

# 基于中国药典方法的中药菊花多成分含量测定

柴瑞平<sup>1</sup> 沈国滨<sup>1</sup> 施磊<sup>2</sup> 郑喆<sup>1</sup> 冉良骥<sup>1</sup> 金燕<sup>1</sup>

<sup>1</sup>赛默飞世尔科技（中国）有限公司，色谱质谱事业部，北京/上海

<sup>2</sup>赛默飞世尔（上海）仪器有限公司，中国创新中心，上海

**关键词：** Vanquish™ Access液相色谱仪，菊花饮片，2020版中国药典，含量测定，VWD波长扫描，方法转换，eWorkflow，中药

## 应用优势

- Vanquish Access 液相色谱系统在 QC 实验室执行中国药典方法用于中药分析稳健可靠，满足检测要求。
- Chromeleon 7.3.2 色谱数据管理系统支持方法转换、e-Workflow 智能工作流程和其他实用功能，可向制药企业标准检验提供全面合规的智能解决方案。

## 应用目标

展示 Vanquish Access 液相色谱系统如何根据 2020 年中国药典对菊花样品进行多成分含量测定，以及 Chromeleon 提供哪些软件功能可以在质量控制实验室中实现高效、可靠的分析。

## 引言

菊花，我国传统中药之一，收录于 2020 版中国药典<sup>[1]</sup>，其药用部位为菊科植物的干燥头状花序，也是卫生部首批批准的药食同源的药材之一，在药用与保健中功效明显，产品开发价值很高。该中药主产于浙江、安徽、河南等地，于每年 9-11 月花盛开时分批采收，阴干或焙干，或熏、蒸后晒干后用。药材按产地和加工方法不同，分为“亳菊”、“滁菊”、“贡菊”、“杭菊”等。

菊花中化学成分多样，主要有黄酮类、挥发油、苯丙素类、萜类、氨基酸等，其中黄酮和苯丙素类化合物为最主要的药效成分<sup>[2]</sup>，在药典中选以绿原酸（ $C_{16}H_{18}O_9$ ）、木犀草苷（ $C_{21}H_{20}O_{11}$ ）、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸（ $C_{25}H_{24}O_{12}$ ）含量测定为菊花的质量评价指标。



图 1 中药菊花样品

选择一台高效、智能、稳定的高性价比液相色谱仪对药企与监管单位来讲至关重要，Vanquish 系列液相色谱历经数年的考验，充分满足制药行业方法开发、方法转移、标准研发与执行方方面面的检测需求。Vanquish Access 液相色谱产品，将更专注执行 QC 检验检测，在 Vanquish 系列产品多项专利的基础上，持续提升用户实验室使用体验。本文以药典品种菊花为例，首先复现其 2020 版中国药典（以下简称药典）含测方法，用于实际样品的质量评价；此外，还积极探索了 Vanquish Access 液相色谱仪与变色龙 Chromeleon 7.3.2 软件在中药分析中方法转换、VWD 不停泵光谱扫描、光谱库自建与辅助定性、eWorkflow 智能电子工作流的应用，可行性高，为药物分析工作者提供了更多实用的智能工具。

## 实验内容

### 化学品

化学品与耗材	货号PN
GenPure Pro UV-TOC 纯水仪, Thermo Scientific, 供应超纯水, 18.2 MΩ·cm	50131948
乙腈, HPLC 级, Fisher Chemical	A998-4
异丙醇, HPLC 级, Merck	1.01040.4008
甲醇, HPLC 级, Fisher Chemical	A452-4
磷酸, 85%, HPLC 级, Fisher Chemical	A260-500
绿原酸对照品, CAS 327-97-9, 采购于同田生物	E-0075
木犀草苷对照品, CAS 5373-11-5, 采购于同田生物	E-0354
3,5-O- 二咖啡酰基奎宁酸对照品, CAS 2450-53-5, 采购于同田生物	E-0449
菊花对照药材, 采购于中国食品药品检定研究院, 记作: 样品 1	121384-201805
菊花药材, 采购于北京市某药店, 记作: 样品 2	N/A
SureSTART™ 系列样品瓶套装, Thermo Scientific	6AK592W
微孔滤膜, 0.22μm, 天津津腾	JTSF0306

### 仪器

仪器	货号PN
Vanquish™ Access 液相色谱系统包括: <ul style="list-style-type: none"><li>• 四元泵 Quaternary Pump AN</li><li>• 自动进样器 Autosampler AT</li><li>• 柱温箱 Column Compartment A</li><li>• 可变波长紫外检测器 Variable Wavelength Detector A</li><li>• 流通池 Standard Flow cell, stainless steel, 11 μL</li></ul>	VA-S22-A-01
分析天平, Mettler Toledo	AB204-S
超声清洗机, 上海安谱	2000TH

### 样品制备

对照品溶液的制备(同药典): 取绿原酸对照品、木犀草苷对照品、3,5-O- 二咖啡酰基奎宁酸对照品适量, 精密称定, 置棕色量瓶中, 加 70 % 甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 35 μg, 木犀草苷 25 μg, 3,5-O- 二咖啡酰基奎宁酸 80 μg 的混合溶液, 即得(10 °C 以下保存)。

系列浓度对照品溶液的制备: 取绿原酸对照品、木犀草苷对照品、3,5-O- 二咖啡酰基奎宁酸对照品母液适量, 使用 70 % 甲醇稀释成系列浓度(5-250 μg/mL)后, 混匀待测。

供试品溶液的制备(同药典): 取饮片粉末(过一号筛)约 0.25 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70 % 甲醇 25 mL, 密塞, 称定重量, 超声处理(功率 300 W, 频率 45 kHz) 40 分钟, 放冷, 再称定重量, 用 70 % 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

### 色谱条件

表 1 列出了测定菊花样品多成分含量的两种不同色谱方法。首先, 2020 ChP 方法源自药典, 未经任何修改。其次, 考虑到 ChP 2020 第四章中 0512 高效液相色谱(HPLC)的规定, 采用加速方法。该方法是使用 Thermo Scientific™ Chromeleon 软件中的加速工具功能获得的, 该功能允许当色谱柱尺寸发生变化时, 可以快速、轻松地进行方法转换。

表 1 色谱条件

	2020 药典方法	加速方法
色谱柱	Thermo Scientific Acclaim C18 色谱柱, 5 $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 250 mm (PN: 059149)	Thermo Scientific Accucore C18 色谱柱, 2.6 $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm (PN: 17126-154630)
流动相	A: 乙腈, B: 0.1 % 磷酸 - 水	A: 乙腈, B: 0.1 % 磷酸水
梯度设置	0 - 11 min 90 - 82% B, 11 - 30 min 82 - 80% B, 30 - 40 min 80% B	0 - 3.43 min 90 - 82% B, 3.43 - 9.36 min 82 - 80% B, 9.36 - 12.48 min 80% B
运行时长	50 min ( 预平衡 10 min)	17.48 min ( 预平衡 5 min)
流速	1.0 mL/min	1.923 mL/min
柱温	25 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$
样品室温度	12 $^{\circ}\text{C}$	12 $^{\circ}\text{C}$
洗针液	10% 异丙醇 - 水	10% 异丙醇 - 水
进样量	5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
检测器参数	波长: 348 nm	波长: 348 nm
	响应时间: 1 s	响应时间: 1 s
	采集频率: 5 Hz	采集频率: 5 Hz
系统压力	最大 114 bar	最大 396 bar

## 色谱数据管理系统

Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.3.2 色谱数据管理系统 (Chromatography Data System ,CDS) 用于数据采集与分析。

## 结果与讨论

### 1. 基于药典方法的色谱峰指认与验证

图 2 展示了在 Vanquish Access HPLC 系统上分析的混合对照溶液和中药菊花样品的典型色谱图。色谱图显示, 3 个目标色谱峰响应适中, 分辨率均达到基线分离, 3,5-O- 二咖啡酰基奎宁酸理论塔板数为 23,742, 远大于 2020 版药典中要求的 8,000。上述结果表明 Vanquish Access HPLC、Acclaim C18 色谱柱及色谱条件适合菊花多成分含量测定。

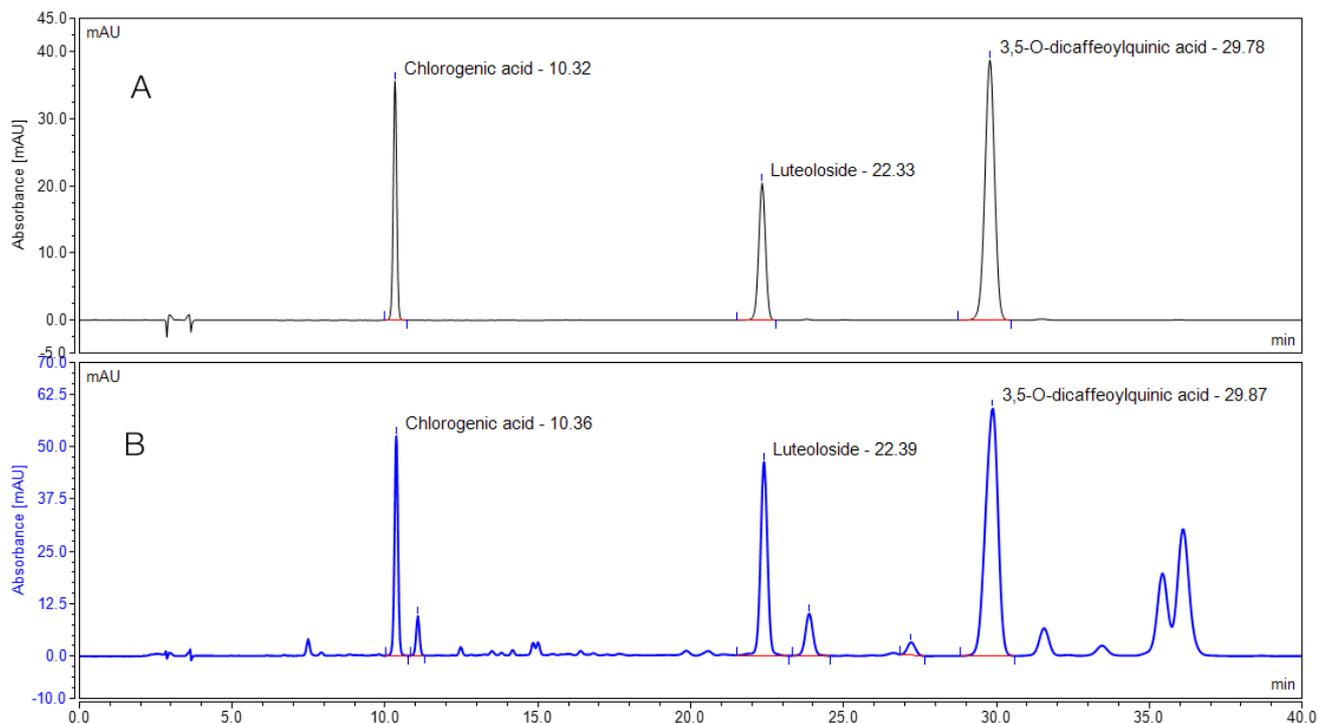


图 2 348 nm 波长下基于药典方法采集的典型色谱图

## 2. 线性与灵敏度

精密配制对照品溶液适量,用水/甲醇 30/70 (v/v) 稀释,得绿原酸、木犀草苷、3, 5-O-二咖啡酰基奎宁酸系列混合对照品溶液 (5; 10; 25; 100; 150; 250  $\mu\text{g/mL}$ )。各组分的峰面积采用表 1 中的 2020 版药典方法测定。此处,浓度 (X) 记录为  $[\mu\text{g/mL}]$ ,峰面积 (Y) 记录为  $[\text{mAU}\cdot\text{min}]$ ,以创建线性方程,线性方程和灵敏度结果如表 2 所示。

表 2 基于药典方法的 3 种目标成分的线性与灵敏度结果

组分名称	线性范围 $\mu\text{g/mL}$	线性方程	相关系数	LOD ( $S/N \geq 3$ ) $\mu\text{g/mL}$	LOQ ( $S/N \geq 10$ ) $\mu\text{g/mL}$
绿原酸	5 - 250	$Y = 0.1366 \cdot X - 0.1220$	0.99998	0.04	0.07
木犀草苷	5 - 250	$Y = 0.23 \cdot X - 0.5154$	0.99938	0.05	0.09
3, 5-O-二咖啡酰基奎宁酸	5 - 250	$Y = 0.1883 \cdot X - 0.1952$	0.99996	0.05	0.16

## 3. 方法重复性

取混合对照品溶液 1 份,菊花样品溶液 1 份,按药典 HPLC 色谱条件在 Vanquish Access 色谱仪中分别连续进样 6 次,记录色谱图,计算 3 个指标成分的峰面积和保留时间的 RSD 值,作重复性考察,结果见表 3。

表 3 药典方法的重复性考察

	混合对照溶液(n=6)		菊花样品(n=6)	
	保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %	保留时间 RSD, %	峰面积 RSD, %
绿原酸	0.02	0.14	0.03	0.05
木犀草苷	0.03	0.08	0.04	0.15
3, 5-O-二咖啡酰基奎宁酸	0.02	0.07	0.04	0.03

## 4. 菊花样品的多成分含量测定结果

根据上述色谱条件,无论是 2020 年药典要求的混合对照品溶液单点测定还是线性方程,菊花样品中 3 种目标成分的含量均未发现显著差异,结果如表 4 所示。

表 4 菊花样品的多成分含量测定结果

	2020 版药典要求	含量测定结果
绿原酸	不少于 0.20%	0.53-0.58%
木犀草苷	不少于 0.08%	0.16-0.38%
3, 5-O-二咖啡酰基奎宁酸	不少于 0.70%	1.62-2.05%

## 5. 基于药典要求的其他实用功能测试

### 5.1 响应 2020 版中国药典“光谱辅助定性”要求:可变波长检测器 (VWD) 光谱扫描 (流速保持) 和自建光谱库

当实验中使用可变波长检测器时,分析工作者可能无法直接对无对照品指认的色谱峰进行快速指认,主要受限于 VWD 无法直接获得与二极管阵列检测器 DAD 一样的 3D 光谱图,以便任意时间点任意色谱峰的光谱提取。Vanquish Access HPLC 系统的 VWD 检测器提供两个单波长通道用于监测,但也可以扫描特定保留时间的波长范围。在 VWD 检测器的仪器方法设置界面,可以设定针对某一色谱峰的起始时间点(建议:色谱峰起点至峰顶点间任一时间点),然后在设定的波段范围内以一定的扫描速度(可选 High Resolution /Slow /Standard /Fast /Maximum 等)实现快速扫描,常用流动相流速为 1.0mL/min 时,建议选择扫描速度为 Standard 或 Fast,扫描结束后光谱图(图 3)将直接保存于结果中,同样可以与光谱库中已知标准品的光谱图进行比对,并给出判断结果。该功能可用于未知色谱峰指认、异常峰形的色谱峰排查、UV 波长快速优化等,满足 2020 版中国药典光谱辅助表征的应用需求。。

扫描菊花样品中 29.70 分钟处的色谱峰,并将光谱与库中的参考光谱进行比较,可见匹配因子为 993,这基本证实样品中的峰是 3, 5-O-二咖啡酰基奎宁酸(图 4)。

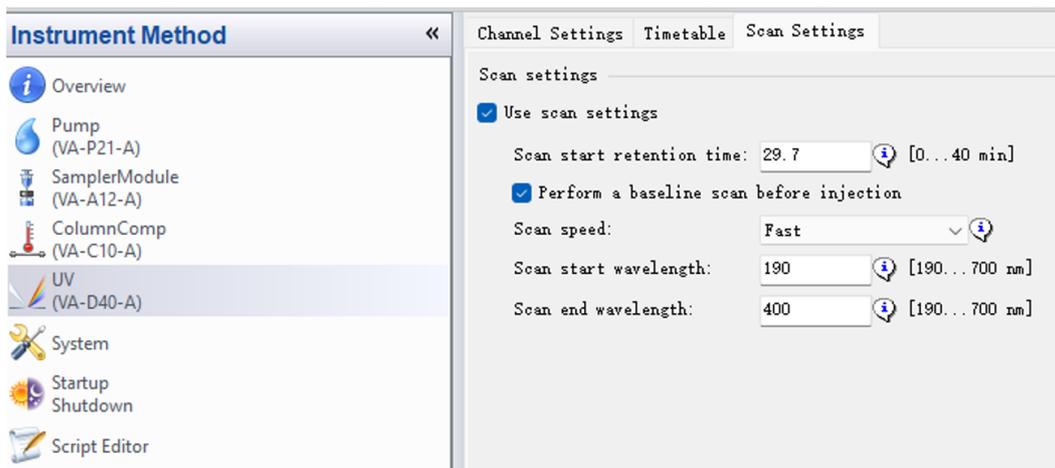


图3 Vanquish Access VWD 执行光谱扫描参数设置  
(以扫描菊花样品中 29.70min 的色谱峰为例)

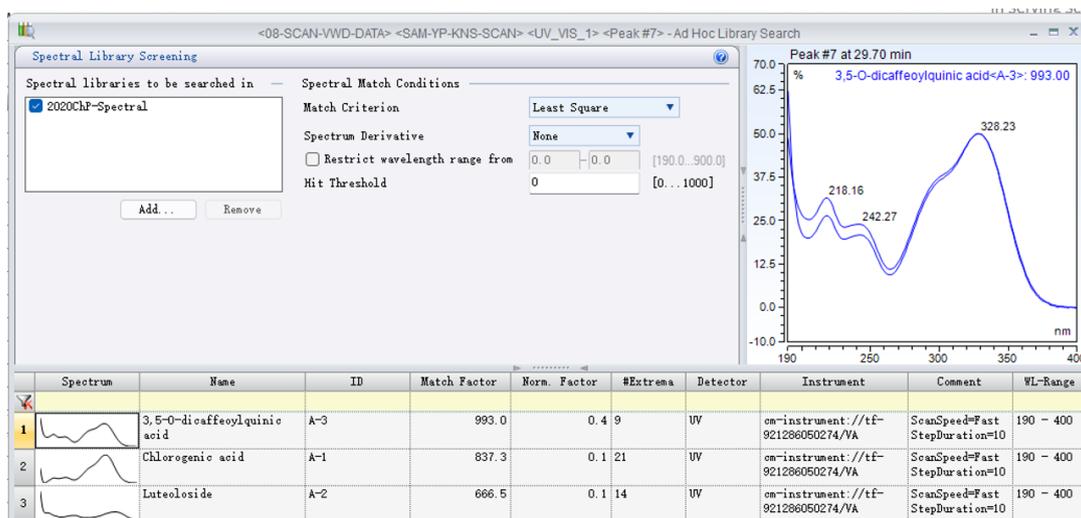


图4 通过样品色谱峰在线扫描结果与光谱库对照品光谱比对, 进行 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸色谱峰指认

## 5.2 基于中国药典 0512 通则要求的方法转换

根据 2020 版中国药典四部通则中 0512 高效液相色谱法的规定, 对于某一特定品种, 固定相类型、流动相组分和检测器不得改变。另一方面可以适当调整柱内径和长度、固定相粒径、流动相流速、流动相组分比例、柱温、进样量、检测器灵敏度等(表 5)。

Chromeleon 软件中的标配的方法加速计算器可以根据色谱柱尺寸和粒径自动转换色谱条件。原始方法中使用的色谱柱规格为 250 x 4.6 mm, 粒径 5 μm, 其作为允许变更的一部分, 色谱柱更换规格为 150 x 4.6 mm, 粒径 2.6 μm(表 1)。更换色谱柱后, 需要调整流速和进样量。转换后, 两种方法的结果比较如表 6 所示。每次进样可以实现更短的运行时间、更低的溶剂消耗和更少的样品消耗, 使得转换后的加速方法能够满足现代制药公司提高效率和环境友好的要求。

表 5 与中国药典规定的色谱方法转换要求对比

参数变量	ChP 0512 (2020)	基于 Chromeleon Speed-Up 功能的方法转换结果
固定相	填料材质, 表面修饰及键合相均保持一致; 从全多孔填料到表面多孔填料改变是允许的	填料材质, 表面修饰及键合相均保持一致, 从全多孔填料改为表面多孔填料改变
填料粒径 (dp)	改变色谱柱粒径和柱长后, L/dp 值在原有数值的 -25%~+50% 范围内。	改变后 L/dp 值为原数值的 +15%
流速 (F)	$F_2 = F_1 \times [(dc_2^2 \times dp_1)/(dc_1^2 \times dp_2)]$ 梯度洗脱按上述公式调整。	1.923 mL/min (工具自动计算)
进样体积 (V <sub>inj</sub> )	$V_{inj2} = V_{inj1} \times [(L_2 \times dc_2^2)/(L_1 \times dc_1^2)]$ 并根据灵敏度的需求进行调整。	3 μL (工具自动计算)

注释 .L1= 原方法中色谱柱柱长; L2= 调整后色谱柱柱长; dp1= 原方法中色谱柱粒径; dp2= 调整后色谱柱粒径; F1= 原方法中流速; F2= 调整后方法流速; dc1= 原方法中色谱柱内径; dc2= 调整后色谱柱内径; V<sub>inj1</sub>= 原方法中进样体积; V<sub>inj2</sub>= 调整后进样体积

表 6 2020 版药典方法与转换后的加速方法结果比较

	2020 版药典方法	加速方法
运行时间 / 针	50 min	17.48 min (减少 65%)
流动相用量 / 针	50.00 mL	33.61 mL (减少 33%)
样品消耗量 / 针	5 $\mu$ L	3 $\mu$ L (减少 40%)
样品重复性	保留时间 RSD: < 0.05%; 峰面积 RSD: < 0.13%	保留时间 RSD: < 0.10%; 峰面积 RSD: < 0.70%

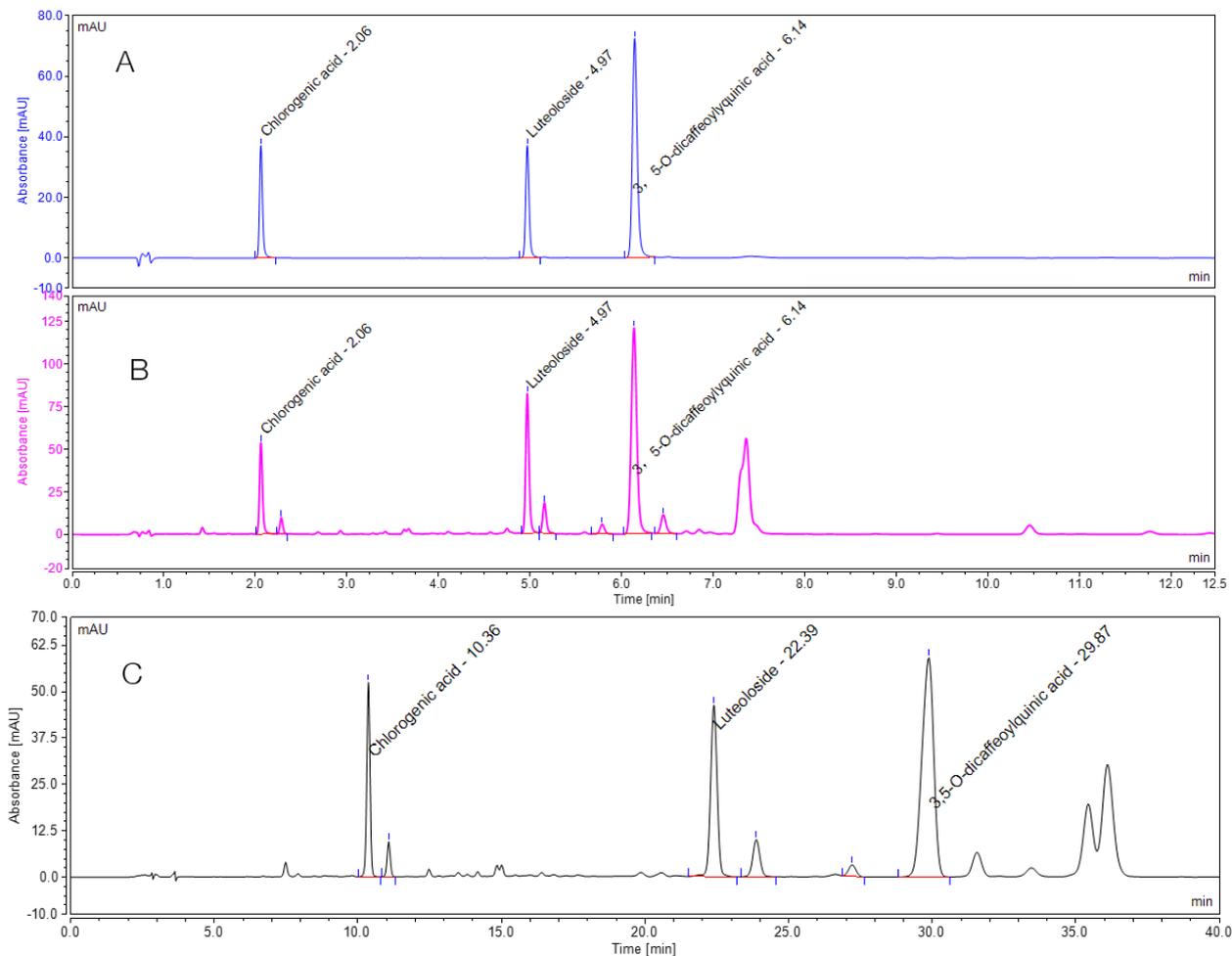


图 5 加速方法和药典方法的典型色谱图对比

(A: 混合对照品溶液, B: 加速方法测试的菊花样品溶液, C: 药典方法测试的菊花样品溶液)

### 5.3 智能执行药典质控方法的电子工作流程: eWorkflow 的应用

Chromeleon CDS 具有使用电子工作流程的技术优势, 这些工作流程包含特定项目的与仪器、处理和报告方法相关的预定义序列设计。此外, 还包括相关文档, 例如应用报告和色谱柱使用维护手册等 (图 6)。

Chromeleon 中的电子签名功能符合 GxP 条件, 因此易于在受监管的环境中实施。通过使用电子工作流程, 可以最大限度地减少手动工作和用户错误的风险。质控实验室工作人员可以实现一键方法导入, 快速进行日常检验工作, 直至报告自动生成。

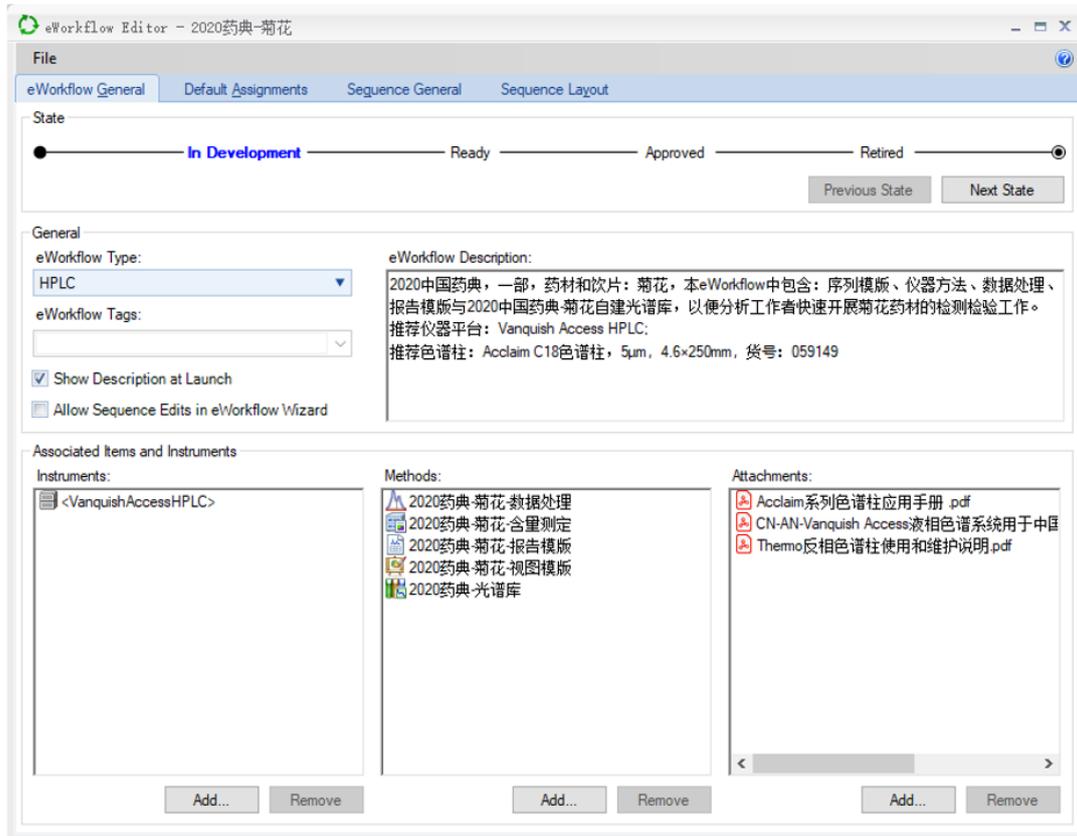


图 6 基于药典方法的菊花多成分含量测定的eWorkflow内容展示

## 结论

中药质量评价是中药临床使用和探索中药科学内涵的重要依据，其中，中国药典是最重要的参考之一。在实际工作中，中药QC分析通常需要对多个批次的样品进行分析，并且往往打算使用基于药典方法的最简单的工作流程。本次实验中使用中药菊花作为示例样品，首先，我们在不改变2020版中国药典方法的情况下，展示了Vanquish Access液相色谱仪稳定可靠的性能。其次，在该平台上对符合药典要求的方法转换、VWD谱图扫描、自建光谱库和辅助表征、电子工作流程等功能进行了测试和验证。

目前，中医药现代化进程仍然是我国中医药科学发展的必经之路，中药质量标准需要不断地修订与提高，基于HPLC技术的多成分含量测定和指纹图谱技术已在2020年药典中得到广泛应用，将进一步扩大2025年药典品种的覆盖范围和影响力。通过提供更高效率、完全合规的应用解决方案，Vanquish Access HPLC系统可以支持您完成更多更复杂的中药实际样品分析。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会.中国药典（一部），2020，323.  
[2] 张伟,丁杨飞,陈慧芳,等.菊花道地性成因及研究进展[J].安徽中医药大学学报, 2023, 42(1):98-104.



赛默飞  
官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
www.thermofisher.com

thermo scientific