

HPLC-DAD 法测定野菊不同部位中蒙花苷和绿原酸的量

吴雪松¹, 王 娇², 许 浚³, 张铁军^{3*}, 陈常青^{3*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津医科大学, 天津 300070

3. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 检测野菊不同部位(花、叶、嫩茎、老茎)中蒙花苷和绿原酸的量, 为野菊各部位质量评价提供理论依据和检验手段。方法 采用 HPLC-DAD 法测定, 色谱柱为 Thermo C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.05%磷酸为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 327 nm。结果 蒙花苷在 0.15~3.00 μg ($r=0.999\ 0$), 绿原酸在 0.01~0.20 μg ($r=0.999\ 5$) 与峰面积呈良好的线性关系, 平均回收率分别为 98.17%、97.99%; 野菊叶中蒙花苷量较高, 野菊花中绿原酸量较高, 茎中各成分量最低。结论 本法操作简便, 结果准确, 可用于野菊不同部位的质量控制, 定量测定结果显示野菊各部位均存在蒙花苷和绿原酸, 但质量分数差异较大。

关键词: 野菊; 不同部位; 蒙花苷; 绿原酸; HPLC-DAD 法

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)11-1634-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.025

Determination for contents of linarin and chlorogenic acid in different parts of *Chrysanthemum indicum* by HPLC-DAD

WU Xue-song¹, WANG Jiao², XU Jun³, ZHANG Tie-jun³, CHEN Chang-qing³

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To analyze the contents of linarin and chlorogenic acid in different parts such as flowers, leaves, young stems, and old stems of *Chrysanthemum indicum*. To provide the theoretical basis and analysis method for the quality evaluation of different parts of *C. indicum*. **Methods** Thermo C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution in the gradient elution by HPLC-DAD. The flow rate was 1 mL/min, the column temperature was set at 30 ℃, and the detective wavelength was 327 nm. **Results** The linear response of linarin ranged from 0.15 to 3.00 μg ($r = 0.999\ 0$), and that for chlorogenic acid was from 0.01 to 0.20 μg ($r = 0.999\ 5$), the average recovery was 98.17% and 97.99%, respectively. The content of linarin from the leaves was higher, the content of chlorogenic acid from the flowers was higher, and the content of each component in the stems was the lowest. **Conclusion** The method is convenient, and the result is accurate and can be used for the quality control of different parts of *C. indicum*. The results of content determination indicate that there are linarin and chlorogenic acid in all different parts of *C. indicum*, but the mass fractions were obviously different.

Key words: *Chrysanthemum indicum* L.; different parts; linarin; chlorogenic acid; HPLC-DAD

野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 为菊科植物, 全草入药, 具有清热解毒的功效, 可用于治疗流行性感、脑脊髓膜炎、高血压病、肝炎、痢疾、毒蛇咬伤等^[1]。现代研究表明其主要含有黄酮、有机酸、挥发油和萜类等成分, 且具有心脏保护、抗血

小板聚集、抗微生物和镇痛抗炎等药理作用^[2]。野菊既是临床常用中药材, 也是珍菊降压片、野菊花注射液等许多中成药的重要原料, 其野生资源丰富, 受原植物品种、产地、加工方法等因素影响, 不同来源的药材质量差异较大。黄酮类和酚酸类成分是

收稿日期: 2014-01-19

作者简介: 吴雪松 (1989—), 男, 天津中医药大学中药专业硕士研究生, 研究方向为中药复方制剂。

E-mail: wxs-1989@163.com Tel: (022)23006843

*通信作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: tiejunzh2000@yahoo.com.cn

陈常青 Tel: (022)23006829 E-mail: chencq@tjipr.com

野菊清热解毒的主要药效组分,相关学者多以蒙花苷为代表的黄酮类和以绿原酸为代表的有机酸类成分为定量测定指标,来评价药材质量^[4-5]。也有学者建立了野菊花的高效液相指纹图谱^[6],为药材整体质量控制提供了参考,但研究多集中在花序部位,而花占野菊整个地上植株质量不足 1/5。为进一步研究有效成分分布情况,本实验对野菊花的花、叶、嫩茎、老茎不同部位分别测定蒙花苷和绿原酸量,以期对现行质量标准进行补充和提高,为野菊资源的综合开发利用提供参考。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪 (UV6000LP 二极管阵列检测器, AS3000 型进样器, OV—2001 型柱温箱,均为赛默飞世尔科技公司); AB204—N 型万分之一天平 (Mettler Toledo 公司); AS3120 型超声仪 (奥特宝恩斯仪器有限公司); XMTB 型水浴锅 (巩义市予华仪器有限公司)。

野菊药材购自辽宁、陕西,经天津药物研究院张铁军研究员鉴定为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥地上部分;蒙花苷 (又名柳穿鱼苷) 对照品为自制,质量分数大于 97%;绿原酸对照品购自中国食品药品检定研究院;甲醇 (分析纯,天津康科德科技有限公司);磷酸 (分析纯,天津市化学试剂三厂);乙腈 (色谱纯,天津康科德科技有限公司);水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取蒙花苷、绿原酸对照品适量于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定量稀释成含蒙花苷 0.75 mg/mL,含绿原酸 0.05 mg/mL 的对照品储备液。精密量取各对照品储备液 5 mL,置同一 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释到刻度,摇匀,得混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

将干燥的野菊药材以花、叶、嫩茎、老茎为不同部位分开,粉碎,过 40 目筛,混合均匀,各精密称定 0.25 g,置于 100 mL 圆底烧瓶中,精密量取 70% 甲醇 50 mL,称取总质量,水浴加热回流 2 h,放冷,称其质量,用甲醇补齐质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液为供试液。

2.3 色谱条件

Thermo C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;检测波长 327 nm;柱温 30 °C;体积流量 1 mL/min;进样体积: 10 μL;流动相为乙腈 (A) -0.05% 磷酸

水溶液 (B),梯度洗脱,0~5 min, 9%~19% A; 5~17 min, 19%~21% A; 17~35 min, 21%~34% A; 35~45 min, 34%~42% A; 45~50 min, 42%~90% A。HPLC 色谱图见图 1。

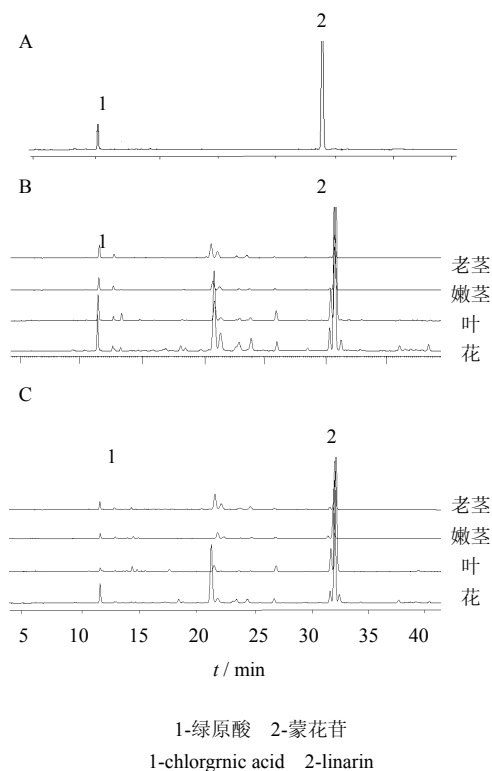


图1 混合对照品 (A)、辽宁样品 (B)、陕西样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), Liaoning samples (B), and Shaanxi samples (C)

2.4 线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液 1、2、4、8、16、20 μL 进样,测定峰面积,记录数据。以各成分峰面积平均值为纵坐标 (Y),进样质量为横坐标 (X) 进行线性回归,得回归方程:蒙花苷 $Y=25\,315X-9\,478.8$, $r=0.999\,0$,绿原酸 $Y=29\,608X+638.25$, $r=0.999\,5$;结果表明蒙花苷在 0.15~3.00 μg,绿原酸在 0.01~0.20 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 10 μL,连续进样 6 次,计算蒙花苷、绿原酸峰面积的 RSD 分别为 1.02%、1.23%。

2.6 稳定性试验

取辽宁产野菊花样品,按“2.2”项方法制备供试品溶液,分别在 0、2、4、6、12、24 h 进样 10 μL,计算蒙花苷、绿原酸峰面积的 RSD 分别为 0.77%、0.54%。

2.7 重复性试验

取辽宁产野菊花样品6份,按“2.2”项方法制备供试品溶液,进样测定,计算蒙花苷、绿原酸质量分数的RSD分别为1.55%、1.34%。

2.8 加样回收率试验

精密称取辽宁产野菊花样品6份,分别加入蒙花苷、绿原酸对照品储备液各13 mL,按“2.2”项方法制备供试品溶液,按样品测定法计算回收率,蒙花苷、绿原酸的平均回收率分别为98.17%、97.99%,RSD分别为1.27%、0.91%。

2.9 样品测定

取辽宁、陕西2个产地野菊花的花、叶、嫩茎、老茎共8个样品,按“2.2”项方法制备供试品溶液,按“2.3”项色谱条件进样测定各样品蒙花苷、绿原酸量,对照品及样品色谱图见图1,测定结果见表1。

表1 样品测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of samples ($n=3$)

样品		质量分数 / %	
		蒙花苷	绿原酸
辽宁	花	4.02	0.26
	叶	4.69	0.20
	嫩茎	0.69	0.11
	老茎	0.42	0.11
陕西	花	2.26	0.19
	叶	2.99	0.05
	嫩茎	0.55	0.04
	老茎	0.32	0.03

3 讨论

3.1 流动相的选择

选用乙腈-2%冰乙酸、甲醇-2%冰乙酸、甲醇-0.05%磷酸、甲醇-0.1%甲酸等流动相系统进行梯度洗脱,由于峰形差、拖尾、分析过长等因素的影响,最后选择乙腈-0.05%磷酸作为流动相,基线平稳、峰形较好、保留时间适中。

3.2 检测波长

本实验采用二极管阵列检测器进行200~400 nm全谱测定,蒙花苷的最大吸收波长为327 nm和334 nm,绿原酸为327 nm,故选择对蒙花苷、绿原酸均有较好响应的波长327 nm作为检测波长,各峰吸收均匀,分离度较好,方法学考察结果表明该波长下试验方法精密、稳定、准确。

3.3 提取溶剂和方法的选择

在实验过程中考察了分别以100%、70%、50%甲醇超声提取30 min,结果表明50%甲醇提取绿原酸量高,然而蒙花苷量低,100%甲醇提取蒙花苷量高而绿原酸量低,因而选用70%甲醇为提取溶剂。又考察了以70%甲醇为溶剂超声和加热回流的提取情况,结果表明加热回流2 h提取完全。

3.4 二极管阵列检测器峰纯度分析

采用二极管阵列检测器检测蒙花苷和绿原酸成分峰的纯度,测定结果表明,其峰纯度分别为99.13%、99.02%;三点光谱图完全重合,表明主成分峰为单一物质峰。

3.5 结果分析

根据含量测定结果可以看出,野菊花和叶中活性成分质量分数较高,茎中质量分数较低,这与本实验出膏率测定结果相一致。其中辽宁产野菊的叶部位蒙花苷质量分数高达4.69%,提示野菊叶可能具有较高的药用价值,或开发作为天然蒙花苷的制备原料;而陕西产野菊的叶部位绿原酸质量分数较低,为0.05%,与茎中质量分数相当,这可能因为作为供试品进行提取时,该野菊的叶部位已经老化并枯萎泛黄,导致绿原酸质量分数较低,提示老叶和新叶的化学成分质量分数也具有一定的差异。

根据各部位色谱图对照结果可以看出,野菊花、叶、嫩茎和老茎4个部位所含化学成分的种类大致相同,但在质量分数上差异较大。

参考文献

- [1] 丁宝章,王遂义.河南植物志(第3册)[M].郑州:河南省科学技术出版社,1997.
- [2] 蔡华芳.野菊花的化学成分及药用研究进展[J].中国医疗前沿,2007,18(2):118-120.
- [3] 李国栋,陈园园,王盼,等.野菊花中萜类和黄酮类化合物保肝作用研究[J].中草药,2013,44(24):3510-3514.
- [4] 郭美兰,敬迎春,蔡国琴.RP-HPLC同时测定野菊花中绿原酸、木犀草苷和蒙花苷的含量[J].中国现代中药,2012,14(4):10-13.
- [5] 何小珍,郭玉,徐小娜,等.野菊不同部位绿原酸和3,5-二咖啡酰奎尼酸的含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(11):72-75.
- [6] 敬迎春,郭美兰,蔡国琴,等.野菊花反相高效液相色谱指纹图谱的建立及品质评价[J].国际药学研究杂志,2012,39(3):246-250.