

野菊花的质量标准研究

樊高洁, 李淑敏, 张 珊, 徐丽华, 周佳慧, 刘文亚, 毕跃峰*

郑州大学药学院, 河南 郑州 450001

摘要: 目的 以黄酮类化合物蒙花苷和倍半萜类化合物豚草素 A 为指标成分, 对不同产地的野菊花药材进行定性定量研究, 提高野菊花的质量标准。方法 采用薄层色谱法 (TLC) 对蒙花苷和豚草素 A 进行定性分析; 采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定蒙花苷和豚草素 A 的量; YMC C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) - 0.05%磷酸水溶液 (B); 梯度洗脱, 0~18 min, 25%~26% A; 18~26 min, 26%~32% A; 26~33 min, 32%~34% A; 33~35 min, 34%~40% A; 35~65 min, 40%~50% A; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 203、340 nm; 柱温 35 ℃。结果 蒙花苷和豚草素 A 的 TLC 鉴别特征较为明显, 不同产地二者的量有所不同, 其中信阳野菊花药材中蒙花苷和豚草素 A 的量最高, 分别为 6.53% 和 0.81%。结论 首次建立了野菊花药材不同类指标成分的 TLC 和 HPLC 法测定综合评价方法, 该方法简单、准确、重复性好, 研究表明蒙花苷和豚草素 A 的量能够反映野菊花药材的品质, 为提高野菊花现有的质量标准提供了科学的实验依据。

关键词: 野菊花; 蒙花苷; 豚草素 A; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 质量标准

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)19-4073-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.027

Quality standard of *Chrysanthemum indicum*

FAN Gao-jie, LI Shu-min, ZHANG Shan, XU Li-hua, ZHOU Jia-hui, LIU Wen-ya, BI Yue-feng

Pharmacy College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective To improve the quality standard of *Flos Chrysanthemum Indicum* from different origins by analyzing on linarin and cumambrin A qualitatively and quantitatively. **Methods** Qualitative analysis of linarin and cumambrin A was carried out by thin layer chromatography (TLC); Content determination of linarin and cumambrin A was using high performance liquid chromatography (HPLC) on YMC C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); The mobile phase was a mixture of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution; The elution mode was gradient system (0—18 min, 25%—26% A; 18—26 min, 26%—32% A; 26—33 min, 32%—34% A; 33—35 min, 34%—40% A; 35—65 min, 40%—50% A); The flow rate was 0.8 mL/min; The detection wavelengths were 203 nm and 340 nm; The column temperature was 35 ℃. **Results** Linarin and cumambrin A by TLC was obvious. The contents of linarin and cumambrin A in *Flos Chrysanthemum Indicum* from different origins were different. The contents of linarin and cumambrin A from Xinyang were the highest (6.53% and 0.81% respectively). **Conclusion** It is the first time to establish a method to evaluate different components in *Flos Chrysanthemum Indicum* by TLC and HPLC. The method is simple, accurate and reproducible, which can effectively improve the existing quality standard of *Flos Chrysanthemum Indicum*. The result also showed Linarin and cumambrin A could reflect the quality of *Flos Chrysanthemum Indicum*.

Key words: *Flos Chrysanthemum Indicum*; linarin; cumambrin A; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; quality standard

野菊花为菊科植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序, 广泛分布于我国大部分省市。野菊花为传统中药, 《名医别录》记载其“性

微寒、味苦、辛, 归肝肺二经, 具有清热解毒、清肝明目的功效^[1], 富含黄酮类、倍半萜类、有机酸类、挥发油类等化学成分^[2], 临床主要用于疗疮疖

收稿日期: 2017-04-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30973872); 河南省科技攻关计划项目 (162102310128)

作者简介: 樊高洁 (1989—), 女, 在读硕士, 研究方向为天然药物化学。Tel: 18937103020 E-mail: 18937103020@163.com

*通信作者 毕跃峰 (1969—), 女, 研究生导师, 教授, 研究方向为天然药物化学及天然健康产品研发。

Tel: 13939091607 E-mail: 2000byf@sina.com

肿、目赤肿痛、头晕目眩等症状的治疗^[3]。

《中国药典》2015 年版中野菊花药材的质量控制主要包括性状、薄层鉴别、蒙花苷定量测定等^[3]。本课题组前期通过对野菊花药材进行深入的研究,发现并得到了 1 个具有抗乙肝病毒、肝保护双功效的活性部位^[4]。该部位主要活性成分为黄酮类化合物(如蒙花苷、芹菜素、刺槐素等)和倍半萜类化合物(如豚草素 A、野菊花内酯等)^[5-7],其中倍半萜类化合物起主要的抗病毒作用;而且研究也发现倍半萜类化合物豚草素 A 随着野菊花药材品质的不同而不同^[8],因此本课题组认为野菊花药材质量控制指标成分应增加倍半萜类成分。本研究首次以黄酮类化合物蒙花苷和倍半萜类化合物豚草素 A 为指标成分,对 5 个不同产地的野菊花药材进行定性定量分析,以提高和完善野菊花药材现有的质量标准,指导野菊花药材的开发利用和临床应用。

1 材料与仪器

1.1 材料

野菊花来自 5 个产地,包括河南省南阳(S1)、济源(S2)、信阳(S3)和山东(S4)、安徽(S5),均由郑州大学潘成学副教授鉴定为菊科菊属植物野菊 *Chrysanthemum indicum* L. 的干燥头状花序,保存于郑州大学药学院标本馆。对照品蒙花苷、豚草素 A 为实验室提取分离(质量分数>98%)。醋酸乙酯、二氯甲烷、无水乙醇、磷酸为分析纯,甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水。

1.2 仪器

Waters 高效液相系统(e2695 Separation Module, 2489 UV Detector, Empower 色谱工作站);FW177 中药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司);三用紫外分析仪(上海康华生化仪器制造厂);RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);KQ5200E 超声清洗机(昆山市超声仪器有限公司);JBIT5374-1991 电子分析天平(上海奥豪斯仪器有限公司);1000 mL 玻璃砂芯过滤装置(天津津腾实验设备有限公司);硅胶 G 薄层色谱板(青岛化工);双槽展开缸(上海信谊仪器厂有限公司);0.22 μm 有机系微孔滤膜、0.22 μm 有机系微孔滤头(天津津腾实验设备有限公司)。

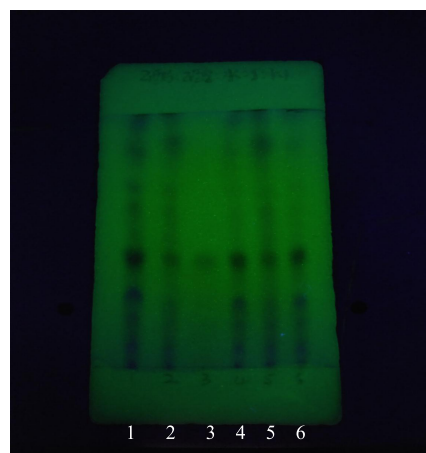
2 方法与结果

2.1 野菊花中蒙花苷和豚草素 A 的薄层鉴别

2.1.1 蒙花苷薄层鉴别 野菊花药材粉碎后过 3 号药筛,称取粉末 5 g 至锥形瓶中,加入甲醇 50 mL,超声提取 30 min,再进行抽滤。提取 3 次,合并滤

液,将滤液浓缩成膏。取浸膏 10 mg,加甲醇 1 mL 超声溶解,作为供试品溶液。另取蒙花苷对照品 2 mg,加甲醇 1 mL 超声溶解,作为对照品溶液。用毛细管吸取供试品溶液和对照品溶液,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以醋酸乙酯-乙醇-水(5:1:1)为展开剂,饱和 20 min,展开,取出,用吹风机吹干,在紫外灯(254 nm)下观察。供试品色谱中,与对照品色谱在相同的位置上,显示相同的荧光斑点,见图 1。结果表明不同产地野菊花均含有蒙花苷。

2.1.2 豚草素 A 薄层鉴别 取野菊花供试品溶液和豚草素 A 对照品溶液适量,配制方法同“2.1.1”项,以二氯甲烷-醋酸乙酯(7:1)为展开剂,喷茴香醛-浓硫酸显色。供试品色谱中,与对照品色谱在相同的位置上,显相同的颜色,见图 2。结果表明不同产地野菊花均含有豚草素 A。



1-S1 2-S2 3-蒙花苷 4-S3 5-S4 6-S5
1-S1 2-S2 3-linarin 4-S3 5-S4 6-S5

图 1 不同产地野菊花和蒙花苷的薄层色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of Flos Chrysanthemum Indicum and linarin



1-S1 2-S2 3-豚草素 A 4-S3 5-S4 6-S5
11-S1 2-S2 3-cumambrin A 4-S3 5-S4 6-S5

图 2 不同产地野菊花和豚草素 A 的薄层色谱图

Fig. 2 TLC chromatogram of Flos Chrysanthemum Indicum and cumambrin A

2.2 野菊花中蒙花苷和豚草素 A 的 HPLC 测定

2.2.1 供试品溶液的制备 野菊花药材粉碎后过 3 号药筛,称取粉末 5 g 至锥形瓶中,加入甲醇 50 mL 超声提取 30 min,再进行抽滤。提取 3 次,合并滤液,将滤液浓缩成膏。取浸膏 5.5 mg 定容至 10 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解。使用时溶液用 0.22 μm 微孔滤头滤过,即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称定对照品蒙花苷 5.0 mg、豚草素 A 4.8 mg,分别放至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容超声溶解。取蒙花苷 5 mL、豚草素 A 2 mL 至 25 mL 量瓶中,加甲醇定容,得蒙花苷的质量浓度为 98.8 $\mu\text{g/mL}$ 、豚草素 A 的质量浓度为 37.9 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。再依次精密量取 0.5、1、

2、4、8、10 mL 定容至 10 mL 量瓶中。使用时溶液用 0.22 μm 微孔滤头滤过,即得含蒙花苷、豚草素 A 的混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件与系统适用性试验 选用 YMC C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);以乙腈(A)-0.05% 磷酸(B)为流动相,梯度洗脱:0~18 min, 25%~26% A; 18~26 min, 26%~32% A; 26~33 min, 32%~34% A; 33~35 min, 34%~40% A; 35~65 min, 40%~50% A; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 203、340 nm; 进样量 10 μL , 色谱图见图 3。

2.2.4 线性范围考察 取“2.2.2”项下的 6 种混合对照品溶液,分别进样 10 μL ,按“2.2.3”项色谱

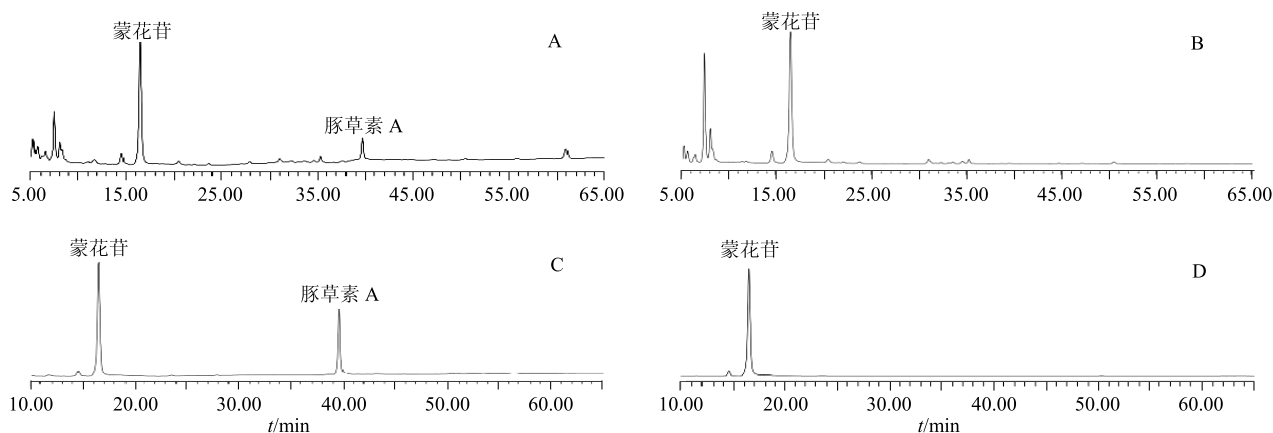


图3 野菊花供试品 (A, B) 和混合对照品 (C, D) 203 nm 波长 (A, C), 340 nm (B, D) 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of *Flos Chrysanthemum indicum* (A and B) and reference substances (C and D, linarin and cumambrin A) at 203 nm (A and C) and 340 nm wavelength (B and D), respectively

条件依次进样测定,以对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线。蒙花苷的线性回归方程为 $Y=18\,878\,X-15\,454$,线性范围为 4.94~98.80 $\mu\text{g/mL}$, R^2 为 0.999 9;豚草素 A 的线性回归方程为 $Y=33\,488\,X-3\,642$,线性范围为 4.94~98.80 $\mu\text{g/mL}$, R^2 为 0.999 8。结果显示,蒙花苷和豚草素 A 在其线性范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 取野菊花药材同一供试品溶液(S1),按“2.2.3”项色谱条件进样分析,连续进样 6 次,测得蒙花苷、豚草素 A 的峰面积并分别计算质量分数, RSD 分别为 0.44%、1.51%。

2.2.6 稳定性试验 取野菊花药材供试品溶液(S1),按“2.2.3”项色谱条件进样分析,分别于 0、2、4、8、10、12、24 h 进样,测定蒙花苷、豚草素 A 的峰面积, RSD 分别为 0.79%、0.84%,表明供

试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取野菊花药材(S1)按“2.2.1”项方法平行制备供试品溶液 5 份,按“2.2.3”项色谱条件进样分析,测定蒙花苷、豚草素 A 的峰面积, RSD 分别为 1.62%、0.94%。

2.2.8 加样回收率试验 精密称定已测定量的野菊花药材粉末 9 份,每 3 份一组,每份约 10 mg。分别按样品中蒙花苷、豚草素 A 含有量的 80%、100%、120%精密加入对照品,按“2.2.1”项方法平行制备供试品溶液,按“2.2.3”项色谱条件进样分析,测得加样回收率分别为 100.3%、99.8%, RSD 值分别为 2.03%、2.17%。

2.2.9 样品测定 5 批野菊花药材粉末按照“2.2.1”项制备供试品溶液,每个产地各配制 3 份,按“2.2.3”项色谱条件进样分析,测定峰面积,计算蒙花苷和豚草素 A 的量,取平均值,定量测定结果见表 1。

表 1 蒙花苷和豚草素 A 的测定结果

Table 1 Content determination results of linarin and cumambrin A

批次	蒙花苷/%	豚草素 A/%
S1	6.24	0.66
S2	5.02	0.75
S3	6.53	0.81
S4	4.79	0.47
S5	6.19	0.61

结果表明,不同产地野菊花均含有蒙花苷和豚草素 A,而且是野菊花的主要成分,不同产地二者的量有所不同。化学成分受采集时间、地点、储存时间和方法的影响,从色泽和测定结果表明,在同样条件下,河南野菊花以信阳野菊花品质较优。

3 讨论

《中国药典》2015 年版以蒙花苷为野菊花药材的指标性成分,并规定其量不得少于 0.8%。本课题组研究发现野菊花中倍半萜类化合物也是主要的活性成分,豚草素 A 在倍半萜类的量较高,且为抗病毒的活性成分。故本实验以黄酮类化合物蒙花苷和倍半萜类化合物豚草素 A 为指标成分,不同类指标成分综合评价野菊花药材的品质,完善其质量标准,使其更加全面、准确、可靠。

采用薄层色谱法对野菊花药材进行定性分析,《中国药典》中蒙花苷的薄层鉴别所用展开剂为醋酸乙酯-丁酮-三氯甲烷-甲酸-水(15:15:6:4:1),该展开剂用了 5 相,配制复杂,操作不方便,并且丁酮、三氯甲烷毒性较大。本实验蒙花苷展开剂选用醋酸乙酯-乙醇-水(5:1:1),简单、环保、低毒。蒙花苷喷茴香醛-浓硫酸显淡黄色斑点,而在紫外灯 254 nm 下斑点清晰,更有利于观察。豚草素 A 的展开剂选择中尝试了石油醚-醋酸乙酯、石油醚-丙酮、三氯甲烷-甲醇等系统,其中出现了拖尾、斑点不清晰、上下分离性不好等问题,最终确定二氯甲烷-醋酸乙酯(7:1)为豚草素 A 的展开剂。茴香醛-浓硫酸对倍半萜类化合物显色良好,所以选用该显色剂。蒙花苷和豚草素 A 的薄层色谱鉴别,斑点圆整、明显,分离度好,Rf 值适宜。

HPLC 法对野菊花药材中蒙花苷和豚草素 A 的

量进行定量分析,分别对流动相、柱温、体积流量、波长、洗脱梯度等条件进行了摸索,确定了上述进样条件。对于中药材分析,在水相中加入少量的磷酸,可以改善峰形,减少拖尾等问题。相应地升高柱温、降低体积流量可以使相邻色谱峰分离更好。在波长的选择上,黄酮类化合物在 203、340 nm 均可出峰,而萜类化合物仅在 203 nm 出峰,所以采用双波长的测定方法。野菊花药材的色谱图峰形对称,无拖尾、堆积,峰与峰之间分离度较好,计算出的蒙花苷和豚草素 A 在野菊花药材中的量更加准确。

5 个不同产地的野菊花药材中蒙花苷和豚草素 A 的量差异不是很大,蒙花苷的量均大于 0.8%,符合《中国药典》2015 年版的规定。其中信阳产地野菊花药材中蒙花苷和豚草素 A 的量相对较高,药材品质较佳;同时前期研究工作发现,野菊花倍半萜类化合物随存储时间增加而量降低^[8],初步研究结果建议野菊花药材保存期不超过 2 年。本实验所建立的方法准确可靠、重复性好,并且更加全面,为提高野菊花现有的质量标准提供了科学依据,对野菊花药材进行合理的开发利用奠定了基础。

参考文献

- [1] 全国中草药汇编组. 全国中草药汇编 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975.
- [2] 毕跃峰, 裴珊珊, 田野. 野菊花研究进展 [J]. 河南中医学院学报, 2007, 133(22): 83-85.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 毕跃峰, 李国栋, 陈园园, 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.
- [5] 毕跃峰, 潘成学, 王普菊, 等. 野菊花化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(12): 894-897.
- [6] 毕跃峰, 贾 陆, 孙孝丽, 等. 野菊花化学成分研究 (II) [J]. 中国药学杂志, 2010, 45(13): 980-983.
- [7] Bi Y F, Jia L, Shi S P, et al. New sesquiterpenes from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. [J]. *Helv Chim Acta*, 2010, 93(10): 1953-1959.
- [8] Bi Y F, Fu L, Wang P, et al. High performance liquid chromatography time of flight electrospray ionization mass spectrometry for quantification of sesquiterpenes in *Chrysanthemi indicis* Flos active extract [J]. *Pharm Magaz*, 2015, 11(44): 740-744.