

不同产地野菊花挥发油成分气相指纹图谱研究

宋青坡¹, 韩永成², 陈宁², 刘伟^{2*}, 吴明侠², 崔永霞², 黄丽杰²

(1. 河南中医学院三附院, 郑州 450008; 2. 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挥发油成分气相指纹图谱,为有效控制和科学评价野菊花药材质量提供依据。**方法:**采用气相色谱法,HP-5(0.25 μm×0.32 mm×30 m)柱;程序升温,初始温度60℃,保持2 min,以4℃·min⁻¹升至105℃,以2℃·min⁻¹升至115℃,以4℃·min⁻¹升至150℃,以15℃·min⁻¹升至250℃保持2 min;载气高纯氮气(≥99.999%),流量1.0 mL·min⁻¹;分流比为20:1,检测器FID,检测器温度250℃,进样口温度250℃。**结果:**对12个产地的野菊花进行了分析,建立了野菊花挥发油成分气相色谱指纹图谱。S1,S2,S8的相似度在0.850以下,S3,S4,S7,S10的相似度在0.850~0.950之间,其他的样品的相似度在0.950以上。**结论:**建立了野菊花挥发油成分气相指纹图谱方法,该方法重复性好,简单,易行,可为野菊花整体质量评价提供依据。

[关键词] 野菊花;挥发油成分;气相指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)11-0079-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014110079

GC Fingerprint of Volatile Constituents of Chrysanthemi Indici Flos from Different Areas

SONG Qing-po¹, HAN Yong-cheng², CHEN Ning², LIU Wei^{2*},
WU Ming-xia², CUI Yong-xia², HUANG Li-jie²

(1. The Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Center of Analysis and Measurement, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an GC method of determining the characteristic chromatographic profile of Chrysanthemi Indici Flos for controlling the drug quality quickly and accurately. **Method:** The separation was performed on HP-5 (0.25 μm×0.32 mm×30 m); the column oven was begun at 60℃ and held 2 min, then programmed from 60℃ to 105℃ at 4℃·min⁻¹, then programmed from 105℃ to 115℃ at 2℃·min⁻¹, then programmed from 115℃ to 250℃ at 15℃·min⁻¹ held 2 min; by using helium as the carries gas, the flow rate is 1 mL·min⁻¹, the split ratio is 20:1; hydrogen flame ionization detector; injector temperature was 250℃, detector temperature was 250℃. **Result:** To analyse 12 batches of volatile oil, the fingerprints of Chrysanthemi Indici Flos from different areas were established. The fingerprint similarity of S1, S2, S8 is in 0.781-0.843. The fingerprint similarity of S3, S4, S7, S10 is in 0.853-0.932. The fingerprint similarity of the rest of the samples is above 0.95. **Conclusion:** This method is reproducible, simple and easy, and can be used to provide a base for the quality control of Chrysanthemi Indici Flos.

[Key words] Chrysanthemi Indici Flos; essential oil; GC fingerprint

[收稿日期] 20130828(005)

[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] 宋青坡,主管中药师,从事药物研究和管理,E-mail:henanzhongyisqp@163.com

[通讯作者] *刘伟,教授,硕士生导师,从事中药质量标准 and 仪器分析方法的研究,Tel:0371-65680206,E-mail:hnluiwei2088@sina.com

野菊花为菊科植物野菊的干燥头状花序^[1],其味苦、性微寒,归肝、心经,具有清热解毒,泻火平肝之功效^[2]。现代药理学研究表明野菊花具有免疫、抗炎、神经保护、抗菌抗病毒、保护心血管系统、保肝和抗肿瘤等药理作用^[3-5]。常用于上呼吸道感染、扁桃体炎等^[6]。野菊花主要含有黄酮类、有机酸和挥发油成分;挥发油对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、绿脓假单胞菌、福氏志贺菌及肺炎链球菌具有良好抑制作用,且还具有抗病毒活性^[7-8]。野菊花是临床常用中药材之一,目前只有较少的野菊花制剂挥发油成分气相指纹图谱研究报道,如李晓波等^[9]建立了野菊花注射液的对照指纹图谱并确定了 22 个共有峰,各批注射液与对照指纹图谱相似度均在 0.95 以上。本实验采用 GC 法建立了不同产地野菊花中挥发油指纹图谱,共获得 24 个共有峰,并指出桉油精、侧柏酮、异龙脑、樟脑等成分的峰位。可为控制野菊花药材的质量,保证临床用药的安全性和有效性提供科学依据。

1 仪器与试剂

GC-7890 型气相色谱仪(美国安捷伦公司),HP-5 弹性石英毛细管柱(325 ℃, 0.25 μm × 0.32 mm × 30 m),GCWYB-5000 型全自动无油空气源(北京怡丰瑞普科技有限公司),GCH-500 型氢气发生器(北京怡丰瑞普科技有限公司),国家药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版科研类)。桉油精(批号 110788-9202)、异龙脑(批号 110881-200504)、樟脑(批号 747-200106) 购买于中国食品药品检定研究院,纯度 ≥ 98%;侧柏酮(批号 89231) 购于 SIGMA-ALORICH 公司。乙醚(烟台市双双化工有限公司)、无水硫酸钠(天津市恒兴化学试剂制造有限公司)均为分析纯。实验所需药材,购自于不同产地的野菊花(产地来源见表 1),经河南中医学院药学院董诚明教授鉴定为野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序。

表 1 12 批野菊花产地来源

No.	产地来源	No.	产地来源	No.	产地来源
S1	河南灵宝	S5	广州佛山	S9	河南温县
S2	安徽黄山	S6	杭州 1	S10	河南南阳
S3	江苏无锡	S7	河南灵宝	S11	杭州
S4	河南临颖	S8	安徽亳州	S12	河南信阳

2 方法与结果

2.1 GC 色谱条件及系统适用性试验

HP-5 弹性

石英毛细管柱(325 ℃, 0.25 μm × 0.32 mm × 30 m);柱温:初始温度 60 ℃,保持 2 min,以 4 ℃·min⁻¹ 升至 105 ℃,以 2 ℃·min⁻¹ 升至 115 ℃,以 4 ℃·min⁻¹ 升至 150 ℃,以 15 ℃·min⁻¹ 升至 250 ℃,保持 2 min;载气高纯氮气(≥99.999%),流量 1.0 mL·min⁻¹,分流比 20:1,氢气 30 mL·min⁻¹,空气 300 mL·min⁻¹,检测器 FID,检测器温度 250 ℃,进样口温度 250 ℃,进样量 1 μL。理论塔板数按龙脑峰计算不低于 1.0 × 10⁵。

2.2 供试品溶液的制备 取野菊花粉末 40 g,置于圆底烧瓶中,加蒸馏水 480 mL,按《中国药典》2010 年版附录 XD 挥发油测定法甲法提取^[10-11],提取 5 h,停止加热,将水缓慢放出,至油层上端到达 0 刻度线以上 5 mm 处为止。乙醚萃取,浓缩,加无水硫酸钠脱水,得到淡褐色透明液体,用乙醚定容至 5 mL 作为供试品,冷藏备用。

2.3 对照品溶液的制备 取桉油精、侧柏酮、异龙脑、樟脑适量,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加乙醚溶解后,并定容至刻度,配制成 126.53, 131.42, 153.40, 179.60 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液,冷藏备用。

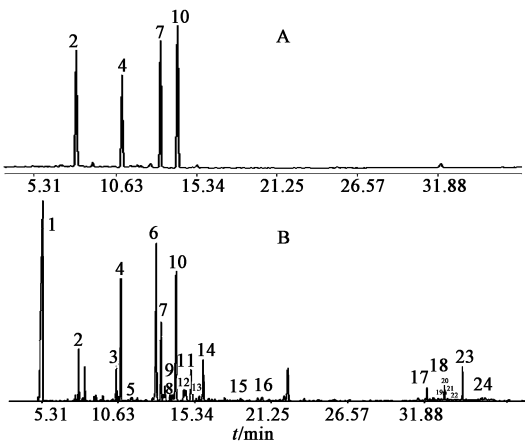
2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下条件,连续进样 5 次,测定,记录其色谱图,以樟脑为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。计算得各共有峰相对保留时间 RSD < 3.0%,各共有峰相对峰面积 RSD < 3.0%,结果表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,按 2.1 项下条件,分别于 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 时进样,测定,记录其色谱图,以樟脑为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。计算得各共有峰相对保留时间 RSD < 3.0%,各共有峰相对峰面积 RSD < 3.0%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批野菊花 5 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样,依次测定,记录其色谱图,以樟脑为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积。计算得各共有峰相对保留时间 RSD < 3.0%,各共有峰相对峰面积 RSD < 3.0%,结果表明该法具有重复性良好。

2.5 样品的测定 取表 1 中的 12 批野菊花样品,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。结果见图 1。



A. 混合对照品;B. 样品;
2. 桉油精;4. 侧柏酮;7. 异龙脑;10. 樟脑

图1 野菊花GC指纹图谱叠加模式色谱

2.6 野菊花挥发油指纹图谱的建立

2.6.1 参比峰的选择 在各批次样品指纹图谱中樟脑(10号)色谱峰分离度良好,峰位居中,峰面积较大,并且所有样品共有,以樟脑色谱峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间。结果见表2。

2.6.2 征指纹图谱的建立及相似度评价 将所得的12批野菊花挥发油GC图谱以AIA格式依次导入中国药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版科研类),以S12药材图谱作为参照谱进行指纹匹配,确定了24个共有峰,建立了野菊花挥发油GC指纹图谱叠加模式色谱图,见图2。并进行了不同产地野菊花药材指纹图谱的相似度计算,见表3。

表2 野菊花各样品峰相对保留时间

峰号	各样品峰相对保留时间											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
1	0.371	0.370	0.372	0.371	0.371	0.372	0.371	0.372	0.371	0.37	0.371	0.371
2	0.538	0.536	0.538	0.537	0.537	0.537	0.537	0.538	0.538	0.536	0.537	0.538
3	0.716	0.716	0.717	0.716	0.716	0.718	0.716	0.717	0.716	0.716	0.717	0.718
4	0.736	0.735	0.737	0.736	0.736	0.737	0.736	0.736	0.735	0.735	0.736	0.737
5	0.775	0.775	0.776	0.776	0.776	0.777	0.777	0.776	0.775	0.775	0.776	0.775
6	0.907	0.906	0.908	0.907	0.907	0.908	0.907	0.908	0.907	0.906	0.906	0.907
7	0.930	0.930	0.931	0.931	0.930	0.931	0.931	0.931	0.930	0.930	0.931	0.930
8	0.971	0.97	0.971	0.971	0.971	0.972	0.972	0.972	0.971	0.97	0.971	0.971
9	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984	0.984
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
11	1.031	1.031	1.033	1.032	1.032	1.032	1.032	1.033	1.033	1.033	1.032	1.032
12	1.045	1.045	1.046	1.046	1.046	1.047	1.047	1.047	1.046	1.045	1.046	1.045
13	1.101	1.101	1.101	1.102	1.101	1.102	1.103	1.102	1.103	1.102	1.101	1.102
14	1.126	1.126	1.127	1.128	1.128	1.127	1.126	1.127	1.128	1.128	1.127	1.126
15	1.305	1.306	1.306	1.307	1.307	1.306	1.306	1.306	1.307	1.307	1.306	1.305
16	1.407	1.408	1.408	1.406	1.408	1.408	1.406	1.407	1.406	1.408	1.406	1.407
17	2.190	2.191	2.189	2.188	2.190	2.191	2.191	2.189	2.189	2.190	2.191	2.189
18	2.206	2.206	2.206	2.205	2.207	2.206	2.206	2.207	2.206	2.207	2.206	2.206
19	2.255	2.254	2.255	2.256	2.256	2.257	2.257	2.256	2.255	2.257	2.255	2.255
20	2.273	2.272	2.273	2.272	2.273	2.273	2.272	2.273	2.274	2.274	2.273	2.272
21	2.288	2.287	2.288	2.287	2.288	2.286	2.286	2.287	2.286	2.288	2.287	2.286
22	2.325	2.324	2.325	2.326	2.327	2.326	2.326	2.325	2.326	2.326	2.325	2.324
23	2.354	2.354	2.356	2.355	2.355	2.354	2.355	2.356	2.355	2.356	2.355	2.354
24	2.41	2.408	2.409	2.408	2.409	2.409	2.41	2.409	2.409	2.41	2.409	2.408

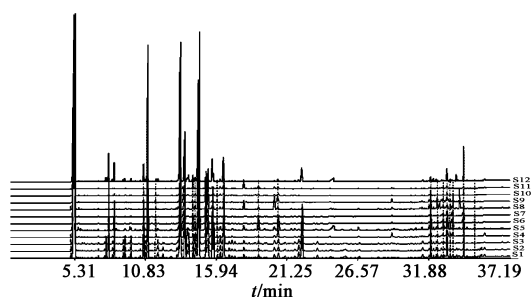


图 2 野菊花 GC 指纹图谱叠加模式色谱

表 3 12 批野菊花指纹图谱的相似度

No.	相似度	No.	相似度
S1	0.781	S7	0.932
S2	0.843	S8	0.785
S3	0.853	S9	0.963
S4	0.876	S10	0.862
S5	0.975	S11	0.966
S6	0.952	S12	0.954

3 讨论

选用了不同型号 HP-5, SE-54, DB-624, DB-1701 的毛细管色谱柱进行分析比较, 结果以 HP-5 色谱柱得到的色谱峰数目较多, 峰基本都达到基线分离且分离度较好, 符合指纹图谱的分析要求。因此选用该色谱柱作为野菊花挥发油指纹图谱^[12-14]分析的色谱柱。

考察了有机溶剂萃取法和水蒸气蒸馏法两种提取方法, 结果表明采用水蒸气蒸馏法提取所得的供试品溶液的成分较多, 且峰形较好, 而采用有机溶剂萃取法所得的供试品在 15 min 后无明显峰出现, 因此本实验选择水蒸气蒸馏法。

比较了单一速率升温 and 程序升温两种升温方式, 发现程序升温所得到的色谱峰分离度较好; 经过优化, 2.1 项下的色谱条件所得到的色谱峰分离度较好, 保留时间适中, 故选择此条件。

本实验对野菊花药材的 GC 指纹图谱进行了系统研究, 各产地的指纹图谱整体相似, 各共有峰都存在, 但不同地域之间有一定的差异, 因此本实验建立

的 GC 指纹图谱具有专属性, 可以结合 HPLC 指纹图谱对野菊花质量的整体控制提供可靠的依据。

[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] 孙昱, 马晓斌, 刘建勋. 野菊花心血管活性部位化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 3(1): 61.

[5] 金沈锐, 祝彼得, 秦旭华. 野菊花注射液对人肿瘤细胞 SMMC7721, PC3, HL60 增殖的影响[J]. 中药药理与临床, 2005, 21(3): 39.

[6] 国家药品监督管理局. 国家中成药标准汇编: 内科, 肺系(一)分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 428.

[7] 李英霞, 王小梅, 彭广芳. 不同产地菊花挥发油的抑菌作用[J]. 陕西中医学院学报, 1997, 20(3): 44.

[8] 胡浩斌, 郑旭东. 子午岭野菊花挥发油的化学成分及抑菌活性[J]. 新疆大学学报: 自然科学版, 2005, 22(3): 295.

[9] 李晓波, 谭晓杰, 贾英, 等. 野菊花注射液的 GC 指纹图谱[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 24(9): 556.

[10] 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: 63, 附录 XD.

[11] 袁焱, 陈超, 鞠海, 等. 不同产地野菊花挥发油化学成分比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(11): 31.

[12] 刘玉红, 刘倩伶, 黄志芳, 等. 不同基源郁金挥发油 GC 指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 166.

[13] 刘伟, 邢志霞, 陈志红, 等. 怀菊花挥发性成分的 GC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2007, 38(8): 1174.

[14] 张敏娜, 王之云. 泽泻药材的 GC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2007, 38(9): 1406.

[责任编辑 顾雪竹]