

## HPLC 法同时测定翠菊不同部位中 5 种黄酮类成分

石国慧<sup>1,2</sup>, 杨世林<sup>1</sup>, 张晓书<sup>2</sup>, 刘晶鑫<sup>3</sup>, 刘振庭<sup>3</sup>, 赵余庆<sup>2,4\*</sup>

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006
2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016
3. 赤峰民益花青素有限公司, 内蒙古 赤峰 024000
4. 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

**摘要:**目的 利用 HPLC 法对翠菊不同部位中的 5 种黄酮类成分同步检测。方法 色谱柱为 XUnion C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱, 0~65 min, 13%~45%A; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 210 nm; 进样量 20 μL, 测定翠菊花瓣、花托、花杆 75%乙醇提取物, 醋酸乙酯萃取部位中芹菜素、大波斯菊苷、山柰酚、金丝桃苷、木犀草素的量。结果 金丝桃苷、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素、山柰酚色谱分离良好, 均在 2.5~200 mg/L 线性关系良好,  $r$  均大于 0.999 0, 加样回收率为 95%~105%。结论 方法快速、准确, 可为翠菊不同部位的质量控制提供依据。

**关键词:** 翠菊; 黄酮类成分; HPLC 法; 金丝桃苷; 大波斯菊苷; 木犀草素; 芹菜素; 山柰酚

**中图分类号:** R286.022 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)03-0428-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.023

## Simultaneous determination of five flavonoids components in different parts of *Callistephus chinensis* by HPLC

SHI Guo-hui<sup>1,2</sup>, YANG Shi-lin<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-shu<sup>2</sup>, LIU Jing-xin<sup>3</sup>, LIU Zhen-ting<sup>3</sup>, ZHAO Yu-qing<sup>2,4</sup>

1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China
2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China
3. Chifeng MinYi Natural Anthocyanins Company Limited, Chifeng, 024000, China
4. Key Laboratory of Structure-Based Drug Design and Discovery (Shenyang Pharmaceutical University), Ministry of Education, Shenyang 110016, China

**Abstract: Objective** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of five flavonoid components in different parts of *Callistephus chinensis*. **Methods** The chromatographic separation was performed on an XUnion C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient of acetonitrile and water, at a flow rate of 1 mL/min, and detected at 210 nm. **Results** The calibration curve was linear within 2.5—200 mg/L for hyperoside, apigenin-7-*O*-β-*D*-glucopyranoside, luteolin, apigenin, and kaempferol, respectively, with the correlation  $r > 0.999 0$ . The extraction recoveries varied from 95% to 105%. **Conclusion** The method is accurate and selective, and can be used for the quality control of different parts of *C. chinensis*.

**Key words:** *Callistephus chinensis* (L.) Nees; flavonoids; HPLC; hyperoside; apigenin-7-*O*-β-*D*-glucopyranoside; luteolin; apigenin; kaempferol

菊花为菊科多年生草本植物菊花的头状花序, 原产于我国中部河南等地, 栽培历史悠久, 距今已有 3 000 多年的历史, 是中国十大名花之一。菊花品种繁多, 全世界至今已有上万个品种。《礼记》中

有“季秋之月, 鞠有黄华”的记载。晋人傅玄, 亦曾作赋, 称菊花“服之者长寿, 食之者通神”<sup>[1]</sup>。菊花是我国常用中药, 具有疏风、清热、明目、解毒之功效, 主要治疗头痛、眩晕、目赤、心胸烦热、

收稿日期: 2014-09-14

基金项目: 中药标准提取物的工业化色谱制备平台建设(2009ZX09301-012-105B)

作者简介: 石国慧(1990—), 女, 内蒙古自治区, 硕士研究生, 研究方向为中药有效成分的提取分离及质量标准研究。

Tel/Fax: (024)23986521 E-mail: sgh9071@163.com

\*通信作者 赵余庆 Tel/Fax: (024)23986521 E-mail: zyq4885@126.com

疗疮、肿毒等症。现代药理研究表明，菊花主要含有挥发油、黄酮类、氨基酸和微量元素等<sup>[2]</sup>，具有抗炎、治疗冠心病、降低血压、预防高血脂、抗菌、抗病毒、抗氧化等多种药理活性<sup>[3-5]</sup>。李英霞等<sup>[6]</sup>对不同产地菊花挥发油的抑菌作用进行了研究，发现不同产地菊花挥发油对金黄色葡萄球菌、白葡菌、变形杆菌等菌种有抑制作用，其中对金黄色葡萄球菌抑制作用最明显。谈宇武等<sup>[7]</sup>研究发现，鲜菊花可增强毛细血管的抵抗力，抑制毛细血管通透性而具有抗炎作用。张尔贤等<sup>[8]</sup>研究了菊花提取物的抗氧化活性，发现菊花提取物对卵黄脂蛋白 LPO、连苯三酚-luminol 发光体系、TBAS 生成都具有较强的抑制作用，证明菊花提取物具有抗氧化活性，并且其活性与所含黄酮类化合物的量直接相关。有研究显示，菊花的总提取物对离体心脏、心肌细胞均显示具有正性肌力作用，杭白菊具有抗乌头碱诱发的大鼠心律失常，以及抗氯仿诱发的小鼠心律失常的作用<sup>[4]</sup>。

翠菊 *Callistephus chinensis* (L.) Nees 又名江西腊、七月菊，为菊科翠菊属唯一一种植物，主要分布于中国、日本、朝鲜。其味苦，性平，主治目赤肿痛、昏花不明，以全花入药。本课题组前期研究表明，翠菊中含有大量的黄酮类成分。黄酮类化合物对心血管和免疫系统疾病以及肿瘤的形成等有显著的抑制作用。对于黄酮类化合物抗癌作用的研究由来已久，目前已发现具有抗癌作用的黄酮类化合物比较多，主要有芹菜素、山柰酚、槲皮素等。现代药理学研究表明，黄酮类化合物主要通过清除自由基、直接抑制癌细胞生长和抗致癌因子生成这3种途径来达到抗癌、抗肿瘤的目的<sup>[9-10]</sup>。翠菊含有的黄酮类成分中芹菜素、大波斯菊苷、山柰酚、金丝桃苷、木犀草素等是比较有代

表性的黄酮类衍生物，其生物活性极为广泛，如芹菜素和山柰酚具有显著的抗癌、抗菌和预防糖尿病等作用<sup>[11-16]</sup>。金丝桃苷和木犀草素则具有镇痛、免疫调节和保肝等作用<sup>[17-21]</sup>。因此，本实验对翠菊不同部位中的5种黄酮类成分进行了测定，为确定翠菊的药用部位提供了科学依据。

### 1 仪器与材料

LC3000 型高效液相色谱仪（北京创新通恒），旋转蒸发仪（上海爱朗仪器有限公司），芹菜素、大波斯菊苷、山柰酚、金丝桃苷、木犀草素对照品（均为自制，HPLC 峰面积归一化法质量分数大于98%），纯净水（杭州娃哈哈集团），乙腈（色谱纯，天津市康科德科技有限公司），甲醇（色谱纯，天津市康科德科技有限公司），其他所用试剂（分析纯，市售）。样品均由内蒙古赤峰民益花青素有限公司提供，原药材经沈阳药科大学中药学院路金才教授鉴定为翠菊 *Callistephus chinensis* (L.) Nees 的花瓣、花托、花杆。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

XUnion C<sub>18</sub> 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相：乙腈（A）-水（B），梯度洗脱，0~65 min，13%~45% A；体积流量为 1 mL/min；柱温 25 °C；检测波长 210 nm；进样量 20 μL。在上述色谱条件下，各成分色谱峰与相邻峰的分离度均大于 1.5，理论塔板数按色谱峰计算不低于 3 000。色谱图见图 1。

#### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取对照品芹菜素、大波斯菊苷、山柰酚、金丝桃苷、木犀草素各 2 mg，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻

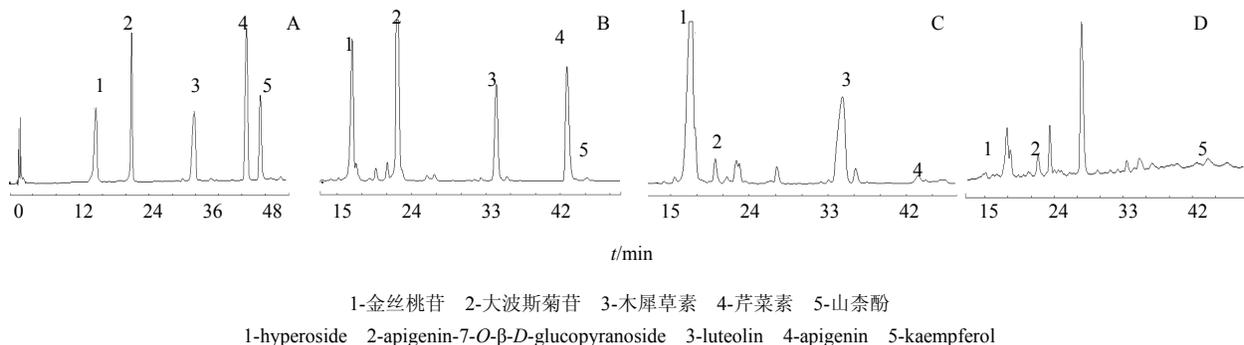


图1 对照品溶液 (A) 和翠菊花瓣 (B)、花托 (C)、花杆 (D) 的样品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of refrence solution (A) and petal (B), receptacle (C), and flower rank (D) of *C. chinensis*

度, 摇匀, 制成 200 mg/L 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 分别取翠菊花杆 10 g、翠菊花瓣 5 g 和翠菊花托 5 g, 精密称定。置 1 000 mL 圆底烧瓶中, 分别加入 10 倍量 75%乙醇溶液超声提取 2 次, 每次 1 h。取出, 冷却至室温, 滤过。合并滤液, 减压浓缩后, 用纯净水溶解并转移至分液漏斗中, 用醋酸乙酯萃取 2 次, 取醋酸乙酯层, 合并萃取液, 减压浓缩。提取物用甲醇溶解, 摇匀, 花瓣配制成质量浓度为 2 g/L 的溶液, 花托和花杆配制成 10 g/L 的溶液。溶液经 0.45 μm 微孔滤膜滤

过, 即得供试品溶液。

**2.3 方法学考察**

**2.3.1 线性关系考察** 分别量取“2.2.1”项对照品溶液适量, 以甲醇依次稀释配成质量浓度为 200、100、50、25、10、2.5 mg/L 的对照品溶液。分别精密吸取 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 在“2.1”项下测定, 记录色谱图。以对照品峰面积为纵坐标 (Y), 对照品溶液的质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 线性回归方程见表 1。结果表明 5 个被测化合物在标准曲线范围内质量浓度与峰面积线性关系良好。

表 1 线性关系考察结果

Table 1 Results of regression equations

| 化合物   | 回归方程                  | r       | 线性范围/(mg·L <sup>-1</sup> ) |
|-------|-----------------------|---------|----------------------------|
| 金丝桃苷  | $Y=55\ 839 X+34\ 746$ | 0.999 1 | 2.5~200                    |
| 大波斯菊苷 | $Y=61\ 518 X+48\ 644$ | 0.999 2 | 2.5~200                    |
| 木犀草素  | $Y=61\ 068 X+31\ 247$ | 0.999 2 | 2.5~200                    |
| 芹菜素   | $Y=98\ 893 X-24\ 447$ | 0.999 6 | 2.5~200                    |
| 山柰酚   | $Y=50\ 780 X-21\ 472$ | 0.999 4 | 2.5~200                    |

**2.3.2 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液 20 μL, 在“2.1”项下色谱条件下重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算金丝桃苷、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素、山柰酚峰面积的 RSD 值分别为 1.3%、0.9%、1.2%、0.8%、1.5%, 结果表明仪器精密度良好。

**2.3.3 重复性试验** 取同一翠菊花瓣样品, 按“2.2.2”项方法平行制备 6 份, 在上述色谱条件下进行分析, 计算金丝桃苷、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素、山柰酚质量分数的 RSD 值分别为 1.0%、1.9%、1.5%、2.1%、1.4%, 均小于 3%, 结果表明方法重复性良好。

**2.3.4 稳定性试验** 取同一翠菊花瓣样品, 分别于 0、2、4、8、12 h 在上述色谱条件下进样分析, 金丝桃苷、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素、山柰酚的色谱峰峰面积的 RSD 值分别为 2.0%、1.3%、1.0%、1.7%、1.4%, 均小于 3%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.3.5 回收率试验** 取已测定的翠菊花瓣样品 3 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别加入适量对照品溶液, 按“2.2.2”项方法操作, 在上述色谱条件下进样分析, 计算回收率。金丝桃苷、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素、山柰酚回收率均在 95%~105% 内, 且 RSD 值小于 2.1%, 表明本方法具有良好的准确度。

**2.4 定量测定**

取翠菊不同部位样品, 按“2.2.2”项方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定。采用外标法计算翠菊不同部位金丝桃苷、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素、山柰酚的量, 测定结果见表 2。

表 2 样品测定结果

Table 2 Results of samples determination

| 部位 | 质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> ) |       |       |       |       |
|----|----------------------------|-------|-------|-------|-------|
|    | 金丝桃苷                       | 大波斯菊苷 | 木犀草素  | 芹菜素   | 山柰酚   |
| 花瓣 | 2.371                      | 4.219 | 1.287 | 1.144 | 0.059 |
| 花托 | 0.151                      | 0.020 | 0.164 | 0.050 | 未检测到  |
| 花杆 | 0.080                      | 0.080 | 未检测到  | 未检测到  | 0.041 |

**3 讨论**

本实验采用乙腈 (A) -水 (B) 为洗脱系统对翠菊样品进行梯度洗脱, 结果显示, 翠菊花瓣中含有 5 种黄酮类成分质量分数较高, 翠菊花托和花杆中只检测出部分成分, 翠菊花托中未检测出山柰酚或量过低没有达到检测限, 翠菊花杆中未检测出木犀草素和芹菜素或质量分数较低没有达到检测限。翠菊花瓣、花托和花杆中金丝桃苷、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素、山柰酚的量均不相同, 翠菊花瓣中 5 种成分的量均最高, 分别为 2.371、4.219、1.287、1.144、0.059 mg/g。

本实验首次建立了 HPLC-UV 法定性鉴别和定量分析翠菊不同部位(花瓣、花托、花杆)中5种成分的量。方法学考察表明,方法重复性好,结果准确,可用于翠菊不同部位金丝桃苷、大波斯菊苷、木犀草素、芹菜素和山柰酚的定性和定量分析。

翠菊是菊科翠菊属的唯一一种植物,具有资源量大、分布广泛、易栽培等特点。翠菊中富含黄酮类成分,具有多种药理活性,值得人们进行开发利用。但是目前国内对于翠菊的研究很少,尤其是关于翠菊的化学成分以及定量测定的研究相对较少,这是对翠菊这一优良资源的极大浪费。本实验基于此情况,对翠菊中含有的黄酮类成分进行了测定,对确定翠菊的有效药用部位提供了科学依据,同时为翠菊的进一步研究奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 李乾构. 药食同源. 药物卷 [M]. 北京: 华夏出版社, 2007.
- [2] 李佰玲. 不同菊花的药理作用分析 [J]. 中国实用医药, 2012, 36(7): 235-236.
- [3] 高 宏. 菊花中微量元素对其抗炎作用的影响 [J]. 中医药管理杂志, 2006, 14(1): 24-25.
- [4] 钟爱娇, 姜 哲, 李雪征, 等. 杭白菊化学成分和药理活性的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(7): 824-830.
- [5] 孔 琪, 吴 春. 菊花黄酮的提取及抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 1001-1002.
- [6] 李英霞, 王小梅, 彭广芳. 不同产地菊花挥发油的抑菌作用 [J]. 陕西中医学院学报, 1997, 20(3): 44.
- [7] 谈宇武. 鲜菊花治疗小儿急性支气管炎 27 例临床观察 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2002(2): 82-84.
- [8] 张尔贤, 方 黎, 张 捷, 等. 菊花提取物的抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2000, 21(7): 6-9.
- [9] 曹纬国, 刘志勤, 邵 云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2241-2247.
- [10] Zhang X S, Liu Z T, Bi X L, *et al.* Flavonoids and its derivatives from *Callistephus chinensis* flowers and their inhibitory activities against  $\alpha$ -glucosidase [J]. *J Excil*, 2013, 12: 956-966.
- [11] 胡太平, 曹建国. 芹菜素诱导人胃癌细胞凋亡作用及机制研究 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(10): 6-10.
- [12] Panda S, Kar A. Apigenin (4', 5, 7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2007, 59(11): 1543-1548.
- [13] Liu A L, Liu B, Qin H L, *et al.* Anti-influenza virus activities of flavonoids from them edicinal plant *Elsholtzia rugulosa* [J]. *Planta Med*, 2008, 74(8): 847-851.
- [14] Bobe G, Sansbury L B, Albert P S, *et al.* Dietary flavonoids and colorectal adenoma a recurrence in the polyp prevention trial [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(6): 1344-1353.
- [15] Xu H X, Lee S E. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria [J]. *Phytother Res*, 2001, 15(1): 39-43.
- [16] Da Silva W S, Harney J W, Keon M B W, *et al.* The small polyphenolic molecule kaempferol increase cellular expenditure and thyroid hormone activation [J]. *Diabetes*, 2007, 56(3): 767-776.
- [17] 司徒曼丽, 李培智, 马传庚, 等. 黄蜀葵溶液及提取物结晶 III 对口腔溃疡止痛作用的临床观察和原理初步探讨 [J]. 安徽医学院学报, 1983, 18(4): 44.
- [18] 韩喻美, 赵小曼, 晏金平. 金丝桃苷与维生素 E 对小鼠脑肝组织的保护作用 [J]. 江西医学院学报, 2002, 42(1): 37-38.
- [19] 鲁小杰, 杨新波, 耿 淼, 等. 鸭乙肝模型氧化应激反应及金丝桃苷的干预 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(43): 8729-8732.
- [20] 闫庆峰, 杨达宽, 黄云超, 等. 木犀草素对小鼠巨噬细胞免疫功能的影响 [J]. 昆明医学院学报, 2007, 28(3): 39-42.
- [21] 张 毅, 王旭光. 木犀草素的体外抗炎机制研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(13): 2331-2341.