

HPLC 同时测定雪菊中 4 种黄酮类成分

高飞¹, 陈芳^{1,2}, 马旗联¹, 郝丽莉¹, 刘江云^{1*}, 李雅丽^{3*}, 杨世林¹

- (1. 苏州大学 医学部 药学院, 江苏 苏州 215123;
2. 无锡卫生高等职业技术学校, 江苏 无锡 214000;
3. 新疆医科大学 第一附属医院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的: 建立雪菊中 4 种主要黄酮类成分的同时含量测定方法。方法: 采用 Cosmosil-5C₁₈-AR-Ⅱ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 乙酸溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm (黄诺玛苷、异奥卡宁) 和 378 nm (马里昔、奥卡宁), 测定雪菊中黄诺玛苷、异奥卡宁、马里昔、奥卡宁的含量。结果: 4 种黄酮类成分色谱分离良好, 黄诺玛苷、异奥卡宁、马里昔、奥卡宁线性范围分别为 0.503 5 ~ 5.035 μg, 0.502 5 ~ 5.025 μg, 0.505 5 ~ 5.055 μg, 0.506 5 ~ 5.065 μg, *r* 值均 > 0.999, 加样回收率在 95.4% ~ 98.4%。结论: 该测定方法快速、准确, 可为雪菊的质量控制方法提供参考。

[关键词] 雪菊; 黄酮; 高效液相色谱; 马里昔; 黄诺玛苷; 奥卡宁; 异奥卡宁

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)20-0049-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016200049

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160829.1652.006.html>

[网络出版时间] 2016-08-29 16:52

Simultaneous Determination of Four Flavonoids Components in *Coreopsis tinctoria* by HPLC

GAO Fei¹, CHEN Fang^{1,2}, MA Qi-lian¹, HAO Li-li¹, LIU Jiang-yun^{1*}, LI Ya-li^{3*}, YANG Shi-lin¹

- (1. College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China;
2. Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214000, China;
3. The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for the simultaneous determination of four flavonoids components in flowers of *Coreopsis tinctoria*. **Method:** The chromatographic separation was performed on Cosmosil-5C₁₈-AR-Ⅱ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% acetic acid solution as the mobile phase for gradient elution, at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 280 nm (for flavanomarein, isookanin) and 378 nm (for marein, okanin) to determine the contents of flavanomarein, isookanin, marein and okanin in *Coreopsis tinctoria*. **Result:** 4 flavonoids components were well separated, with good linear relationship between 0.503 5-5.035 μg, 0.502 5-5.025 μg, 0.505 5-5.055 μg, 0.506 5-5.065 μg, *r* > 0.999, and average recovery rate was between 95.4% - 98.4%. **Conclusion:** The method is accurate and selective, which could provide reference for the quality control of *C. tinctoria*.

[Key words] *Coreopsis tinctoria*; flavonoid; HPLC; marein; flavanomarein; okanin; isookanin

[收稿日期] 20151026(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460634)

[第一作者] 高飞, 在读硕士, 从事天然药物活性成分研究, Tel: 15262405963, E-mail: 992604433@qq.com

[通讯作者] * 刘江云, 副教授, 从事天然药物活性成分研究与新药开发研究, Tel: 0512-65882079, E-mail: liujiangyun@suda.edu.cn;

* 李雅丽, 副教授, 从事非酒精性脂肪肝及代谢综合征的基础和临床研究, Tel: 0991-4363245, E-mail: lylemai@sina.cn

雪菊原产北美,现在全球均有分布。近年来,新疆和田等地区将雪菊(维吾尔语“古里恰依”)作为一种特色花茶饮用^[1-2]。现代药理研究表明,雪菊具有降血糖^[3]、降血压^[4]、降血脂^[5]、抗氧化等多种功效^[6],因具有改善代谢紊乱综合征作用,现已在新疆多地区进行规模化种植^[7]和推广应用。

现有研究表明,雪菊中的主要有效成分是黄酮及其他多酚类物质^[2,3,8-9],包括奥卡宁、马里苷等查尔酮类,异奥卡宁、黄诺玛苷等二氢黄酮类,绿原酸类等。随着对雪菊药效物质基础认识的不断深入,对该药材的质量控制方法也日渐受到重视。早期文献多采用紫外法测定雪菊中总黄酮含量,该法专属性较弱。已有文献报道采用高效液相法,以紫外单波长法测定雪菊中马里苷^[10]、黄诺玛苷^[11]、黄芩苷和绿原酸^[12]等成分含量,质量分析方法有了进一步提高,但其检测成分仅为 1~2 种,雪菊中特征性成分的代表性有待进一步完善;另一方面,考虑雪菊总黄酮中主要包括二氢黄酮(特征吸收波长 280 nm)和查耳酮(特征吸收波长 378 nm)两类,采用单波长法测定时方法专属性有所欠缺。

本课题前期工作中,研究表明雪菊总黄酮对高脂血症模型小鼠具有明确的降血脂作用^[5],马里苷和黄诺玛苷是雪菊总黄酮中的主要成分之一^[13]。为进一步分析雪菊总黄酮的药效物质基础,本文采用 HPLC 双波长法,建立雪菊中黄诺玛苷、异奥卡宁、马里苷和奥卡宁 4 种特征性主成分的同时测定方法,并采用液质联用技术定性分析其主要物质组成,为雪菊及其总黄酮的质量控制方法提供参考。

1 材料

1260 系列高效液相色谱系统(包括 1260 Infinity VL 型四元泵,1260 DAD VL 紫外检测器,1260 TCC 柱温箱,LC-Solution 色谱工作站,美国 Agilent 公司);Cosmosil 5C₁₈-AR-II ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm)。液质联用分析采用 LC-20ADXR 型高效液相色谱系统(包括 DAD 检测器,日本 Shimadzu),API 4000 Q-trap 型质谱(电喷雾质谱负离子检测,加拿大 MDS-AB SCIEX 公司);Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm)。

雪菊药材(批次 20120501)购自新疆达坂城,经苏州大学药学院陆叶博士鉴定为菊科两色金鸡菊 *Coreopsis tinctoria* 的干燥花蕾。对照品黄诺玛苷(纯度 93.2%),异奥卡宁(纯度 97.0%),马里苷(纯度 96.8%)和奥卡宁(纯度 97.1%)由本实验室自制,

并经 ESIMS,NMR,UV 数据与文献[13-14]对照鉴定,其纯度采用液相峰面积归一法计算。乙腈色谱纯,娃哈哈纯净水;乙醇、甲醇等试剂均为分析纯。MP2002 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),ME215S 型 1/10 万电子天平(德国 Starorious 公司)。

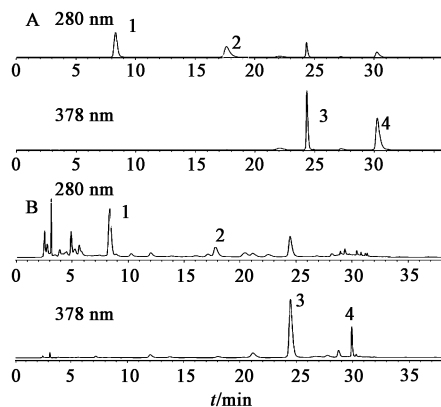
2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品黄诺玛苷 10.07 mg,异奥卡宁 10.05 mg,马里苷 10.11 mg,奥卡宁 10.13 mg,置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解定容,即得 4 种对照品储备液。分别精密吸取上述对照品储备溶液 2.5 mL,置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇至刻度,作为混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取雪菊样品粗粉约 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入 50% 乙醇 25 mL,称定质量,回流提取 60 min,放冷后用 50% 乙醇补足失重,过滤,取续滤液 5 mL,50% 乙醇定容至 25 mL 量瓶中,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性和专属性 采用 DAD 检测待测成分最大特征吸收波长,分别在 280 nm(二氢黄酮类成分)和 378 nm(查耳酮类成分,3 和 4),同时测定雪菊中 4 种黄酮成分含量。优化色谱条件,流动相乙腈(A)-0.1% 乙酸溶液(B)梯度洗脱(0~20 min,16% A,20~35 min,16%~25% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 20 μL。各成分色谱峰与相邻峰的分离度均 >1.5,理论板数按色谱峰计算不低于 5 000。色谱图见图 1。



A. 混合对照品;B. 供试品;1. 黄诺玛苷;2. 异奥卡宁;3. 马里苷;4. 奥卡宁

图 1 雪菊样品 HPLC

Fig. 1 HPLC of *Coreopsis tinctoria*

2.3.2 线性范围考察 分别精密吸取混合对照品溶液 2,4,8,12,16,20 μL,注入高效液相色谱仪,按

2.3.1 项下色谱条件测定,记录色谱图。以对照品峰面积为纵坐标(Y),对照品溶液的质量为横坐标(X),

绘制标准曲线,线性回归方程见表 1。结果表明 4 个被测成分在标准曲线范围内线性关系良好。

表 1 方法学考察

Table 1 Results of method investigations

| 成分 | 回归方程 | 线性范围/ μg | 精密度 | 稳定性 | 重复性 |
|------|--------------------------|---------------------|-----|-----|-----|
| 黄诺玛苷 | $Y = 1\,970.6X - 285.69$ | 0.503 5 ~ 5.035 | 0.7 | 0.7 | 1.0 |
| 异奥卡宁 | $Y = 1\,306.3X - 257.77$ | 0.502 5 ~ 5.025 | 0.8 | 0.5 | 0.6 |
| 马里苷 | $Y = 2\,351.5X - 507.29$ | 0.505 5 ~ 5.055 | 0.7 | 0.8 | 0.8 |
| 奥卡宁 | $Y = 2\,977.6X - 804.5$ | 0.506 5 ~ 5.065 | 0.3 | 0.1 | 0.4 |

注:r 均为 0.999 9。

2.3.3 精密密度考察 分别精密吸取混合对照溶液各 20 μL ,重复进样 6 次,以峰面积指标计算 RSD,考察方法的精密密度。结果表明仪器的精密密度良好,见表 1。

2.3.4 稳定性考察 取同一供试品溶液,分别在 0,4,8,12,18,24 h 进样分析,测定 4 种成分峰面积并计算 RSD,考察方法的稳定性。结果表明供试品在 24 h 内稳定性良好,见表 1。

2.3.5 重复性考察 按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,在 2.3.1 项色谱条件下,同时测定 4 种目标成分的含量并计算 RSD,考察方法的重复性。结果测得该样品中黄诺玛苷、异奥卡宁、马里苷、奥卡宁 4 种成分质量分数分别为 61.69,21.34,112.4,16.51 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 计算结果表明本法重复性良好,见表 1。

2.3.6 加样回收率试验 取同一批雪菊提取物样品(批号 20120501)各 6 份,每份约 0.20 g,精密称定,各供试品中分别精密加入新配制的混合对照品溶液 2 mL(其中对照品黄诺玛苷、异奥卡宁、马里苷、奥卡宁质量浓度分别为 6.231,2.028,11.03,1.626 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定各成分含量,计算回收率。测得黄诺玛苷、异奥卡宁、马里苷和奥卡宁平均回收率分别为 97.0%,95.6%,98.3%,95.4%,结果表明本方法加样回收率良好,见表 2。

2.4 样品测定 按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件进行测定,根据 2.3.2 项下建立的标准曲线计算 4 个成分的含量。测得雪菊样品中各成分质量分数依次为黄诺玛苷 61.69 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,异奥卡宁 21.34 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,马里苷 112.4 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,奥卡宁 16.51 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.5 液质联用分析 取雪菊药材,采用 75% 乙醇回流提取,提取液再经 AB-8 大孔吸附树脂柱精制、75% 乙醇洗脱获得雪菊总黄酮样品^[13]。采用液质

表 2 雪菊中 4 种成分的加样回收率试验

Table 2 Results of recovery rate test of *Coreopsis tinctoria*

| 成分 | 样品中量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD /% |
|------|-------------|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
| 黄诺玛苷 | 12.35 | 12.46 | 24.32 | 96.07 | 95.4 | 0.7 |
| | 12.46 | 12.46 | 24.39 | 95.75 | | |
| | 12.14 | 12.46 | 24.01 | 95.26 | | |
| | 12.36 | 12.46 | 24.26 | 95.51 | | |
| | 12.31 | 12.46 | 24.04 | 94.14 | | |
| 异奥卡宁 | 4.251 | 4.056 | 8.279 | 99.31 | 98.4 | 0.9 |
| | 4.317 | 4.056 | 8.358 | 99.63 | | |
| | 4.318 | 4.056 | 8.265 | 97.31 | | |
| | 4.239 | 4.056 | 8.194 | 97.51 | | |
| | 4.218 | 4.056 | 8.198 | 98.13 | | |
| 马里苷 | 4.259 | 4.056 | 8.254 | 98.50 | 96.7 | 1.5 |
| | 22.86 | 22.06 | 44.01 | 95.87 | | |
| | 22.45 | 22.06 | 44.17 | 98.46 | | |
| | 22.29 | 22.06 | 43.41 | 95.74 | | |
| | 22.27 | 22.06 | 43.15 | 94.65 | | |
| 奥卡宁 | 22.61 | 22.06 | 44.13 | 97.55 | 97.8 | 0.7 |
| | 22.43 | 22.06 | 44.04 | 97.96 | | |
| | 3.342 | 3.252 | 6.556 | 98.83 | | |
| | 3.315 | 3.252 | 6.482 | 97.39 | | |
| | 3.222 | 3.252 | 6.366 | 96.68 | | |
| | 3.311 | 3.252 | 6.494 | 97.88 | | |
| | 3.331 | 3.252 | 6.518 | 98.00 | | |
| | 3.292 | 3.252 | 6.487 | 98.25 | | |

联用分析其中的主要色谱峰,色谱条件:流动相乙腈-0.1% 乙酸溶液(20:80),流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,供试品进样量 20 μL ;电喷雾质谱负离子检测,扫描范围 m/z 100 ~ 800,子离子扫描采用 EMS-EPI 模式,电喷雾离子源碰撞电压 -40 eV,碰撞电压差 15 eV。根据获得的各色谱峰相对分子量、碎片离子信息,经与对照品和文献[3,8-9,15]比较,确定其中主要成分结构,见图 2,表 3。

3 讨论

3.1 分析方法和指标成分的选择 现有研究表明,

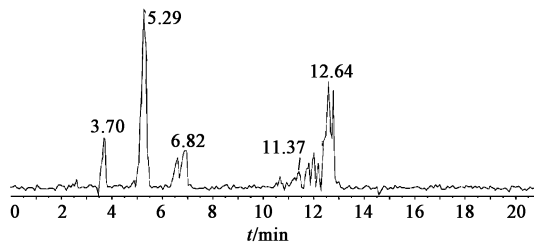


图 2 雪菊总黄酮 HPLC/(-)ESI-MS 总离子流
Fig. 2 HPLC/(-)ESI-MS of total flavonoid of *Coreopsis tinctoria*

雪菊中的主要降血糖、降高血压有效成分是黄酮及

表 3 雪菊总黄酮 HPLC/(-)ESI-MS 分析

Table 3 Results of HPLC/(-)ESI-MS profile of total flavonoid of *Coreopsis tinctoria*

| 峰号 | t_R /min | 成分 | UV_{max} /nm | $[M - H]^-$ | MS/MS |
|----|------------|-----------------------------|----------------|-------------|-------------|
| 1 | 3.70 | 3,4',5,6,7-五羟基二氢黄酮-O-六碳苷 | 285 | 465 | 303,285,125 |
| 2 | 5.29 | 黄诺玛苷 | 283 | 449 | 431,287,135 |
| 3 | 6.58 | flavanokanin | 289 | 433 | 151,271,135 |
| 4 | 6.82 | quercetagitin-7-O-glucoside | 357 | 479 | 317,233 |
| 5 | 11.98 | 异奥卡宁 | 285 | 287 | 151,135 |
| 6 | 12.06 | 3',5,5',7-四羟基二氢黄酮-7-O-葡萄糖苷 | 285 | 449 | 287 |
| 7 | 12.64 | 马里苷 | 380 | 449 | 431 |
| 8 | 12.88 | 奥卡宁 | 380 | 287 | 151,135 |

现,超声提取法提取的黄诺玛苷含量远低于加热回流提取;指标成分黄诺玛苷和马里苷的提取效率显著受到溶剂影响,二者分别在 30% 乙醇,75% 乙醇提取时含量较高,其优选提取溶剂不一致^[16]。经综合考虑,选用 50% 乙醇加热回流提取方法,并对供试品的提取溶剂比例、料液比、提取时间等因素进行考察,最终确定了优化的供试品制备方法。方法学考察结果表明,该方法灵敏度高、结果准确、简便快捷。

[参考文献]

[1] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 93-94.
[2] 姜保平, 许利嘉, 贾晓光, 等. 两色金鸡菊的化学成分和药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 567-572.
[3] Dias T, Bronze M R, Houghton P J, et al. The flavonoid rich fraction of *Coreopsis tinctoria* promotes glucose tolerance regain and pancreatic function recovery in streptozotocin-induced glucose-intolerant rats [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 132(10): 483-490.
[4] Yang Q, Sun Y, Zhang L, et al. Antihypertensive effects of extract from flower buds of *Coreopsis tinctoria* on spontaneously hypertensive rats [J]. Chin Herbal Med, 2014, 6(2): 103-109.
[5] Li Y, Chen X, Xue J, et al. Flavonoids from *Coreopsis tinctoria* adjust lipid metabolism in hyperlipidemia animals by down-regulating adipose differentiation-related protein [J]. Lip Health Dis, 2014, 13(1): 193-201.
[6] Guo L, Zhang W, Li S, et al. Chemical and

其他多酚类成分^[3,8-9]。本课题前期研究证明,雪菊总黄酮中的主要成分马里苷、黄诺玛苷^[5,13]及其相应苷元异奥卡宁、奥卡宁 4 种主要活性成分。本文采用专属性的双波长法,建立了雪菊中这 4 种成分的同时测定方法,见图 1;同时结合液质联用分析技术,进一步对雪菊总黄酮中的 8 种黄酮类物质进行定性分析,见图 2,表 3。该研究方法和结果可为该药材及相关产品的质量控制在提供参

3.2 供试品的制备方法 本课题研究过程中发

nutraceutical properties of *Coreopsis tinctoria* [J]. J Funct Foods, 2015, 13(4): 11-20.
[7] 袁辉, 赵建勇, 杨文菊, 等. 新疆不同产地雪菊 UPLC 指纹图谱的建立及其成分测定[J]. 中草药, 2015, 46(8): 1223-1226.
[8] Zhang Y, Shi S P, Zhao M B, et al. A novel chalcone from *Coreopsis tinctoria* Nutt. [J]. Biochem Syst Ecol, 2006, 34(10): 766-769.
[9] Li N, Meng D, Pan Y, et al. Anti-neuroinflammatory and NQO1 inducing activity of natural phytochemicals from *Coreopsis tinctoria* [J]. J Funct Foods, 2015, 17: 837-846.
[10] 张兰兰, 孙玉华, 哈木拉提, 等. HPLC 测定金鸡菊中金鸡菊查尔酮含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(7): 48-49.
[11] 张瑞, 李新霞, 毛新民, 等. HPLC 法测定两色金鸡菊提取物中 Flavanomarein 和 Marein 的含量[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(6): 73-74.
[12] 张彦丽, 王艳, 李新霞, 等. 高效液相色谱法测定昆仑雪菊中绿原酸和黄芩苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 107-109.
[13] 邱佳俊, 高飞, 李雅丽, 等. 雪菊总黄酮抗氧化活性研究[J]. 中国现代中药, 2015, 17(5): 435-437.
[14] 赵军, 孙玉华, 徐芳, 等. 昆仑雪菊黄酮类成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(1): 50-52.
[15] 刘金俊. 两色金鸡菊头状花序的化学成分和药材质量研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2015.
[16] 陈芳. 雪菊总黄酮提取工艺研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2014.

[责任编辑 顾雪竹]