

不同产地野菊花中绿原酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸的含量测定

崔永霞, 吴明侠*, 许闽, 王丽果(河南中医学院, 郑州 450008)

摘要: 目的 建立不同产地野菊花中绿原酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸的含量测定方法。方法 采用 HPLC, 色谱柱为 Diamonsil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 采用梯度洗脱; 检测波长 327 nm; 柱温 30 ℃; 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 绿原酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸的线性范围分别为 0.011~0.22 μg, 0.0175~0.35 μg。加样回收率分别为 99.1%和 98.8%; RSD 分别为 1.93%和 1.54%(n=9)。结论 本方法操作简便, 分析速度快, 结果准确, 重复性好, 可用于野菊花中绿原酸和 4,5-二咖啡酰奎尼酸含量的测定。

关键词: 野菊花; 高效液相色谱法; 绿原酸; 4,5-二咖啡酰奎尼酸

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)09-0799-03

Content Determination of Chlorogenic Acid and 4,5-O-Dicaffeoylquinic Acid in Chrysanthemi Indici Flos from Different Areas

CUI Yongxia, WU Mingxia*, XU Min, WANG Liguo(Henan College of TCM, Zhengzhou 450008, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the content of chlorogenic acid and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid in Chrysanthemi Indici Flos from different areas. **METHODS** HPLC was used. The chromatographic separation was performed on a Diamonsil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with gradient elute. The detection wavelength was 327 nm and column temperature was 30 ℃. **RESULTS** Good linear relationship between the peak area and content of chlorogenic acid and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid was achieved when the amount was within 0.011~0.22 μg, 0.0175~0.35 μg; the recoveries were 99.1% and 98.8%; RSD were 1.93% and 1.54%(n=9). **CONCLUSION** The method is accurate, reproducible and suitable to determine chlorogenic acid and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid in Chrysanthemi Indici Flos.

KEY WORDS: Chrysanthemi Indici Flos; HPLC; chlorogenic acid; 4,5-O-dicaffeoylquinic acid

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序^[1], 具有清热解毒、泻火平肝之功效, 用于疔疮痈肿, 目赤肿痛, 头痛眩晕等症^[2-3]。野菊花主要含有多种倍半萜类、黄酮类、有机酸及挥发油成分^[4], 而野菊花中有机酸类具有抗菌、抗炎的药理活性^[5]。目前, 大部分文献只对不同产地野菊花绿原酸含量进行测定, 而其他有机酸类成分的报道却很少, 文献[6]报道绿原酸、异绿原酸是抑菌的有效成分。本实验采用 HPLC 对不同产地野菊花中绿原酸及 4,5-二咖啡酰奎尼酸的含量同时进行测定, 为野菊花的质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

美国戴安高效液相色谱仪。甲醇为色谱纯, 水

为纯水, 其他试剂为分析纯。绿原酸对照品购自中国药品生物制品检定所(批号: 0753-200111, 纯度≥98%); 4,5-二咖啡酰奎尼酸对照品购自成都曼思特生物科技有限公司(批号: MUST-09041001, 含量≥98%)。购自不同产地的野菊花药材, 经河南中医学院董诚明教授鉴定为野菊花 *Chrysanthemum indicum* L.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱为 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; B 为甲醇, A 为 0.1%醋酸溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, B 相从 15%线性改变至 20%, 20~20.1 min, B 相从 20%线性改变至 30%, 20.1~45 min, B 相

基金项目: 河南中医学院博士科研基金(BSJJ2009-11)

作者简介: 崔永霞, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0371)65575838

E-mail: tianshicui@yahoo.com.cn

*通信作者: 吴明侠, 女, 博士, 副教授

Tel: (0371)65575838 E-mail: mxwu711@163.com

从 30%线性改变至 40%; 检测波长 327 nm; 柱温 30 ℃; 流速 1.0 mL·min⁻¹。理论板数不低于 3 000。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取两种对照品适量, 加 70%乙醇溶解, 配制成绿原酸和 4, 5-二咖啡酰奎尼酸浓度分别为 22, 35 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取野菊花粉末约 0.5 g, 精密称定, 加 70%乙醇 50 mL, 称定重量, 80 ℃回流提取 2 h, 放冷, 用乙醇补足减失的重量, 滤过, 精密吸取续滤液 25 mL 置 50 mL 量瓶中, 加 70%乙醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密量取“2.2”项下混合对照品溶液 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 mL, 甲醇定容至 10 mL, 按“2.1”项下色谱条件测定峰面积; 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程, 绿原酸: $Y=8.024\ 5X-1.286\ 6$ ($r=0.999\ 9$); 4,5-二咖啡酰奎尼酸: $Y=0.531\ 5X-0.941\ 8$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明绿原酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸分别在 0.011~0.22 μg、0.017 5~0.35 μg 内线性关系良好。

2.4.2 仪器精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 绿原

酸和 4,5-二咖啡酰奎尼酸的 RSD 值分别为 0.38%, 0.49%, 结果表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 分别在 0, 1, 2, 6, 8, 12 h 测定, 记录峰面积, 绿原酸和 4,5-二咖啡酰奎尼酸的 RSD 分别为 1.68%, 1.37%, 结果表明样品在 12 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 精密称取供试品样品适量共 6 份, 按“2.3”项下的方法制备供试品溶液, 平行进行测定, 每次进样 10 μL, 测定混合组分的含量, 测得绿原酸和 4,5-二咖啡酰奎尼酸的 RSD 分别为 1.75%, 1.86%, 结果表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取已知含量的野菊花(安徽亳州)6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 精密加入一定量两种对照组分, 其余按“2.3”项下方法制备样品, 作为加样回收供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 各进样 10 μL, 绿原酸和 4,5-二咖啡酰奎尼酸的平均回收率分别为 99.1%和 98.8%; RSD 分别为 1.93%和 1.54%($n=9$), 结果见表 1。

2.4.6 样品含量测定 称取不同产地野菊花, 每份约 0.5 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法, 制成供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算不同产地野菊花中绿原酸和 4, 5-二咖啡酰奎尼酸的含量, 测定结果见表 2 和图 1。

表 1 回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results for recovery tests($n=9$)

成 分	序号	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
绿原酸	1	0.248 3	0.112 0	0.084	0.200 6	102.4	99.1	1.93
	2	0.251 1	0.113 2	0.084	0.191 3	97.0		
	3	0.250 6	0.113 0	0.084	0.192 8	97.9		
	4	0.250 3	0.112 9	0.126	0.235 2	98.5		
	5	0.249 9	0.112 7	0.126	0.236 6	99.1		
	6	0.250 1	0.112 8	0.126	0.240 7	100.8		
	7	0.247 9	0.111 8	0.189	0.293 3	97.5		
	8	0.252 0	0.113 7	0.189	0.295 3	97.6		
	9	0.249 5	0.112 5	0.189	0.305 1	101.2		
4, 5-二咖啡酰奎尼酸	1	0.250 3	0.999 7	1.080	2.088 1	100.8	98.8	1.54
	2	0.249 9	0.998 1	1.080	2.051 7	97.6		
	3	0.250 1	0.998 9	1.080	2.057 1	98.0		
	4	0.251 1	1.002 9	0.720	1.725 3	100.1		
	5	0.247 4	0.988 1	0.720	1.657 7	97.1		
	6	0.251 7	1.005 3	0.720	1.720 1	99.7		
	7	0.247 9	0.990 1	1.620	2.520 9	96.6		
	8	0.250 9	1.002 1	1.620	2.601 1	99.2		
	9	0.252 6	1.008 9	1.620	2.629 9	100.0		

表 2 绿原酸及 4,5-二咖啡酰奎尼酸含量测定结果

Tab 2 Results of content determination of Chlorogenic acid and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid

产地来源	绿原酸含量/mg·g ⁻¹	4,5-二咖啡酰奎尼酸含量/mg·g ⁻¹	产地来源	绿原酸含量/mg·g ⁻¹	4,5-二咖啡酰奎尼酸含量/mg·g ⁻¹
安徽黄山	0.363	2.692	安徽亳州	0.451	3.994
佛山德众	0.384	2.708	河南临颖	0.221	0.992
江苏无锡	0.428	3.419	华东大药房	0.366	3.085
河南驻马店	0.474	2.868	杭州顾寿昌	0.319	2.000
河南灵宝	0.377	1.413	杭州翰草堂	0.377	1.500

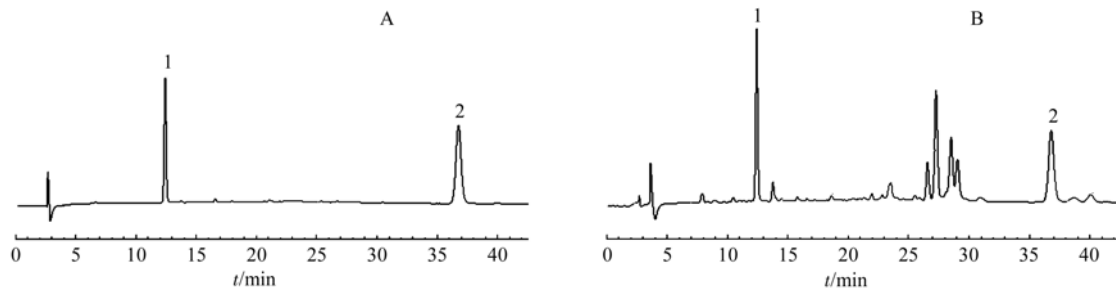


图 1 野菊花 HPLC 色谱图

A-对照品; B-供试品; 1-绿原酸; 2-4,5-二咖啡酰奎尼酸

Fig 1 HPLC chromatogram of *Chrysanthemum indicum* L.

A-control; B-sample; 1-Chlorogenic acid; 2-4,5-O-dicaffeoylquinic acid

3 讨论

3.1 溶剂的选择

对于药材中绿原酸的提取, 中国药典多采用 50%的甲醇进行提取, 本试验选用了甲醇、乙醇、水、50%甲醇、50%乙醇、70%乙醇作为提取溶剂进行比较, 发现用 70%乙醇作为溶剂提取的绿原酸和 4,5-二咖啡酰奎尼酸的含量明显高于其他溶剂, 且乙醇无毒, 价格便宜、无污染。

3.2 提取方法的选择

本试验考察了超声和加热回流两种方法, 结果发现加热回流所提取的有机酸含量高于超声提取有机酸含量, 通过正交试验对回流提取方法进行考察, 最后选择 50 mL, 70%乙醇加热回流 2 h 最适宜。

3.3 检测波长的选择

本试验所测定两种有机酸结构相似, 最大吸收波长相差不大, 通过全波长扫描发现 327 nm 两种物质的响应值相对较大, 因此选择 327 nm 作为检测波长。

3.4 流动相的选择

用 70%的乙醇提取样品的杂质相对较多, 且野菊花中含有多种有机酸成分, 采用等度洗脱的

方式难以分离, 因此采用多步梯度洗脱, 水相加入 0.1%的冰醋酸以减少有机酸的拖尾, 结果达到满意的分离效果。

由测定结果可以看出, 不同产地绿原酸和 4,5-二咖啡酰奎尼酸含量相差较大, 以安徽亳州含量相对较高, 而河南临颖的含量比较低。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 295.
- [2] CHEN G F, GUO X L, MENG Q. Analysis of chemical constituents of flos *Chrysanthemum* L. [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2002, 25(2): 103-104.
- [3] WU M X, CUI Y X, WANG J J, et al. Study on extraction of total polysaccharides in *Chrysanthemi Indici Flos* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(2): 133-136.
- [4] ZHANG Y M, HUANG Y F, TAO L, et al. Chemical components of essential oils from Flos *Chrysanthemi Indici* in different areas [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2002, 27(4): 265-267.
- [5] SHI L P, TIAN L L, YUAN J S, et al. The overview on the research of Flos *Chrysanthemum* [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管病杂志), 2005, 3(5): 434-436.
- [6] LIU X, GAO J D. Studies on quality control and chemistry constitutes and pharmacology of Flos *Lonicerae* [J]. J Gansu Coll Tradit Chin Med(甘肃中医学院学报), 2006, 123(6): 46-49.

收稿日期: 2011-12-07