al. Study on quality of flavone in various cultivars of *Chrysanthemum morifolium* for medicine. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2008, 33: 756-759.
- 6 Shen HJ(申海进), Guo QS(郭巧生), Fang HL(房海灵), et al. Determination of quercetin, luteolin, apigenin and acacetin in Flos *Chrysanthemi Indici* by RP-HPLC. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2010, 35: 191-193.
- 7 Liu F(刘菲), Yang Y(杨洋), Tan XJ(谭晓杰), et al. Simultaneous determination of six flavonoids in Flos *Chrysanthemi Indici* by RP-HPLC. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 34: 2067-2069.
- 8 Wang Y(王岩), Xie YY(谢媛媛), Sun JH(孙嘉鸿), et al. Quantitative determination of the total flavonoids and organic acids of *Chrysanthemum morifolium* extract. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2011, 28: 124-129.
- 9 Tian J(田杰), Chen X(陈璇), Bai XH(白小红). Mechanism and comparison of dispersive liquid phase microextraction based on organic solvent and ionic liquid for determination of compounds in traditional Chinese medicine. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2010, 38: 1593-1598.
- 10 He YJ(何雅君), Su J(苏娟), Yang Q(杨茜), et al. Simultaneous determination of chlorogenic acid and vitexin 2"-rhamnoside in *Crataegi Fructus* extracts by HPLC. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37: 829-831.