

不同产地野菊花中蒙花苷含量与红外光谱的对比

吴明侠¹, 王晶娟², 张贵君^{2*}, 孙素琴³

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 北京中医药大学, 北京 100102; 3. 清华大学化学系, 北京 100084)

[摘要] 目的: 建立测定野菊花中蒙花苷含量的方法, 并且与其红外光谱进行对比研究。方法: 以不同产地的供试品为载体, 采用 HPLC 法测定含量, Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A 相为 0.5% 磷酸水溶液, B 相为乙腈, 进行梯度洗脱, 在 0 ~ 10 min, B 相从 10% 线性改变至 20%, 10 ~ 30 min, B 相从 20% 线性改变至 30%; 30 ~ 40 min, B 相从 30% 线性改变至 40%; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 326 nm; 柱温 35 °C。IR 光谱采用傅里叶变换红外光谱技术, 获得野菊花的红外谱, 二阶导数谱和二维相关红外谱。结果: 蒙花苷的线性范围为 0.262 ~ 5.24 μg ($r = 0.999\ 91$), 回收率为 98.75%, RSD 为 1.02%。不同产地野菊花由于其中所含蒙花苷含量的差异, 在 IR 二阶导数谱上 1 700 ~ 1 400 cm⁻¹ 及二维红外光谱在 1 800 ~ 800 cm⁻¹ 波段均有明显区别。结论: 建立的 HPLC 方法测定蒙花苷含量准确、快速、重复性好, 适合于测定野菊花中黄酮类成分的含量。野菊花中蒙花苷含量的不同在 IR 光谱上可以看出差异, 可以作为鉴别其质量的参考指标之一。

[关键词] 高效液相色谱法; 傅里叶变换红外光谱法; 野菊花; 蒙花苷

[中图分类号] 284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0054-04

Study on Content of Buddleoside from Flos Chrysanthemi Indici and Their Identification by Infrared

WU Ming-xia¹, WANG Jing-juan², ZHANG Gui-jun^{2*}, SUN Su-qin³

(1. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 3. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for determination of Buddleoside from Flos Chrysanthemi Indici. The result was compared with IR spectrums. **Method:** Flos Chrysanthemi Indici from various habitats were used as test sample and HPLC was used. The chromatographic separation was performed on a Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column gradient eluted with a mobile phase of 0.5% H₃PO₄ (A)-acetonitrile (B), B changed from 10% to 20% in the first 10 min, in the next 20 min, when B changed from 20% to 30%, and in the last 10 min, B changed to 40%. The detection wavelength was set at 326 nm and column temperature was set at 35 °C. The FTIR spectrums, the second-order derivative spectrogram and the two-dimensional infrared correlation spectrograms were used. **Result:** Buddleoside was linear within the range of 0.262-5.24 μg ($r = 0.999\ 91$). The average recovery was 98.75%, with RSD 1.02% ($n = 5$). There were differences of samples on the second-order derivative spectrogram of Flos Chrysanthemi Indici. in 1 700-1 400 cm⁻¹ and the two-dimensional infrared correlation spectrograms could be classified between frequency range 1 800-800 cm⁻¹. **Conclusion:** The method was accurate, repetable and suitable to determine buddleoside from Flos Chrysanthemi Indici. The method can be used for quality control of Flos Chrysanthemi Indici. IR spectrum can also be used to identify the flavonoids from Flos Chrysanthemi Indici.

[收稿日期] 20100511(001)

[基金项目] 河南中医学院博士科研基金 (BSJJ2009-11)

[第一作者] 吴明侠, 女, 博士, 副教授, 研究方向中药质量分析, Tel: 13613801926, E-mail: mxwu711@163.com

[通讯作者] * 张贵君, 博导, 从事组分中药及中药药效组分质量评价体系研究、中药鉴定方法学研究, E-mail: guijunzhang@163.com

[Key words] HPLC; Fourier transform infrared spectroscopy; Flos Chrysanthemi Indici; buddleioside

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序,具有清热解毒、疏风明目之功效,其主要成分为总黄酮,研究表明黄酮类化合物具有抗炎、抗病毒、抗氧化、扩张血管及消除体内自由基等药理作用^[1]。目前对野菊花中黄酮类成分含量的研究多是对蒙花苷^[2-3]、木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷^[4]及木犀草素^[5-6]等成分进行测定,而且多是利用有机溶剂对其进行提取,传统中药临床多以水煎液入药,因此水提取液中所含成分及其含量是反映中药质量优劣的关键。

本文选择不同产地的野菊花为研究载体,探讨其水提取液中蒙花苷含量,并将其中蒙花苷含量与其 IR 图谱进行对比分析,探讨野菊花中蒙花苷含量不同,在 IR 图谱中是否亦有差别,旨在为中药药效组分分析方法的建立提供科学数据,为野菊花质量标准的建立提供方法和思路。

1 材料

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序(张贵君教授鉴定)。蒙花苷对照品(批号 111528-200605)购自中国药品生物制品检定所。乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为屈臣氏纯净水,溴化钾为分析纯。

Agilent 1100 高效液相色谱仪(HP 真空脱气泵,HP 四元泵,HP 自动进样器,HP 柱温箱,HP DAD 检测器)。Spectrum GX 型傅里叶变换红外光谱仪(PerkinElmer 公司),光谱范围 4 000 ~ 400 cm^{-1} ,中红外 DTGS 检测器,光谱分辨率为 4 cm^{-1} ,扫描信号累加 16 次。扫描实时扣除 H_2O 和 CO_2 的干扰。变温附件为北京市朝阳区自动化仪表厂的 CKW-II 型程序升温仪,Portable Controller 可编程温度控制单元(50-886 型 Love Control 公司)。升温速度 2 $^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2 方法和结果

2.1 液相色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 相为 0.5% 磷酸水溶液, B 相为乙腈,进行梯度洗脱,在 0 ~ 10 min, B 相从 10% 线性改变至 20%, 10 ~ 30 min, B 相从 20% 线性改变至 30%; 30 ~ 40 min, B 相从 30% 线性改变至 40%;流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长 326 nm;柱温 35 $^\circ\text{C}$ 。对照品及供试品色谱图见图 1。

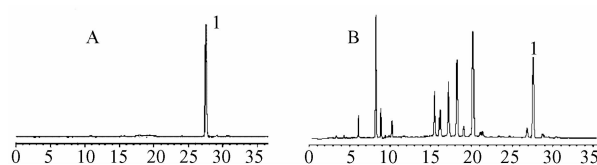


图 1 野菊花高效液相色谱

A. 蒙花苷对照品; B. 野菊花样品

2.2 供试样品的制备 取不同产地野菊花样品 20 g,精密称定,加 25 倍量水浸泡 10 min,煎煮 2 次,每次 20 min,滤过,滤渣用水洗涤 2 次,合并水提液浓缩至适量,置冻干机中制成冻干粉,收集冻干粉,精密称定质量,计算提取率。结果如下河南漯河 21.09%、安徽金寨 27.96%、湖北罗田 32.70%、安徽青山 26.38%、安徽梅山 28.59%。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取蒙花苷对照品 2.62 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,作为对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 取不同产地野菊花冻干粉约 0.5 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加水溶解,并稀释至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.5 线性关系的考察 精密吸取对照品溶液 1, 5, 10, 15, 20 μL ,按上述色谱条件测定峰面积;以峰面积积分值(A)为纵坐标,进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程分别为 $Y = 1.95 \times 10^3 X + 54.14$, $r = 0.99991$;结果表明,蒙花苷在 0.262 ~ 5.24 μg 呈现良好的线性。

2.6 重复性试验 精密称取同一产地供试样品 5 份,按 2.4 项下方法制备供试品,按 2.1 项下色谱条件测定含量。蒙花苷的平均含量为 0.5169%;RSD 为 1.36%。

2.7 精密度试验 精密吸取对照品溶液 10 μL ,重复进样 5 次,测定峰面积,RSD 为 0.99%。

2.8 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 5 μL ,分别于配制后 0, 3, 6, 9, 12 h 测定色谱峰峰面积。蒙花苷的 RSD 为 1.65%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.9 回收率试验 取已测定含量的安徽金寨野菊花药材 5 份,每份 0.8 g,精密称定,分别精密加入对照品适量,加 25 mL 水煎煮 2 次,每次 20 min,滤过,滤渣洗涤 2 次,合并滤液,浓缩至 10 mL,经 0.45 μm

微孔滤膜滤过,按 2.1 项下色谱条件进行测定,计算各自的量。结果见表 1。

表 1 蒙花苷回收率试验

样品量 /g	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.811 3	4.340 5	3.72	8.057 5	99.92		
0.800 5	4.282 7	3.66	7.874 3	98.13		
0.795 2	4.254 3	3.93	8.167 4	99.57	98.75	1.07
0.801 5	4.288 0	4.12	8.304 6	97.49		
0.800 9	4.284 8	4.18	8.407 1	98.62		

2.10 样品的含量测定 分别精密称定不同产地野菊花冻干粉,按 2.4 项下方法制备供试品,按 2.1 项下测定,进样量为 5 μ L,测定峰面积,计算蒙花苷的含量。不同产地野菊花中蒙花苷含量(原药材中质量分数, $n=5$)分别为:河南漯河(市售)0.322 7%, RSD 2.02%;安徽金寨(市售)0.535 0%, RSD 1.85%;湖北罗田(市售)0.441 9%, RSD 1.74%;安徽青山(晒干)1.078 0%, RSD 1.90%;安徽梅山(晒干)1.561 8%, RSD 1.38%。

2.11 不同产地野菊花的红外光谱分析 取样品粉末约 3 mg 与 200 mg 溴化钾(碎晶)混合研磨充分均匀,压片测定,对其一维红外光谱图、二阶导数谱和二维相关红外光谱进行分析。结果表明在整体上看不同的野菊花样品红外光谱有着许多共同的特征,这是由它们包含很多同样的化学成分所决定的。

样品的区别可以在二阶导数谱 1 700 ~ 1 400 cm^{-1} 处,以及二维相关红外光谱 1 800 ~ 800 cm^{-1} 处鉴定出来。结果见图 2 ~ 4。

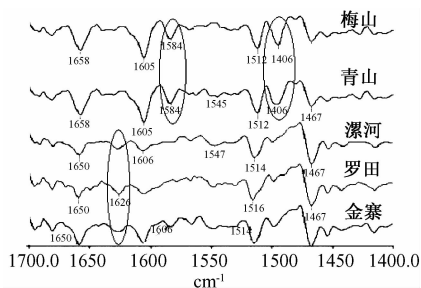


图 2 野菊花样品的二阶导数红外光谱(1 700 ~ 1 400 cm^{-1})

5 个样品中 1 659, 1 626, 1 606 cm^{-1} 3 个吸收峰各有不同。Qingshan、Meishan 中基本看不到 1 626 cm^{-1} 这个峰,而在其他 3 个样品中 1 626 cm^{-1} 峰的强度基本一致。1 659 cm^{-1} 和 1 606 cm^{-1} 这 2 个吸收峰在 Luotian, Luohu, Jinzhai, Qingshan, Meishan 5

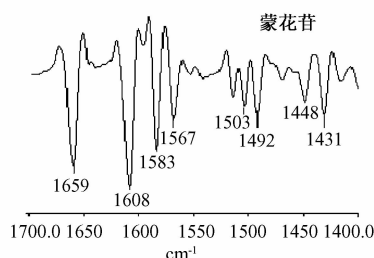


图 3 蒙花苷对照品的二阶导数红外光谱(1 700 ~ 1 400 cm^{-1}) 个样品中强度依次增加。同时 Qingshan、Meishan 中 1 584, 1 496 cm^{-1} 这两个峰格外明显。而在蒙花苷对照品二阶导数谱中, 1 659, 1 608, 1 583 cm^{-1} 和 1 492 cm^{-1} 是蒙花苷的特征峰,由此可以认为 Qingshan、Meishan 中蒙花苷相对含量明显高于其他 3 个样品,这一点在 HPLC 分析结果中可以得到验证。

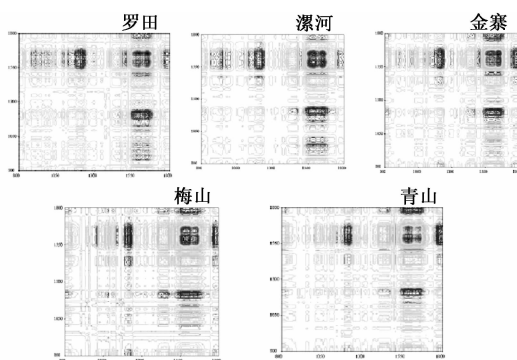


图 4 不同产地野菊花样品二维红外光谱

在二维相关红外光谱(1 800 ~ 800 cm^{-1}) 中,野菊花样品的自动峰基本都出现在 1 650, 1 590, 1 450, 1 215 cm^{-1} 以及 1 000 ~ 900 cm^{-1} 附近,主要是黄酮苷类及糖类的吸收区域。自动峰和交叉峰形成 4 \times 4 的对称分布,其中 1 650, 1 590 cm^{-1} 两峰为正相关,1 650 ~ 1 590 cm^{-1} 附近的峰与 1 450 cm^{-1} 呈正相关,而 1 215 cm^{-1} 附近的峰与其余 3 个自动峰呈负相关。

不同之处在于青山和梅山野菊花样品中 1 650 cm^{-1} 峰明显弱于 1 590 cm^{-1} 峰,而在另外几个样品中 1 650 cm^{-1} 峰略强于 1 590 cm^{-1} 峰或者两峰强度基本一致。二维红外光谱再次说明青山、梅山两个样品中高含量的蒙花苷造成的影响。

3 讨论

目前对野菊花的质量控制,多是测定其中蒙花苷、绿原酸等化学成分的含量,并且多是以有机溶剂来提取,以便尽可能多的提出野菊花原药材中的这些成分,并未考虑临床上的有效性。本研究则是对

临床上切实有效的水煎剂进行研究,对其中蒙花苷含量进行测定,并与其 IR 光谱相比较。

市售野菊花多是炒后晒干,而采集的青山、梅山样品未经炒制直接晒干制成,其中蒙花苷含量明显高于市售样品。2010 年版《中国药典》中野菊花项下是以蒙花苷作为其质量控制指标,因此关于野菊花的炮制方法还有待进一步研究规范。

青山、梅山样品中蒙花苷含量较其他样品高,在其二阶导数光谱中 $1\ 584, 1\ 496\ \text{cm}^{-1}$ 这 2 个峰格外明显,且在二维相关红外光谱中 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 峰明显弱于 $1\ 590\ \text{cm}^{-1}$ 峰,这些是否可以作为蒙花苷含量高低的依据还有待深入探讨。

不同产地野菊花由于其所含黄酮类成分的种类及其含量的不同,在二阶导数光谱及二维相关红外光谱中均存在这显著的差异。因此采用 IR 光谱技术可以作为野菊花质量控制的辅助手段,既能客观反映野菊花内在物质基础,又能在宏观上有效控制其整体质量,达到快速鉴别的目的。

[参考文献]

- [1] 李沙沙,史新元,展晓日,等. 沙漠嘎子中总黄酮及圣草酚-7-甲醚、异樱花素的含量测定[J]. 中华中医药杂志,2009,24(9):1223.
- [2] 陈蕾,朱霓虹. HPLC 法测定野菊花中蒙花苷的含量[J]. 中国药事,2005,19(2):97.
- [3] 谭晓杰,贾英,陈晓辉,等. RP-HPLC 法测定野菊花中蒙花苷含量[J]. 沈阳药科大学学报,2004,21(6):434.
- [4] 谭晓杰,贾英,李清,等. RP-HPLC 法同时测定野菊花中木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷和蒙花苷[J]. 中草药,2006,37(8):1261.
- [5] 钱频非,葛滨,王殿广. 高效液相色谱法测定野菊花中木犀草素的含量[J]. 中国药房,2005,16(22):1741.
- [6] 杨柳,李俐,雷基祥,等. 不同品种菊花和贵州产野菊花中木犀草素的含量比较[J]. 中国野生植物资源,2009,28(1):67.

[责任编辑 顾雪竹]