

黑龙江产万寿菊花醇提物的指纹图谱研究

苏 瑞^{1,2}, 金敏婷¹, 许 鑫¹, 方 舟¹, 任恒鑫¹, 方洪壮^{1*}

1. 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007

2. 哈尔滨市第一医院 药剂科, 黑龙江 哈尔滨 150010

摘 要: **目的** 建立黑龙江产万寿菊花醇提物的指纹图谱并定性分析共有峰, 为万寿菊花的质量控制提供参考。 **方法** 采用 HPLC 分离 UV 检测建立色谱指纹图谱, Zorbax Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.2%磷酸水溶液梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 ℃, 检测波长 254 nm; 用 LC-MS 定性共有峰, 电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式扫描, 雾化器压力 241.325 kPa, 干燥器温度 350 ℃, 干燥气体积流量 10 L/min, 扫描范围: m/z 50~1 000。 **结果** 万寿菊花醇提物的指纹图谱有 8 个共有峰, 并具有较好的精密度、重复性和稳定性, 其中 5 个共有峰所对应的化学物质为万寿菊素、异槲皮素、异槲皮素苷和槲皮万寿菊素及其苷。 **结论** 建立的万寿菊花醇提物的指纹图谱, 为万寿菊花的质量控制提供参考。 **关键词:** 万寿菊; 指纹图谱; 液相质谱联用; 万寿菊素; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1324-04

Fingerprint for methanol extract of *Tagetes erecta* flowers from Heilongjiang Province

SU Rui^{1,2}, JIN Min-ting¹, XU Xin¹, FANG Zhou¹, REN Heng-xin¹, FANG Hong-zhuang¹

1. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China

2. Pharmacy Department of the First Hospital of Harbin, Harbin 150010, China

Abstract: **Objective** To establish fingerprint and qualitatively analyze the common peaks for the methanol extract of *Tagetes erecta* flowers from Heilongjiang Province, which could provide reference for the quality control of *T. erecta*. **Methods** The fingerprint was established with UV detection and HPLC separation. Chromatographic condition included a Zorbax Eclipse XDB column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), gradient elution with acetonitrile-0.2% phosphoric acid as mobile phase, flow rate 1 mL/min, column temperature 25 ℃, and detection wavelength 254 nm. LC-MS was used for the qualitative analysis of common peaks. LC-MS performed on electrospray ionization (ESI) source with anion-pattern scanning and atomizer-pressure 241.325 kPa as well as desiccator temperature 350 ℃, flow rate 10 L/min, and scanning area m/z 50—1 000. **Results** The fingerprint of the alcohol extract from *T. erecta* flowers with good precision, repeatability, and stability composed of eight common peaks. The chemical compositions corresponding to five common peaks were patuletin, isoquercitrin, isoquercitrin, and quercetagenin with its glycosides. **Conclusion** The liquid fingerprint established could offer reference for the quality control of *T. erecta*.

Key words: *Tagetes erecta* L.; fingerprint; LC-MS; patuletin; quality control

万寿菊 *Tagetes erecta* L. 为菊科万寿菊属一年生草本植物, 夏秋季开花, 花期较长, 花色有柠檬黄、橙红等, 其花、叶、根均可入药^[1]。万寿菊原产于墨西哥, 我国现为主要产地之一。黑龙江省各个地区均有万寿菊的大面积种植, 花的颜色主要为橙红色。万寿菊花中含有的化学成分有类胡萝卜素、叶黄素、黄酮类及挥发油等^[2], 黄酮类物质多以苷的形式存在, 如槲皮万寿菊苷、万寿菊苷等^[3-4]。万

寿菊花具有镇静、降压、扩张支气管、解痉挛的作用, 其黄酮类物质具有降血糖、调血脂、镇痛和抗炎、抗肿瘤等作用^[5]。

国内外关于万寿菊研究主要集中在叶黄素的分离、定量及药理作用方面, 美国药典对叶黄素的单体进行了定量^[6], 现虽有花中黄酮类化学成分的研究, 但尚未涉及其指纹图谱。指纹图谱已成为中药或天然药物质量控制与评价的有力工具^[7], 对其特

收稿日期: 2011-11-04

作者简介: 苏 瑞 (1985—), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士研究生, 研究方向为中药分析。E-mail: surui_2008@163.com

*通讯作者 方洪壮 Tel: (0454)8611265 E-mail: fhz-chjms@sohu.com

网络出版时间: 2012-05-16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120516.1417.004.html>

征峰的定性,是指纹图谱深层次研究的重要内容之一。本研究采用 HPLC 法建立黑龙江产万寿菊花中醇提取物黄酮的指纹图谱,并利用 LC-MS/MS 对部分共有色谱峰定性分析,为万寿菊花质量评价与控制提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 LC/DAD/MS 系列高效液相-质谱联用色谱仪(美国 Agilent 公司); G1322A 脱气机,

G1311A 四元泵, G1329A 自动进样仪, G1316A 柱温箱, G1315D DAD 检测器, 6310 质谱仪, Sartorius BP211D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

万寿菊花 24 批, 分别于 2009 年 8 月采集于黑龙江省 9 个不同地区, 经佳木斯大学药学院宗希明高级实验师鉴定为菊科万寿菊属植物万寿菊 *Tagetes erecta* L. 的花, 见表 1。乙腈、甲醇为色谱纯, 磷酸、甲醇为分析纯。

表 1 万寿菊花样品

Table 1 Samples of *T. erecta* flowers

批次	采集地	色泽	批次	采集地	色泽	批次	采集地	色泽
W1	萝北县共青农场 1 队东部	橙红	W9	萝北县共青农场 15 队东部	橙红	W17	哈尔滨松北区乐业镇	橙红
W2	萝北县共青农场 1 队南部	橙红	W10	萝北县共青农场场部西部	橙红	W18	大庆市大同区	橙红
W3	萝北县共青农场 3 队南部	橙红	W11	勃利县小五站	橙红	W19	齐齐哈尔哈拉海农场	橙红
W4	萝北县共青农场 6 队南部	橙红	W12	勃利县双河镇	橙红	W20	黑龙江明水县崇德镇	土黄
W5	萝北县共青农场 8 队东部	橙红	W13	勃利县大四站	橙红	W21	佳木斯市西林公园	黄
W6	萝北县共青农场 8 队北部	橙红	W14	勃利县勃利镇	橙红	W22	佳木斯大学校园	土黄
W7	萝北县共青农场 9 队西部	橙红	W15	青冈县中和镇	橙红	W23	佳木斯大学校园	橙红
W8	萝北县共青农场 14 队西部	橙红	W16	肇州县二井镇	橙红	W24	佳木斯大学校园	黄

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取万寿菊花粗粉(过 60 目药筛)约 0.25 g, 精密称定, 置 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 50 mL 甲醇, 称定质量。加热回流提取, 保持微沸 2 h, 冷却, 再称定质量, 加入甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过至 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 得供试品溶液。冷藏, 备用。

2.2 检测条件

2.2.1 色谱条件 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Zorbax Eclipse XDB C₁₈ 保护柱(12.5 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 25 ℃; 0.2%磷酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相; 梯度洗脱程序: 0~5 min, 10%~15% B; 5~21 min, 15%~23% B; 21~35 min, 23%~62% B; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI); 负离子扫描模式; 雾化器压力 241.325 kPa; 干燥器温度 350 ℃; 干燥气体流量 10 mL/min; 相对分子质量扫描范围 50~1 000; 碎裂电压 1.0 V。

2.3 测定波长的选择

取供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件进样, 记录保留时间下的 200~400 nm 色谱光谱数据, 绘制万寿菊花中醇提取物溶液色谱-光谱等值线图, 见

图 1。可知分离出的大多数物质在 254 nm 处有较大的吸收, 故选择 254 nm 为测定波长, 谱带宽为 4 nm。

2.4 共有峰的选取与分析

2.4.1 共有峰选取 在确定的色谱条件下, 供试品溶液和空白溶液(甲醇)的色谱图见图 2。由图可知实验所用的试剂对样品的测定无干扰, 样品色谱图中, 有 8 个峰面积较大的符合指纹图谱共有峰要求的色谱峰, 其峰面积总和占色谱图总峰面积的 95%以上。8 个色谱峰分别用 1~8 来标记, 其保留时间分别为 10.22、12.91、16.46、17.04、21.16、24.70、27.35、29.18 min。

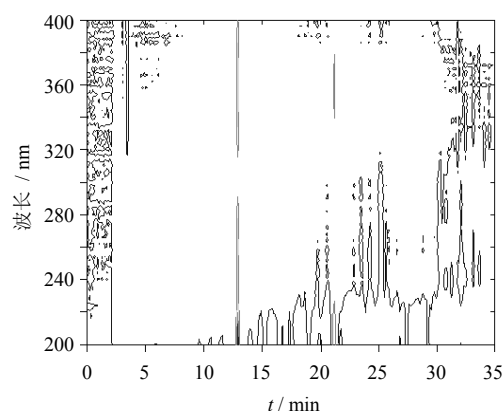


图 1 万寿菊花醇提取物色谱-光谱等值线图

Fig. 1 Contour map of chromatography-spectra for methanol extract of *T. erecta* flowers

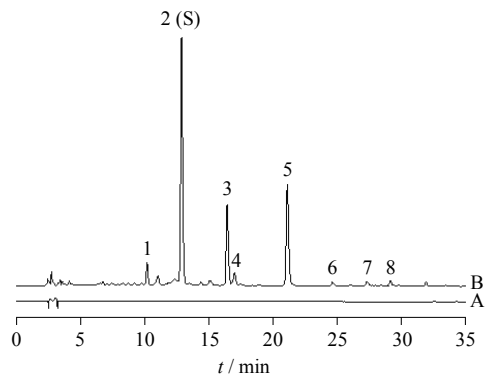


图 2 空白溶液 (A) 和供试品溶液 (B) 的 HPLC 色谱图
Fig. 2 HPLC chromatograms of blank solution (A) and sample solution (B)

2.4.2 色谱峰鉴定 供试品溶液在 HPLC 上经 0.2% 甲酸水-乙腈的流动相梯度洗脱后, 记录各色谱峰的 DAD 数据; 同时按设定的质谱条件, 获取一级质谱数据, 并分别以准分子离子峰为母离子, 再提高相对碰撞能, 利用 ESI-MSⁿ 离子阱的步进式碰撞技术进行多级质谱分析, 获得相应的子离子质谱信息。

结合各色谱峰的紫外光谱和质谱及色谱峰的保留时间, 对其色谱图中的部分色谱峰进行结构归属的判断, 结果见表 2。可知, 2 号峰的母离子为 m/z 479, 经 MSⁿ 的碎裂生成 m/z 317、299、271 离子, 其中, m/z 317 是由母离子失去 1 个六碳糖基而形成, m/z 299、271 分别来自于 317 丢失 H₂O 和 H₂CO₂ (CO+H₂O); 5 号峰的母离子及 MS² 离子与 2 号峰 MSⁿ 的离子相同, 结合文献数据^[8-9]及化合物的极性, 推断 2 和 5 号峰分别为槲皮万寿菊苷、槲皮万寿菊素。4 号峰的母离子 m/z 463 的 MSⁿ 碎裂失去 1 个六碳糖生成 m/z 301 离子, 再由 m/z 301 分别失去 H₂O 和 CO 产生 283 和 273 两个离子, 这两个离子与 7 号峰的离子碎片相同, 根据色谱峰的保留时间和文献数据^[10-11]推断, 4、7 号色谱峰属同类物质, 分别为异槲皮素苷和异槲皮素。8 号峰母离子 m/z 331, MS² 的碎裂生成 m/z 301、288、271, 这 3 个离子分别为 m/z 331 丢失 CH₃、CO 和 H₂O+CO 的碎片, 经与文献数据^[9]比较, 推断 8 号峰为万寿菊素。

表 2 部分共有峰的归属

Table 2 Attribution of some common peaks

色谱峰	保留时间 / min	波长 / nm	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ⁿ	化合物
2	12.91	358、260	479	317, 299, 271, 227, 199, 167, 139, 111	槲皮万寿菊苷
4	17.04	345、274	463	301, 283, 273, 255, 245, 227, 217, 201, 183	异槲皮素苷
5	21.16	358、258	317	299, 271, 227, 215, 199, 167, 139, 111	槲皮万寿菊素
7	27.35	350、274	302	283, 273, 255, 245, 227, 217, 201, 183	异槲皮素
8	29.18	371、258	331	316, 288, 271, 255, 243, 229, 194, 179, 166, 138	万寿菊素

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取 W1 批样品制备的供试品溶液, 在上述色谱条件下重复进样 6 次, 记录色谱图。计算各色谱峰相对于参照峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明, 各色谱峰相对峰面积的 RSD<3%, 相对保留时间的 RSD<1%。

2.5.2 重复性试验 取 W1 批的样品 6 份, 按供试品溶液制备项下方法操作, 在上述色谱条件下分别进样, 记录色谱图。计算各色谱峰相对于参照峰的相对峰面积和相对保留时间。结果表明, 各色谱峰相对峰面积 RSD<3%, 相对保留时间 RSD<1%, 符合指纹图谱的要求。

2.5.3 稳定性试验 取 W1 批的供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h, 在上述色谱条件下分别进样, 记录色谱图。计算各色谱峰的相对峰面积和相对保留时间。结果表明, 各色谱峰相对峰面积 RSD<3%, 相对保留时间 RSD<1%, 表明供试品溶

液在 24 h 内稳定。

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 共有模式建立 取 10 批产地有代表性的橙红色花样品, 用于指纹图谱的建立。10 批样品分别为 W1、W5、W8、W11、W12、W15、W16、W17、W18 和 W19。按上述方法制备供试品溶液并测定, 获取指纹图谱。按峰方式以均值法、中位数法分别建立对照图谱 (R), 以对照图谱 (均值和中位数) 作为指纹图谱的共有模式, 结果见图 3。根据样品和其共有模式的各峰的峰面积, 计算各批样品与其共有模式的相似度, 结果表明, 10 批样品与其共有模式的相关系数均大于 0.95, 符合指纹图谱的技术要求。

2.6.2 共有模式检验 取剩余 14 批样品, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 记录指纹图谱, 并计算各批万寿菊花醇提取物的色谱峰与所建立共有模式的相关系数, 结果见表 3。可知 14 批样品与所建立共有模式的相似度均大于 0.85, 表明不同产地

的各种颜色万寿菊花的指纹图谱在总体特征上基本接近,所建立的指纹图谱能够满足万寿菊花质量控制的要求。

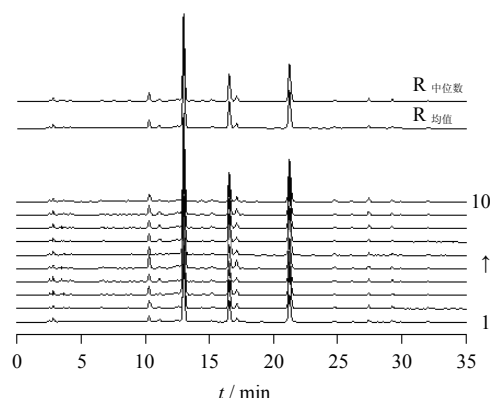


图 3 10 批万寿菊花的 HPLC 指纹图谱

Fig. 3 HPLC fingerprint for ten batches of *T. erecta* flowers

表 3 14 批样品与共有模式相似度

Table 3 Fingerprint similarity for 14 batches of *T. erecta* flowers with common pattern

样品	均值法	中位数法	样品	均值法	中位数法
W2	0.976 7	0.976 3	W13	0.982 2	0.979 1
W3	0.983 3	0.981 8	W14	0.980 3	0.978 8
W4	0.975 2	0.973 5	W20	0.950 3	0.945 3
W6	0.964 6	0.964 2	W21	0.896 9	0.891 3
W7	0.977 8	0.976 6	W22	0.867 9	0.861 6
W9	0.971 2	0.970 6	W23	0.876 1	0.873 4
W10	0.966 7	0.964 2	W24	0.871 9	0.875 9

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择

考察了 75%、100% 甲醇, 100% 甲醇盐酸水解及盐酸水解后氯仿萃取不同提取溶剂法。实验表明, 100% 甲醇提取率较高, 化合物种类较多, 因此本实验采用 100% 甲醇提取。

3.2 色谱条件选择

万寿菊指纹图谱按设定的色谱条件, 在 35 min 后, 流动相中乙腈的比例升至 100%, 继续洗脱至 1 h, 未见色谱峰出现, 因此将 35 min 以前的色谱图作为万寿菊药材的指纹图谱。

由于磷酸水溶液较难挥发, 易污染质谱检测器, 不适宜作为 LC-MS 联用时的流动相。因此, 样品质谱分析时, 将 0.2% 磷酸水溶液换成与其 pH 值相似且易挥发的 0.2% 甲酸水溶液。

3.3 LC-MS 峰的归属

LC-MSⁿ 检测并结合文献推断出万寿菊花中 8 个主要共有峰中的 5 个物质, 即第 2、4、5、7 和 8 号峰分别为槲皮万寿菊素苷、异槲皮素苷、槲皮万寿菊素、异槲皮素及万寿菊素。其他 3 个色谱峰由于无文献数据支持, 未推断其化合物的归属, 有待进一步研究。

3.4 指纹图谱相似性

虽然用于共有模式验证的万寿菊花指纹图谱较接近, 但 W21~W24 批样品与所建立的共有模式的相似度显然较另外 10 批样品的相似度低。分析其原因, W21~W24 批均为供观赏的园林培育品种, 而另 10 批来自于大面积生产种植。不同颜色万寿菊花的指纹图谱虽有一定的差异, 但差异的程度要小于同一颜色的园林与生产品种间的差异。

参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [2] 杨念云, 段金殿, 钱士辉, 等. 万寿菊花的化学成分研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(4): 258-259.
- [3] Abdala L R, Seeligmann P. Natural distribution of flavonoids in *Tagetes minuta* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1995, 23(5): 567-568.
- [4] D'Agostino M, Simone D F, Zhong L Z, et al. Flavonol glycosides from *Tagetes elliptica* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(12): 4387-4388.
- [5] 贾昌平. 万寿菊镇咳作用有效部位的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009.
- [6] The United States Pharmacopeial Convention. USP 31-NF26 [S]. 2008.
- [7] 张水寒, 袁清照, 蔡光先, 等. 金银花超微粉体不同极性部位的指纹图谱及其与抑菌活性相关性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2226-2230.
- [8] Park E J, Kim Y, Kim J. Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula britannica* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(1): 34-36.
- [9] Ibdah M, Zhang X H, Schmidt J, et al. A novel Mg²⁺-dependent O-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(45): 43961-43972.
- [10] 池玉梅, 朱华云, 居 羚, 等. 高效液相-四极杆飞行时间串联质谱分析黄蜀葵中黄酮醇类化合物 [J]. 分析化学, 2009, 37(2): 227-231.
- [11] 赵爱华, 彭丽艳, 王宗玉, 等. 白叶香茶菜中的紫罗兰酮衍生物 [J]. 云南植物研究, 2003, 25(4): 503-506.