

# 野菊花的 UPLC 指纹图谱研究

陈宁, 韩永成, 刘伟\*, 崔永霞, 吴明侠, 王丽果, 黄丽杰  
(河南中医学院分析测试中心, 郑州 450008)

**[摘要]** 目的: 建立不同产地野菊花药材的超高效液相特征性指纹图谱, 为全面有效控制和科学评价野菊花药材整体质量提供科学依据。方法: 采用 Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 0.4 mL·min<sup>-1</sup> 梯度洗脱, 进样量 1.0 μL, 检测波长 326 nm, 柱温 25 °C。结果: 在 12 min 内得到野菊花药材的指纹图谱, 对其中 5 个色谱峰进行了初步归属, 并对 15 批药材样品进行了分析, 其相似度为 0.871 ~ 0.985。结论: 相对于 HPLC 指纹图谱, UPLC 指纹图谱方法具有更好分离效率、更高灵敏度, 并大大缩短了分析时间, 可用于野菊花药材的质量控制。

**[关键词]** 野菊花; 超高效液相色谱; 不同产地; 指纹图谱; 质量控制

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0083-03

**[doi]** 10.11653/syfy2014030083

## UPLC Fingerprint of *Chrysanthemum indicum*

CHEN Ning, HAN Yong-cheng, LIU Wei\*, CUI Yong-xia, WU Ming-xia, WANG Li-guo, HUANG Li-jie  
(Center of Analysis and Measurement, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an UPLC method of determining the characteristic chromatographic profile of *Chrysanthemum indicum* for controlling the drug quality quickly and accurately. **Method:** The analysis was performed on an Agilent C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid as mobile phase in gradient elution mode. The flow rate was 0.4 mL·min<sup>-1</sup> and the injection volume was 1.0 μL with the detection wavelength of 326 nm. The column temperature was set at 25 °C. **Result:** The fingerprint of *C. indicum* was obtained within 12 min, and five peaks in the fingerprint were designed. 15 samples were analyzed, and the similarities were 0.871-0.985. **Conclusion:** The UPLC system enjoys the merits of a higher speed, sensitivity, and resolution, compared with the HPLC system. It can be used to control the quality of *Chrysanthemum indicum*.

**[Key words]** *Chrysanthemum indicum*; UPLC; fingerprint; quality control

野菊花为菊科植物野菊的干燥头状花序<sup>[1]</sup>, 秋、冬两季花初开放时采摘, 晒干或蒸后晒干。其味苦、性微寒, 归肝、心经, 具有清热解毒、泻火平肝之功效<sup>[2]</sup>, 主治疗疮痈肿、目赤肿痛、头痛眩晕。现代临床则广泛用于治疗痈肿疮毒、湿疹、宫颈炎、前列

腺炎、肛窦炎、高血压等<sup>[3]</sup>, 主要活性成分有黄酮类、萜类、挥发油及其他类成分。2010 年版《中国药典》野菊花含量测定项下仅测定了野菊中蒙花苷的含量, 不能对野菊花的质量进行全面准确地评价。

通过 HPLC 方法建立药材的指纹图谱, 并将相似度分析技术应用于药材的指纹图谱已有文献报道<sup>[4-8]</sup>, 但采用 UPLC<sup>[9-11]</sup> 建立野菊花药材的指纹图谱分析方法还未见相关报道。

### 1 材料

Agilent 1290 型 UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平公司), KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), HH-S 型水浴锅(巩义市英

**[收稿日期]** 20130708(018)

**[基金项目]** 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2010A360016)

**[第一作者]** 陈宁, 研究生, 从事现代仪器分析方法应用, Tel: 15903607407, E-mail: chenning0257@163.com

**[通讯作者]** \* 刘伟, 教授, 从事中药质量标准 and 仪器分析方法的研究, Tel: 0371-65575838, E-mail: hnliuwei2088@sina.com

峪予华仪器厂), DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海医用恒温设备厂)。

绿原酸对照品(批号 110753-200212), 蒙花苷对照品(批号 111520-200201), 均购自中国药品生物制品检定所, 3,4-二咖啡酰奎尼酸对照品(批号 MUST-09061602), 3,5-二咖啡酰奎尼酸对照品(批号 MUST-09061601), 4,5-二咖啡酰奎尼酸对照品(批号 MUST-09061603)均购自成都曼思特生物科技有限公司, 乙腈(色谱纯, Tedia), 水为娃哈哈纯净水, 甲醇、磷酸等试剂均为分析纯。

实验所需野菊花药材, 经河南中医学院董诚明教授鉴定为菊科植物野菊花 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序, 见表 1。

表 1 野菊花药材来源

No.	产地	No.	产地	No.	产地
1	安徽亳州	6	广东佛山	11	广西柳州
2	安徽黄山	7	浙江金华	12	河北唐山
3	浙江杭州	8	河南灵宝	13	陕西汉中
4	江苏无锡	9	河南漯河	14	湖南新东
5	江苏南京	10	河南焦作	15	山东日照

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX RH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流动相 0.1% 磷酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 2 min, 13% B; 2 ~ 3 min, 13% ~ 17% B; 3 ~ 6 min, 17% B; 6 ~ 8.5 min, 17% ~ 32% B; 8.5 ~ 12 min, 32% ~ 80% B; 12 ~ 14 min, 80% ~ 13% B), 流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 326 nm, 柱温 25 °C, 进样量 1.0 μL。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 供试品溶液的制备** 取不同产地野菊花粉末(过 60 目筛)约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 的甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理(25 °C, 24 kHz) 30 min, 放冷至室温, 再称定, 加 70% 甲醇补足质量, 摇匀, 滤过, 滤液用 0.22 μm 微孔滤膜过, 作为供试品溶液。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 取绿原酸、3,4-二咖啡酰奎尼酸、3,5-二咖啡酰奎尼酸、4,5-二咖啡酰奎尼酸和蒙花苷 5 种对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加 70% 的甲醇配制成质量浓度分别为 40.00, 130.00, 44.70, 39.00, 80.00 mg·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 即得, 冷藏备用。

### 2.3 色谱条件的选择

**2.3.1 检测波长的选择** 绿原酸、蒙花苷为野菊花

中 2 种主要的活性成分, 其化学性质和 UV 光谱均存在差异, 因此将其作为质控指标成分代表性较强。根据 UV 光谱的特征吸收, 对野菊花供试品溶液进行光谱纯化并提取不同波长下的色谱图进行比对, 结果 326 nm 下可得到基线较平稳的色谱图, 考虑其他各成分的检测灵敏度, 因此选择 326 nm 为检测波长。

**2.3.2 流动相的选择** 在其他条件相同的情况下, 对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水溶液 3 种流动相梯度洗脱进行了考察。结果表明, 在同等条件下, 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相, 得到的色谱峰不仅分离度好、基线平稳, 而且峰数目也较多, 因此采用乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相, 见图 1。

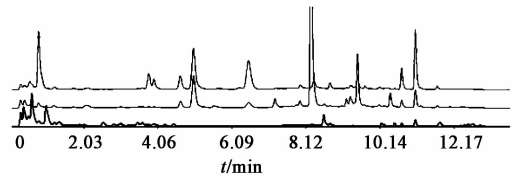


图 1 3 种流动相色谱图比较

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 专属性考察** 分别对单个对照品溶液、混合对照品溶液以及野菊花药材供试品溶液进样, 并采集 3D 光谱图。根据对照品各峰对供试品溶液色谱峰进行归属并计算理论塔板数、分离度, 同时查看峰纯度。结果表明, 各供试品色谱中对照品色谱峰理论塔板数均 > 5 000, 分离度均 > 1.5, 峰纯度均 > 99%, 符合指纹图谱测定要求。

**2.4.2 精密度试验** 精密吸取同一混合对照品溶液 1.0 μL, 按照 2.1 项下色谱条件进样, 连续进样 6 次, 记录色谱指纹图谱, 测得其各共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值的 RSD 0.58%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.3 重复性试验** 取同一供试品 6 份, 按照 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 测得其各共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值 RSD 0.86%, 符合指纹图谱要求。

**2.4.4 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 在相同的条件下分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 测定, 结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积积分值 RSD 1.12%, 符合指纹图谱要求, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

**2.5 样品测定** 取 15 批野菊花药材样品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件依次进样测定, 记录色谱图, 共确定 20 个共有峰(除去溶剂峰), 通过对比保留时间的方法, 指认其中 5 个共有峰, 分别为绿原酸(2 号峰)、3,4-二咖啡酰奎尼酸(6

号峰)、3,5-二咖啡酰奎尼酸(7号峰)、4,5-二咖啡酰奎尼酸(9号峰),蒙花苷(12号峰),见图2,3。

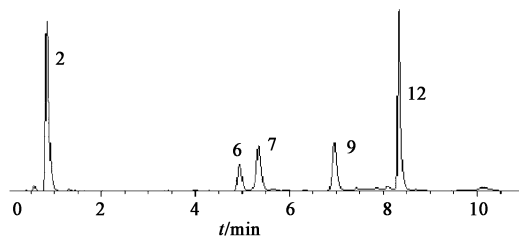


图2 混合对照品色谱图

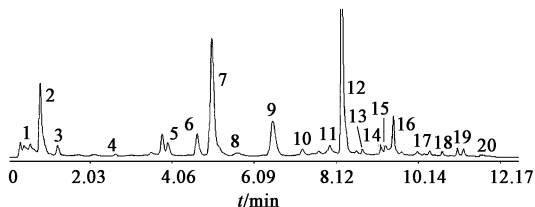


图3 野菊花药材指纹图谱

## 2.6 特征指纹图谱的建立

**2.6.1 参比峰的选择** 在各批次样品指纹图谱中,4,5-二咖啡酰奎尼酸分离度良好,峰位居中,峰面积较大,并且所有样品共有,所以确定4,5-二咖啡酰奎尼酸(9号峰)为参照峰。

**2.6.2 特征指纹图谱的建立、相似度评价** 将所得的15批野菊花药材 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 版 A》软件,以 S1 批药材图谱作为参照谱进行指纹匹配,确定了20个共有峰(去除溶剂峰),建立了野菊花药材特征指纹图谱的共有模式,并进行了相似度计算,15批野菊花药材的相似度见表2。

表2 15批野菊花药材的相似度

No.	相似度	No.	相似度	No.	相似度
1	0.907	6	0.983	11	0.971
2	0.928	7	0.968	12	0.985
3	0.984	8	0.907	13	0.949
4	0.900	9	0.974	14	0.879
5	0.918	10	0.871	15	0.931

15批野菊花药材的 UPLC 指纹图谱,见图6。

## 3 讨论

以不同体积分数的甲醇(50%甲醇、70%甲醇、75%甲醇、95%甲醇、100%甲醇)作为提取溶剂进行考察,结果发现采用70%甲醇和50%甲醇所提取的样品溶液色谱法相差不大,但是50%甲醇提取的样

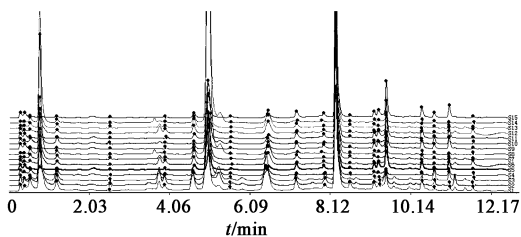


图6 15批野菊花药材 UPLC 指纹图谱

品溶液分离度不好,因此确定采用70%甲醇作为提取溶剂。

考察了超声和水浴回流两种提取方法,结果回流提取和超声提取所得色谱峰相差不大。因此采用简单简便的超声作为提取方法。对超声时间、超声功率、溶剂用量进行考察,发现超声功率对色谱峰影响不大,而超声时间为30 min和溶剂用量为50 mL时,色谱峰最多,色谱图最具特征性,因此选择用50 mL的70%甲醇超声提取30 min作为样品的提取方法。

## [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:295.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:801.
- [3] 戴敏,刘青云,刘道中,等. 菊花解热、降压作用的物质基础研究[J]. 中药材,2001,24(7):505.
- [4] 敬应春,郭美兰,蔡国琴,等. 野菊花反相高效液相色谱指纹图谱的建立及品质评价[J]. 国际药学研究杂志,2012,39(3):246.
- [5] 周新,陈会明,白桦,等. HPLC与UPLC色谱条件转换方法研究[J]. 分析实验室,2008,27(4):56.
- [6] 林丽美,李春,刘塔斯,等. 野菊花药材 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):120.
- [7] 张明,蒋三元,张健民,等. 几种常用中草药及制剂的薄层鉴别方法探讨[J]. 中国医药导报,2006,3(11):155.
- [8] 刘伟,杨艳玲,刘乃强,等. 柴胡口服液 HPLC 指纹图谱及柴胡皂苷 b<sub>2</sub> 的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):134.
- [9] 范旭航,王振中,李清,等. 牡丹皮药材 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):715.
- [10] 张琦,王振中,萧伟,等. 白芍药材 UPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):712.
- [11] 崔思娇,罗洁,马天成,等. 酸枣仁的超高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药学杂志,2013,48(7):509.

[责任编辑 顾雪竹]