

# 黄山贡菊高效液相色谱指纹图谱的建立

查芳芳<sup>1</sup>, 高学玲<sup>1,\*</sup>, 邹敏亮<sup>2</sup>, 何常明<sup>2</sup>, 贺曼曼<sup>1</sup>

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 健士星生物技术研发(上海)有限公司, 上海 200335)

**摘要:**目的: 研究黄山贡菊高效液相色谱指纹图谱的建立方法, 为其质量控制和科学评价提供依据。方法: 采用高效液相色谱法测定 28 种不同来源的菊花样品, 用药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 进行评价, 建立共有模式。结果: 建立了黄山贡菊的指纹图谱, 确定了 12 个共有峰, 各贡菊样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均在 0.96 以上, 与其他菊花品种的相似度均小于 0.86。结论: 此方法简便、准确、重复性好, 可用于黄山贡菊药材质量控制与评价。

**关键词:** 黄山贡菊; 高效液相色谱法(HPLC); 指纹图谱; 相似度

## HPLC Fingerprinting of Huangshan Gongju Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)

ZHA Fang-fang<sup>1</sup>, GAO Xue-ling<sup>1,\*</sup>, ZOU Min-liang<sup>2</sup>, HE Chang-ming<sup>2</sup>, HE Man-man<sup>1</sup>

(1. College of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. Healthy-Star Biotech R&D Co. Ltd., Shanghai 200335, China)

**Abstract:** Objective: To establish the HPLC fingerprint of Huangshan Gongju chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) for its quality control and evaluation. Method: A total of 28 chrysanthemum samples of different geographical origins were determined by HPLC and evaluated using the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprints of Traditional Chinese Medicine to construct a common pattern. Results: Twelve common peaks were identified in the established fingerprints, each of which shared a similarity exceeding 0.96 with the control fingerprint and a similarity below 0.86 with other chrysanthemum varieties. Conclusion: The proposed method is simple, accurate, repeatable and suitable for quality control and evaluation of Huangshan Gongju chrysanthemum.

**Key words:** Huangshan Gongju chrysanthemum; high performance liquid chromatography (HPLC); chromatographic fingerprint; similarity

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)20-0146-05

黄山贡菊亦称“徽州贡菊”, 产自著名的旅游胜地黄山地区, 与杭菊、亳菊、滁菊共同收载于 2010 年版《中国药典》<sup>[1]</sup>。贡菊为多年生草本菊科植物菊(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)的头状花序, 具有疏风清热、平肝明目、清热解毒之功效, 用于风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花、疮痍肿毒等症<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 黄山贡菊主要活性成分包括酚酸、黄酮及其苷类、挥发油等<sup>[2-4]</sup>, 具有抗菌、抗氧化、降低血压和调节血脂含量等多方面药理作用<sup>[5-7]</sup>。黄山贡菊既有观赏价值, 又有饮用和药用功能, 是药食

兼用之佳品。

目前, 关于黄山贡菊药材的质量控制大部分还停留在药材性状鉴别和冲泡时风味口感等感官鉴别上, 仅有部分文献对菊花其他品种高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)指纹图谱进行研究<sup>[8-10]</sup>, 尚未见关于黄山贡菊中主要成分酚酸及黄酮类化合物的鉴别及指纹图谱研究的报道。本研究应用高效液相色谱法对不同种植地、采摘批次的黄山贡菊及其他品种菊花的主要功效成分酚酸及黄酮类化合物进行指纹图谱研究, 以期对贡菊的质量控制建立有效方法, 并为药材

收稿日期: 2011-01-18

基金项目: 国家星火计划项目(2010GA710027)

作者简介: 查芳芳(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物源食品质量与安全。E-mail: zhafangfang0921@hotmail.com

\* 通信作者: 高学玲(1967—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为食品饮料加工。E-mail: shling@ahau.edu.cn

鉴别和规范种植提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

本实验所用黄山贡菊(GJ-4)均采自黄山贡菊各种地,其他菊花购于各主产地药材公司,所有菊花样品均由复旦大学药学院何常明博士鉴定。

木犀草苷、绿原酸、1,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照品(纯度 98%) 成都曼思特生物科技有限公司;甲酸(色谱纯) 美国 Tedia 公司;乙腈(色谱纯) 德国 Merck 公司;超纯水;其余试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

1200 高效液相色谱系统(配有四元泵、在线真空脱气系统、自动进样器、柱温箱、VWD 检测器、Chem Station 工作站) 美国 Agilent 公司;RUC-5200 型超声波清洗机 上海睿祺公司;TL-5.0W 台式离心机 上海市离心机械研究所有限公司。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 色 谱 条 件

色谱柱:Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl(4.6mm × 250mm, 5 μm);流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, B 为 0.1% 甲酸-乙腈溶液,梯度洗脱程序见表 1;流速 1.0mL/min,检测波长 327nm,柱温 30 °C,进样量 5 μL。以木犀草苷的色谱峰计算理论塔板数不低于 7 万。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution program for HPLC fingerprinting of Huangshan Gongju chrysanthemum

时间/min	0.00	15.00	30.00	40.00	50.00	60.00	60.01	70.00
流动相 A 相	92	83	82	80	60	50	92	92
流动相 B 相	8	17	18	20	40	50	8	8

表 2 黄山贡菊 HPLC 指纹图谱相对保留时间

Table 2 Relative retention time of main peaks in the HPLC fingerprint of Huangshan Gongju chrysanthemum

样品号	峰号											
	1	2	3(S)	4	5	6	7	8	9	10	11	12
GJ-1	0.446	0.482	1.000	1.019	1.194	1.253	1.303	1.327	1.467	1.533	1.996	2.217
GJ-2	0.446	0.482	1.000	1.019	1.196	1.255	1.305	1.330	1.470	1.535	1.994	2.214
GJ-3	0.446	0.482	1.000	1.019	1.196	1.255	1.306	1.330	1.471	1.536	1.995	2.215
GJ-4	0.445	0.481	1.000	1.020	1.197	1.256	1.307	1.331	1.472	1.538	1.995	2.212
GJ-5	0.446	0.481	1.000	1.019	1.195	1.254	1.305	1.329	1.470	1.536	1.997	2.216
GJ-6	0.446	0.482	1.000	1.019	1.197	1.255	1.306	1.329	1.470	1.536	1.994	2.214
GJ-7	0.446	0.482	1.000	1.019	1.197	1.256	1.307	1.330	1.471	1.536	1.995	2.215
GJ-8	0.446	0.481	1.000	1.019	1.196	1.255	1.305	1.329	1.470	1.535	1.995	2.214
GJ-9	0.444	0.480	1.000	1.019	1.197	1.255	1.306	1.331	1.471	1.537	1.991	2.208
GJ-10	0.446	0.481	1.000	1.019	1.196	1.255	1.305	1.330	1.471	1.537	1.993	2.212
GJ-11	0.446	0.482	1.000	1.019	1.197	1.255	1.306	1.330	1.472	1.538	1.994	2.211
GJ-12	0.446	0.482	1.000	1.019	1.195	1.254	1.305	1.329	1.469	1.535	1.997	2.219
GJ-13	0.446	0.482	1.000	1.019	1.197	1.256	1.307	1.331	1.473	1.539	1.997	2.214
平均值	0.446	0.482	1.000	1.019	1.196	1.255	1.306	1.330	1.471	1.536	1.995	2.214
相对标准偏差/%	0.130	0.128	0.001	0.013	0.073	0.067	0.072	0.072	0.101	0.101	0.080	0.125

#### 1.3.2 对 照 品 溶 液 制 备

精确称取木犀草苷对照品适量,置 10mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制得含 0.04g/L 木犀草苷溶液,0.45 μm 微孔滤膜过滤,备用。

#### 1.3.3 供 试 品 溶 液 的 制 备

精密称取菊花粉碎样 1g(过 24 目筛),先用 20mL 75% 乙醇浸泡 30min,再放入 50 °C 超声提取器超声提取 30min,用滤纸进行抽滤,滤液用 75% 乙醇定容至 100mL 容量瓶中,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液贮存备用。

#### 1.3.4 样 品 测 定

按 1.3.3 节条件制备 28 种不同来源菊花供试品溶液,按 1.3.1 节色谱条件进行测定,记录色谱图。

## 2 结 果 与 分 析

### 2.1 精 密 度 实 验

取黄山贡菊样品(GJ-4)供试液,按 1.3.1 节色谱条件连续进样 6 次,相似度结果均在 0.99 以上,各色谱峰峰面积的 RSD 值小于 1.2%。

### 2.2 稳 定 性 实 验

取黄山贡菊样品(GJ-4)供试液,分别在 0、2、4、8、12、24h 按 1.3.1 节色谱条件进样检测,各主要色谱峰保留时间的相对标准偏差为 0.014%~0.140%,峰面积的相对标准偏差为 0.205%~3.543%。结果表明,黄山贡菊供试液在室温条件 24h 内稳定。

### 2.3 重 复 性 实 验

精密称取同一贡菊样品(GJ-4)6 份,按 1.3.3 节方法制备供试液,按 1.3.1 节色谱条件进样分析,记录色谱图,计算出相似度均在 0.99 以上,各主要色谱峰保留时间和峰面积的相对标准偏差均小于 2.0%,表明重复

表3 黄山贡菊 HPLC 指纹图谱峰面积  
Table 3 Relative areas of main peaks in the HPLC fingerprint of *C. morifolium* Ramat.

样品号	峰号												
	1	2	3(s)	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
GJ-1	323.4	40.1	193.6	77.7	46.0	464.1	922.5	53.6	196.6	412.1	76.2	84.5	
GJ-2	339.7	63.7	273.1	70.3	53.0	414.8	923.0	74.5	382.6	592.0	162.4	110.1	
GJ-3	229.9	42.8	197.5	59.8	37.7	313.3	788.6	53.6	366.0	421.6	166.7	98.0	
GJ-4	410.9	85.8	473.4	96.2	92.4	442.6	1276.3	135.8	311.8	817.5	118.8	269.7	
GJ-5	432.1	54.3	284.2	83.6	74.3	499.7	1109.6	74.2	250.5	692.3	82.7	112.3	
GJ-6	371.9	45.6	210.0	99.0	114.3	558.1	1341.5	46.2	228.9	672.9	87.6	159.9	
GJ-7	496.1	63.2	242.3	134.1	63.0	606.1	1437.4	46.5	239.8	613.5	79.8	110.8	
贡菊	GJ-8	422.4	66.9	196.8	96.6	45.0	411.6	1006.2	37.5	284.7	546.3	109.4	77.0
GJ-9	431.9	69.7	340.1	85.2	87.1	414.4	1018.8	106.9	300.7	707.4	121.2	136.9	
GJ-10	324.5	67.9	239.2	52.3	29.3	356.2	816.4	86.0	395.6	467.5	223.2	99.2	
GJ-11	371.1	65.5	216.4	56.2	31.3	326.6	744.3	78.0	359.6	428.7	223.1	70.8	
GJ-12	377.5	93.0	253.4	62.5	65.8	316.0	953.0	78.9	298.9	599.1	117.3	135.0	
GJ-13	343.9	89.7	298.2	88.0	68.5	328.5	931.2	97.8	379.9	729.0	171.6	95.1	
平均值	375.0	65.2	263.0	81.7	62.1	419.4	1020.7	74.6	307.4	592.3	133.8	119.9	
相对标准偏差/%	17.1	25.0	28.2	26.4	39.3	21.5	20.2	36.0	20.5	21.2	36.8	41.2	
JH-14	465.6	0.0	71.8	80.7	135.8	552.3	2625.1	254.3	88.3	389.8	631.5	0.0	
JH-15	396.5	0.0	56.7	0.0	0.0	258.5	1072.1	226.9	124.6	71.0	866.2	0.0	
JH-16	353.9	0.0	72.3	57.1	129.3	345.1	1429.3	383.9	98.0	296.1	794.9	0.0	
JH-17	379.8	0.0	71.4	63.8	164.2	306.3	1410.3	463.7	102.3	388.7	938.3	0.0	
JH-18	605.2	0.0	278.8	199.9	0.0	441.7	1195.2	384.5	557.3	115.1	826.1	0.0	
JH-19	372.8	76.4	272.6	59.0	0.0	376.4	824.3	71.0	490.2	580.1	206.6	62.6	
其他品种	JH-20	526.1	114.4	150.2	58.2	0.0	262.0	1449.5	221.8	500.6	582.3	928.0	0.0
JH-21	467.7	0.0	129.1	51.3	0.0	0.0	1028.7	0.0	0.0	237.8	0.0	0.0	
JH-22	402.8	58.8	264.3	250.5	94.5	295.3	1034.5	404.8	275.0	787.4	556.5	0.0	
JH-23	427.6	0.0	215.3	197.3	81.2	356.6	1069.6	272.8	211.0	722.1	366.1	0.0	
JH-24	555.0	85.2	428.7	365.8	167.9	334.3	1194.7	734.3	416.9	1040.0	919.0	0.0	
JH-25	445.3	0.0	0.0	0.0	0.0	919.4	1181.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
JH-26	406.7	0.0	0.0	0.0	0.0	768.8	3093.4	0.0	0.0	0.0	428.1	0.0	
JH-27	363.0	0.0	0.0	0.0	98.0	359.7	1448.5	0.0	0.0	427.6	0.0	0.0	
JH-28	488.5	0.0	0.0	260.4	0.0	847.3	2371.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

性良好,符合指纹图谱要求。

#### 2.4 黄山贡菊 HPLC 指纹图谱中的特征峰

根据 13 个不同来源贡菊的 HPLC 指纹图谱的检测结果,确定 12 个共有色谱峰,共有峰面积占总峰面积比例的 90% 以上;除对照峰 3 为木犀草苷外,峰 1、6、7 经与对照品比较,分别鉴定为绿原酸、1,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸。以峰 3(木犀草苷)为内参比峰,结果显示黄山贡菊样品指纹图谱中共有峰相对保留时间为 0.446~2.214min,相对保留时间的相对标准偏差为 0.001%~0.130%(表 2),表明所有贡菊花样品出峰时间一致,色谱条件稳定、可靠;峰面积的 RSD 值为 17.1%~41.2%(表 3)。通过对照品比较及紫外吸收特征,将 12 个共有峰分为 2 类,为酚酸类(包括峰 1、2、5、6、7、10、12);为黄酮类(包括峰 3、4、8、9、11)。

#### 2.5 各菊花样品的指纹图谱相似度评价

从各产地采集的菊花样品,采用药典委员会编写的

“中药色谱指纹图谱相似度系统 2004A”软件,生成贡菊药材共有模式的对照指纹图谱(图 1),相似度评价结果见表 4,各菊花样品叠加指纹图谱见图 2,菊花及金银花样品指纹图谱见图 3。根据相似度结果,不同种植地、不同采收时间的黄山贡菊被正确区分出来,相似度在 0.96~1.00 之间,而与其他品种菊花样品的相似度均小于 0.86。

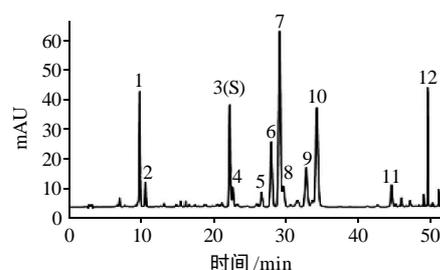


图1 黄山贡菊 HPLC 对照指纹图谱  
Fig.1 Control HPLC chromatogram of 13 Huangshan Gongju chrysanthemum

表4 与共有模式比较的各样品相似度评价

Table 4 Similarity evaluation of 28 Huangshan Gongju chrysanthemum samples with the common pattern

序号	样品	采摘地点	采样时间	相似度	序号	样品	采摘地点	采样时间	相似度
GJ-1	贡菊	歙县金竹岭	08年11月	0.971	JH-15	七月菊	黄山市歙县	10年11月	0.750
GJ-2	贡菊	歙县金竹岭	10年11月	0.984	JH-16	七月菊	黄山市黟县	09年11月	0.765
GJ-3	贡菊	歙县金竹岭	10年11月	0.972	JH-17	七月菊	黄山市休宁县	09年11月	0.719
GJ-4	贡菊	歙县金竹岭	10年11月	1.000	JH-18	金香菊	黄山市休宁县	09年11月	0.829
GJ-5	贡菊	黄山区太平	09年11月	0.988	JH-19	黄菊	黄山市歙县	10年11月	0.732
GJ-6	贡菊	黄山区太平地区	10年11月中旬	0.975	JH-20	万寿菊	黄山市歙县	10年11月	0.722
GJ-7	贡菊	黄山区太平地区	10年11月下旬	0.963	JH-21	野菊花	黄山市歙县	09年11月	0.776
GJ-8	贡菊	黄山区太平地区	10年12月上旬	0.977	JH-22	杭白菊	浙江桐乡市	09年11月	0.681
GJ-9	贡菊	黄山市上丰乡	09年11月	0.993	JH-23	杭黄菊	浙江杭州	09年11月	0.765
GJ-10	贡菊	黄山市上丰乡	10年11月	0.968	JH-24	杭白菊胎菊	浙江桐乡市	09年11月	0.610
GJ-11	贡菊	黄山市上丰乡	10年11月	0.961	JH-25	怀菊	河南	09年11月	0.808
GJ-12	贡菊	黄山市石门乡	09年11月	0.992	JH-26	祁菊	河北	09年11月	0.842
GJ-13	金贡菊	黄山市石门乡	09年11月	0.984	JH-27	滁菊	滁州市	09年11月	0.848
JH-14	七月菊	黄山区太平	09年11月	0.840	JH-28	毫菊	亳州市	09年11月	0.857

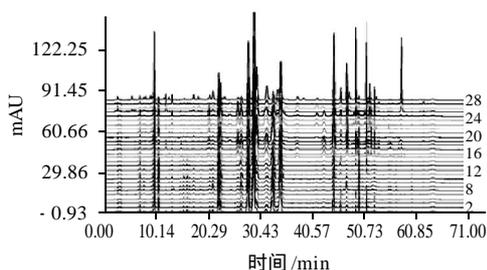


图2 菊花样品指纹图谱

Fig.2 Overlapped HPLC fingerprint chromatograms of 28 Huangshan Gongju chrysanthemum samples

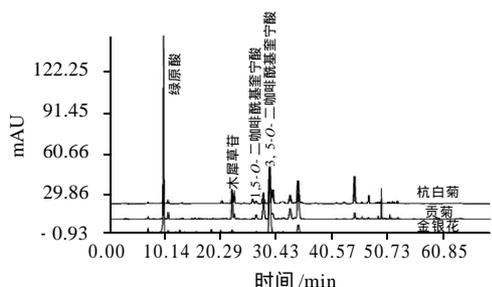


图3 菊花及金银花样品指纹图谱

Fig.3 HPLC fingerprint chromatograms of Huangshan Gongju chrysanthemum and *Lonicera japonica* flower

### 3 讨论

本实验对黄山贡菊进行了HPLC指纹图谱研究,结果表明,不同来源的贡菊化学成分既有相关性,又有所区别。所有贡菊样品共有峰一致,表明所含化学成分相近,主要为酚酸和黄酮类成分;但受种植地、采摘时间等因素的影响,各色谱峰的峰面积相差很大(相对标准偏差为17.1%~41.2%),即表明不同成分相对含量有明显差异。GJ-6、GJ-7、GJ-8是为同一种地不

同时间采集的3批贡菊样品,其中11月中旬和12月上旬采收的贡菊内成分含量远低于11月下旬的含量,表明11月下旬采收的贡菊质量最佳。JH-14~JH-17为七月菊,又称早贡菊,可以看到七月菊与贡菊在内成分含量上有很大的区别,七月菊木犀草苷(峰3)的含量很低,但是峰11的含量却是贡菊中峰11含量的6~8倍,且七月菊中不含有峰12。在表3中金香菊、黄菊、万寿菊、野菊花与贡菊在内成分含量和数量上区别也有很大的,尤其是野菊花,检测发现其内成分数量比贡菊的减少了一半,而杭白菊的内成分却比贡菊丰富得多(图2、3)。表4相似度结果进一步证明:黄山贡菊质量较为稳定、均一,相似度大于0.96,与其他品种的菊花差异显著,相似度均小于0.86。因此,可通过HPLC指纹图谱的方法有效保证黄山贡菊药材的质量稳定。

本实验研究发现,峰9在贡菊和杭白菊色谱图中出峰清晰,峰面积可观,但在毫菊、滁菊,祁菊、怀菊和野菊花中均未检测到,是贡菊和杭白菊的特有成分;峰10在贡菊、杭白菊、滁菊及野菊花色谱图中出峰明显,但在毫菊、祁菊、怀菊中含量很低或不含,是贡菊、杭白菊及滁菊的特有成分;1,5-O-二咖啡酰基奎宁酸(峰6)在所有样品中出峰稳定、峰面积显著,是菊花的特征性成分。

2010年版《中国药典》中菊花以绿原酸、木犀草苷和3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸为主要指标成分,其中规定木犀草苷(峰3)的含量不得少于0.080%。从表3可知,毫菊、滁菊、怀菊和祁菊中木犀草苷峰面积非常低,有的甚至不含有。因此,以木犀草苷作为菊花的指标性成分进行质量控制是否合适还值得商榷。

2010年版《中国药典》中金银花以绿原酸和木犀草苷作为指标成分,但金银花中3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸

的含量非常高<sup>[11-12]</sup>。从图3可知,如果把3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸作为菊花的指标成分,可能会导致菊花和金银花药材的滥用、混用;而1,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸在所有菊花样品中均含有,是菊花的特有成分,因此,可考虑将1,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(峰6)增加作为菊花品种的指标性成分进行质量控制。

#### 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: 192.
- [2] 刘金旗, 沈其权, 刘劲松, 等. 贡菊化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(8): 547-548.
- [5] 秦民坚, 龚建国, 顾瑶华, 等. 黄山贡菊的挥发油成分[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 54-56.
- [4] 陈国平, 王靖宇. 黄山贡菊中绿原酸含量的测定[J]. 光谱仪器与分析, 2006(增刊1): 176-178.
- [5] 陈国平, 王澍. 黄山贡菊提取物对羟自由基清除作用[J]. 化工时刊, 2005, 19(5): 14-17.
- [6] 潘正军, 王新风, 周雪瑞. 黄山贡菊水煎剂对实验性高血压小鼠血压和血脂含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(3): 669-670.
- [7] 张鞍灵, 马琼, 高锦明, 等. 绿原酸及其类似物与生物活性[J]. 中草药, 2001, 32(2): 173-176.
- [8] 蒋惠娣, 胡碧波, 曾苏. 杭白菊 HPLC 指纹图谱的评价[J]. 中国药学杂志, 2005, 4(8): 578-581.
- [9] 赵玉丛, 刘国际, 任保增, 等. 菊花的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2005, 10(10): 1552-1555.
- [10] 程宏英, 冯启余, 曹玉华, 等. 菊花中活性成分的高效液相色谱测定与指纹图谱研究[J]. 分析科学学报, 2007, 23(3): 257-262.
- [11] 张宇平, 黄可龙. 高效液相色谱法同时测定金银花中5种有机酸[J]. 分析实验室, 2007, 26(7): 67-70.
- [12] 库尔班江, 苏文琴, 张鹏威. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定金银花中绿原酸和木犀草苷的含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1441-1442.