

不同市售野菊花药材的 RP-HPLC 指纹图谱

毕跃峰, 符玲, 王蒲菊, 孙孝莉, 刘晓庆

(郑州大学 药学院 新药研发中心 河南 郑州 450001)

摘要: 采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法,以甲醇和醋酸(体积分数 4%)为流动相梯度洗脱,建立了野菊花药材的指纹图谱,并标定出 25 个共有峰,指认出 9 个特征峰.测定了 12 批不同市售野菊花药材的相似度.所建立的野菊花药材 RP-HPLC 色谱指纹图谱重复性好,专属性强,可用于野菊花药材的质量评价.

关键词: 野菊花; RP-HPLC; 指纹图谱

中图分类号: O 657.63

文献标识码: A

文章编号: 1671-6841(2010)04-0092-03

0 引言

野菊花是菊科菊属植物野菊的干燥头状花序,秋、冬二季初开放时采摘,晒干或蒸后晒干,具有清热解毒、清肝明目的功效,临床主要用于治疗痔疮肿痛、目赤肿痛、头痛眩晕^[1].作者对野菊花药材指纹图谱进行了研究,并在此基础上对 12 批不同市售野菊花药材进行了质量考察,以期建立和完善评价野菊花质量优劣的分析方法,为市面上野菊花药材的质量评价和相关制剂生产提供科学依据和参考^[2-3].

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HPLC 系统:G1314AVWD 紫外检测器;G1311A 四元泵;Agilent Chemstation 色谱工作站;BP211D 分析天平(德国赛多利斯);KQ5200E 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);FW177 中药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);PA6-GF30 闪式提取器(北京金鼎科技发展有限公司);BXHW 电热套(北京科伟永兴有限公司);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);滤纸;微孔滤膜(0.45 μm).

乙腈为色谱纯,水为超纯水,甲醇、醋酸为分析纯.蒙花苷、木犀草素、芹菜素、木犀草苷、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、刺槐素、香草醛对照品均来自提取分离;12 批不同市售野菊花药材的来源及性状见表 1.

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:YMC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 4% (体积分数)醋酸(pH 2.26),梯度洗脱程序见表 2,流速 0.7 mL/min;进样量 20 μL;柱温 25 °C;检测波长 320 nm,记录时间 90 min.以蒙花苷作为指纹图谱的内参比峰.

1.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛)约 2 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加入 75% (体积分数)甲醇溶液 200 mL,浸泡 20 min,加热回流,保持微沸 60 min,滤过,残渣加 200 mL 甲醇溶液再次回流 60 min,合并提取液,减压浓缩,用甲醇溶液溶解定容到 25 mL 容量瓶,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液.

1.2.3 对照品溶液的制备 分别取对照品少许,加甲醇溶液适量溶解,做成对照品溶液备用.

1.2.4 精密度实验 取同一供试品溶液 10 μL,连续进样 5 针,测定结果导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版软件,以蒙花苷作参比峰,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5%,符合指纹图谱的技术要求.

1.2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 24 h 进样检测,结果导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版软件,以蒙花苷作参比峰,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5%,

收稿日期:2009-11-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目,编号 30973872.

作者简介:毕跃峰(1969-),女,副教授,博士,主要从事天然药物化学及新药开发研究,E-mail:2000byf@sina.com;通讯联系人:符玲(1978-),女,讲师,硕士,主要从事生药成分及质量分析研究,E-mail:fuling1011@126.com.

表1 12批不同市售野菊花药材的来源和性状

Tab.1 The origin and character of *Flos Chrysanthemi indicici* from 12 different sources

来源	性状	鉴定结果
安徽	未开花,棕黄色、芳香味较淡	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花蕾
山东 ¹	未开花,棕色、几乎无芳香味	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花蕾
山东 ²	半开花,棕黄色、芳香味较浓	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花
贵州	半开花,棕黄色、芳香味较浓	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花
信阳	半开花,棕黄色、芳香味较浓	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花
云南	半开花,棕黄色、芳香味较淡	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花
江西	半开花,棕黄色、芳香味较浓	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花
郑州	半开花,棕色、几乎无芳香味	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花
济源	已开花,黄色、芳香味较浓	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花
广西	已开花,亮黄色、芳香味较淡	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花
桐柏	未开花,棕黄色、芳香味较淡	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花蕾
南阳	未开花,棕黄色、芳香味较淡	正品野菊(<i>Chrysanthemum indicum</i> L.)的干燥花蕾

说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

1.2.6 重现性试验 取同一供试品溶液,按照 1.2.2 的制备方法,平行制备样品 5 份,同法进行检测,结果导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版软件,以蒙花苷作参比峰,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 *RSD* 均小于 5%,符合指纹图谱的技术要求。

2 结果与讨论

2.1 野菊花药材指纹图谱及共有峰、特征峰的指认

12 批不同市售野菊花药材按照供试品的制备方法提取制备并且检测,以蒙花苷为参比峰,计算相对保留时间并以此来标定共有峰,通过与对照品溶液相对照,共标定出 25 个共有峰,指认出 9 个特征峰,如图 1 所示。

2.2 相似度分析

将 12 批野菊花样品数据(简称为 S₁~S₁₂)导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版软件进行分析,生成共有模式对照图谱(简称为 S_{对照}),进行各个市售样品的相似度评价,见图 2。12 份样品和共有模式对照图谱的相似度值分别为:0.765, 0.496, 0.364, 0.662, 0.729, 0.514, 1.720, 0.613, 0.314, 0.531, 0.528, 0.424。

2.3 讨论

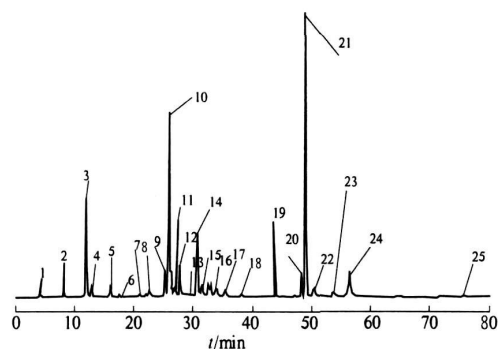
2.3.1 提取溶剂的考察 考察了不同的溶剂如甲醇、75%(体积分数)甲醇溶液、纯水,结果显示,采用 75% 甲醇溶液作为提取溶剂,野菊花中的黄酮类和有机酸类成分均较单用甲醇和水出峰多,且基线平稳,故选择 75% 甲醇溶液作为提取溶剂。

2.3.2 流动相的考察 流动相参考文献[4],分别筛选了甲醇-水、乙腈-0.1%(体积分数)甲酸、乙腈-0.05%(体积分数)磷酸、甲醇-0.05%(体积分数)磷酸、甲醇-4%(体积分数)醋酸等。由于乙腈洗脱能力太强,色谱峰的保留时间均比较短,分离效果不好,因而选择洗脱能力相对较弱的甲醇,考虑到甲醇易挥发,因此,选择甲醇-4%醋酸作为流动相。

表2 流动相梯度洗脱条件

Tab.2 The gradient elution parameter of mobile phase

时间/min	0	10	40	45	65	75	85
溶剂 A/%	30	45	47	60	62	98	100
溶剂 B/%	70	55	53	40	38	2	0



3. 绿原酸;5. 咖啡酸;6. 香草醛;12. 木犀草苷;13. 阿魏酸;21. 蒙花苷;22. 木犀草素;24. 芹菜素;25. 刺槐素

图1 12批不同市售野菊花药材的共有峰和特征峰

Fig.1 The same fingerprint peak and characteristic peak of *Flos Chrysanthemi indicici* from 12 different sources

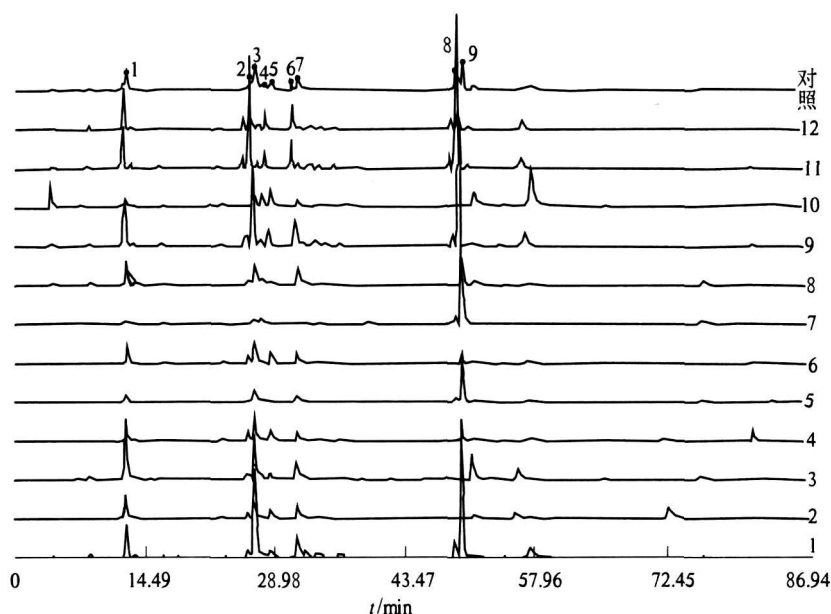


图2 12批不同市售野菊花药材的指纹图谱和共有模式对照图谱

Fig-2 The fingerprint atlas and the same pattern contrast fingerprint atlas for *Flos Chrysanthemi indici* from 12 different sources

2.3.3 柱温和波长的考察 选择了20, 25, 30, 35 °C 4个柱温进行考察, 25 °C时各色谱峰的分度最好; 此外, 比较了249, 254, 320, 350 nm 4个波长, 320 nm 检测到的色谱数和基线及峰形等较为满意, 故确定25 °C, 320 nm 分别为最佳柱温和检测波长。

2.3.4 讨论 共指认出9个特征峰, 分别是: 绿原酸、咖啡酸、香草醛、木犀草苷、阿魏酸、蒙花苷、木犀草素、芹菜素、刺槐素。而文献[4]中只指认了绿原酸、咖啡酸、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、蒙花苷、刺槐素5个特征峰。从12批野菊花药材的指纹图谱可以看出, 市场上所售该药材质量差别较大, 所建立的野菊花标准指纹图谱为进一步评价该药材质量提供了科学依据和方法。

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: 化学工业出版社, 2005: 219.
- [2] 吴钉红, 杨立伟, 苏薇薇. 野菊花化学成分及药理研究进展[J]. 中药材, 2004, 23(2): 142-144.
- [3] 毕跃峰, 裴姗姗, 贾陆, 等. 野菊花中挥发油及氨基酸成分分析[J]. 郑州大学学报: 理学版, 2008, 40(2): 91-93.
- [4] 谭晓杰, 贾英, 齐丹丹, 等. 野菊花 RP-HPLC 色谱指纹图谱的建立及其质量标准的研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(1): 29-31.

RP-HPLC Fingerprint for *Flos Chrysanthemi indici* from Different Sources

BI Yue-feng, FU Ling, WANG Pu-ju, SUN Xiao-li, LIU Xiao-qing

(New Drugs Research and Development Center, School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: RP-HPLC fingerprint methods for *Flos Chrysanthemi Indici* is established. The RP-HPLC system consists of a mixture of methanol and 4% acetic acid with gradient elution. 25 same characteristic peaks of *Flos Chrysanthemi indici* are established and 9 characteristic peaks are recognized. Based on the chromatographic fingerprints, the similarity of *Flos Chrysanthemi indici* from 12 different sources is analyzed. The results show that the chromatographic fingerprint for *Flos Chrysanthemi indici* is repeatable, feasible and can be used to estimate the quality of *Flos Chrysanthemi indici*.

Key words: *Flos Chrysanthemi indici*; RP-HPLC; fingerprint