

不同种质红花药材的高效液相色谱法指纹图谱研究

张戈, 郭美丽*, 张汉明, 苏中武

(第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究不同种质红花药材的指纹图谱。 **方法:** 采用高效液相色谱法(HPLC)对分布于我国 11 个省份的红花药材(共 36 份样品)进行色谱分离, 色谱条件: Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.5% 磷酸水溶液梯度洗脱, 运行时间为 60 min; 流速 1.0 ml/min; 检测波长 265 nm; 室温为 20℃。使用“中药指纹图谱工作站”(第二军医大学药学院药物分析学教研室等编制)进行数据处理, 对不同种质红花药材进行聚类分析, 并对其相似度进行分析。 **结果:** 来自我国 11 个省份的不同种质红花药材可以聚为两类, 生长于西北地区的红花品种之间相似度较高; 生长于中部、南部地区的红花品种之间相似度较高。红花种质药材的指纹图谱相似度差别明显。 **结论:** 红花种质化学组成差异显著, 固定种质来源对保障红花质量的稳定性极为重要。

[关键词] 红花; 色谱法, 高效液相; 指纹图谱

[中图分类号] R 282.71

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2006)03-0280-04

Study on high-performance liquid chromatographic fingerprints of different germplasms of *Flos Carthami*

ZHANG Ge, GUO Mei-li*, ZHANG Han-ming, SU Zhong-wu (Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the high-performance liquid chromatographic (HPLC) fingerprints of different germplasms of *Flos Carthami*. **Methods:** HPLC was applied in chromatographic separation of 36 different germplasms of *Flos Carthami* collected from 11 provinces of China. The chromatography condition was: Agilent Zorbax C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 mm); mobile phase: CAN, 0.5% H₃PO₄ (from 10:90 to 80:20); running time: 60 min; flow speed: 1.0 ml/min; detection wavelength: 265 nm; and temperature: 20℃. The data were processed by Chromatographic Fingerprint Station designed by Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University. Different germplasms of *Flos Carthami* were subjected to cluster analysis and their similarity was also evaluated. **Results:** The different germplasms of *Flos Carthami* in this study were grouped into 2 chemical types. Samples from northwest of China were of high similarity; samples from the middle China were of high similarity to those from South China. The similarity of some germplasms of *Flos Carthami* was significantly different. **Conclusion:** The chemical components of different germplasms of *Flos Carthami* are obviously different from each other; selection of germplasm is very important in quality control of *Flos Carthami*.

[KEY WORDS] *Flos Carthami*; chromatography, high pressure liquid; chromatographic fingerprint

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 280-283]

红花(*Flos Carthami*)为菊科一年生草本植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥管状花, 是传统的活血化瘀中药, 具有活血通经、散瘀止痛之功效^[1]。现代医学认为红花可以抗凝、防止血栓形成、扩张血管活性, 有效防治心脑血管疾病^[2]。目前, 《中国药典》(2005 版)规定以红花中羟基红花黄色素 A 和山柰素的含量来作为评价红花药材质量的标准^[3]。而近年来, 指纹图谱技术已被用于中药的质量控制及鉴定, 其优点在于可以比较全面地反映中药复杂的化学成分及其相对比例^[4]。本实验中采用高效液相色谱法(HPLC)法, 对不同种质红花药材进行了指纹图谱研究。

1 方法和结果

1.1 仪器和材料 Agilent1100 高效液相色谱仪,

紫外可变波长检测器, Agilent1100 化学工作站, 羟基黄色素 A(纯度 98.6%)与山柰酚-3-O-芸香糖苷(纯度 99.5%)均为自行提取、纯化得到。红花不同种质 1~22 号来自国家种质资源库, 23~36 号为自选品种, 并由本教研室郭美丽副教授鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥管状花(表 1)。磷酸、甲醇为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为双蒸水。

1.2 色谱条件 色谱柱: Agilent Zorbax C₁₈ 柱(Agilent 公司, 4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.5% 磷酸水溶液梯度洗脱, 运行时间为 60

[基金项目] 国家自然科学基金(30271588). Supported by National Natural Science Foundation of China(30271588).

[作者简介] 张戈, 博士生。

* Corresponding author. E-mail: mlguo@smmu.edu.cn

min,梯度洗脱程序:0~5 min 10%~15%乙腈;5~15 min 15%~20%乙腈;15~35 min 20%~40%乙腈;35~55 min 40%~80%乙腈;55~60 min 为80%乙腈;流速:1.0 ml/min;检测波长:265 nm;进样量:20 μ l;室温:20 $^{\circ}$ C。

1.3 数据处理软件 采用“中药指纹图谱工作站”(第二军医大学药学院药物分析学教研室等编)进行数据处理,将多个色谱图进行比较,采用中位数法进行相似度评价,并采用欧式距离-最大距离法对各红花种质进行聚类分析。

表1 红花种质资源来源

Tab 1 Sources of different germplasms of *Flos Carthami*

No.	Name	Locality	No.	Name	Locality
S1	Hami Youci	Xinjiang	S19	Hefei Honghua	Anhui
S2	Hami Wuci	Xinjiang	S20	Wuzhong Honghua	Ningxia
S3	Jimusa'er Wuci	Xinjiang	S21	Yuyao Honghua	Zhejiang
S4	Tacheng Wuci	Xinjiang	S22	Wuci Dahongpao	He'nan
S5	Ruoqiang Wuci	Xinjiang	S23	Self-select line	Xinjiang
S6	Ruoqiang Youci	Xinjiang	S24	Self-select line	Xinjiang
S7	Zhangye Wuci	Gansu	S25	Self-select line	Xinjiang
S8	Zhangye Youci	Gansu	S26	Self-select line	Xinjiang
S9	Yanjin Dahongpao	He'nan	S27	Weishan Honghua	Yunnan
S10	Wuchong	Ningxia	S28	Jiayang Honghua	Sichuan
S11	Xinxiang Honghua	He'nan	S29	Self-select line	Xinjiang
S12	Heze Honghua	Shandong	S30	Self-select line	Xinjiang
S13	Ruicheng Honghua	Shanxi	S31	Self-select line	Xinjiang
S14	Shulu Honghua	Hebei	S32	Self-select line	Xinjiang
S15	Heze Wuci	Shandong	S33	Self-select line	Xinjiang
S16	Qixian Honghua	He'nan	S34	Self-select line	Xinjiang
S17	Bozhou Honghua	Anhui	S35	Self-select line	Xinjiang
S18	Yutai Honghua	Shandong	S36	Self-select line	Xinjiang

1.4 供试品溶液的制备 取红花样品0.4 g,精密称定,加入50%甲醇液10 ml,密闭浸泡24 h后超声提取20 min,提取液经微孔滤膜(直径0.45 μ m)滤过,待测。

1.5 样品分析 将待测红花样品提取液按上述色谱条件进行高效液相色谱法 HPLC-VWD 测定,记录60 min 色谱图,利用中药指纹图谱工作站将所得色谱图进行相同色谱峰匹配,结果见图1。并将所得结果进行相似度分析和聚类分析,结果分别见图2及图3。

1.6 稳定性、精密度和重现性试验 取红花样品供试品溶液分别在制备后即刻、2、6、12、24 h 检测指纹图谱,结果显示各色谱峰的相对保留时间和峰面积基本一致,峰面积 RSD=1.82%,表明供试品溶液在24 h内稳定。另取此溶液连续进样3次,检测指纹图谱,结果显示各色谱峰的相对保留时间和峰面积基本一致,峰面积 RSD=0.84%。另取该红花样品3份,精密称定按供试品溶液制备方法制备供试品,检测指纹图谱,结果显示各色谱峰的相对保留时间和峰面积基本一致,峰面积 RSD=1.06%。试验结果表明该实验方法精密度和重现性良好。

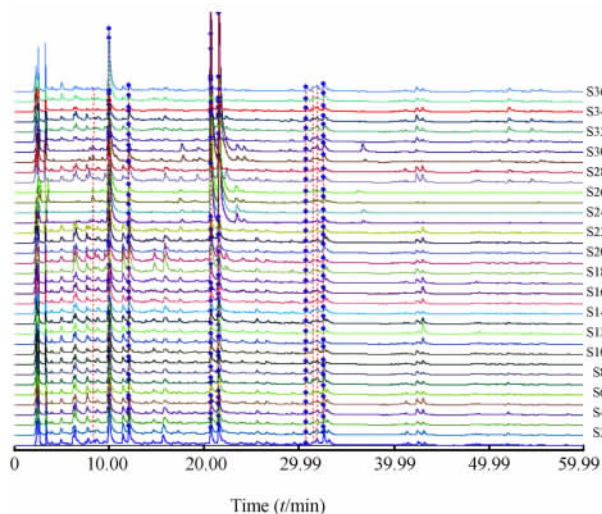


图1 不同种质红花 HPLC 指纹图谱

Fig 1 Chromatographic fingerprints of different germplasms of *Flos Carthami*

2 讨论

由于红花中主要含黄酮类成分,包括黄酮及其苷类^[5]、查耳酮及其苷类^[6],且药理活性研究表明,羟基黄色素 A 和山柰酚-3-O-芸香糖苷为其主要活性成分^[7,8],同时在红花中的含量也较高,因此选择羟基黄色素 A 和山柰酚-3-O-芸香糖苷为对照品。

红花中所含成分复杂且极性范围跨度较大,采用固定的洗脱剂洗脱时效果很不理想,所以采用梯度洗脱方式洗脱。由于红花中所含黄酮成分较多,呈弱酸性,故使用酸性缓冲系统。实验中我们比较了乙酸系统和磷酸系统,结果表明使用磷酸系统所得图谱峰形更好,此外还比较了甲醇-磷酸系统和乙

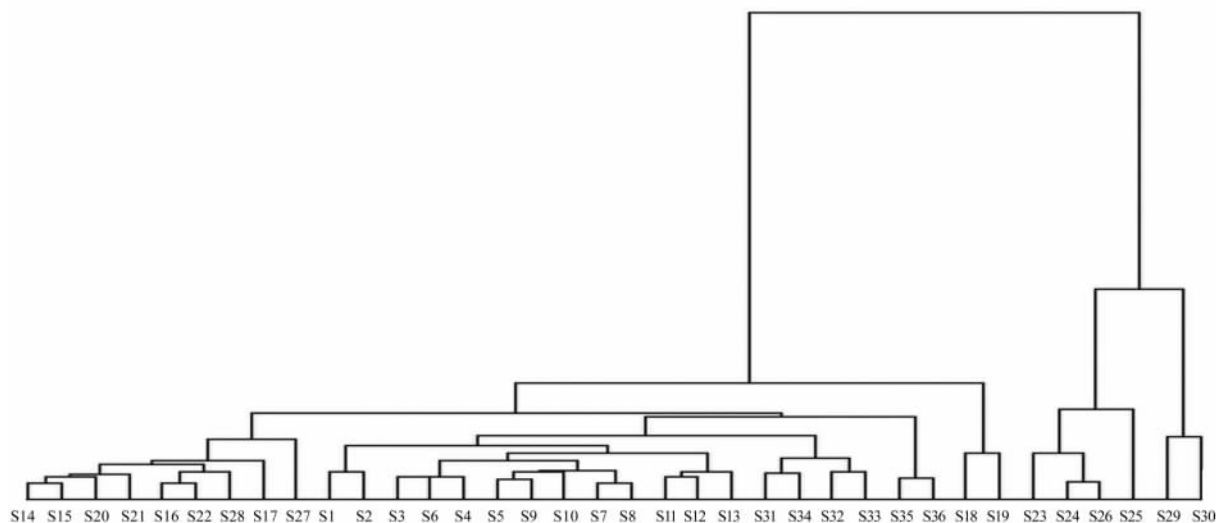


图3 不同种质红花 HPLC 指纹图谱聚类分析结果

Fig 3 Cluster analysis of different germplasms of *Flos Carthami*

腈-磷酸系统,结果显示乙腈-磷酸系统的分离度更好,所以确定了乙腈-磷酸水溶液系统为流动相。

在相同洗脱条件下分别考察了 220、265、300、360、400 nm 波长处的色谱图,结果显示在 265 nm 下色谱信息最为丰富,考虑到红花中的黄酮类化合物较多,并且此类化合物在 265 nm 大多有紫外吸收,所以在实验中选择 265 nm 作为检测波长。

分别比较了水、50%甲醇、纯甲醇对红花药材提取效果的影响。精密称取红花药材 0.4 g,共 3 份,分别加入不同提取溶剂 10 ml,密闭浸泡 24 h 后超声提取 20 min,结果显示 50%甲醇提取液指纹图谱的色谱峰最多。此外还比较了回流法和超声法对红花药材的提取效果,结果显示两种方法对红花药材提取效果的影响相差较小,故确定提取方法为:干燥红花药材加入 25 倍量 50%甲醇,密闭浸泡 24 h 后超声提取 20 min。

本实验利用 HPLC-VWD 建立了不同种质来源的红花药材的指纹图谱,从指纹图谱聚类分析的结果可以看出,36 个不同的红花种质资源可以聚为两大类,其中山柰酚-3-O-芸香糖苷含量高的聚为一类,羟基黄色素 A 含量高的聚为另一类。

从指纹图谱的相似度看,花色浅的红花品种 S23、S24、S25、S26、S29、S30 号之间的相似度较高,两两之间的相似度均 $>95\%$,而这些品种与其他品种间的相似度较低,均 $<75\%$;S18、S19 号品种两者间的相似度较高,而与其他品种间的相似度基本上都在 $70\% \sim 85\%$ 之间;S10~S16 号样品之间的相似度较高,均在 90% 以上。相似度分析的结果与聚类

分析的结果基本一致。

从相似度分析结果与聚类分析结果中可以看出,生长于我国西北地区的红花品种之间相似度较高,而生长于我国中部、南部地区的红花品种之间相似度较高,证实不同种质红花之间存在一定量及质的差异,表明固定种质来源对保障红花质量的稳定性极为重要。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:992.
- [2] 朴永哲,金 鸣. 红花抗心肌缺血研究进展[J]. 中草药, 2001,32:473-475.
- [3] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社, 2005:103.
- [4] 洪筱坤,王智华. 中药数字化色谱指纹谱[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2003. 18-23.
- [5] Hattori M, Huang XL, Che QM, et al. 6-Hydroxykaempferol and its glycosides from *Carthamus tinctorius petals*[J]. Phytochemistry, 1992,31:4001-4004.
- [6] Yin HB, He ZS. A novel semi-quinone chalcone sharing a pyrrole ring C-glycoside from *Carthamus tinctorius*[J]. Tetrahedron Lett, 2000,41:1955-1958.
- [7] Meselhy MR, Kadota S, Momose Y, et al. Two new quinochalcone yellow pigments from *Carthamus tinctorius* and Ca^{2+} antagonistic activity of tinctormine[J]. Chem Pharm Bull, 1993,41:1796-1802.
- [8] 陈文梅,金 鸣,吴 伟,等. 红花黄酮成分抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用[J]. 药理学报, 2001,36:881-885.

[收稿日期] 2005-07-14

[修回日期] 2006-01-19

[本文编辑] 尹 茶