

野菊花药材 HPLC 指纹图谱

林丽美^{1,2},李春³,刘塔斯¹,许招懂²,刘菊妍⁴,廖端芳^{1*}

(1. 湖南中医药大学,长沙 410208; 2. 广州星群(药业)股份有限公司,广州 510288;
3. 中国中医科学院中药研究所,北京 100700; 4. 广州医药集团有限公司,广州 510130)

[摘要] 目的:建立野菊花药材的指纹图谱,为野菊花药材的质量控制提供依据。方法:采用 HPLC,Agilent Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱,以乙腈-1.0% 醋酸水为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 290 nm,柱温 30 ℃,进样 10 μL。结果:建立了 16 批野菊花药材的指纹图谱,选择 11 个野菊花样品作为标准药材,标准药材有 16 个共有峰,多数峰可以达到较好分离,具有较高的相似度。结论:建立的高效液相指纹图谱有较好的精密度、重复性和稳定性,可作为野菊花质量评价参考。

[关键词] 野菊花; 高效液相色谱; 指纹图谱; 质量控制

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)22-0120-04

HPLC Fingerprint of *Chrysanthemum indicum*

LIN Li-mei^{1,2}, LI Chun³, LIU Ta-si¹, XU Zhao-dong², LIU Ju-yan⁴, LIAO Duan-fang^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. Guangzhou Xingqun Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510288, China;
3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
4. Guangzhou Pharmaceutical Holdings Ltd., Guangzhou 510130, China)

[Abstract] Objective: To establish HPLC fingerprint of *C. indicum* to provide the basis for the standards of quality control and identification of the Chinese crude drug. Method: The HPLC method was used on an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.1% acetic acid as mobile phase by

[收稿日期] 20120615(403)
[基金项目] 湖南省科技厅项目(2011FJ7008);湖南省教育厅项目(11C0958);湖南省十二五重点学科药科学学科项目
[第一作者] 林丽美,副教授,博士,从事中药药效物质基础及质量标准化研究,Tel: 0731-88458232, E-mail:lizasmile@163.com
[通讯作者] *廖端芳,教授,博士,博士生导师,从事中药心血管药理及新药研究,Tel: 0731-88458002, E-mail:dfliao66@yahoo.com.cn

心中异莲心碱、甲基莲心碱同样具有明确的药理作用^[2,7]。如果能以莲心碱、异莲心碱、甲基莲心碱的含量共同评价莲子心的质量,则莲子心将能得到更全面的评价。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010;256.
[2] 曾建伟,吴锦忠,张书娟.莲子心药学研究进展[J].福建中医学院学报,2005,15(增刊):40.
[3] 张京梅,李鹏跃,王岚,等.莲子心总生物碱的提取分离及药效学初步研究[J].中国实验方剂学杂志,

2009,15(6):26.
[4] 刘萍,黄颖,胡本容,等.甲基莲心碱对大鼠肝 CYP450 酶含量及 CYP2D1,CYP3A1,CYP2E1 mRNA 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(10):161.
[5] 杨成梓,葛培盛,陈丽艳,等.建莲子的本草考证[J].现代中药研究与实践,2004,18(3):24.
[6] 宋金春,李娟,叶鹏.正交试验法优选莲子心中甲基莲心碱提取工艺的研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):18.
[7] 商品,潘扬.近年来异莲心碱化学和药理的研究进展[J].南京中医药大学学报,2010,26(3):238.

[责任编辑 顾雪竹]

gradient elution at the detection wavelength of 290 nm and the column temperature was set at 30 ℃ with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the sample injection was 10 μL. **Result:** HPLC fingerprints of 16 samples of *C. indicum* were established. 16 common peaks were selected as the fingerprint peaks in 11 samples. Among the obtained fingerprints, most of the detected peaks were separated effectively. 11 samples had high similarities. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint has desirable accuracy, repeatability and stability, which can be used for one of the quality control of *C. indicum*.

[**Key words**] *Chrysanthemum indicum*; fingerprints; HPLC; quality control

野菊花秋、冬二季花初开放时采摘,晒干,或蒸后晒干,具有清热解毒之功效,用于疮痈肿,目赤肿痛,头痛眩晕^[1]。现代研究表明,野菊花具有抗菌抗病毒^[2]、保护心脏^[3]、降压^[4]等作用;主要活性成分有黄酮类、萜类、挥发油及其他类成分^[5]。文献报导^[6-7],目前市场流通的野菊花药材黄酮类成分、蒙花苷含量差异较大、质量参差不齐。因此,为了保证名优中成药大品种夏桑菊颗粒质量,本课题组在前期工作基础之上^[8-10],采用与复方夏桑菊颗粒相同的 RP-HPLC 条件对市场上购买和委托药材公司收集的样品进行 HPLC 指纹图谱分析。

1 仪器、试剂和药材

1.1 仪器 KQ-100B 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司),BPZ11D 型电子分析天平(Sartorius 公司),Waters2695-2996 高效液相色谱系统,Empower 工作站,含四元梯度泵、自动进样器(Waters 公司)。

1.2 试剂 醋酸(分析纯,北京化工厂),甲醇(色谱纯,TEDIA 公司),乙腈(色谱纯,Fisher 公司),水为哇哈哈纯净水。

1.3 材料 不同产地的野菊花药材,均由湖南中医药大学药室刘塔斯教授鉴定为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序。16 批野菊花药材的具体来源见表 1,其中无批号的是从市场上购买所得,有批号的是由当地药材公司提供。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),以乙腈(A)-1.0%醋酸水(B)为流动相系统梯度洗脱(0~10 min,5% A; 10~70 min,5%~25%A%),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 290 nm,柱温 30 ℃,进样 10 μL。

2.2 供试品溶液制备 取野菊花粉末约 1g(80 目)置 50 mL 锥形瓶中,精密称定,加甲醇 10 mL,称重,超声 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz),取出,静置,放凉,补重,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 对照品溶液制备 取对照品绿原酸、木犀草苷

表 1 野菊花药材来源

编号	品种名称	批号	称样量 /g	来源
1	野菊花药材	无	1.002 7	湖北神农架
2	野菊花药材	无	1.005 2	湖北随州
3	野菊花药材	无	1.003 3	湖北英山
4	野菊花药材	无	1.003 7	湖北罗田
5	野菊花药材	071002	1.006 3	湖北
6	野菊花药材	000001	1.002 6	湖北
7	野菊花药材	无	1.001 2	安徽凤阳
8	野菊花药材	01	1.004 4	安徽
9	野菊花药材	02	1.001 6	安徽
10	野菊花药材	无	1.002 7	湖南新东
11	野菊花药材	0001	1.002 3	湖南
12	野菊花药材	0803120403	1.004 1	广西
13	野菊花药材	00001	1.003 2	广西
14	野菊花药材	071223	1.000 2	江苏
15	野菊花药材	07113001	1.002 8	浙江
16	野菊花药材	001	1.001 2	广东

和蒙花苷适量,精密称定,加甲醇溶解,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 精密度试验 取供同一试品溶液,按上述 HPLC 分析条件,连续进样 6 次,记录色谱图。各色谱峰与蒙苷内参峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值分别为 0.2%、3.5%,符合指纹图谱要求。

2.5 重复性试验 一份固定粉末样品,平行制备 6 份供试品溶液,然后进行 HPLC 分析,以各色谱峰与蒙花苷内参峰的相对峰面积计算,考察方法重复性,其 RSD<3.5%,表明方法的重复性在误差范围内。

2.6 稳定性试验 制备药材供试品溶液后,在室温下放置不同时间,进行 HPLC 分析,以各色谱峰与蒙花苷内参峰的相对峰面积计算,考察样品的稳定性,其 RSD<0.5%,表明样品至少在 48 h 内是稳定的。

3 结果

3.1 标准药材及标准图谱和对照品图谱 对收集到的野菊花药材分别进行含量测定,结果其中有 11

个样品(1,2,4,5,6,7,8,9,10,12,16)达到了规定要求(符合 2010 年版《中国药典》),因此把这 11 个样品作为标准药材。通过优化色谱条件及其以后的方法学考察,建立了野菊花药材的色谱指纹图谱,所得标准药材图谱见图 1,对照品图谱见图 2。

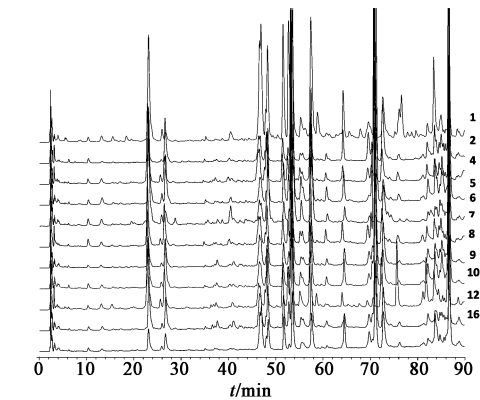


图 1 野菊花药材标准指纹图谱

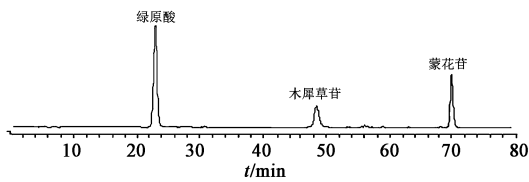


图 2 对照品 HPLC 图谱

以 11 个野菊花标准药材的色谱指纹图谱为基础,通过药典会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 软件,选择色谱图中 16 个主要峰为校正点,建立野菊花药材的对照图谱。将样品色谱图与标准品色谱图的保留时间和 UV 信息进行比对,可以确定 1 号峰为绿原酸,6 号峰为木犀草苷,12 号峰为蒙花苷。如图 3 所示。

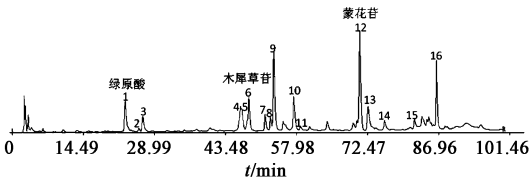


图 3 野菊花药材标准指纹图谱

3.2 指纹峰的确定 在 11 个野菊花标准药材的指纹图谱中选择 16 个色谱峰作为共有指纹峰。选择 12 号峰(蒙花苷)作为内参峰,该峰是野菊花药材中最主要的成分,也是 2010 年版《中国药典》野菊花药材含量测定的指标性成分。

3.3 相对保留时间和面积 以 12 号峰(蒙花苷)

的保留时间和峰面积为标准,其他色谱峰的保留时间和峰面积与之相比,得各色谱峰的相对保留时间和峰面积值。相对保留值体系将波动性较大的保留时间和峰面积转变成稳定性较好的相对保留时间和峰面积,有助于建立各样品统一的定性定量依据。野菊花标准药材的 16 个共有峰的相对保留时间和峰面积值见表 2。

表 2 野菊花标准药材的平均相对保留值

峰号	相对保留 时间阈值	时间 平均值	相对保留 峰面积阈值	面积 平均值
1	0.323 ~ 0.327	0.325	0.076 ~ 2.289	0.424
2	0.362 ~ 0.366	0.364	0.005 ~ 0.207	0.032
3	0.374 ~ 0.377	0.376	0.069 ~ 0.397	0.140
4	0.655 ~ 0.658	0.657	0.077 ~ 1.005	0.295
5	0.673 ~ 0.677	0.675	0.014 ~ 0.201	0.066
6	0.679 ~ 0.683	0.681	0.060 ~ 1.228	0.333
7	0.726 ~ 0.729	0.727	0.040 ~ 0.769	0.154
8	0.742 ~ 0.744	0.743	0.032 ~ 0.699	0.119
9	0.751 ~ 0.754	0.753	0.307 ~ 3.911	0.896
10	0.809 ~ 0.811	0.810	0.117 ~ 2.331	0.437
11	0.829 ~ 0.831	0.830	0.001 ~ 0.461	0.045
12	1.000 ~ 1.000	1.000	1.000 ~ 1.000	1.000
13	1.023 ~ 1.025	1.024	0.050 ~ 1.030	0.322
14	1.070 ~ 1.073	1.071	0.010 ~ 1.333	0.148
15	1.155 ~ 1.159	1.158	0.026 ~ 0.577	0.108
16	1.220 ~ 1.223	1.221	0.223 ~ 1.369	0.543

3.4 系统聚类分析 本研究应用 SPSS 软件,采用组间均联法(between-groups linkage),选用夹角余弦(cosine)为测度,聚类分析结果见图 4。聚类分析将 16 批样品分为 2 大类,其中 1,3,6,10,11,13,16,14,15 号为第一类;其他 2,4,5,7,8,9,12 号为第二类。

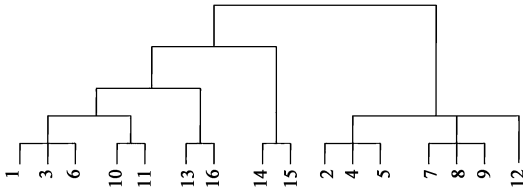


图 4 野菊花药材系统聚类分析树状示意

3.5 相似度分析 按照《中国药典》及传统中医对野菊花用药的要求,根据形态学鉴定和蒙花苷含量测定结果,选择 11 批代表性药材,再依据 11 批代表性合格药材的色谱指纹图谱,建立共有模式。采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件,计算 16 批样品

与共有模式间的相似度,见表3。除1,6,10,13,14号外,其他样品与共有模式之间相似度均大于0.8。经典分析结果3,11,13,14,15不符合要求,其中这5个样品相似度与共有模式间的相似度也均<0.9。相似度高的药材(大于0.9)聚类分析时基本可以聚为一类。从3种分析结果可知,应结合相似度分析、经典分析和聚类分析综合考虑以控制药材质量。

表3 野菊花药材的相似度

样品	相似度	样品	相似度
1	0.727	9	0.943
2	0.914	10	0.706
3	0.882	11	0.809
4	0.955	12	0.971
5	0.915	13	0.768
6	0.716	14	0.665
7	0.944	15	0.893
8	0.943	16	0.866

4 讨论

比较了不同提取溶剂如甲醇、95% 甲醇、75% 甲醇、30% 甲醇,不同提取方法如浸泡提取、回流提取、超声提取的提取效果,结果发现以甲醇超声提取时,主要色谱峰面积较大,干扰较少,处理简便快速,且方法稳定、重复性好。

分别以乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸、乙腈-1.0% 磷酸;乙腈-1.0% 醋酸、乙腈-0.5% 醋酸;甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-甲醇-0.1% 磷酸等不同体积分数、不同比例的流动相系统进行等度和梯度洗脱实验。结果表明,用乙腈-1.0% 醋酸水进行梯度洗脱为佳,在调整好流动相的不同时间洗脱比例之后,各峰的保留时间适中,且基线平稳,不易漂移,有利于指纹图谱的分析。

目前对于指纹图谱的统计分析方法较多^[11-12],本文测试了不同产地的野菊花药材样品,采用两种统计学方法进行分析,结果显示,16批药材中整体相似度不高(其中相似度0.9的药材仅占43.75%),聚类分析结果并不能完全体现产地分布的结果。这可能与样品的采收季节、种植环境均有密切关系。

采用HPLC的方法,建立了野菊花药材的指纹图谱,结果表明,全国各地的16批野菊花药材中有

11批含有的12号峰的量在处理方法的阈值之上,其余5批在其之下。所收集的药材主要化学成分(1号,6号和12号色谱峰)含量相差还是比较大的(相似度<0.8的有5批药材,且这5批药材与经典分析结果的5批不符合要求药材不是完全一致),说明市场上流通的野菊花药材质量参差不齐。为保证野菊花大宗药材及其相应中成药品质,构建野菊花质量标准体系迫在眉睫^[13]。本课题组拟下一步派专人收集不同产地样品和鉴定,以选取符合条件的样品进行研究,保证结果的可靠性。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010;295.

[2] 姚帆,徐惠波. 中药野菊花抗菌抗病毒作用的研究[J]. 长春中医药大学学报,2011,27(2):298.

[3] 张宝恒. 野菊花注射液对心血管系统的作用[J]. 中草药,1984,15(4):14.

[4] 石兰萍,田琳琳,袁劲松,等. 野菊花的研究概况[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2005,3(5):434.

[5] 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,2004,27(2):142.

[6] 宋宏刚,裴彩云,赵韶华,等. 不同产地野菊花药材中蒙花苷及总黄酮含量测定[J]. 中成药,2008,30(4):556.

[7] 涂兴明,刘淦华,刘承萍,等. 不同来源野菊花的质量研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(4):425.

[8] 林丽美,许招懂,闫积彪,等. 夏枯草中活性成分迷迭香酸的提取分离、结构鉴定与富集[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):35.

[9] 林丽美,许招懂,姚江雄,等. 夏桑菊颗粒的质量标准研究[J]. 中成药,2012,34(8):87.

[10] 林丽美,王永炎,许招懂,等. RP-HPLC法同步测定野菊花中绿原酸、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和蒙花苷含量[J]. 中南药学,2009,7(8):574.

[11] 刘婷娜,朱恩圆,俞桂新,等. 野菊花高效液相色谱指纹图谱及质量评价方法的建立[J]. 时珍国医国药,2009,20(4):823.

[12] 叶皓,沈顺,张祥民. 液相指纹图谱结合欧氏距离对野菊花质量控制的研究[J]. 世界科技研究与发展,2006,28(2):72.

[13] 涂兴明,刘淦华,刘承萍. 不同来源野菊花的质量研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(4):425.

[责任编辑 顾雪竹]