

野菊花栓剂质量标准研究

彭朋^{1,2}, 程雪梅¹, 郭英³, 王长虹^{1*}, 蒋健², 王峥涛¹

(1. 上海中药标准化研究中心; 上海中医药大学中药研究所; 中药标准化教育部重点实验室; 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属曙光医院临床药理科, 上海 201203; 3. 山东鲁泰环中制药有限公司, 山东 青岛 255086)

[摘要] **目的:** 建立野菊花栓剂的质量标准。**方法:** 木犀草苷、蒙花苷为指标, 采用 TLC 法对野菊花栓剂进行鉴别; 采用 HPLC 法测定野菊花栓剂中绿原酸、蒙花苷的含量。**结果:** 在硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水(7:3:1:1) 为展开剂, 以 2% 三氯化铝乙醇溶液为显色剂, 在 TLC 色谱中检出野菊花栓剂中的木犀草苷、蒙花苷。采用色谱柱为 Agilent Eclipse, 流动相为甲醇-乙腈-0.5% 冰醋酸(5:6:89), 检测波长为 326 nm, 栓剂中绿原酸与其他成分分离度良好。再以甲醇-0.5% 冰醋酸(47:53) 为流动相, 检测波长 326 nm 条件下, 蒙花苷与其他成分具有良好的分离度。绿原酸和蒙花苷分别在 3.27 ~ 408.40 mg·L⁻¹ 和 0.63 ~ 79.10 mg·L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 100.16%, 96.99%, RSD 分别为 1.44%, 0.88%。**结论:** 所建立的方法简便可行, 重现性好, 可用于野菊花栓剂的质量控制。

[关键词] 栓剂; 野菊花; 绿原酸; 木犀草苷; 蒙花苷; 薄层色谱; 高效液相色谱法; 质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0081-05

Quality Standard of Suppository for Flos Chrysanthemi Indici

PENG Peng^{1,2}, CHENG Xue-mei¹, GUO Ying³, WANG Chang-hong^{1*}, JIANG Jian², WANG Zheng-tao¹

(1. Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and The SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines; Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Clinical Pharmacology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Shandong Lutaihuanzhong Pharmaceutical Co. Ltd., Qingdao 255086, China)

[Abstract] **Objective:** To establish quality control system of suppository for Flos Chrysanthemi Indici (FCI) by identification and content determination. **Method:** The suppository for FCI was identified by TLC with luteoloside and linarin as indexes. The content of chlorogenic acid and linarin in the suppository for FCI was determined by HPLC. **Result:** On the silica gel thin layer plate, developed with mixture of acetic ether-acetone-formic acid-water (7:3:1:1) and sprayed with 2% aluminum trichloride ethanol solution, luteoloside and linarin were detected in the suppository for FCI. Chlorogenic acid was separated well in Agilent Eclipse column with isocratic elution by methanol-acetonitrile-0.5% glacial acetic acid (5:6:89) and detected at 326 nm. Linarin was separated well in Agilent Eclipse column with isocratic elution by methanol-0.5% glacial acetic acid (47:53) and detected at 326 nm. Chlorogenic acid and linarin showed a good linear relationship with its peak area in the range of

[收稿日期] 20110521(005)

[基金项目] 国家药典委员会《中国药典》2010 版一部标准研究基金资助(课题编号:TS-54)

[第一作者] 彭朋, 实习研究员, 研究方向: 药物分析及中药质量标准研究, Tel:021-20256536, Email: harryp_2007@hotmail.com

[通讯作者] * 王长虹, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药新制剂与体内过程研究, Tel:021-51322511, E-mail: wehcxm@hotmail.com

3.27-408.40 mg·L⁻¹ and 0.63-79.10 mg·L⁻¹ respectively. Their average recoveries were 100.16% and 96.99% with RSD of 1.44% and 0.88% respectively. **Conclusion:** These methods are simple and feasible with good reproducibility. The study will provide a quality control method of suppository for FCI.

[Key words] suppository; *Flos Chrysanthemi Indici*; chlorogenic acid; luteoloside; linarin; TLC; HPLC; quality standard

野菊花系菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序, 主治疗疮痈肿、目赤肿痛、头痛眩晕。野菊花栓剂是野菊花经加工制成的栓剂, 具有抗菌消炎, 用于前列腺炎及慢性盆腔炎等疾病^[1]。野菊花含有黄酮和绿原酸类化合物, 绿原酸具有抗炎、抗氧化、抗诱变、扩冠降脂、保肝利胆、抗菌、抗病毒和解痉等多种生物活性^[2-3], 与野菊花具有的某些药理作用相吻合^[4-6]。黄酮类化合物是野菊花中重要的药效成分之一^[7]。2010 年版《中国药典》野菊花栓的“鉴别”和“含量测定”项下均以蒙花苷为指标成分, 而中医临床疗效是一组成分协同作用的结果。野菊花及其制剂, 包括野菊花注射剂、颗粒剂^[8-9]等, 一般以总黄酮或单一黄酮类成分, 或以绿原酸作为控制质量的指标^[5, 10-12], 尚未见同时以酚酸类和黄酮类两类成分为指标控制野菊花栓剂的质量的研究报道。本文选择蒙花苷和绿原酸为定量指标成分, 木犀草苷和蒙花苷为定性指标成分, 改善了药典指标成分单一性的缺点, 使定性指标可以和定量指标形成互补, 达到提升质量标准的目的^[13]。

1 仪器与试药

Agilent1100 高效液相色谱仪; 薄层色谱自动点样器 (Linomat-VI, 瑞士 CAMAG 公司), 薄层色谱摄像机 (Reprostar 3, 瑞士 CAMAG 公司); METTLER 200 型电子天平; KQ-250DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。甲醇、乙腈为色谱纯, 超纯水, 其他试剂为分析纯; 对照品绿原酸 (Chlorogenic acid)、蒙花苷 (linarin) 和木犀草苷 (luteoloside) 由中国药品生物制品检定所提供, 纯度大于 98%。对照药材采自安徽青阳, 药材由上海中药标准化研究中心吴立宏副研究员鉴定为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序, 凭证标本存于上海中药标准化研究中心标本室, 空白基质由山东鲁泰环中制药有限公司提供。供研究用的野菊花栓剂 10 批, 分别来自广西康华药业有限责任公司、哈药集团中药三厂、山东鲁泰环中制药有限公司及自制样品 2 份 (野菊花药材由山东鲁泰环中

制药有限公司提供)。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取木犀草苷和蒙花苷对照品, 加甲醇制成每 1 mL 含各 0.2 mg 的溶液, 作为对照品溶液。

2.1.2 对照药材溶液的制备 取野菊花对照药材 0.2 g, 加石油醚 (60~90 °C) 10 mL, 在 50 °C 水浴中温浸 30 min, 弃去石油醚, 药渣挥尽溶剂, 加甲醇 10 mL, 加热回流 30 min, 放冷, 滤过, 滤液作为对照药材溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 重量差异项下的本品 5 粒, 置小烧杯中, 在 60 °C 水浴中加热使熔化, 取出, 在不断搅拌下冷却至室温, 取约 0.8 g, 精密称定, 置 10 mL 具塞离心管中, 加石油醚 (60~90 °C) 5 mL, 50 °C 超声处理 (功率 250 W, 频率 33 kHz) 15 min, 取出, 离心, 倾去上清液, 药渣再用石油醚 (60~90 °C) 同法处理 1 次, 弃去石油醚, 药渣挥尽溶剂, 加甲醇适量使溶解并转移至 100 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 在 60 °C 超声处理 30 min, 放冷, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.1.4 空白溶液的制备 取聚乙二醇 0.8 g, 精密称定, 置 10 mL 具塞离心管中, 照“供试品溶液的制备”项下制备, 作为空白溶液。

2.1.5 点样与展开 照薄层色谱法试验, 吸取上述 2 种对照品溶液及对照药材溶液各 3 μL, 供试品溶液和空白溶液各 15 μL, 分别点于同一以硅胶 G 薄层板上, 以乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水 (7:3:1:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 三氯化铝乙醇试液, 置紫外灯 (365 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照药材色谱和对照品色谱相应的位置上, 分别显相同颜色的荧光斑点。本法可作为野菊花栓的定性鉴别方法, 具有较强的专属性。

2.2 绿原酸含量测定

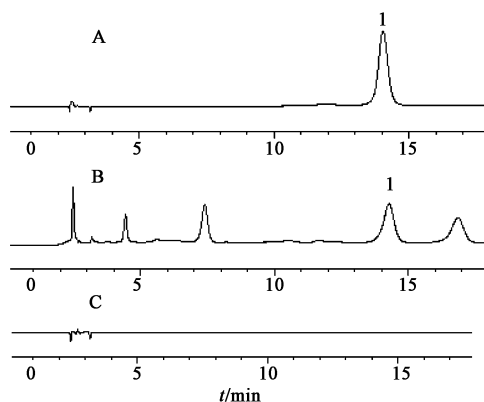
2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-乙腈-0.5% 冰

醋酸(5:6:89)为流动相,检测波长为326 nm,理论塔板数按绿原酸峰计应不低于2 500。

2.2.2 对照品溶液的制备 取绿原酸适量,精密称定,加甲醇制成 $16.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取重量差异项下的本品5粒,置小烧杯中,在 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热使熔化,取出,在不断搅拌下冷却至室温,取约0.8 g,精密称定,置10 mL具塞离心管中,照薄层色谱鉴别“供试品溶液的制备”项下制备,作为供试品溶液。

2.2.4 空白溶液的制备 取聚乙二醇0.8 g,精密称定,置10 mL具塞离心管中,照薄层色谱鉴别“供试品溶液的制备”项下制备,作为空白溶液。分别精密吸取对照品溶液、空白溶液与供试品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,测定,即得,见图1。



A. 对照品;B. 样品;C. 空白;1. 绿原酸

图1 野菊花栓剂绿原酸测定 HPLC

2.2.5 标准曲线的绘制 取绿原酸对照品适量,精密称定,加甲醇制成每毫升含 $408.40 \mu\text{g}$ 的溶液,摇匀,即为储备液。将含绿原酸的储备溶液依次稀释为 $408.40, 204.20, 40.84, 16.34, 6.53, 3.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, HPLC分析,进样量10 μL ,按上述确定的色谱条件进行测定,以每个对照品的进样浓度(X)为横坐标,峰面积积分值(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程及线性范围。绿原酸在 $3.27 \sim 408.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 呈线性, $Y = 28.43 X - 26.876 (r = 1)$ 。

2.2.6 精密度试验 取绿原酸对照品高、中、低($408.40, 204.20, 40.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)3种浓度的对照品溶液,进样量10 μL ,重复进样6次,测定峰面积分别为11 559.9, 5 809.7, 1 144.9计算得知RSD分别为1.53%, 1.71%, 0.75%,表明其日内精密度良好。连续3天测试,计算日间精密度结果,RSD分别为2.85%, 0.57%, 2.76%。表明其日间精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取本品0.8 g,(批号091201),精密称定,平行制备6份,按“供试品溶液制备”方法制备,HPLC方法测定平均含量为0.120%,得知RSD为2.34%,说明方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取本品约0.8 g,精密称定,按“供试品溶液制备”方法制备,分别在0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h内进行HPLC测定,绿原酸RSD 2.93%。样品溶液在48 h内稳定。

2.2.9 样品测定结果 取本品约0.8 g,精密称定,按“供试品溶液制备”项下操作,制成供试品溶液。分别吸取对照品溶液及供试品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪按色谱条件项下测定。按外标一点法计算百分含量,10批野菊花栓剂中绿原酸的平均含量为0.154%。结果见表1。

2.3 蒙花苷的含量测定

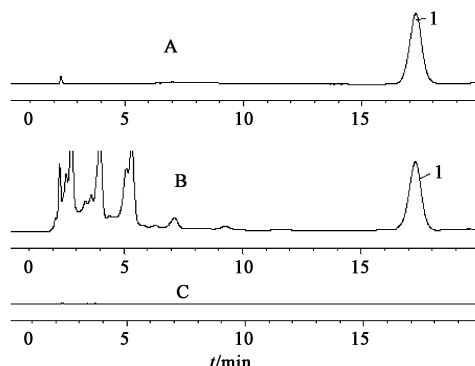
2.3.1 色谱条件与系统适应性试验 色谱柱为Agilent Eclipse XDB- C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),甲醇-0.5%冰醋酸溶液(47:53)为流动相,检测波长为326 nm,理论板数按蒙花苷计算不低于2 500。

2.3.2 对照品溶液的制备 取蒙花苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含40 μg 的溶液,即得。

2.3.3 供试品溶液的制备 同绿原酸“供试品溶液的制备”制备。

2.3.4 空白溶液的制备 同绿原酸“空白溶液的制备”制备。

分别精密吸取对照品溶液、空白溶液与供试品溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,测定,即得,见图2。



A. 对照品;B. 样品;C. 空白;1. 蒙花苷

图2 野菊花栓剂蒙花苷测定 HPLC

2.3.5 标准曲线的绘制 取蒙花苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含蒙花苷 $79.10 \mu\text{g}$ 的溶液,摇匀,即为储备液。将储备溶液依次稀释为

表 1 野菊花含量测定

No.	生产厂家	批号	绿原酸/%	绿原酸/mg/粒	蒙花苷/%	蒙花苷/mg/粒
1	广西康华	080405	0.164	4.0	0.476	11.4
2		091002	0.107	2.6	0.637	15.4
3	哈药集团	080403	0.158	3.9	0.351	8.6
4	山东鲁泰环中	091201	0.124	3.1	0.346	8.6
5		091202	0.109	2.8	0.304	7.7
6		091203	0.111	2.7	0.298	7.4
7		070201	0.127	3.0	0.268	6.4
8		070401	0.136	3.2	0.358	8.4
9	自制	100307	0.279	4.8	0.499	8.6
10		100308	0.225	3.8	0.504	8.5
	均值		0.154	3.4	0.404	9.1

79.10, 39.55, 23.73, 7.91, 3.16, 1.26, 0.63 mg · L⁻¹, HPLC 分析, 进样量 10 μL, 按上述确定的色谱条件进行测定, 以每个对照品的进样浓度 (X) 为横坐标, 峰面积积分值 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程及线性范围。蒙花苷在 0.63 ~ 79.10 mg · L⁻¹ 呈线性。线性回归方程为 Y = 19.826 X - 2.577 5 (r = 0.999 9)。

2.3.6 精密度试验 取蒙花苷高、中、低 (23.73, 7.91, 3.16 mg · L⁻¹) 3 种浓度的对照品溶液, 进样量 10 μL, 重复进样 6 次, 测定峰面积分别为 455.7, 152.7, 64.9, RSD 分别为 0.59%, 0.94%, 1.09%, 表明其日内精密度良好。连续 3 天测试, 计算日间精密度结果, RSD 分别为 0.97, 0.86, 0.41%, 表明其日间精密度良好。

2.3.7 重复性试验 取本品 0.8 g, (批号 091201), 精密称定, 平行制备 6 份, 按“供试品溶液制备”方法制备, HPLC 测定平均含量为 0.354%, RSD 为 1.15%, 说明方法重复性良好。

2.3.8 加样回收试验 取重量差异项下的本品 5 粒, 置小烧杯中, 在 60 °C 水浴中加热使熔化, 取出, 在不断搅拌下冷却至室温, 取约 0.4 g, 精密称定, 加入不同量的蒙花苷、绿原酸对照品溶液, 按“供试品溶液制备”方法制备样品, HPLC 测定, 计算加样回收率, 蒙花苷平均回收率分别为 96.99%, RSD 为 0.88%, 绿原酸平均回收率 100.16%, RSD 为 1.44%。结果见表 2, 3。

2.3.9 稳定性试验 取野菊花栓 0.8 g, 精密称定, 按“供试品溶液制备”方法制备, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 进行 HPLC 测定, RSD 为 1.31%。结果

表明, 样品在 48 h 内稳定。

表 2 蒙花苷加样回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率/%	RSD /%
1.391 0	0.993 6	2.310 0	96.87		
1.386 9	0.993 6	2.320 4	97.48		
1.390 0	0.993 6	2.325 6	97.57		
1.376 2	1.242 0	2.563 1	97.89		
1.380 0	1.242 0	2.571 4	98.07	96.99	0.88
1.377 6	1.242 0	2.533 9	96.73		
1.390 0	1.490 4	2.766 2	96.03		
1.391 4	1.490 4	2.789 6	96.80		
1.391 7	1.490 4	2.752 1	95.49		

表 3 绿原酸加样回收率 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

本底含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均 回收率/%	RSD /%
0.501 2	0.204 2	0.689 6	97.76		
0.499 7	0.204 2	0.706 5	100.37		
0.500 8	0.204 2	0.704 4	99.91		
0.495 8	0.408 4	0.920 7	101.83		
0.497 2	0.408 4	0.896 7	99.01	100.16	1.44
0.496 3	0.408 4	0.915 3	101.16		
0.500 8	0.612 6	1.106 3	99.36		
0.501 3	0.612 6	1.110 1	99.65		
0.501 4	0.612 6	1.140 5	102.37		

2.3.10 样品测定结果 取本品约 0.8 g, 精密称定, 按“供试品溶液制备”项下操作, 制成供试品溶液。精密称取蒙花苷对照品适量, 加甲醇制成 40 mg · L⁻¹ 的溶液, 分别吸取对照品溶液及供试品溶液各 10 μL 注入液相色谱仪按含量测定项下色谱条件测定。按外标一点法计算百分含量, 10 批野菊花栓

剂中蒙花苷的平均含量为 0.404%。结果见表 1。

3 讨论

本研究在 2010 年版《中国药典》野菊花栓标准的基础上进行了修订,提高了原标准。定性部分修订了 2010 年版《中国药典》野菊花栓“鉴别”项目,优选了展开系统。以常用试剂丙酮替代原展开系统中的丁酮,重新优化了展开剂的比例。同时以木犀草苷、蒙花苷为指标成分在同一薄层条件下的定性鉴别。结果显示,以乙酸乙酯-丙酮-甲酸-水(7:3:1:1)为展开剂,薄层斑点无拖尾,分离较好, Rf 值较合适。同时分别比较了不同厂家的 7 种薄层预制板、32%~88% 不同的湿度范围、低温(4℃)与室温(25℃)温度条件下,对试验结果的影响,结果表明,上述试验条件对试验结果无影响,说明方法具有一定的耐用性。通过对照药材和栓剂的比对,发现药材中的主要斑点在栓剂中均可以找到,说明栓剂和药材的主要化学成分一致,栓剂工艺达到了将药材中的主要化学成分转移到制剂中的目的。空白实验结果表明,栓剂的基质对野菊花栓的定性鉴别和含量测定均无干扰。

《中国药典》2010 年版野菊花栓“含量测定”项下,是以甲醇-水-冰醋酸(54:44:2)为流动相,现将其修订为甲醇-0.5%冰醋酸溶液(47:53)为流动相。这样有两大优点,一是将有机相甲醇和水相冰醋酸分开,可以根据不同的色谱柱要求微调流动相的比例;二是原流动相中冰醋酸比例达 2%,对色谱柱的耐酸性要求较高,现在修订的条件在 C₁₈ 色谱柱上基本都能满足试验要求。

本文虽然用了 2 个色谱条件测绿原酸、蒙花苷 2 个成分的含量,但供试品溶液的制备方法一致,实验操作步骤较为简化。由于绿原酸为酚酸类成分,而蒙花苷为黄酮类成分,二者极性差异较大。曾试图用一个方法同时测定绿原酸和蒙花苷的含量。如果要保证这 2 个成分和其他成分分离度大于 1.5,分析时间将长达 60 min。作为质量标准,一般要求方法简洁、快速,故分析时间过长的方法不适合作为标准建立。而用现在所用的 2 种方法,可以保证绿原酸和蒙花苷峰形良好,与其他成分分离度大于 1.5,且两者的保留时间也都在 20 min 以内。如果样品数量较多,将大大缩短分析时间。

2010 年版《中国药典》收录的野菊花栓剂,其“制法”项下的工艺参数不明确,本次用于野菊花栓

质量标准的自制样品的制备工艺是以药典中野菊花栓的“制法”为基础,结合之前已优化出的野菊花提取物的制备工艺^[14],明确了工艺参数。根据药典对野菊花栓中蒙花苷含量 5 mg/粒的规定,折算成提取物中蒙花苷的含量,从该工艺所制得的提取物含量来看,均符合上述要求,说明该工艺可以制备出合格的提取物,这就从物质基础的角度证明了该栓剂可以很好地发挥临床疗效。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 295.
- [2] Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. J Ethnopharmacol [J], 2005, 96 (1/2):151.
- [3] Mladenove K., Tsankove E., Kostora I, et al. Indicumenone a new bisabolane ketodiol from *Chrysanthemum indicum* [J]. Planta Med., 1987, 53 (1):118.
- [4] 刘建萍. 中药野菊花的研究概况[J]. 天津药学, 2007, 19(4): 66.
- [5] 刘艳清, 汪洪武. 野菊花中绿原酸提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1612.
- [6] 张涛, 陈学松, 林冬杰. 高效液相色谱法测定野菊花中木犀草苷和蒙花苷含量[J]. 中国药师, 2007, 10 (11): 1091.
- [7] 裴姗姗, 毕跃峰, 田野, 等. 野菊花的研究进展[J]. 河南中医学院学报, 2007, 11(6): 83.
- [8] 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[S]. 2002:429.
- [9] 国家药品监督管理局. 国家中成药标准汇编: 外科妇科分册[S]. 2002:26.
- [10] 罗显华, 郁建生. 野菊花总黄酮的提取与纯化[J]. 食品科技, 2008, (7): 179.
- [11] 周洪雷. 高效液相色谱法测定野菊花中蒙花苷的含量[J]. 化学分析计量, 2007, 16(6): 27.
- [12] 刘菲, 杨洋, 谭晓杰, 等. RP-HPLC 同时测定野菊花中 6 种黄酮的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2067.
- [13] 彭朋, 程雪梅, 刘力, 等. 野菊花提取物的质量标准研究[J]. 中国药事, 2010, 24(7): 650.
- [14] 彭朋, 程雪梅, 王长虹, 等. 正交实验优选野菊花提取物的制备工艺[J]. 上海中医药大学学报, 2010, 24 (2):81.

[责任编辑 蔡仲德]