

菊花的 HPLC 指纹图谱研究

赵玉丛¹, 刘国际¹, 任保增¹, 屈凌波^{1,2*}

(1. 郑州大学 化学系, 河南 郑州 450002; 2. 安阳师范学院, 河南 安阳 455002)

摘要:目的 研究建立菊花 HPLC 指纹图谱分析法, 评价不同品种不同来源菊花药材的质量。方法 采用梯度洗脱的方法进行色谱分离, 用竞争层神经网络进行数据处理, 对不同品种、不同来源的菊花样本进行模式识别。结果 建立了菊花的 HPLC 指纹图谱分析方法, 识别结果将菊花样本分为 5 类。结论 利用菊花指纹图谱可对不同品种不同来源的菊花药材进行鉴别, 并可在一定程度上进行质量控制。

关键词:菊花; HPLC; 指纹图谱; 竞争层神经网络

中图分类号:R282.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)10-1552-04

Fingerprint of *Flos Chrysanthemi* by HPLC

ZHAO Yu-cong¹, LIU Guo-ji¹, REN Bao-zeng¹, QU Ling-bo^{1,2}

(1. Department of Chemistry, Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China;

2. Anyang Normal College, Anyang 455002, China)

Abstract: Objective To establish the analytical method for the fingerprint of *Flos Chrysanthemi* by HPLC and estimate the quality of *Flos Chrysanthemi* in various species from different habitats. **Methods** The gradient elution mode was applied in chromatographic separation, data can be treated by competitive layer neural network (NN) and pattern recognition be made for *Flos Chrysanthemi* samples of various species from different habitats. **Results** The analytical method of fingerprint for *Flos chrysanthemi* by HPLC was established, samples can be classified into five categories according to the recognition result. **Conclusion** The established fingerprint can be used for the identification and quality control of *Flos Chrysanthemi*.

Key words: *Flos Chrysanthemi*; HPLC; fingerprint; competitive layer neural network

菊花为菊科多年生草本植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的头状花序, 具有疏风清热、平肝明目的功效, 其主要成分为黄酮类、挥发油、氨基酸、微量元素等。菊花总黄酮具有降血压、扩张冠状动脉、防止冠脉粥样硬化等作用, 其中木犀草素及其苷类以及芹菜素具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤及扩张血管等药理作用^[1-3]。目前对菊花的研究多集中在某单一有效成分的提取和测定上, 而中医药理论强调中药所含的某一种活性成分均不能代表其整体的疗效。本实验采用 HPLC 法建立了菊花的指纹图谱, 并用竞争层 (competitive layer) 神经网络对不同来源的菊花样本进行模式识别, 为菊花药材的品种鉴定和质量控制提供科学依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱系统, DAD 检测

器, Agilent 色谱工作站; R201 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); KQ-50 型超声波清洗器 (昆山市淀山湖检测仪器厂); 索氏提取装置; MATLAB 6.5 处理软件。

甲醇为色谱纯; 水为二次重蒸水; 其他试剂均为分析纯; 木犀草素、芹菜素对照品购于中国药品生物制品检定所; 菊花样品来源见表 1, 均经河南中医药大学生药教研室鉴定。样品置烘箱内 50~60 °C 干燥 2 h, 粉碎后过 40 目筛备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Zorbax SB C₁₈ 柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相: A 为甲醇-水 (15:85)、B 为甲醇-水 (52:48), 从 A 到 B 进行 30 min 线性梯度洗脱, 然后在 B 流动相条件下保持 30 min。体积流量: 0.7 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样量:

收稿日期: 2004-12-12

作者简介: 赵玉丛 (1971—), 女, 河南巩义人, 郑州大学化学系研究生, 主要从事药物分析方面的研究。

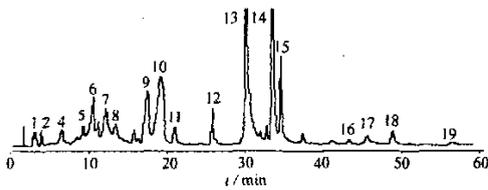
* 通讯作者 屈凌波 E-mail: qulingbo@zsu.edu.cn

10 μ L;分析时间:60 min;检测波长:350 nm。在上述色谱条件下杭菊花色谱指纹图见图1。

表1 菊花样品来源

Table 1 Source of *Flos Chrysanthemi* samples

编号	品种	产地或来源	编号	品种	产地或来源
1	杭菊	浙江杭州	9	贡菊	黄山
2	杭菊	江苏	10	贡菊	河南
3	杭菊	广西	11	贡菊	黄山
4	杭菊	广西	12	药菊	黄山
5	杭菊	浙江杭州	13	怀菊	河南
6	杭菊	浙江桐乡	14	野菊花	河南
7	金菊	黄山	15	野菊花	东莞
8	金菊	湖北	16	野金菊	黄山



18-木犀草素 19-芹菜素
18-luteolin 19-apigenin

图1 杭菊花的HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC Fingerprint of *Flos Chrysanthemi* from Hangzhou

2.2 样品溶液的制备:取各药材样品 2.003 g 置圆底烧瓶中,加 95%乙醇 40 mL,回流提取 2 次,每次 2h,合并提取液,滤过,挥干乙醇,加水溶解,再用

80 mL 醋酸乙酯分 4 次萃取,挥干醋酸乙酯,用甲醇溶解,定容至 50 mL 量瓶中,经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液即得。

2.3 对照品溶液的制备:精密称取木犀草素、芹菜素对照品适量,分别用甲醇溶解定容,得对照品溶液,浓度分别为木犀草素 0.000 6 mol/L,芹菜素 0.002 mol/L。

2.4 色谱指纹峰的标定:以参照物木犀草素对应的色谱峰的保留时间和峰面积为 1,计算其他各色谱指纹峰的相对保留时间及相对峰面积。

2.5 精密度试验:取同一菊花样品溶液,连续进样 5 次,按上述条件进行检测,各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.1%~0.8% 和 1.5%~2.8%。

2.6 重现性试验:取同一菊花样品,分别制备 5 份样品溶液进行检测,各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.2%~1.1% 和 2.2%~4.2%。

2.7 稳定性试验:取同一份菊花药材的供试品溶液在 0、4、6、12、24 h 按上述条件进行检测,各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.1%~2.5% 和 1.7%~3.7%。

2.8 样品测定:按供试品溶液的制备方法,在上述色谱条件下对 16 个菊花样品进行测定,各样品的相对保留时间见表 2,相对峰面积见表 3。

表2 16个菊花样品的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of 16 samples of *Flos Chrysanthemi*

样品号	各峰相对保留时间																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	0.063	0.086			0.196				0.374	0.395	0.455	0.556	0.664	0.732	0.758	0.949	1.000		
2	0.063	0.085			0.195				0.375	0.397	0.455	0.556	0.661	0.731	0.756	0.950	1.000		
3	0.064	0.087			0.198	0.233			0.376	0.397	0.458	0.558	0.663	0.731	0.756	0.949	1.000		
4	0.066	0.085			0.184				0.371	0.393	0.454	0.555	0.662	0.732	0.758	0.949	1.000		
5	0.070	0.082			0.206	0.225				0.408	0.444	0.574	0.668	0.734	0.759	0.950	1.000		
6	0.066	0.086		0.143	0.203	0.23	0.264	0.293	0.381	0.421	0.463	0.565	0.657	0.732	0.756	0.949	1.000	1.071	
7	0.065	0.084			0.208	0.237		0.302		0.392	0.472		0.664	0.731	0.756	0.960	1.000		
8	0.062	0.086			0.184	0.228		0.286	0.372	0.402	0.455	0.557	0.659	0.73	0.756	0.949	1.000		
9	0.063	0.087			0.156	0.192	0.228		0.369	0.388	0.452	0.553	0.660	0.731	0.757		1.000		
10	0.068	0.086			0.147	0.204	0.234	0.269		0.393	0.433	0.473	0.586	0.654	0.728	0.752		1.000	
11	0.064	0.087			0.185	0.228			0.369	0.389	0.453	0.555	0.659	0.732	0.757		1.000		
12	0.068	0.086	0.110		0.199	0.231			0.370	0.391	0.455	0.560	0.663	0.733	0.758		1.000		1.230
13	0.066	0.086			0.15	0.202	0.239			0.406	0.446	0.607	0.657	0.730	0.754	0.949	1.000		1.240
14		0.072				0.248								0.667	0.729	0.753	0.948	1.000	
15	0.067	0.086												0.668	0.733	0.759	0.950	1.000	
16	0.065	0.086		0.154										0.732	0.755	0.950	1.000	1.101	

表 3 16 个菊花样品的相对峰面积
Table 3 Relative peak area of 16 samples of *Flos Chrysanthemi*

样品号	各峰相对峰面积																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	0.33	0.50			0.17				0.06	0.23	0.43	0.71	0.54	0.61	2.00	0.44	1.00			
2	0.10	0.48			0.30				0.05	0.12	0.24	0.47	0.84	0.50	2.07	0.52	1.00			
3	0.13	0.24			0.36	0.28			0.09	0.19	0.37	0.52	0.63	0.45	2.06	0.37	1.00			
4	0.34	0.43			0.26				0.11	0.10	0.34	0.48	0.77	0.45	1.80	0.51	1.00			
5	0.24	0.04			0.40	0.45				0.43	0.56	0.12	0.56	0.58	1.89	0.35	1.00			
6	1.54	0.76		1.45	1.16	5.46	5.92	2.9	8.10	17.23	1.93	2.14	24.64	34.59	5.82	0.46	1.00	1.72		
7	1.18	3.35			0.92	0.34		0.40		0.51	0.51		2.83	0.60	2.08	0.45	1.00			
8	0.94	0.85			0.80	0.48		0.52	1.38	1.40	0.55	0.46	2.89	1.57	3.60	0.50	1.00			
9	1.31	0.98		1.13	0.61	0.60			1.02	1.65	0.28	0.42	6.86	5.93	1.68		1.00			
10	0.69	0.74		1.22	0.35	3.47	2.48		2.77	1.38	0.45	0.42	10.18	3.72	1.52		1.00			
11	1.88	1.83			0.40	0.84			0.94	1.28	0.21	0.56	7.92	5.72	1.62		1.00			
12	0.51	0.94	0.29		0.63	0.08			0.38	1.60	0.38	1.36	0.27	0.96	0.33		1.00		2.57	
13	0.32	0.09		0.22	0.08	1.16				0.46	0.35	0.76	0.25	0.25	0.34	0.12	1.00		0.74	
14		2.41				3.77							6.35	1.80	0.46	24.23	1.00			
15	2.25	6.22											11.93	5.54	1.14	26.35	1.00			
16	16.26	26.43		6.23										3.04	2.29	1.07	1.00	2.12		

2.9 信息处理:用竞争层神经网络在 MATLAB 平台对所得的色谱信息进行处理,竞争层神经网络为单层网络,网络传递函数为竞争函数。对于本实验所采用的竞争层网络,相关函数如下:权值函数为 negdist,输入函数为 netsum 函数,传递函数为 compet 函数,网络用 train 函数训练,输入相对保留时间和相对峰面积值(数据经过适当处理),结果分为 5 类:1~5 号样品为一类;6 号样品为一类;7、8、12、13 号样品为一类;9~11 号、16 号样品为一类;14、15 号样品为一类。

3 讨论

3.1 本实验以木犀草素对照品的最大吸收波长 350、254 nm 为指标进行检测波长的考察,结果发现 254 nm 处的色谱图中基线漂移较大,且峰数少,故为获取更多信息,选取 350 nm 作为菊花指纹图谱的检测波长。同时进行了乙醇回流提取、乙醇回流提取-醋酸乙酯萃取、超声波提取、酸解提取、索氏提取等提取方法的考察,结果表明乙醇回流提取-醋酸乙酯萃取法所得色谱图中色谱峰峰数较多,峰分离比较好、且主峰强度较高,所以选取乙醇回流提取-醋酸乙酯萃取法来制备样品溶液。

3.2 建立了菊花药材指纹图谱的 HPLC 测定法,该方法能使菊花提取液中的大部分化学成分得到较好分离,具有很好的稳定性、重现性和可行性。其中木犀草素和芹菜素已确证为菊花中的药效成分,但由

于对照品的匮乏,无法判定菊花样品图 1 中 1~17 号各峰所代表的物质成分,尚需进行进一步的研究。

3.3 杭菊酸水解后仅有木犀草素和芹菜素两个主要色谱峰,且它们的量远远高于未水解时,表明杭菊中黄酮类成分主要为以木犀草素和芹菜素为苷元的黄酮苷类化合物,酸解后黄酮苷类化合物发生分解,从而形成游离的苷元。

3.4 竞争层神经网络在样本类别大致可知的情况下,可以无须学习样本即可对数据进行分类,在样本量不是太多的情况下较为适用。按 HPLC 色谱峰相对保留时间和相对峰面积,用 competitive layer 神经网络可将样品分为 5 类:即 1~5 号杭菊为 1 类,6 号杭菊为一类,贡菊、野金菊为一类,药菊、怀菊与金菊为一类,野菊花为一类,与实际样本基本一致。因此用 competitive layer 神经网络可以对菊花药材的种类进行模式识别,从而为菊花资源的开发利用提供科学依据。

3.5 不同品种的菊花指纹图谱差异较为明显,同一品种的菊花指纹图的整体概貌是一致的,但各色谱峰的强度有差异。药菊、怀菊的色谱图相似,这与文献报道药菊可能起源于河南的怀菊^[4]是一致的;且二者色谱图中各色谱峰均较强,尤其木犀草素和芹菜素的量在这几个菊花品种中为最高,这为临床上药菊、怀菊主要药用,而杭菊、贡菊为药茶兼用提供了依据。金菊花是菊科植物神农香菊与菊花的杂交

新品种^[4],从模式识别结果上可以推测金菊花与怀菊、药菊有较类似的药理作用,但尚需进一步的实验来论证。

References:

[1] He L N, He S B, Yang J. *In vitro* anti-coxsackie B₃ virus [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2000, 17(5): 362-363.
 [2] Chan E C, Pannangpetch P, Woodman O L. Relaxation of flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta; mecha-

nism of action and structure-activity relationships [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 35(2): 326-329.

[3] Yuan L H, Wu K. Advances in studies on anti-tumor activity of apigenin [J]. *Chin J Public Health* (中国公共卫生), 2004, 20(2): 241-242.
 [4] Peng S P, Li J, Lu J Q. Study on extracting technology of total extraction and total flavone in *Dendranthema morifolium* Tavel with orthogonal design [J]. *J Hubei Coll Tradit Chin Med* (湖北中医学院学报), 2002, 4(2): 29.

红大戟的组织培养及植株再生

凌征柱¹, 覃文流², 余丽莹¹, 蓝祖裁¹, 吴庆华¹

(1. 广西药用植物园, 广西南宁 530023; 2. 广西大学, 广西南宁 530005)

摘要:目的 研究红大戟快速繁殖技术, 为人工栽培提供种源。方法 以野生红大戟的茎尖作外植体, 通过不同的培养基进行诱导培养获得丛生芽, 进而生根获得再生植株。结果 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 适合红大戟的丛生芽继代增殖。1/2MS+NAA 1.0 mg/L 适宜诱导生根获得健全再生植株。移栽成活率 70%。结论 本研究得出的方法可为人工栽培红大戟提供种源。

关键词:红大戟; 组织培养; 试管苗

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)10-1555-03

Tissue culture and plantlet regeneration of *Knoxia valerianoides*

LING Zheng-zhu¹, QIN Wen-liu², YU Li-ying¹, LAN Zu-zai¹, WU Qing-hua¹

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China; 2. Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract; Objective The tissue culture of the stem apex of *Knoxia valerianoides* was done to research the optimum culture medium for test-tube seedlings for large-scale planting. **Methods** The stem apex of wild *K. valerianoides* was used as the explants and cultivated in different culture media separately to induce fascicled-bud, root, and plantlet regeneration. **Results** The cultural medium MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L was suitable for the sub-multiplication of fascicled bud and the medium 1/2MS+NAA 1.0 mg/L for root inducement and the plantlet regeneration. The transplantation survival rate of the plantlet regeneration was 70%. **Conclusion** The tissue culture of *K. valerianoides* could be used to produce test-tube seedlings for large-scale planting.

Key words: *Knoxia valerianoides* Thorel et Pitard; tissue culture; test-tube seedling

红大戟 *Knoxia valerianoides* Thorel et Pitard 为茜草科多年生草本植物, 又名红芽大戟、红芽戟。药用部位块根, 有泻水逐饮, 攻毒消肿散结功效。主治胸腹积水、二便不利、痈肿疮毒、瘰疬痰核^[1], 是中成药紫金锭的主药。由于自然繁殖缓慢, 以及滥采乱挖, 致使野生资源濒临灭绝。20世纪90年代初单是

广西产地上市为 3×10⁴ kg 以上, 到了2000年上市不足 1.5×10⁴ kg, 而今不足 5 000 kg, 致使价格不断攀升。1999年 50~55 元/kg, 2000年升至 60~65 元/kg, 2001年升至 70 元/kg, 2002年 80 元/kg, 2003年升到 90 元/kg, 2004年上半年已升至 125 元/kg^[2]。20世纪80年代后虽然已开展人工栽

收稿日期: 2004-12-27

基金项目: 广西壮族自治区科技厅科技攻关项目(0322024-3A)

作者简介: 凌征柱(1953-), 男, 广西桂平市人, 副研究员, 硕士生导师, 从事药用植物组织培养及引种驯化研究工作。
Tel: (0771) 5602792