

# Determination and Analysis of Main Active Components in Several Tea Chrysanthemum Cultivars after Being Introduced in Plateau Environment

Yan Wang, Xiaofei Guo, Qiaohuan Ba, Lipeng Zhou, Lijun Xu\*

Lhasa Institute of Plateau Biology, Lhasa Tibet  
Email: 958869013@qq.com, \*kaixu11@qq.com

Received: Aug. 1<sup>st</sup>, 2018; accepted: Aug. 9<sup>th</sup>, 2018; published: Aug. 16<sup>th</sup>, 2018

## Abstract

**Objective:** HPLC was used to determine the contents of chlorogenic acid, luteoloside, quercetin and total flavonoids in tea chrysanthemum flower extract under plateau area after the introduction. **Methods:** Using Agilent SB C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), taking acetonitrile A-0.5% aqueous formic acid B as the mobile phase, the column temperature is 25 degrees Celsius, the flow rate is 0.8 mL/min, sample volume is 5 μL, and the detection wavelength is 348 nm. **Results:** Under the plateau area, the main active components of tea chrysanthemum flower increased significantly after introduction, and the contents of main active components in different tea chrysanthemum flower lines are different ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** The main active ingredients in one variety in different areas of chrysanthemum flower are different, and the main active ingredients in different varieties of chrysanthemum flower are different.

## Keywords

HPLC, Plateau Area, Tea Chrysanthemum Flower, Main Active Substance, Content

# 几种茶用菊花在高原环境下引种后主要活性成分含量测定及分析

汪艳, 郭晓飞, 把桥环, 周利鹏, 徐立军\*

拉萨市高原生物研究所, 西藏 拉萨  
Email: 958869013@qq.com, \*kaixu11@qq.com

\*通讯作者。

**文章引用:** 汪艳, 郭晓飞, 把桥环, 周利鹏, 徐立军. 几种茶用菊花在高原环境下引种后主要活性成分含量测定及分析[J]. 农业科学, 2018, 8(8): 911-917. DOI: 10.12677/hjas.2018.88134

收稿日期: 2018年8月1日; 录用日期: 2018年8月9日; 发布日期: 2018年8月16日

## 摘要

目的: 利用HPLC测定茶用菊花品种高原环境下引种后提取物中绿原酸、木犀草苷、槲皮素的含量, 测定菊花总黄酮含量。方法: 采用Agilent SB C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈A-0.5%甲酸水溶液B为流动相, 柱温为25℃, 流速为0.8 mL/min, 进样量为5 μL, 检测波长为348 nm。结果: 高原环境下引种后, 茶用菊花主要活性成分含量均有显著增加( $p < 0.05$ ), 不同茶用菊花品系主要活性成分含量存在差异。结论: 同一菊花品种不同产区主要活性成分含量存在差异, 不同品种菊花主要活性成分含量各异。

## 关键词

HPLC, 高原环境, 茶用菊花, 主要活性物, 含量

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

菊花作为一种常见的药食两用花卉包含多种维生素、微量元素和次生代谢产物等而具有一定的药效或功效, 近年越来越受到人们的青睐。菊花主要活性成分为黄酮类和酚类化合物, 由于菊花品种、产地、甚至采摘期不同, 菊花中的主要活性成分的种类和含量都有差异[1] [2] [3]。

目前在菊花质量评价中所选用的指标各不相同, 有的选用总黄酮和总挥发油[4] [5] [6], 有的定量测定菊花中黄酮或酚酸类成分[5]-[10], 有的借助指纹图谱反映菊花质量的差异[11]。根据有关报道, 目前西藏地区茶用菊花品种比较少, 仅有零星的雪菊种植, 为增加高原地区菊花的种类, 本研究通过从内地引种茶用菊花品种, 并对菊花品种中主要成分进行人工提取纯化, 利用高效液相色谱法(HPLC)检测茶用菊花中绿原酸、木犀草苷、槲皮素等含量较高的几种成分, 同时测定菊花样品中总黄酮的含量, 以为茶用菊花高原引种后的研究和开发提供一定基础和依据。

## 2. 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); SB-5200D 型高功率数控超声波仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。芦丁标准品(MUST-11040302)、绿原酸(MUST-11042802)、木犀草苷(MUST-12041703)、槲皮素(MUST-10092801)。

## 3. 方法与结果

### 3.1. 菊花中绿原酸、木犀草苷、槲皮素 HPLC-DAD 测定条件

#### 3.1.1. 样品提取方法

分别取 0.25 g 菊花样品: 取样地点为河北的小黄菊、小白菊、大黄菊; 取样地点为西藏的小黄菊(西藏温室)、小白菊、大黄菊、小黄菊(西藏露天)。精密称定, 置于锥形瓶中, 加入 25 mL 70%甲醇, 密塞,

称定重量, 超声处理 40 min 后, 放冷, 再称定重量, 用 70% 甲醇补足减失的重量, 分离上清液, 后置于 4℃ 冰箱。取 0.5 mL 样品液, 过 0.22 μm 有机膜, 后进样分析。

### 3.1.2. 对照品溶液的制备

分别称取 1.00 mg 的绿原酸、木犀草苷和槲皮素, 置于 1 mL 的容量瓶中, 用 70% 的甲醇稀释至刻度, 配成 1 mg/mL 的标准储存液。分别吸取适量的上述标准储存溶液, 置于同一容量瓶中, 采用 70% 甲醇稀释至实验需求的浓度。

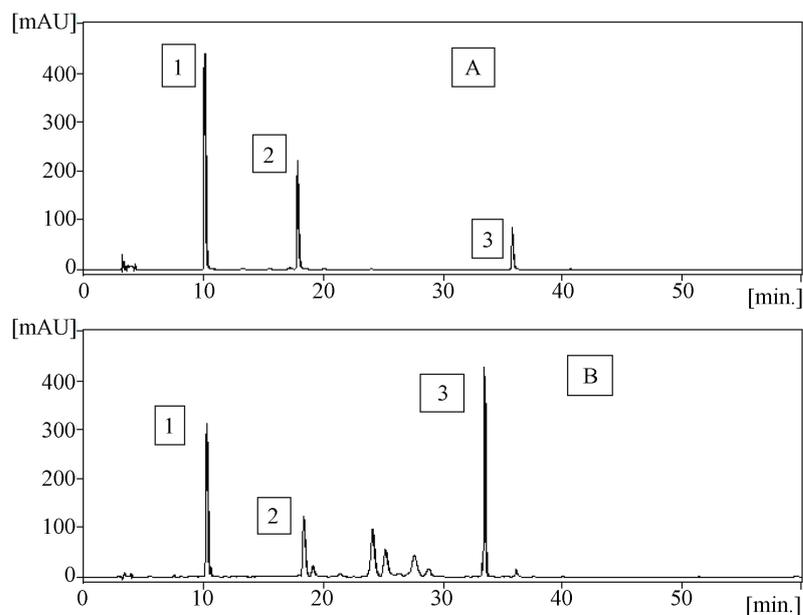
### 3.1.3. HPLC 条件

采用 Agilent SB C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 A-0.5% 甲酸水溶液 B 为流动相; 梯度洗脱条件: 0~10 min, 10%~20% A; 10~25 min, 20%~20% A; 25~30 min, 20%~36% A; 30~40 min, 36%~36% A; 40~45 min, 36%~40% A; 45~50 min, 40%~50% A; 50~60 min, 50%~90% A。柱温为 25℃, 体积流量为 0.8 mL/min, 进样量为 5 μL, 检测波长为 348 nm [12]; 各茶用菊花样品绿原酸、木犀草苷、槲皮素的 HPLC 图见图 1。

### 3.1.4. 标准曲线的建立

吸取一定体积的 3 种标准储备液, 采用 70% 甲醇稀释至一定体积, 配成不同浓度的混合标准液; 按上述色谱条件进样分析, 测定各化合物的峰面积, 以各化合物浓度(μg/mL)为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 并求得回归方程, 见表 1。

根据标准曲线, 求得各标准品的回归方程为: 绿原酸“ $y = 26.919x + 3.7684$ ”, 木犀草苷“ $y = 17.733x - 124.66$ ”, 槲皮素“ $y = 16.831x + 18.794$ ,  $R^2 = 0.9997$ ”, 总黄酮“ $y = 0.005x - 0.0229$ ”, 回归系数和线性范围为: 绿原酸“ $R^2 = 1.0000$ , 0.05~50.00 μg/mL”, 木犀草苷“ $R^2 = 0.9993$ , 0.05~50.00 μg/mL”, 槲皮素“ $R^2 = 0.9997$ , 0.10~50.00 μg/mL”。结果表明, 在各标准液的线性范围内化合物浓度与峰面积具有良好的线性关系。



注: A. 标准品; B. 菊花样品; 1. 绿原酸; 2. 木犀草苷; 3. 槲皮素。

Figure 1. The HPLC diagram of mixed standard reference substances and samples  
图 1. 混合标准对照品与样品 HPLC 图

**Table 1.** The results of three standard products HPLC about regression equation, linear range, detection limit and quantitative limit measurement**表 1.** 3 种标准品 HPLC 分析回归方程、线性范围及检测限、定量限测定结果

化合物	出峰时间/min	回归方程	线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ )	相关系数 ( $R^2$ )	检出限 ( $\mu\text{g/mL}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/mL}$ )
绿原酸	10.30	$y = 26.919x + 3.7684$	0.05~50.00	1.0000	0.010	0.033
木犀草苷	17.80	$y = 17.733x - 124.66$	0.05~50.00	0.9993	0.010	0.033
槲皮素	35.80	$y = 16.831x + 18.794$	0.10~50.00	0.9997	0.023	0.077
总黄酮		$y = 0.005x - 0.0229$	0.10~50.00	0.9945	0.013	0.067

### 3.1.5. 三种有效成分的含量测定

供试品溶液制备方法制备样品溶液, 采用上述色谱条件分别进样分析, 获得 3 种化合物色谱峰面积, 将测得结果带入表 1 HPLC-DAD 线性回归方程, 计算菊花样品中三种化合物的含量, 结果如表 2。

由表 2 结果可知, 西藏产的小白菊与河北产的小白菊之间绿原酸的含量具有显著性差异, 小黄菊和大黄菊亦是呈现同样的结果; 西藏地区的小白菊与河北产的小白菊之间木犀草苷的含量具有显著性的差异, 西藏地区的小黄菊与河北地区的小黄菊之间木犀草苷的含量也具有显著性的差异, 大黄菊也呈现同样的结果; 西藏地区小白菊与河北地区小白菊之间槲皮素的含量具有显著性的差异, 西藏地区的小黄菊与河北地区的小黄菊之间槲皮素的含量也具有显著性的差异, 大黄菊也呈现同样的结果( $p < 0.05$ )。

## 3.2. 总黄酮测定

### 3.2.1. 提取过程

取各类菊花样品 0.15 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙醇 25 mL, 密塞, 摇匀, 超声处理 10 分钟, 放置 3 小时以上, 过滤。

### 3.2.2. 对照品溶液的制备

取芦丁对照品适量, 精密称定, 加乙醇制成每 1 mL 含芦丁 0.20 mg 的溶液。

### 3.2.3. 标准曲线的建立

精密量取对照品溶液 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 各加水至 6 mL, 加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL, 使混匀, 放置 6 分钟, 加 10%硝酸铝溶液 1 mL, 摇匀, 放置 6 分钟, 加氢氧化钠试液 10 mL, 再加水至刻度, 摇匀, 放置 15 分钟, 以相应的试剂为空白, 用紫外-可见分光光度法, 以 500 nm 的波长处测定吸光度, 以吸光度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 并求得回归方程, 结果见表 1。

### 3.2.4. 总黄酮含量的测定

精密量取滤液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试样品溶液。精密量取供试品溶液 2 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 照标准曲线的制备方法, 依法测定吸光度, 同时精密量取供试品溶液 2 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 作为空白溶液。从标准曲线上读出供试品溶液中芦丁的量, 计算, 即得总黄酮的含量(见表 3)。

由表 3 可知, 针对各茶用菊花总黄酮的含量, 西藏地区植的小白菊的含量明显高于河北地区种植的小白菊, 西藏地区种植的小黄菊和大黄菊总黄酮的含量也呈现高于河北地区的特点( $p < 0.05$ )。

## 3.3. 统计分析

数据处理和统计分析采用 SPSS22.0 软件, 结果以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

**Table 2.** The determination of 3 active components in chrysanthemum samples ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n = 10$ )  
**表 2.** 菊花样品中 3 种有效成分含量测定( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n = 10$ )

样品名	绿原酸	木犀草苷	槲皮素
河北小黄菊	1290.069	1290.069	91.055
河北小白菊	812.276	812.276	144.190
河北大黄菊	585.573	739.097	86.608
西藏小黄菊(温室种植)	2100.673	1967.229	144.520
西藏小白菊	2073.958	1297.930	196.174
西藏大黄菊	2171.616	1282.469	156.882
西藏小黄菊(露天种植)	2418.569	2017.748	148.917

**Table 3.** The determination of total flavonoids in chrysanthemum samples ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n = 10$ )  
**表 3.** 菊花样品中总黄酮含量测定( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $n = 10$ )

样品名	总黄酮含量
河北小黄菊	7334.308
河北小白菊	7090.643
河北大黄菊	7456.140
西藏小黄菊(大棚种植)	7913.012
西藏小白菊	7517.057
西藏大黄菊	7577.973
西藏小黄菊(露天种植)	8765.838

## 4. 结论

### 4.1. 样品中待测含量的比较

#### 4.1.1. 绿原酸含量的比较

从表 2 中可以看到, 将同一产区的各类茶用菊花绿原酸含量进行比较得到: 西藏产的小黄菊含量高于大黄菊高于小白菊; 河北产的小黄菊高于小白菊高于大黄菊; 不同产区相同品种菊花绿原酸含量进行比较得到: 西藏小黄菊高于河北小黄菊, 西藏的小白菊高于河北小白菊, 西藏的大黄菊高于河北的大黄菊; 将同产区不同栽培措施条件下的茶用菊花绿原酸含量进行比较得到: 露天小黄菊高于温室大棚小黄菊, 由此可以得到菊花中绿原酸的含量受到栽培措施的影响。

#### 4.1.2. 木犀草苷含量的比较

由表 2 的结果可知, 将同一生境下各类菊花木犀草苷含量进行比较得到: 西藏产小黄菊木犀草苷含量高于小白菊高于大黄菊; 河北产的小黄菊高于小白菊高于大黄菊; 不同生境下同一品系茶用菊花木犀草苷含量进行比较得到: 西藏小黄菊高于河北小黄菊, 西藏小白菊高于河北小白菊, 西藏大黄菊高于河北大黄菊; 另外, 由表 2 可知, 不同栽培措施条件下菊花木犀草苷高含量存在差异: 露天的小黄菊高于温室大棚里的小黄菊。

#### 4.1.3. 槲皮素含量的比较

根据测定结果(见表 2)可见, 将同一生境下各类茶用菊花槲皮素含量进行比较得到: 西藏产小白菊槲皮素含量高于大黄菊高于小黄菊, 河北产的小白菊高于小黄菊高于大黄菊; 不同生境下同一品系茶用菊

花槲皮素含量比较：西藏产小黄菊高于河北产小黄菊，西藏产小白菊高于西藏产小白菊，西藏产大黄菊高于河北产大黄菊。另外，菊花槲皮素含量受栽培措施条件的影响不大。

#### 4.2. 菊花总黄酮含量的比较

现代研究表明，黄酮类化合物是菊花提取物中含量较多的有效成分，其含量因菊花品种不同而存在差异[13][14][15]。本实验测得各类菊花总黄酮含量见表3，将相同生境下茶用菊花总黄酮的含量进行比较得到：西藏产小黄菊高于大黄菊高于小白菊；不同产区下产的同类菊花总黄酮含量：西藏产小黄菊高于河北产小黄菊，西藏产小白菊高于河北产小白菊，西藏产大黄菊高于河北产大黄菊。此外，由表3可知，菊花中总黄酮的含量受栽培措施条件的影响。

通过对7个菊花样品中主要成分含量的测定，发现相同产区不同品种菊花绿原酸、木犀草苷、槲皮素含量各异；不同产区相同品种菊花绿原酸、木犀草苷、槲皮素、总黄酮等主要活性成分含量也存在差异；总体而言，高原环境产的菊花主要活性成分的含量明显高于内地。据此，通过对引进菊花主要活性成分含量的测定和比较分析，可为茶用菊花引种高原后对其质量评价、遗传多样性以及品种选育研究提供依据。

#### 4.3. 茶用菊花各主要活性成分含量存在差异的可能原因

从内地引种高原后，相同菊花品种主要活性成分含量存在显著差异，且呈现显著性增加，主要原因可能是：高原上特殊的气候条件(光照、降雨、温度等)、地理条件等对菊花的主要活性成分含量产生了影响；相同生境下相同栽培措施不同品系菊花各活性成分含量存在差异，可能原因是不同种类菊花存在种质上的差异，其次代谢产物等后含物也可能不同；此外，不同产地间菊花的栽培措施、采收方法以及菊花成熟度等因素也会对茶用菊花的有效成分含量造成影响。因此，菊花的内在质量受多因素的影响[16]。

从研究结果可以见到，在我国不同产区往往相同的茶用菊花品系，其主要活性成分存在较大的差异，同一生境下存在的多个类型茶用菊花，其主要活性成分含量同样存在差异，这些均体现了茶用菊花的多样性，为茶用菊花在高原上的育种工作提供了丰富的材料，使高原上菊花品种种类增加成为可能。

#### 基金项目

西藏自治区拉萨市科技计划项目(201604)。

#### 参考文献

- [1] 纪小燕, 王玉, 丁兆唐, 等. 不同采摘期野生菊花主要功效成分的研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(3): 40-44.
- [2] 沈维治, 邹宇晓, 刘凡, 等. 雪菊与市售菊花活性成分的比较研究[J]. 热带作物学, 2012, 33(12): 2284-2287.
- [3] Wang, T., Zhu, Z.B., Guo, Q.S., et al. (2013) Variation in Major Flavonoids Glycosides and Caffeoylquinic Acids during Florescence of Three *Chrysanthemum morrifolium* Ramat cv. "Hangju" Genotypes. *Biochemical Systematics and Ecology*, 47, 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.11.004>
- [4] 徐文斌, 郭巧生, 李彦农, 等. 药用菊花不同栽培类型内在质量的比较研究[J]. 中国中药学杂志, 2005, 30(21): 1645-1648.
- [5] 杨俊, 蒋惠娣, 戈震, 等. 杭白菊绿原酸及其他成分的含量在采摘期中的动态变化[J]. 中国中药杂志, 2003, 38(11): 833-836.
- [6] 郭巧生, 汪涛, 等. 药用菊花不同栽培类型总黄酮动态积累研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1237-1239.
- [7] 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(1): 29-32.
- [8] 梁迎暖, 郭巧生, 张重义, 等. 不同加工方法对怀菊品质的影响[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(21): 2314-2316.

- [9] 姜从良, 卢金清, 李竣, 等. 神农香菊中挥发油、总黄酮与杭菊花、贡菊花的比较研究[J]. 湖北中医学院学报, 2001, 3(3): 48-49.
- [10] 刘金旗, 吴德林, 王兰, 等. 菊花中黄酮苷的含量分析[J]. 中草药, 2011, 32(4): 308-310.
- [11] 蒋惠娣, 胡碧波, 曾苏, 等. 杭白菊 HPLC 指纹图谱的评价[J]. 中国中药杂志, 2005, 39(8): 578-581.
- [12] 覃珊, 温学森. HPLC 同时测定菊花中 6 种活性成分含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1474-1476.
- [13] 国家药典学会. 《中国药典》一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [14] 查芳芳, 高学玲, 邹敏亮, 等. 黄山贡菊高效液相色谱指纹图谱的建立[J]. 食品科学, 2011, 36(20): 146-150.
- [15] 郭巧生, 汪涛, 程俐陶, 等. 不同栽培类型药用菊花黄酮类成分比较分析[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(7): 756-760.
- [16] 郭巧生, 钱大玮, 何先元, 等. 药用白菊花四个栽培类型内在质量的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 896-898.

#### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5507, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjas@hanspub.org](mailto:hjas@hanspub.org)