

· 基础研究 ·

款冬花欧盟质量标准研究[△]相婷¹, 吴丽真¹, 郑璐^{1*}, 周海燕²

(1. 扬子江药业集团有限公司 国家中医药管理局中药质量控制实验室, 江苏 泰州 225321;

2. 中国中药公司, 北京 100195)

[摘要] 目的: 根据《欧洲草药植物专论研究指导原则》建立款冬花药材的质量标准, 主要包括薄层鉴别方法和含量测定方法。方法: 薄层鉴别选用款冬酮作为指标成分, 以环己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂, 展开后喷以硫酸乙醇试液加热显色, 置于紫外灯 365 nm 下检视; 含量测定采用 YMC-Pack ODS-A 色谱柱, 甲醇-水为流动相, 梯度洗脱, 柱温: 35 ℃, 流速: 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长: 220 nm。结果: 薄层鉴别方法专属性强, 主成分条带清晰, 辨识度高; 含量测定方法学结果表明款冬酮在 3.074 ~ 153.7 μg·mL⁻¹内线性关系良好($r=0.999\ 9$), 平均回收率为 99.9% (RSD=2.0%), 重复性、中间精密度、稳定性及耐用性考察 RSD 均小于 2.0%。结论: 本研究建立的薄层色谱鉴别方法和含量测定方法可准确测定款冬花中款冬酮的含量, 为《欧洲药典》款冬花专论提供研究数据。

[关键词] 款冬花; 欧洲药典; 款冬酮; 薄层鉴别; 含量测定

Research on Quality Standard of Farfarae Flos for EP Monograph

XIANG Ting¹, WU Lizhen¹, ZHENG Lu^{1*}, ZHOU Haiyan²

[1. Yangtze River Pharmaceutical(Group) Co., Ltd., The National Key Institute of TCM Quality Control, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the P. R. China(NKI-TCM), Jiangsu Taizhou 225321, China;

2. China National Traditional Chinese Medicine Corp., Beijing 100195, China]

[Abstract] **Objective:** To establish the quality standard of Farfarae Flos mainly including TLC method and HPLC determination method, according to the technical guide for the elaboration of EP monographs. **Methods:** Tussilagone was selected as the marker constituent in the TLC identification method. After developing with cyclohexane-ethyl acetate(4:1), the plate was sprayed with alcoholic solution of sulfuric acid Reagent and heated, and then examined under 365 nm UV light. In the HPLC determination method, a YMC-Pack ODS-A chromatographic column was used for the separation, with the mobile phase of methanol-water in a gradient elution procedure. The column temperature was set at 35 ℃, the flow rate was set as 0.8 mL·min⁻¹ and the wavelength was set at 220 nm. **Results:** The TLC identification method was established with good specificity, and the fluorescent zone of tussilagone was clearly detected with high distinguishing degree. **Results:** of HPLC method validation showed that the determination method kept good linearity($r=0.999\ 9$) in the concentration range of 3.074-153.7 μg·mL⁻¹ for tussilagone. The average recovery was 99.9% (RSD = 2.0%), RSDs of repeatability, intermediate precision, stability and robustness test were no more than 2.0%. **Conclusion:** In this paper, a sensitive TLC identification method and an accurate HPLC determination method were established for the quality control of Farfarae Flos, which provided useful research data for EP monograph.

[Keywords] Farfarae Flos; European Pharmacopeia; tussilagone; TLC identification; determination.

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.4.006

款冬花为菊科植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 具有润肺下气、止咳化痰之功效, 用于治

疗新久咳嗽、喘咳痰多和老嗽咳血等症^[1]。款冬花中主要含有萜、黄酮和生物碱等类成分^[2]。现代药

[△] [基金项目] 国家中医药管理局中医药行业科研专项(201307002)

* [通信作者] 郑璐, 高级工程师, 研究方向: 中药欧盟质量标准; E-mail: zhengl@yangzijiang.com

理学研究表明,款冬花醇提物具有明显的镇咳祛痰作用^[3];款冬酮能显著增加外周作用,具有较强的升压作用^[4];另有实验证明款冬酮具有较强的抗过敏和抗炎作用^[5-6]。本研究以款冬酮为指标性成分,按照《欧洲草药植物专论研究指导原则》建立款冬花药材的薄层鉴别方法和 HPLC 含量测定方法,为《欧洲药典》款冬花专论的质量标准草案提供详细的研究资料。

1 仪器与试药

瑞士 CAMAG 薄层成像系统;美国安捷伦 1200 高效液相色谱仪(G1322A 脱气机, G1312A 二元高压泵, G1367B 自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315D 紫外检测器和 ChemStation 色谱工作站);KQ-250B 型超声清洗仪;瑞士梅特勒 XP205DR 型分析天平。

款冬酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111884-201102);15 批款冬花样品购自河北安国市中药材市场,经中国药科大学李会军教授鉴定为款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾,样品信息见表 1。

HPLC 分析用甲醇为色谱纯;TLC 分析用乙醇、乙酸乙酯、环己烷和硫酸等试剂均为分析纯;纯化水(杭州娃哈哈集团有限公司);TLC 分析用硅胶 G 板(德国默克公司,10 cm×20 cm)。

表 1 15 批款冬花样品信息

样品编号	植物拉丁名	产地	批号
S01	<i>Tussilago farfara</i>	甘肃	20131102
S02	<i>Tussilago farfara</i>	四川	20131103
S03	<i>Tussilago farfara</i>	浙江	20131104
S04	<i>Tussilago farfara</i>	东北	20131105
S05	<i>Tussilago farfara</i>	河南	20131106
S06	<i>Tussilago farfara</i>	山西	20131107
S07	<i>Tussilago farfara</i>	新疆	100003963
S08	<i>Tussilago farfara</i>	甘肃	20130410
S09	<i>Tussilago farfara</i>	河北	131023
S10	<i>Tussilago farfara</i>	安徽	20140201
S11	<i>Tussilago farfara</i>	河北	20140202
S12	<i>Tussilago farfara</i>	甘肃	20140203
S13	<i>Tussilago farfara</i>	江苏	20140204
S14	<i>Tussilago farfara</i>	河北	20140205
S15	Open flowers of <i>Tussilago farfara</i>	河北	201311

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

取款冬花药材粉末(过 50 目筛)约 1 g,精密称

定,加 20 mL 乙醇,超声 1 h 后过滤,滤液蒸干,残渣溶解于 1 mL 乙酸乙酯中,即得供试品溶液。另取款冬酮对照品约 1 mg,精密称定后溶解于 1 mL 乙醇溶液中,即得对照品溶液。吸取以上供试品溶液和对照品溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层色谱板上,条带点样,以环己烷-乙酸乙酯(4:1, V/V)为展开剂,展距不小于 8 cm,展开后取出晾干,喷以硫酸乙醇试液显色,置于紫外灯 365 nm 下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显示相同颜色的荧光条带,见图 1。

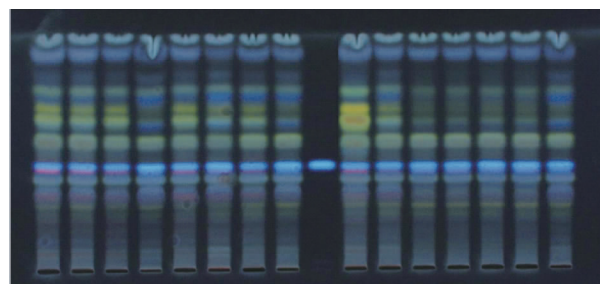


图 1 15 批款冬花薄层鉴别色谱图
注:1~8. S01~S08 号样品;9. 款冬酮;10. S15;11~16. S09~S14 号样品。

图 1 15 批款冬花薄层鉴别色谱图

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: YMC-Pack ODS-A (150 mm×4.0 mm, 5 μ m);流动相 A: 水,流动相 B: 甲醇;按程序梯度洗脱(0~15 min, 25% A; 15~16 min, 25% A→0% A; 16~25 min, 0% A);流速为 0.8 mL·min⁻¹;柱温为 35℃;检测波长为 220 nm;进样量为 10 μ L。

2.2.2 制备溶液

2.2.2.1 空白溶液 乙醇溶液。

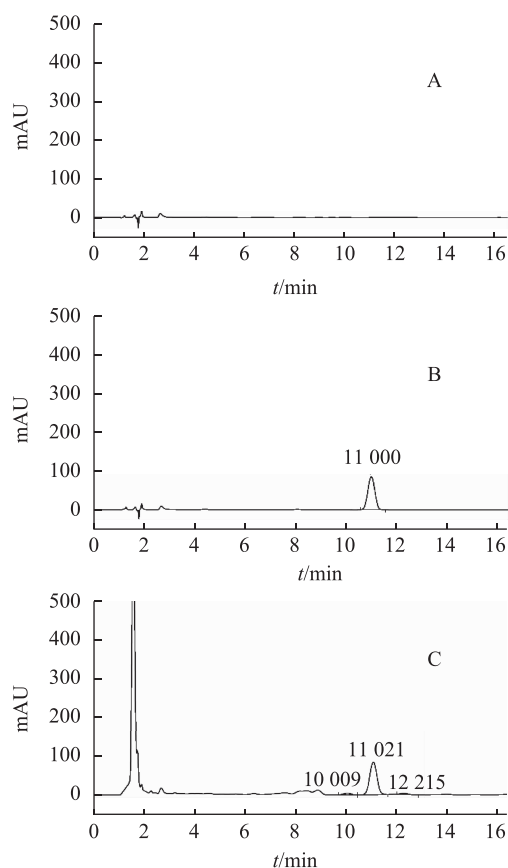
2.2.2.2 对照品溶液 取款冬酮对照品约 13.0 mg,精密称定,置于 10 mL 容量瓶中,用乙醇溶解并定容至刻度,摇匀,精密吸取上述溶液 1 mL,乙醇稀释定容至 25 mL,即得。

2.2.2.3 供试品溶液 取款冬花药材粉末(过 50 目筛)约 1.000 g,精密称定,置于具塞容量瓶中,精密加入 20 mL 乙醇后称重,室温下超声提取 1 h,冷却后补足损失的重量,摇匀,过滤,收集续滤液,即得。

2.2.2.4 空白供试品溶液 不加入款冬花药材,按照 2.2.2.3 项下供试品溶液制备方法进行操作,即得。

2.2.2.5 对照品供试品混合溶液 分别量取适量的供试品溶液和空白供试品溶液,1:1 等体积混合,即得。

2.2.3 系统适用性试验 按照2.2.2分别制备空白溶液、对照品溶液和供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进行测定,记录色谱,见图2。结果显示对照品连续进样5针,峰面积RSD=0.05%,对照品和供试品溶液中款冬酮色谱峰的对称因子在0.95~1.05,理论塔板数均不小于6000,款冬酮色谱峰与前后杂质峰分离度均大于1.50,提示该色谱系统适用性良好。



注: A. 空白溶液; B. 款冬酮对照品溶液; C. 供试品溶液。

图2 款冬花及对照品溶液 HPLC 图

2.2.4 专属性试验 按照2.2.2项下溶液制备方法分别制备空白溶液、对照品溶液、供试品溶液、空白供试品溶液和对照品供试品混合溶液,按2.2.1项下色谱条件进行测定,记录色谱。结果显示空白溶液和空白供试品溶液对主色谱峰无干扰,对照品供试品混合溶液中主色谱峰峰形无裂分,提示该方法专属性良好。

2.2.5 线性关系考察

2.2.5.1 对照品线性关系考察 取款冬酮对照品约15.0 mg,精密称定,溶解于50 mL乙醇溶液,作为

母液。分别精密量取适量上述母液,稀释配制成质量浓度为3.074、6.148、15.37、46.11、76.85、153.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。按2.2.1项下色谱条件进行测定,记录色谱。以质量浓度(X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性拟合,得回归方程 $Y=29.37X+0.590$ ($r=0.9999$)。结果表明,款冬酮在3.074~153.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.5.2 供试品线性关系考察 分别取款冬花药材粉末(过50目筛)约0.20、0.40、0.60、1.00、1.50、2.00 g,精密称定,按照2.2.2.3方法制备得到一系列不同质量分数的供试品溶液。按2.2.1项下色谱条件对以上供试品溶液进行测定,记录色谱。以质量分数(X ,%)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性拟合,得回归方程 $Y=15.06X+7.415$ ($r=0.9999$)。结果表明,供试品在0.2026~2.0051 g线性关系良好。

2.2.6 重复性试验 分别取款冬花药材粉末(过50目筛)约0.50、1.00、1.50 g(相当于50%、100%、150%3个质量分数水平)各6份样品,精密称定。按照2.2.2.3方法制备18份供试品溶液,按2.2.1项下色谱条件进行测定,记录色谱。结果款冬酮含量在低、中、高3个质量分数水平下RSD值分别为0.88%、0.84%、0.99%,提示该方法重复性良好。

2.2.7 中间精密度试验 另外一名操作者取款冬花药材粉末(过50目筛)约1.00 g,平行6份样品,精密称定。按照2.2.2.3方法制备6份供试品溶液。按2.2.1项下色谱条件用另外一台高效液相色谱仪Agilent 1260进行测定,记录色谱。结果两名操作者不同仪器上测得款冬酮含量的RSD值为1.28%,提示该方法中间精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 分别取2.2.2.2和2.2.2.3项下对照品和供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、18、24 h时按2.2.1项下色谱条件进行测定,记录色谱。结果对照品和供试品峰面积的RSD值分别为0.12%和0.24%,提示对照品和供试品在乙醇溶液中24 h内稳定性良好。

2.2.9 加样回收试验 取已知含量的款冬花药材粉末(过50目筛)约0.50 g,平行9份样品,分为3组,分别加入3个质量分数水平(50%、100%、150%)的款冬酮对照品。按照2.2.2.3方法制备得到9份供试品溶液。按2.2.1项下色谱条件进行测定,记录色谱并计算加样回收率,结果见表2。

表 2 款冬花中款冬酮加样回收率试验结果($n=9$)

取样量 /g	样品中 量/ μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0.501 1	521.75	249.23	759.95	95.6	99.9	2.0
0.500 9	521.54	249.23	766.93	98.5		
0.500 3	520.92	249.23	767.98	99.1		
0.500 1	520.71	498.46	1 019.34	100.0		
0.500 4	521.02	498.46	1 028.20	101.7		
0.501 6	522.27	498.46	1 017.59	99.4		
0.501 7	522.38	747.68	1 280.18	101.4		
0.500 4	521.02	747.68	1 273.31	100.6		
0.500 3	520.92	747.68	1 287.52	102.5		

2.2.10 耐用性试验 本研究中耐用性试验是通过单变量分析法(OVAT)微调测试条件中的单个变量观察结果的不受影响程度,改变色谱条件变量(流速、流动相比、柱温、检测波长和色谱柱),结果表明该方法耐用性良好,具体数据见表 3。

表 3 色谱条件耐用性结果

色谱条件		款冬酮质量 分数(%)		RSD (%)
		1	2	
流速/ $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0.7	0.104	0.104	0.13
	0.8	0.104	0.104	
	0.9	0.104	0.104	
流动相比 (甲醇-水)	77:23	0.104	0.103	1.28
	75:25	0.103	0.103	
	73:27	0.101	0.101	
柱温/ $^{\circ}\text{C}$	33	0.104	0.104	0.57
	35	0.104	0.104	
	37	0.105	0.105	
检测波长/nm	218	0.104	0.104	0.13
	220	0.104	0.104	
	222	0.104	0.104	
色谱柱	YMC-pack ODS-A (150 mm $\times$ 4.0 mm, 5 μm)	0.099	0.099	0.37
	Welch Ultimate XB-C ₁₈ (150 mm $\times$ 4.0 mm, 5 μm)	0.099	0.100	

2.2.11 样品含量测定 取 14 批次款冬花样品适量,按照 2.2.2.3 项下方法制备供试品溶液,再按 2.2.1 项下色谱条件进行测定,双样双针,记录色谱并计算样品含量,结果见表 4。

表 4 款冬花样品中款冬酮含量测定结果($n=2$)

样品编号	产地	款冬酮质量分数(%)
S01	甘肃	0.12
S02	四川	0.10
S03	浙江	0.12
S04	东北	0.15
S05	河南	0.13
S06	山西	0.17
S07	新疆	0.09
S08	甘肃	0.14
S09	河北	0.10
S10	安徽	0.13
S11	河北	0.12
S12	甘肃	0.12
S13	江苏	0.12
S14	河北	0.10

3 讨论

3.1 薄层条件筛选与优化

2015 版《中华人民共和国药典》中款冬花薄层鉴别方法为采用硅胶 GF254 板,以石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)-丙酮(6:1)为展开剂,展开自然晾干后直接置于紫外灯 254 nm 下检视。然而实验发现款冬酮在 254 nm 波长下未见有明显的暗斑,对照品和样品在该条件下均不具有较好的辨识度。后经摸索发现采用硅胶 G 板展开后用硫酸乙醇显色剂进行加热显色后再置于紫外灯 365 nm 下检视,款冬酮呈现清晰的蓝色荧光条带。因欧洲草药委员会专家提出各国生产石油醚沸程存在较大差异,建议用其他溶剂作为展开剂,经调整最终确定环己烷-乙酸乙酯(4:1)作为展开剂。

3.2 含量测定条件筛选与优化

本研究对款冬酮的含量测定提取方法进行了摸索与优化,比较了不同提取方法(超声、回流和冷浸)、提取溶剂量(10、20、30 mL)和提取时间(30、60、90 min)对含量测定结果的影响,最终确定最佳提取条件为 20 mL 乙醇溶液超声提取 1 h。色谱条件方面比较了不同流动相比、柱温、流速和检测波长对色谱峰的影响,最终确定最佳色谱条件:流动相为甲醇-水(75:25),柱温为 35 $^{\circ}\text{C}$,流速为 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为 220 nm。

(下转第 517 页)

3 讨论

本文采用高效液相色谱法建立了刺玫果的指纹图谱,标定出10个共有峰,并根据对照品指出其中4个,18批刺玫果与对照图谱匹配相似度较高。但因仅凭相似度结果无法准确鉴定刺玫果的产地来源,参考各共有峰之间的差异,本实验再通过聚类分析和主成分分析对18批刺玫果进行统计学分析。其中,聚类分析将不同基原的刺玫果药材分为4大类,如吉林安图、黑龙江伊春和河北承德的刺玫果聚为一类,东北小兴安岭、东北大兴安岭和辽宁葫芦岛的刺玫果聚为一类,安徽亳州产的刺玫果与其他均不能聚为一类,这可能与刺玫果生长环境(产地、气候、土壤等)有关。利用主成分分析,得到了3个主成分,累计方差贡献率为73.432%,其中,第3个主成分经对照品比对得知是没食子酸,其余两个主成分未知,还需结合质谱等手段进一步确定。模式识别中,聚类分析和主成分分析的结果基本一致,并可以与相似度结果相互验证。

本文在前文基础上重新优化了HPLC色谱条件^[7],色谱条件更简单易行。主要侧重用聚类分析和主成分分析法对不同产地刺玫果的质量进行评价,主成分分析能筛选出共有的特征成分,与聚类分析结合使用,发挥各自优势,弥补了单纯用相似度评价指纹图谱的不足,可多角度综合评判刺玫果药材的质量。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第37卷[M]. 北京:科学出版社,1985:402.
- [2] 程东岩,王隶书,范艳君,等. 刺玫果总黄酮纯化工艺研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(3):664-665.
- [3] 钟方丽,王晓林,薛健飞,等. 刺玫果化学成分的研究[J]. 林产化学与工业,2014,34(4):126-130.
- [4] 南京中医药大学. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1837-1838.
- [5] 王领弟,李艳荣,张晓峰,等. 刺玫果的研究近况[J]. 承德医学院学报,2011,28(4):416-417.
- [6] 韩竞,金哲雄. 刺玫果的药理作用及临床应用概况[J]. 黑龙江医药,2014,27(1):106-108.
- [7] 崔凤侠,王领弟,杜义龙,等. 刺玫果提取物指纹图谱构建及4种成分含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(7):93-96.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:467.
- [9] 王璠,欧阳臻,郭兰萍,等. 苍术综合化学模式识别[J]. 中国中药杂志,2014,39(13):2536.
- [10] 沈莉,赵燕燕,谢洪平,等. 升麻的¹H-NMR指纹图谱-模式识别研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(2):217.
- [11] 吴玲芳,林琛,袁永兵,等. 叶下珠指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药,2014,45(5):652-658.
- [12] 李效贤,熊耀康,余陈欢,等. 高效液相色谱指纹图谱法分析南方红豆杉药材的氯仿提取物[J]. 色谱,2010,28(11):1067-1070.

(收稿日期 2016-07-06)

(上接第503页)

综上所述,本研究建立的薄层鉴别和含量测定方法可灵敏检测并准确测定款冬花中款冬酮的含量,为《欧洲药典》款冬花专论提供详细的研究数据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:332-333.
- [2] 刘可越,张铁军,高文远,等. 款冬花的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2006,31(22):1837-1841.

- [3] 凌珊,易炳学,龚千锋,等. 生品和蜜炙款冬花不同提取物的镇咳祛痰作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):187-190.
- [4] 李一平,王筠默. 款冬酮对清醒狗和失血性休克狗血流动力学的影响[J]. 药学报,1987,22(7):486-490.
- [5] 李艳芳,陈雪园,熊卫艳,等. 款冬酮抗过敏作用研究[J]. 中国新药杂志,2015,24(13):1517-1522.
- [6] Li W, Huang X, Yang X W. New sesquiterpenoids from the dried flower buds of *Tussilago farfara* and their inhibition on NO production in LPS-induced RAW264. 7 cells [J]. *Fitoterapia*, 83(2):318-322.

(收稿日期 2016-07-01)