

新疆不同产地雪菊 UPLC 指纹图谱的建立及其成分测定

袁 辉, 赵建勇, 杨文菊

新疆产品质量监督检验研究院, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要: 目的 建立新疆不同产地雪菊的 UPLC 指纹图谱, 为雪菊的真伪鉴别和质量控制提供依据。方法 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈-pH 3.0 磷酸水溶液为流动相, 体积流量 0.2 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 30 °C, 以儿茶素、木犀草苷、3,5-*O*-二咖啡奎宁酸为参照物, 对 13 批次新疆不同产地雪菊进行指纹图谱分析。结果 建立了新疆产雪菊的 UPLC 指纹图谱, 标定共有峰 17 个, 并用对照品指认了 3 个色谱峰, 测定了 13 批次新疆产雪菊中 3 种成分的量。结论 13 批次新疆产雪菊相似度虽然存在微小差异, 但均大于 0.90。根据该色谱条件构建的 UPLC 指纹图谱为新疆产雪菊质量评价提供了科学依据。

关键词: 雪菊; UPLC 指纹图谱; 相似度分析; 儿茶素; 木犀草苷; 3,5-*O*-二咖啡奎宁酸

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)08-1223-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.023

Establishment of fingerprint for Xinjiang chrysanthemum and analysis on its components by UPLC

YUAN Hui, ZHAO Jian-yong, YANG Wen-ju

Academy of Product Quality Supervision and Inspection in Xinjiang, Urumqi 830011, China

Abstract: Objective In order to identify the authenticity and control the quality of Xinjiang chrysanthemum, the fingerprinting of it was established using UPLC and discussed in this paper. **Methods** Thirteen batches of Xinjiang chrysanthemum from different origins were analyzed by UPLC with catechin, luteoloside, quercetin, and 3,5-di-*O*-caffeoyl quinic acid as reference substances. The chromatographic condition was performed on Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) and eluted with mobile phase containing acetonitrile-pH 3.0 phosphoric acid solution. The flow rate was 0.2 mL/min with detection wavelength 280 nm in the temperature of 30 °C. **Results** There were 17 peaks in the UPLC fingerprint of Xinjiang chrysanthemum and three components were identified by three peaks determined using reference substance. **Conclusion** The similarity of 13 batches is little difference, but is more than 0.90. The results showed that the UPLC fingerprint chromatogram could be used as a valuable method for the quality evaluation of Xinjiang chrysanthemum.

Key words: Xinjiang chrysanthemum; UPLC fingerprint; similarity evaluation; catechin; luteoloside; 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid

雪菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt., 又名两色金鸡菊, 原产美国中西部地区, 现为中国西部地区尤其是新疆和田地区广为栽培的一种植物。因其能够生长在海拔 3 000 m 以上的新疆昆仑山积雪高山区域^[1], 金色的花朵经冲泡后, 汤汁自然呈现出犹如琥珀一般的绛红色, 浓稠适中、红润剔透, 近似血液, 被大家冠以“昆仑雪菊”的美称。雪菊是维吾尔族世代传承下来的一种养生、保健的天然植物^[2], 具有高效调血脂^[2-3]、降压^[4-7]、抗氧化^[7-9]、降糖^[10-11]、软化血管、去除体内垃圾, 达到人体的体液平衡,

主要对冠心病、高血脂、糖尿病有着特殊的疗效。

雪菊的品质是由其生长的海拔高度、土壤、环境、种植方法所决定的, 而且采摘标准的差异也会影响雪菊的品质。另外, 不同产地雪菊中包括黄酮在内的主要成分的量与气候、地理位置等生态环境存在着一定的相关性^[1]。本实验利用超高效液相色谱 (UPLC) 对新疆不同产地的雪菊进行考察研究, 建立雪菊的 UPLC 指纹图谱, 以期为雪菊的质量评价和研究开发提供参考依据, 为促进其更深度研究开发打下良好的基础。

收稿日期: 2014-11-10

作者简介: 袁 辉 (1980—), 女, 新疆人, 工程师, 硕士, 从事食品、药品质量及安全方面的研究。E-mail: yuanhui8553@163.com

1 仪器、试剂与材料

1.1 主要仪器

UPLC H Class 超高效液相色谱仪, PDA 检测器, Empower 色谱工作站均为美国 Waters 公司, Sartorius BP211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司), 5418 离心机 (德国 Eppendorf), CQ-250 超声波清洗仪, Milli-Q 超纯水仪。

1.2 试剂和材料

甲醇、乙腈为色谱纯, Fisher 公司; 乙酸铵为色谱纯, Sigma 公司; 磷酸为优级纯; 对照品儿茶素 (批号 MUST-12050702)、木犀草苷 (批号 100080-200707)、3,5-*O*-二咖啡奎宁酸 (批号 MUST-11061601) 均购自中国食品药品检定研究院。

雪菊样品由本课题组于 2013、2014 年在新疆和田等地区采集, 经新疆维吾尔自治区中医院李永和主任药师鉴定为两色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* Nutt., 样品经干燥、粉碎过 24 目筛, 装瓶保存。样品来源见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Samples of Xinjiang chrysanthemum

编号	产地	生长海拔高度/m	采集时间
S1	新疆民丰县	2 800	2014-08
S2	新疆民丰县	2 600	2014-08
S3	新疆民丰县	2 200	2014-08
S4	新疆达阪城	1 100	2013-09
S5	新疆达阪城	1 100	2014-09
S6	新疆策勒县	2 200	2014-09
S7	新疆策勒县	1 800	2013-09
S8	新疆墨玉县	2 700	2013-08
S9	新疆墨玉县	2 300	2013-08
S10	新疆吉木萨尔县	1 400	2013-09
S11	新疆皮山克里阳地区	1 800	2013-08
S12	新疆皮山克里阳地区	2 600	2013-08
S13	新疆伊犁察县	1 800	2013-08

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取儿茶素、木犀草苷、3,5-*O*-二咖啡奎宁酸对照品, 用色谱纯甲醇溶解, 并配制成质量浓度分别为 100、60、40、20、10、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 精密称取过 24 目筛的雪菊样品粉末 250.0 mg 于 25 mL 量瓶中, 加入 70%

甲醇水溶液 20 mL, 超声提取 30 min, 放凉后用甲醇水溶液定容至 25 mL, 提取液用 0.22 μm 微孔滤膜, 作为供试品溶液进行测定。

2.2 色谱条件

色谱柱 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C_{18} (150 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为乙腈 (A) -pH 3.0 磷酸溶液 (B), 梯度洗脱程序: 0~3 min, 15%~20% A; 3~11 min, 20%~40% A; 11~13 min, 40%~80% A; 13~15 min, 80% A; 15~17 min, 80%~15% A; 17~20 min, 15% A; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 280 nm; 进样量 1 μL 。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一批菊花样品的供试品溶液按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录其指纹图谱。检测结果表明, 17 个共有色谱峰保留时间 RSD 均小于 0.1%, 除 9 号 (RSD=1.22%)、10 号 (RSD=1.31%) 峰以外, 其他共有峰峰面积 RSD 均小于 1.0%。表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

2.3.2 稳定性试验 取同一批菊花样品的供试品溶液, 分别在 0、4、8、16、24 h 按“2.2”项下色谱条件进样, 考察各共有色谱峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性。检测结果表明, 各共有色谱峰保留时间 RSD 均小于 0.3%, 17 个共有色谱峰峰面积 RSD 小于 2.0%, 其他色谱峰 RSD 介于 2.0%~3.0%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一菊花样品 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.2”项下色谱条件进行测定。检测结果表明, 各共有色谱峰保留时间及峰面积 RSD 分别小于 0.2% 和 2.0%。表明方法重现性良好。

2.4 样品的测定

取不同产地的雪菊 13 批次, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.2”项下色谱条件进行测定, 记录 UPLC 图谱, 见图 1。

2.5 UPLC 指纹图谱的建立

2.5.1 参比峰的选择 在 13 批次样品指纹图谱中, 3,5-*O*-二咖啡奎宁酸分离度良好, 峰位居中, 且峰面积较大, 并且所有样品共有, 所以确定 3,5-*O*-二咖啡奎宁酸为参比峰。

2.5.2 指纹图谱的建立及相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统” (2004 A 版) 对 13 批新疆产雪菊样品的 UPLC 指纹图谱进行分析, 见图 2。确定共有峰 17 个 (去除溶剂峰), 占总峰面积

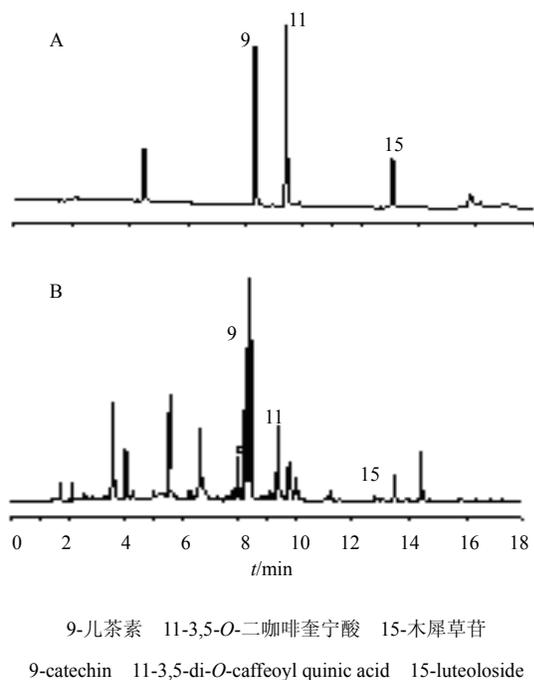


图 1 混合对照品 (A) 和新疆产雪菊 (B) 的 UPLC 图谱
Fig. 1 UPLC fingerprint of mixed reference substances (A) and Xinjiang chrysanthemum samples (B)

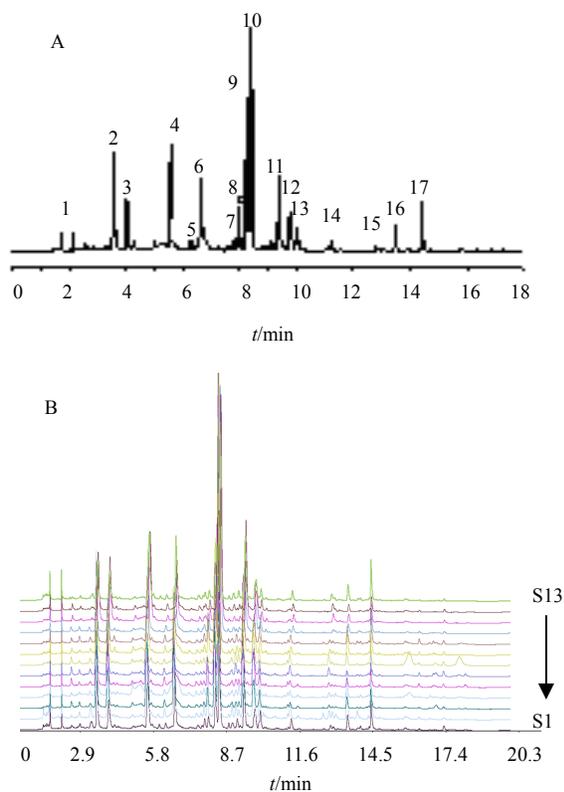


图 2 共有峰 (A) 和新疆产雪菊样品 (B) 的 UPLC 指纹图谱
Fig. 2 UPLC fingerprint of common peaks (A) Xinjiang chrysanthemum samples (B)

80.63%~88.76%，其中 9 号峰和 10 号峰峰面积较大，单峰面积与总峰面积平均比值分别为 14.37% 和 32.55%。S1~S13 批次新疆产雪菊指纹图谱相似度分别为 0.955、0.971、0.945、0.922、0.931、0.981、0.928、0.951、0.963、0.907、0.916、0.954、0.924，从 13 批次新疆产雪菊的相似度结果可以看出，新疆各产地雪菊表现出较高的相似度，所含的化学成分随产地及海拔高度的变化较小。但可以从微小的变化中看出，海拔 1 800 m 以下的新疆产雪菊的相似度均小于 0.931，而生长在海拔高度 2 000 m 以上的新疆产雪菊，其相似度均大于 0.945。

2.6 儿茶素、3,5-O-二咖啡奎宁酸、木犀草苷的测定

2.6.1 线性关系 将配制的 100、60、40、20、10、5 $\mu\text{g/mL}$ 混合对照品溶液按“2.2”项下色谱条件进行测定，记录 UPLC 色谱图，以对照品溶液的质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，得到每种对照品的线性回归方程，见表 2。

2.6.2 样品的测定 利用每种对照品的标准曲线，按照外标法计算 13 种样品中儿茶素、木犀草苷、3,5-O-二咖啡奎宁酸的量，结果见表 3。

3 讨论

3.1 供试液提取溶剂的选择

分别选取 0、30%、50%、70%、100% 甲醇水溶液作为提取溶剂，提取方法为超声法。经过比较，70%、100% 甲醇水溶液作为提取溶剂所提取的色谱峰较为丰富，因此选择 70% 甲醇水溶液作为提取溶剂。

3.2 流动相的选择

雪菊主要含有黄酮类和有机酸类成分，在酸性流动相中分离较好。以乙腈为有机相，在其他条件相同的情况下，分别比较 pH 值分别为 3、4 时的磷酸水溶液、pH 值分别为 3、4 时的 20 mmol/L 乙酸铵溶液分离效果。结果表明，在同等条件下，以 pH 值为 3 的磷酸水溶液-乙腈作为流动相，得到的色谱峰不仅分离度好、基线平稳，而且峰数目比较多，因此采用 pH 值为 3 的磷酸水溶液-乙腈作为流动相。

3.3 检测波长的选择

利用二极管阵列检测器对供试溶液在 200~400 nm 进行三维图谱扫描，并比较波长 220、280 及 340 nm，结果表明在 280 nm 波长下测定峰数目最多，基线平稳，并可兼顾各种成分检测灵敏度，故最终选用 280 nm 作为检测波长。

本实验利用 UPLC，通过对提取溶剂、流动相

表 2 雪菊中 3 种化合物线性关系

Table 2 Linear relationship of compounds in three kinds of Xinjiang chrysanthemum

对照品	t_R /min	线性回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检出限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
儿茶素	8.33	$Y=6.21\times 10^3 X-103$	0.998 7	5~100	0.3
3,5- <i>O</i> -二咖啡奎宁酸	9.41	$Y=9.61\times 10^3 X-117$	0.998 9	5~100	0.2
木犀草苷	13.10	$Y=2.64\times 10^4 X-131$	0.996 5	5~100	1.0

表 3 新疆产雪菊的测定结果

Table 3 Determination content in Xinjiang chrysanthemum

样品	质量分数/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$		
	儿茶素	3,5- <i>O</i> -二咖啡奎宁酸	木犀草苷
S1	17.06	10.43	0.62
S2	16.28	9.84	0.58
S3	15.44	9.27	0.57
S4	12.46	8.19	0.59
S5	13.04	8.27	0.56
S6	15.78	9.14	0.61
S7	13.56	9.02	0.64
S8	16.54	10.67	0.65
S9	14.20	9.32	0.53
S10	11.26	8.14	0.57
S11	12.43	9.75	0.60
S12	16.82	10.17	0.62
S13	13.18	8.76	0.57

及检测波长等的选择,建立了 13 批次不同产地新疆产雪菊的指纹图谱,同时对其中 3 种主要成分进行了测定,这对新疆产雪菊的质量控制与产品开发利用都具有重要的意义。

UPLC 在指纹图谱的建立中,不仅能够大大缩短检测时间,而且因色谱柱填料粒径小的自身特点而具有良好的分离度,这为中药材的指纹图谱建立提供了更快捷的方法。实验证明,13 批次新疆产雪菊供试品试液的精密度、稳定性、重复性均良好。13 批次新疆产雪菊指纹图谱的平均相似度在 0.907~0.971,符合国家有关部门的要求。通过对新疆产雪菊几个主要产地的样品进行分析,可以更好

地控制新疆产雪菊的质量,为今后更深入、全面地研究提供理论依据。

参考文献

[1] 过利敏,张平,张谦,等.雪菊化学成分分析、提取、鉴定及其生物活性研究进展[J].食品科学,2014,35(7):298-303.

[2] 梁淑红,庞市宾,刘晓燕,等.金鸡菊提取物降血脂作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):234-235.

[3] 梁淑红,庞市宾,刘晓燕,等.金鸡菊提取物降血脂作用的动物实验研究[J].农垦医学,2009,31(6):495-498.

[4] 崔康康,姬凤彩,王志琴,等.新疆昆仑雪菊水提液对大鼠血压的影响[J].畜牧兽医科技信息,2013(7):17-19.

[5] 梁淑红,哈木拉提,庞市宾,等.金鸡菊提取物降血压化学成分实验研究[J].时珍国医国药,2012,21(7):1619-1621.

[6] 曹燕,庞市宾,徐磊,等.金鸡菊提取物对血管环舒张作用的探讨[J].农垦医学,2011,33(2):148-152.

[7] 明婷,孙玉华,胡梦颖,等.金鸡菊提取物降压及体内抗氧化作用的研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(10):249-252.

[8] 鲁晓翔.黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展[J].食品研究与开发,2012,33(3):220-224.

[9] 曹燕,庞市宾,徐磊,等.金鸡菊提取物体外抗氧化活性[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):144-147.

[10] 张淑鹏,李琳琳,王丽凤,等.昆仑雪菊提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用[J].现代生物医学进展,2011,11(6):1055-1058.

[11] 张燕,李琳琳,王丽凤,等.新疆昆仑雪菊 5 种提取物对 α -葡萄糖苷酶活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):1-4.