

HPLC法测定三种常见菊花中木樨草素的含量

刘莉^{1,2}, 龙婷³, 姚建忠¹ (1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 上海市食品药品监督管理局认证审评中心, 上海 200020; 3. 石河子大学医学院预防医学系, 新疆 石河子 832002)

摘要 目的: HPLC法测定市场上 3种常见菊花中木樨草素的含量。方法: 采用 Diamasil C₁₈色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (50: 50) 30 min 内匀速变换至甲醇-水 (80: 20); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 350 nm。结果: 木樨草素在 0.224~2.24 μg 范围线性关系良好, $r = 0.9999$ 平均加样回收率 99.40%, RSD 为 2.67% ($n = 9$); 杭菊、贡菊和毫菊中木樨草素平均含量分别为 0.34、0.4 和 0.69 mg/g RSD 分别为 0.8%、1.2% 及 1.3% ($n = 6$)。结论: 毫菊中木樨草素含量最高。本法灵敏、简便准确、重现性好, 可用于市场不同品种菊花中木樨草素的质量控制。

关键词 菊花; 木樨草素; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)04-0289-03

Determination of luteolin in three kinds of *Chrysanthemum morifolium* by HPLC

LIU Li², LONG Ping³, YAO Jian-zhong¹ (1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Center for Certification and Evaluation, Shanghai Food and Drug Administration, Shanghai 200020, China; 3. Department of Pharmacology, College of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

ABSTRACT Objective To determine the content of luteolin in three kinds of *Chrysanthemum morifolium* that are often seen in market by HPLC. **Methods** The luteolin was quantified by reverse HPLC on Diamasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using methanol-water (changed from 50: 50 to 80: 20 in 30 min at pace) as mobile phase with a flow rate of 1 mL/min. The detecting wavelength was 350 nm. **Results** The linear range of luteolin was 0.224 ~ 2.24 μg ($r = 0.9999$). The average recovery was 99.40%, and RSD was 2.67% ($n = 9$). The average content of luteolin in *Hangju*, *Gongju* and *Haoju* was 0.34, 0.41, 0.69 mg/g, and RSD was 0.8%, 1.2%, 1.3%, respectively ($n = 6$). **Conclusion** The content of luteolin in *Haoju* was the highest. The established method is delicate, simple, convenient, accurate, reproducible, and suitable for the quality control of luteolin in different kinds of *Chrysanthemum morifolium* that are often seen in market.

KEY WORDS *Chrysanthemum morifolium* Ramat; luteolin; HPLC

菊花为菊科植物菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) 的干燥头状花序, 主要产地为浙江、安徽、河南、山东、四川等, 按产地和加工方法的不同分为滁菊、毫菊、杭菊、贡菊等。《神农本草经》将其列为上品, 称“久服利气血, 轻身耐老延年”。菊花味辛、甘、苦, 性微寒, 归肺、肝二经, 甘凉益阴, 苦寒泄热; 具有疏风、清热、明目、解毒的功效, 临床用于治疗高血压和冠心病^[1]。菊花是卫生部公布的药食两用植物, 市场上有多种菊花供选择。现代药理学研究表明, 黄酮类化合物木樨草素及其苷是菊花的有效成分之一, 具有降低胆固醇、抗炎、抗病毒、抗肿瘤及扩张血管等作用^[2,3]。本实验采用 HPLC 法比较测定市场 3 种常见菊花杭菊、贡菊和毫菊中木樨草素

的含量, 为市售菊花的质量控制及优质菊花的选用提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 DL-720B 智能超声波清洗器 (上海之信仪器有限公司); Waters-2695 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 2996 型 PDA 检测器 (美国 Waters 公司); 色谱柱: Diamasil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (迪马公司)。

1.2 试剂 木樨草素对照品购自 SIGMA 公司 (含量 99.8%); 杭菊 (杭州桐乡, 批号 20071121)、贡菊 (安徽黄山, 批号 20071026) 和毫菊 (山东, 批号 20071015); (上海石梁茶叶有限公司, 55 °C 烘干过夜, 粉碎, 备用), 经上海中医药大学药学院李医明教授鉴定为菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat, 甲醇为色谱纯 (国药集团化学试剂有限公司); 水为

作者简介: 刘莉 (1973-), 女, 主管技师。Tel (021) 63356001, E-mail liul@ snda.gov.cn

通讯作者: 姚建忠. Tel (021) 81871235 E-mail yaoj@ sh163.net

超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamosil C₁₈柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (50:50) 30 min 内匀速变化到甲醇-水 (80:20), 梯度洗脱; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 350 nm; 柱温: 30 °C。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取木樨草素对照品 11.20 mg 置 100 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 备用。

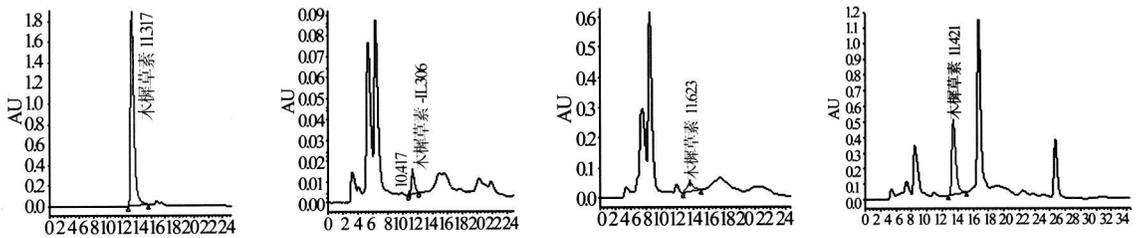


图 1 木樨草素的高效液相色谱图

A-木樨草素对照品; B-贡菊; C-杭菊; D-毫菊

2.5 线性关系考察 取对照品溶液, 精确进样 2.5 & 10 & 15 & 20 μL。以峰面积积分值 (Y) 对进样量 X (μg) 进行回归分析, 木樨草素回归方程为: $Y = 2.65 \times 10^6 X + 2.62 \times 10^6$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 木樨草素在 0.224~2.24 μg 范围线性关系良好。

2.6 精密度实验 精密吸取木樨草素对照品溶液, 分别稀释 2 倍和 10 倍, 与原对照品溶液组成高中低 3 个浓度, 各重复进样 3 次, 每次 10 μL, 同上法测定, RSD 分别为 0.41%、1.05%、1.25%, 表明本仪器精密度良好。

2.7 重复性实验 精密称取同一批号毫菊 (20071015) 样品 6 份, 按供试品溶液制备方法制得 6 份供试液, 按上述色谱条件分别测定, 木樨草素平均含量为 0.069%, RSD = 1.3% (n = 6), 结果表明本试验方法重复性良好。

2.8 稳定性实验 取同一批号的毫菊 (20071015)、杭菊 (20071121) 和贡菊 (20071026) 供试品溶液各 1 份, 室温下分别放置 0、4、8、12、24、48 h 后, 按上述色谱条件, 均进样 10 μL, 测得 3 种菊花中木樨草素平均峰面积的 RSD 分别为 2.43%、1.96% 和 1.57%, 表明供试品溶液中的木樨草素在 48 h 内稳定性较好。

2.9 加样回收率实验 精密称取已知木樨草素含量的毫菊样品 (20071015 木樨草素平均含量 0.069%) 1 g 再分别精密加入一定量的对照品, 按上述供试品溶液的配制方法处理, 制得低、中、高

2.3 供试样品溶液的制备 精确称取菊花样品粉末 1.0 g 置 50 mL 具塞三角瓶中, 加甲醇 25 mL, 超声提取 15 min, 滤过, 重复超声提取 3 次, 合并滤液, 减压回收大部分溶剂, 把母液定量转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

2.4 系统适应性试验 对照品溶液及供试样品溶液按上述色谱条件下分别进样 10 μL。结果表明, 木樨草素色谱峰与其他杂质峰达到了基线分离, 见图 1。

三种浓度的供试样品溶液, 按上述色谱条件测定其含量, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 木樨草素加样回收试验结果

样品含量 (mg)	加入量 (mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.69	0.112	0.768	95.76	99.40	2.67
	0.112	0.785	97.88		
	0.112	0.823	102.62		
0.69	0.560	1.21	96.80	99.40	2.67
	0.560	1.23	98.40		
	0.560	1.30	104.0		
0.69	1.12	1.79	98.90	99.40	2.67
	1.12	1.82	100.55		
	1.12	1.80	99.45		

2.10 含量测定 取 3 种供试品溶液 10 μL 进样, 依上述色谱条件测定其含量, 结果见表 2。

表 2 3 种菊花中木樨草素含量测定结果 (n = 6)

品种	批号	平均含量 (mg/g)	RSD (%)
杭菊	20071121	0.34	0.8
贡菊	20071026	0.41	1.2
毫菊	20071015	0.69	1.3

3 讨论

本研究采用的木樨草素含量测定方法, 与先前 (下转第 293 页)

HPLC-UV 方法,但是由于人参皂苷 R_e 较弱的紫外吸收,只能选择末端吸收作为检测波长,势必带来较大的测定误差^[9-12]。本实验结果表明,采用 HPLC-ELSD 方法测定人参茎叶总皂苷中人参皂苷 R_e 的含量,简便、准确、可靠,可用于人参茎叶总皂苷的质量控制。

参考文献:

[1] 罗兰,殷惠军,张颖,等. 人参果总皂苷对高脂饲养大鼠胰岛素敏感指数的影响 [J]. 中西医结合学报, 2005, 3(6): 463.
 [2] 李敏,凌昌全,黄雪强,等. 人参茎叶皂苷对热损伤大鼠不同脏器糖皮质激素受体的影响 [J]. 中西医结合学报, 2006, 4(2): 156.
 [3] 李勇,李敏,王喜,等. 人参茎叶皂甙增强糖皮质激素受体转录激活效应的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 710.
 [4] 李敏,凌昌全,沈志雷,等. 人参茎叶皂甙提高机体耐热受能力作用 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19(12): 1473.
 [5] 凌昌全,李敏,苏永华,等. 人参茎叶皂苷对失血性休克

大鼠糖皮质激素受体的影响 [J]. 中草药, 2003, 34(5): 433.
 [6] 凌昌全,沈志雷,黄雪强,等. 人参茎叶皂苷对热损伤大鼠糖皮质激素受体的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(8): S16-F003.
 [7] 程俊霖,朱玲,赵妍妍. 人参茎叶总皂苷对衰老小鼠的作用研究 [J]. 四川生理科学杂志, 2004, 26(3): 97.
 [8] 庞慧民,朱玉琢,明月,等. 人参茎叶总皂苷对培养的人视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2002, 28(4): 363.
 [9] 王光忠,胡迪,邹阳. RP-HPLC 测定五参芪口服液中人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_e 的含量 [J]. 中成药, 2006, 28(4): 495.
 [10] 朱照静,邓开英. 红参中人参皂苷 R_{g1} 和人参皂苷 R_e 的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(5): 10.
 [11] 李长新,亓校鹏. 高效液相色谱法测定人参茎叶总皂苷胶囊中人参皂苷 R_e 的含量 [J]. 黑龙江医药, 2005, 18(4): 244.
 [12] 朱文良,李发美. HPLC 法同时测定复方黄芪注射液中人参皂苷 R_{g1}、R_{g2} 含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(9): 577.

收稿日期: 2008-11-05

(上接第 283 页)

的 SH(从 0 增加至 1 mg/mL, 因 SH 溶液的黏度较大,未对更高浓度的 SH 进行相关实验),测定 CS 的含量,测定结果均在本方法的误差范围内。同样在已知浓度为 1 mg/mL SH 溶液中加入不同浓度的 CS(从 0 增加至 5 mg/mL),测定 SH 的含量,结果也均在本方法的误差范围内。可见,本实验条件下 SH 和 CS 浓度的不同比例对本方法无影响。

3.2 不同批次的 SH 对本方法的影响 在已知浓度为 1 mg/mL CS 溶液中,分别加入 3 个不同批次的 SH(浓度均为 1 mg/mL),分别测定 CS 的含量,测定结果均在本方法的误差范围内。这表明,本实验条件下,不同批次的 SH 对本方法无影响。

3.3 不同批次的 CS 对本方法的影响 在已知浓度为 1 mg/mL SH 溶液中,分别加入 3 个不同批次的 CS(浓度均为 1 mg/mL),分别测定 SH 的含量,测定结果均在本方法的误差范围内。这表明,本实验条件下,不同批次的 CS 对本方法无影响。

参考文献:

[1] Koshiishi I, Takenouchi M, Hasegawa T, *et al*. Enzymatic method for the simultaneous determination of hyaluronan and chondroitin sulfates using high performance liquid chromatography [J]. Anal Biochem, 1998, 265: 49.
 [2] 凌沛学. 透明质酸 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 41.

收稿日期: 2008-07-01

(上接第 290 页)

发表的方法相比^[4,5],流动相简单,可节约成本,减少污染。由于采用梯度洗脱,分离效果好,简化了样品的预处理步骤,使测定方法更加快捷简便。

3 种菊花中木犀草素含量的测定结果显示,毫菊中含量最高,如从预防癌症和心血管病的角度出发,在选择食用菊花品种时应更多考虑毫菊。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1997-2008.
 [2] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册

[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 681.

[3] Chan EC, Pannan Gpeth P, Woodman OL. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. Cardiovasc Pharmacol, 2000, 35(2): 326.
 [4] 胡碧波,蒋惠娣,杨俊,等. HPLC 法测定不同采收期杭白菊中木犀草素及其苷的含量 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2004, 33: 29.
 [5] 张洪坤,国兴明. 应用反相高效液相色谱法测定菊花中的木犀草素 [J]. 贵州大学学报(农业与生物科学版), 2002, 21: 424.

收稿日期: 2009-01-06