

红花 RP-HPLC 指纹图谱的建立及其质量研究

赵明波¹, 邓秀兰², 王亚玲¹, 卢敏³, 屠鹏飞^{1*}

(1. 北京大学药学院, 北京 100083; 2. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 3. 浙江永宁制药厂, 浙江台州 318020)

摘要: 目的 建立红花 RP-HPLC 指纹图谱分析法, 研究不同产地红花药材的质量。方法 采用梯度洗脱的方法进行色谱分离, 使用“计算机辅助相似度评价软件”进行数据处理, 对不同产地红花药材指纹图谱的相似度进行比较分析。结果 不同产地红花药材指纹图谱相似度较好, 但仍有少数产地的药材指纹图谱中有明显差别。结论 采用 RP-HPLC 方法控制药材的指纹图谱, 方法重现性好, 用于红花的质量评价切实可行。不同产地红花药材化学组成相似, 其相对比例较稳定。

关键词: 红花; RP-HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)03-0212-05

Establishment of chromatographic fingerprint and quality assessment of *Carthamus tinctorius* L. by high performance liquid chromatography

ZHAO Ming-bo¹, DENG Xiu-lan², WANG Ya-ling¹, LU Min³, TU Peng-fei¹

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Zhejiang Yongning Pharmaceutical Factory, Taizhou 318020, China)

Abstract: **Aim** To establish chromatographic fingerprint of *Carthamus tinctorius* L. by RP-HPLC in order to control the quality of *Carthamus tinctorius* L. **Methods** The gradient elution mode was applied in chromatographic separation, and data were analysed by “Computer Aided Similarity Evaluation” software to compare the quality of *Carthamus tinctorius* L. samples from different habitats. **Results** Samples from different habitats were of high similarity, though a few samples showed evident difference in fingerprint graphics. **Conclusion** The RP-HPLC fingerprint method is repeatable, feasible in analysis of *Carthamus tinctorius* L. and can be used in quality assessment of *Carthamus tinctorius* L.. Chemical components in *Carthamus tinctorius* L. samples from various habitats are similar, and their ratios between each other are stable.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; RP-HPLC; chromatographic fingerprint

红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 具有活血通经、散瘀止痛的功效, 是传统的活血化瘀中药^[1]。现代药理研究^[2]表明红花对心血管系统有广泛而显著的作用, 临床疗效确切, 大量用于中成药生产和临床处方。因此, 建立红花药材有

效的质量评价方法, 对不同产地红花药材的质量进行系统的比较研究, 确保红花药材质量稳定, 直接关系到红花相关药品和临床处方的疗效。

近年来, 指纹图谱技术被用于中药的质量控制, 其优点在于可全面反映中药复杂的化学成分及其相对比例, 在大多数中药有效成分尚未阐明的现状下, 仍可有效地表征中药质量。本文采用反相高效液相色谱法, 建立红花药材的指纹图谱, 并对不同来源的红花药材进行比较研究, 为红花的质量控制提供有效方法。

收稿日期: 2003-04-12.

基金项目: 国家经贸委中药材生产扶植资金项目(国经贸医药 2000-56 号)。

* 通讯作者 Tel: 86-10-82802750,

E-mail: pengfeitu@bjmu.edu.cn

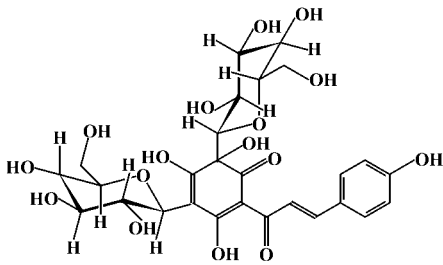
材料与amp;方法

仪器与材料 Waters 600 型高效液相色谱仪, 2996 二极管阵列检测器, Waters Millennium 色谱工作站; 色谱柱 Phenomenex Luna (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm)。羟基红花黄色素 A 由本室分离鉴定, 纯度大于 98%, 红花药材购于各地药店或直接从产地收集, 均由屠鹏飞教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。

色谱条件与系统适用性 以十八烷基键合硅胶为填充剂; 乙腈-0.5%磷酸为流动相梯度洗脱, 运行时间 65 min, 0~55 min 从 0:100 变化到 25:75, 55~65 min 从 25:75 变化到 0:100; 柱温为 25 ℃; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 275 nm; 理论塔板数以羟基红花黄色素 A 计, 不低于 3 000。

数据处理软件 用“计算机辅助相似度评价系统”软件进行数据处理, 将多个色谱图进行比较, 得到可全面反映多个色谱图特征的对照模式色谱图。以此模式为基准, 计算每个色谱图与之相比较的相似度, 并采用相关系数(均数)评价。

对照品的选择 红花主要含黄酮类成分, 包括黄酮及其苷类^[3]、查耳酮及其苷类^[4], 药理活性研究^[5]表明, 羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A) 为其主要活性成分之一, 同时该成分在红花中含量也较高, 因此本文选择羟基红花黄色素 A 作为对照品, 其结构如下:



对照品溶液的制备 精密称取真空干燥 3 h 的羟基红花黄色素 A 对照品适量, 加水制成 0.2 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

流动相的选择 红花药材所含成分复杂且极性范围跨度很大, 等度洗脱很难分离, 故采用梯度洗脱方式。黄酮类成分含有多个酚羟基, 呈弱酸性, 故使用酸性缓冲系统。分别比较了乙酸系统和磷酸系统, 结果使用磷酸系统可得到更好的峰形。又比较了甲醇-磷酸系统和乙腈-磷酸系统, 结果乙腈-磷酸系统分离度更好, 故确定乙腈-磷酸水溶液为流动相。

检测波长考察 采用二极管阵列检测器对检测

波长进行了考察, 分别提取在 220, 254, 275, 360 和 400 nm 波长处的色谱图, 结果在 275 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收, 色谱信息最为丰富, 并且黄酮类化合物在此波长下大多有吸收, 因此, 选择该波长作为检测波长。

提取溶剂的考察 分别比较了水、50%乙醇、95%乙醇、50%甲醇和纯甲醇对红花药材的提取效果。取红花药材 5 份, 每份 10 g, 分别加入 10 倍量的不同溶剂, 加热回流提取 1 h, 提取液滤过。用 HPLC 测定羟基红花黄色素 A 的含量, 分别为 0.676%, 0.488%, 0.498%, 0.002%, 0.014%, 并对指纹图谱进行考察。结果表明水提溶液羟基红花黄色素 A 的含量最高, 指纹图谱中色谱峰最多。

提取方法的考察 分别比较了 50, 70 和 90 ℃ 水浴提取, 超声提取对红花药材的提取效果。取红花药材 4 份, 每份 10 g, 分别在不同温度下提取 1 h, 提取液滤过, 采用 HPLC 测定红花黄色素 A 的含量, 分别为 0.840%, 0.904%, 0.946%, 0.676%, 并对指纹图谱进行考察。结果表明, 90 ℃ 提取的溶液中羟基红花黄色素 A 的含量最高, 指纹图谱中色谱峰最多。根据以上试验结果, 最终确定以水为提取溶剂, 90 ℃ 水浴提取 1 h。

供试品溶液的制备 取本品粉末(过 4 号筛) 2.0 g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 加水 50 mL, 称重, 90 ℃ 水浴中提取 1 h, 称重, 补足减失重量, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 微孔滤膜滤过, 即得。

测定法 分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录 65 min 的色谱图。

结果

1 稳定性、精密度和重现性试验

取样品 h 的供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8 和 24 h 检测指纹图谱。另取此溶液连续进样 5 次, 检测指纹图谱。另取样品 h 5 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。以上结果表明各色谱峰的相对保留时间和峰面积基本一致, 相似度均 > 0.95, 符合指纹图谱的要求。

2 红花药材 HPLC 指纹图谱中的特征峰

根据 31 批不同供试品指纹图谱的检测结果, 总结出供试品中指纹图谱中的典型色谱峰共 36 个, 其中峰 22 为羟基红花黄色素 A 的色谱峰。部分共有峰的峰形为: 2 号峰峰形较宽, 有时表现为多个小峰组成的宽峰; 4 号峰由两小峰组成, 前峰低于后峰, 有时表现为肩峰, 有时可很好分离; 12 号峰由两小

峰组成,前峰低于后峰,有时为一小宽峰;14号峰峰形较宽,或见肩峰;20,21号峰为两组峰,均有多个小峰组成,峰形常有小的变化;22号峰为最高峰,为羟基红花黄色素A的色谱峰;23号峰形较宽,或有

肩峰;35号峰,有时为单峰,有时为双峰;以样品药材指纹图谱为例(图1),各峰保留时间,相对于22号色谱峰的相对保留时间和峰面积见表1。

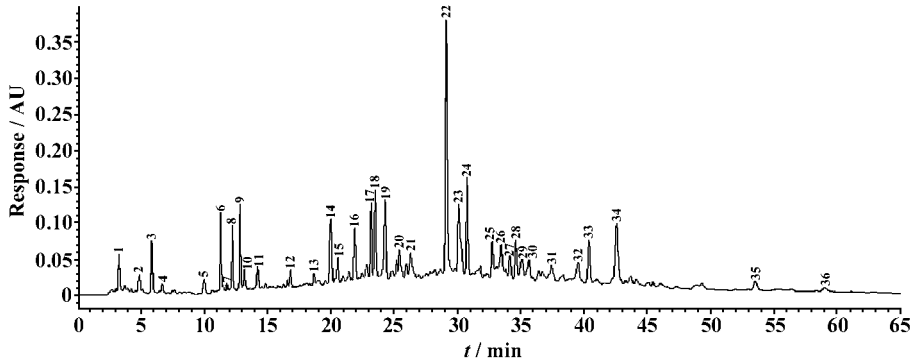


Figure 1 Fingerprint graphic of *Carthamus tinctorius* L.

Table 1 Chromatography data of fingerprint graphic

Peak	t_R	Relative t_R	Area	Peak	t_R	Relative t_R	Area
1	3.27	0.11	425 108	19	24.30	0.83	2 083 063
2	4.90	0.17	325 416	20	25.42	0.87	1 016 956
3	5.87	0.20	666 665	21	26.32	0.90	1 284 903
4	6.68	0.23	162 136	22	29.12	1.00	4 944 965
5	10.01	0.34	222 568	23	30.11	1.03	2 219 283
6	11.32	0.39	730 921	24	30.76	1.06	1 711 490
7	11.80	0.41	169 233	25	32.77	1.13	807 365
8	12.23	0.42	769 156	26	33.48	1.15	1 208 226
9	12.83	0.44	922 034	27	34.16	1.17	758 760
10	13.18	0.45	425 586	28	34.62	1.19	991 910
11	14.22	0.49	488 722	29	35.11	1.21	871 849
12	16.81	0.58	330 665	30	35.65	1.22	901 770
13	18.66	0.64	329 674	31	37.45	1.29	979 308
14	20.02	0.69	1 447 342	32	39.54	1.36	1 069 211
15	20.55	0.71	791 308	33	40.39	1.39	982 786
16	21.91	0.75	1 091 393	34	42.58	1.46	1 860 576
17	23.20	0.80	1 128 666	35	53.52	1.84	243 628
18	23.50	0.81	1 488 162	36	59.01	2.03	139 046

3 各地商品红花药材的指纹图谱相似度评价

从各地购得商品红花,记录指纹图谱(图2),并采用“计算机辅助相似度评价系统”软件进行数据处理,结果样品a~n的相似度分别为0.96,0.78,0.88,0.96,0.91,0.95,0.87,0.93,0.96,0.96,0.96,0.91,0.94和0.93。

详细考察14批商品红花的指纹图谱,可以看出差异主要集中在4,5和6号峰的峰形及其相对高度上。陕西西安商品(b)和内蒙古包头商品(g)的指纹图谱中,5号峰较高,一般情况下,22号峰(羟基红花黄色素A)为最高峰,而这两批药材5号峰异常突出,成为最高峰,使两者相似度较低,分别为0.78和

0.87。内蒙古呼和浩特商品(c)的4,5号峰较高,相似度也较低,为0.88。河南新乡吴村镇商品(l)和河南新乡邵二村商品(k)的6号峰较低,安徽滁州商品(e)的4号峰较高。

4 新疆各产地红花药材的指纹图谱相似度评价

新疆为红花药材主产地,其产量占全国总产量的80%,因此作者对新疆各产地的红花药材的指纹图谱进行了系统考察,以期对中药产业和临床用药的优质药材选用提供参考。新疆各产地红花药材的指纹图谱见图3,相似度评价结果分别为0.97,0.97,0.98,0.99,0.96,0.96和0.95。

比较新疆不同产地红花药材指纹图谱,可以看

出差异主要集中在 2,3,4,5,6,8 和 9 号峰的峰形及其相对高度上。焉耆,奇台,英吉莎样品的 3,6,8 和 9 号峰均很弱,4 号峰明显。木垒样品的 3 和 6 号峰很弱。于田,吉木莎尔样品的 4 号峰很弱。和静样品的 6 号峰很弱。

由结果 3 和 4 可见,31 批供试品的指纹图谱中,保留时间在 15~65 min 的 12~36 号色谱峰峰形及相对比例较稳定,体现了红花的共同特征;而保留时间在 0~15 min 的 1~11 号色谱峰则变化较多,是不同药材的差异所在。

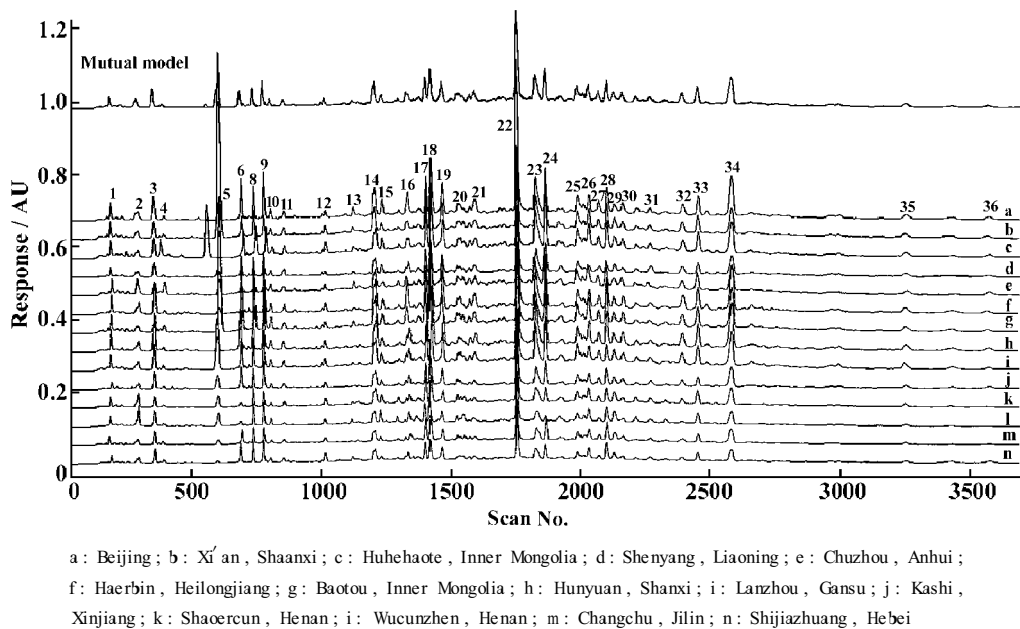


Figure 2 Fingerprint graphics of *Carthamus tinctorius* L. commodities from different places

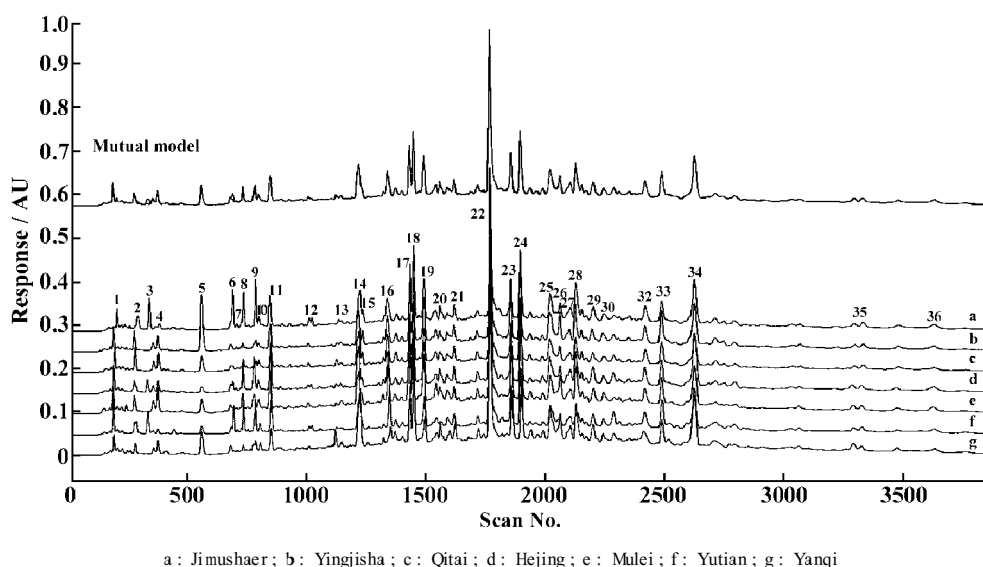


Figure 3 Fingerprint graphics of *Carthamus tinctorius* L. samples from different habitats in Xinjiang

5 新疆红旗农场产红花药材指纹图谱相似度评价

新疆吉木萨尔县红旗农场为我国栽培面积最大的红花基地,以品质优良稳定闻名全国,目前用于红花注射液的原料大部分来源于该基地,为了进一步考察该基地所产药材质量,从该基地收集了 10 批代表性样品,进行指纹图谱考察,为注射剂用红花

药材的选择提供参考。10 批红花药材的指纹图谱相似度评价结果分别为 0.97,0.95,0.98,0.98,0.98,0.98,0.99,0.98,0.92 和 0.94。

讨论

根据以上 31 批不同来源红花药材的分析结果

可看出,不同红花药材指纹图谱相似度较高,绝大多数大于0.9,说明不同产地红花药材的化学组成一致性较好,质量稳定。不同商品红花中,内蒙古包头、呼和浩特,陕西西安三地的商品相似度较差,即14批中有3批偏离整体水平较远,占21.4%;而同在新疆这一产地范围的17批红花药材相似度很高。该结果提示,虽然从整体上红花药材质量稳定,但仍然有一定比例的红花药材偏离整体水平较远,在选择药材产地时应予以注意;缩小药材的产地范围,无疑对保证红花的质量一致具有重要作用。

本文使用了“计算机辅助相似度评价系统”软件,为大量复杂的色谱数据的处理提供了方便。中药成分复杂,液相色谱分析中多采用梯度洗脱的方式,以保证分离的效果和工作的效率。而梯度洗脱中,基线的漂移是常见的问题,由此引起的积分困难使中药指纹图谱的数据处理难以进行。而该软件的使用,可针对图像进行数据处理,在不作积分计算的前提下,充分使用色谱图中的全部图像信息,直接对图像进行处理,使梯度洗脱方式用于中药指纹图谱成为可能。

本法反映了红花的化学组成及其相对比例,既可用于定性鉴别,也可用于定量分析,可对红花的栽培、生产加工、贮藏运输、临床使用等各个环节进行全面可靠的质量监控,为中药红花全面深入的研究奠定了基础。

References:

- [1] Jiangsu New Medical College. *Traditional Chinese Medicine Dictionary* (中药大辞典) [Z]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1975.1992.
- [2] Piao YZ, Jin M. Progress of studies on myocardial ischemia inhibition effect of *Carthamus tinctorius* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, **32**(5):473 - 475.
- [3] Li YM, Che QM. Studies on chemical components of *Carthamus tinctorius* petals [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1998, **33**(8):626 - 628.
- [4] Yin HB, He ZS. A novel semi-quinone chalcone sharing a pyrrole ring C-glycoside from *Carthamus tinctorius* [J]. *Tetrahedron Lett*, 2000, **41**(12):1955 - 1958.
- [5] Takahashi Y, Miyasaka N, Tasaka S, et al. Constitution of two matter in the flower petals of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Tetrahedron Lett*, 1982, **23**(49):5163.