

不同品种红花黄酮类成分的 HPLC 含量测定及其遗传稳定性研究

张戈, 郭美丽*, 李颖, 张汉明, 苏中武*

(第二军医大学药学院, 上海 200433)

红花为菊科一年生草本植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 是常用的活血化瘀中药之一, 具有抗凝、防栓、扩张血管之功效^[1], 其中黄酮类成分是红花中的一类主要活性成分, 目前市场上出售的红花注射液中主要活性成分是总黄酮, 其中的黄色素含量甚微。Shu-Huey 等研究表明, 黄酮类成分漆树黄酮、山柰酚、桑色素、槲皮素、杨梅素具有显著抑制由 ADP、凝血酶、花生四烯酸诱导的血小板聚集作用^[2], 陈文梅等研究表明, 红花黄酮成分具有抑制血小板激活因子介导的血小板活化作用^[3]。笔者在对红花黄酮类化学成分研究的基础上^[4], 通过紫外分光光度法测定了在山西、新疆两个生态地区栽培的不同红花品种中红花总黄酮的含量, 并通过 RP-HPLC 法测定了其中芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量, 旨在为红花优良品种的选育以及药材和制剂的质量控制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 种植材料: 红花 22 个品种, 1998 年 4 月分别在新疆乌鲁木齐、山西清徐种植 1 年, 1999 年 4 月在山西种植 1 年。试验地土壤肥力中等, 播前施入基肥。种植密度分别为 0.6 m × 0.06 m, 0.33 m × 0.2 m, 出苗后及时间苗和定苗, 花期及时采花, 8 月收获种子。

1.2 试剂和仪器 岛津 UV-265FW 型紫外分光光度仪; Waters 510-996 高效液相色谱仪; 冰醋酸 (AR)、乙腈 (色谱纯); 芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品均为红花中分离提纯得到, HPLC 法检测其纯度均高于 98.0%。

1.3 色谱条件: 色谱柱: RP-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长: 265.8 nm; 流动相: 乙腈-水-冰醋酸 (19.5: 80.5: 0.5) (pH = 3.8); 体积流量: 1.0 mL/min; 室温: 20℃。

1.4 对照品溶液的配制

1.4.1 精密称取山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品 5 mg, 加入 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL, 供紫外测定用。

1.4.2 精密称取芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品各 5 mg, 分别加入甲醇溶解并定容至 5 mL, 供 HPLC 测定用。

1.5 供试液的配制

1.5.1 精密称取不同产地红花样品各 200 mg, 精密加入 50% 甲醇 10 mL, 60℃ 超声提取 1.5 h, 离心 (3 000 r/min) 30 min, 取上清液, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过。精密吸取滤液 0.2 mL, 50% 甲醇定容至 10 mL, 供紫外测定用。

1.5.2 精密称取不同产地红花样品各 200 mg, 精密加入 50% 甲醇 10 mL, 60℃ 超声提取 1.5 h, 离心 (3 000 r/min) 30 min, 取上清液, 微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 供 HPLC 测定用。

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择: 将芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷的对照品溶液在 UV-265FW 紫外分光光度计下进行扫描, 两者在 265.8 nm 处均有较强吸收, 故选择 265.8 nm 波长进行含量测定。

2.2 标准曲线的绘制

2.2.1 总黄酮标准曲线的绘制: 精密吸取紫外测定对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL, 分别用 50% 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 在 265.8 nm 处测定光。以质量浓度 (μg/mL) 为横坐标, 吸光度为纵坐标, 得线性回归方程: $Y = 0.06475 + 0.038945X$, $r = 0.9996$ 。线性范围为 5~45 μg/mL。

2.2.2 芦丁标准曲线的绘制: 分别吸取芦丁对照品溶液 5、15、25、35、45、55、65、75、85、95 μL 置于 1 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 混匀, 吸取 20 μL 进样, 按上述色谱条件, 测定峰面积, 以进样量为横坐

* 收稿日期: 2004-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39700012)

作者简介: 张戈 (1975-), 男, 河南省安阳市人, 博士研究生, 主要从事中药的品质评价和质量控制研究。

* 通讯作者 T: (021) 25070395 E: zhangli01@i

标, 峰面积为纵坐标, 得线性回归方程: $Y = -34\ 162.82 + 1\ 280\ 287.5 X$, $r = 0.999\ 4$ 。说明芦丁在 $0.1 \sim 1.9\ \mu\text{g}$ 与峰面积呈线性关系。

2.2.3 山柰酚-3-O-芸香糖苷的标准曲线绘制: 分别吸取山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品溶液 5、20、35、50、65、80、95、110、125、140 μL 置于 1 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 混匀, 吸取 20 μL 进样, 按上述色谱条件, 测定峰面积, 以进样量为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得线性回归方程: $Y = -185\ 451.47 + 1\ 557\ 499.98 X$, $r = 0.996\ 5$ 。说明山柰酚-3-O-芸香糖苷在 $0.1 \sim 2.8\ \mu\text{g}$ 与峰面积呈线性关系。

2.3 稳定性试验: 分别取两对照品溶液各 1 mL 混合, 按 HPLC 色谱条件测定, 结果两者在 24 h 内均稳定, 芦丁: $\text{RSD} = 0.62\%$; 山柰酚-3-O-芸香糖苷: $\text{RSD} = 0.80\%$ 。另取山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品 0.5 mL, 用 50% 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 进行紫外测定, 结果表明室温放置 6 h 内稳定, $\text{RSD} = 1.08\%$ 。

2.4 精密度试验: 取混合后的对照品溶液 20 μL 进样, 按色谱条件测定, 重复 5 次, 芦丁: $\text{RSD} = 0.94\%$; 山柰酚-3-O-芸香糖苷: $\text{RSD} = 1.01\%$ 。

2.5 重复性试验

2.5.1 精密称取同批红花样品 5 份, 每份约 200 mg, 按上述紫外测定供试品溶液制备方法及条件进行紫外测定, 结果 $\text{RSD} = 1.56\%$ 。

2.5.2 精密称取同种红花样品 5 份, 每份约 200 mg, 按上述 HPLC 供试品溶液制备方法及色谱条件进行测定, 芦丁: $\text{RSD} = 1.42\%$; 山柰酚-3-O-芸香糖苷: $\text{RSD} = 2.76\%$ 。

2.6 加样回收率试验

2.6.1 紫外测定法: 精密称取 100 mg 同批红花粉末 5 份, 加入一定量的山柰酚-3-O-芸香糖苷对照

品, 加入 50% 甲醇至 10 mL, 依上述方法提取、离心、滤过, 精密吸取滤液 0.2 mL, 50% 甲醇定容至 10 mL, 测定其吸光度, 计算回收率得 98.5% , $\text{RSD} = 2.26\%$ ($n = 5$)。

2.6.2 HPLC 法: 精密称取 20 mg 同批红花粉末 5 份, 加入一定量的芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品, 加入 50% 甲醇至 1 mL, 依上述方法提取、离心、滤过, 吸取 20 μL 进样, 测定峰面积, 计算回收率得芦丁: 101.4% ($\text{RSD} = 1.45\%$, $n = 5$), 山柰酚-3-O-芸香糖苷: 107.2% ($\text{RSD} = 3.60\%$, $n = 5$)。

2.7 样品测定: 根据上述所建立的方法, 通过紫外分光光度法对所搜集栽培的不同红花品种中总黄酮的含量进行测定, 并通过 HPLC 法对芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量进行测定 (图 1), 并对其结果进行比较, 结果见表 1。

3 结论

3.1 研究表明: 不同红花品种间总黄酮及芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量存在显著差异, 总黄酮质量分数为 $1.62\% \sim 7.90\%$, 其中合肥红花、亳州红花、鱼台红花品种最优, 芦丁质量分数为 $0.018\% \sim 0.140\%$, 其中亳县红花、延津大红袍、束鹿红花品种最优, 山柰酚-3-O-芸香糖苷的质量分数为 $0.085\% \sim 0.895\%$, 其中合肥红花、亳州红花、鱼台红花品种最优。红花各品种中芦丁含量均小于山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量。相关分析结果表明, 红花总黄酮含量与山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量呈正相关 ($r = 0.8535^{**}$)。在新疆、山西同一年份种植时, 不同品种间含量存在显著差别, 而同一品种总黄酮含量及芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量虽有变化但小于品种间的差异; 不同年份同一地区种植时, 不同品种间的含量差异规律及同一品种的含量变化规律与同一年份、不同地区种植时基本一致。以上分析

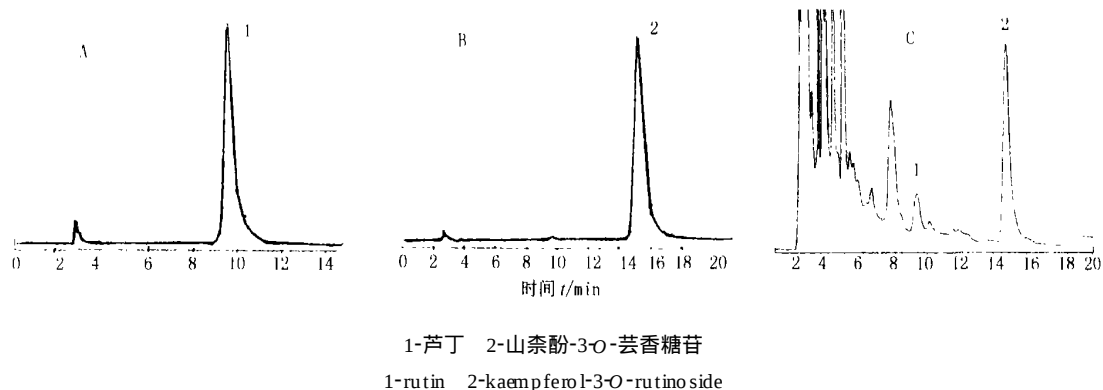


图 1 芦丁(A)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(B)和红花样品(C)

Fig. 1 HPLC chromatograms of rutin (A), kaempferol-3-O-rutinoside (B), and C. tinctorius samples (C)

表 1 不同红花品种中黄酮类成分的含量($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 1 Flavonoids in different species of *C. tinctorius* samples ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	品种	年份	总黄酮/%		芦丁/%		山柰酚-3-O-芸香糖苷/%	
			山西	新疆	山西	新疆	山西	新疆
1	哈密有刺	1998	5.26 ± 0.01	4.48 ± 0.01	0.049 ± 0.001	0.052 ± 0.003	0.299 ± 0.007	0.165 ± 0.004
		1999	5.08 ± 0.01		0.056 ± 0.003		0.297 ± 0.007	
2	哈密无刺	1998	4.02 ± 0.02	5.69 ± 0.01	0.044 ± 0.001	0.103 ± 0.004	0.170 ± 0.006	0.243 ± 0.009
		1999	4.48 ± 0.01		0.058 ± 0.002		0.220 ± 0.002	
3	吉木萨尔无刺	1998	5.03 ± 0.01	5.61 ± 0.01	0.045 ± 0.002	0.024 ± 0.001	0.177 ± 0.005	0.176 ± 0.007
		1999	4.65 ± 0.01		0.048 ± 0.003		0.181 ± 0.001	
4	塔城无刺	1998	4.80 ± 0.01	4.84 ± 0.01	0.049 ± 0.002	0.042 ± 0.002	0.219 ± 0.016	0.192 ± 0.016
		1999	4.94 ± 0.01		0.052 ± 0.005		0.221 ± 0.002	
5	若羌无刺	1998	5.25 ± 0.01	5.03 ± 0.01	0.025 ± 0.001	0.023 ± 0.001	0.161 ± 0.002	0.194 ± 0.016
		1999	4.49 ± 0.01		0.023 ± 0.001		0.146 ± 0.003	
6	若羌有刺白	1998	4.34 ± 0.01	4.90 ± 0.01	0.024 ± 0.001	0.094 ± 0.003	0.174 ± 0.006	0.185 ± 0.004
		1999	4.42 ± 0.01		0.026 ± 0.001		0.192 ± 0.003	
7	张掖无刺	1998	4.56 ± 0.01	4.99 ± 0.01	0.021 ± 0.001	0.075 ± 0.001	0.131 ± 0.006	0.115 ± 0.002
		1999	4.98 ± 0.01		0.027 ± 0.001		0.136 ± 0.002	
8	张掖有刺	1998	4.97 ± 0.01	4.96 ± 0.01	0.026 ± 0.001	0.090 ± 0.002	0.135 ± 0.002	0.176 ± 0.004
		1999	4.54 ± 0.01		0.021 ± 0.001		0.127 ± 0.001	
9	延津大红袍	1998	5.32 ± 0.02	4.82 ± 0.02	0.059 ± 0.002	0.115 ± 0.002	0.193 ± 0.016	0.172 ± 0.016
		1999	4.91 ± 0.01		0.059 ± 0.001		0.194 ± 0.005	
10	无刺红	1998	4.55 ± 0.01	4.31 ± 0.02	0.033 ± 0.001	0.078 ± 0.004	0.161 ± 0.006	0.137 ± 0.009
		1999	4.76 ± 0.01		0.038 ± 0.001		0.170 ± 0.002	
11	新乡红花	1998	4.53 ± 0.01	5.31 ± 0.01	0.031 ± 0.001	0.033 ± 0.001	0.163 ± 0.002	0.111 ± 0.003
		1999	4.77 ± 0.01		0.034 ± 0.004		0.172 ± 0.002	
12	菏泽红花	1998	4.16 ± 0.01	4.89 ± 0.02	0.052 ± 0.002	0.079 ± 0.003	0.142 ± 0.002	0.157 ± 0.006
		1999	4.45 ± 0.01		0.055 ± 0.002		0.190 ± 0.001	
13	芮城红花	1998	6.02 ± 0.01	1.63 ± 0.01	0.098 ± 0.003	0.019 ± 0.001	0.279 ± 0.003	0.093 ± 0.008
		1999	5.59 ± 0.01		0.090 ± 0.002		0.201 ± 0.026	
14	束鹿红花	1998	4.25 ± 0.01	5.19 ± 0.01	0.033 ± 0.006	0.138 ± 0.002	0.166 ± 0.008	0.254 ± 0.007
		1999	4.38 ± 0.01		0.039 ± 0.004		0.209 ± 0.004	
15	菏泽无刺	1998	4.42 ± 0.01	5.24 ± 0.01	0.048 ± 0.003	0.103 ± 0.002	0.168 ± 0.005	0.229 ± 0.006
		1999	4.62 ± 0.01		0.048 ± 0.002		0.250 ± 0.005	
16	淇县红花	1998	4.66 ± 0.01	5.64 ± 0.02	0.051 ± 0.001	0.074 ± 0.002	0.143 ± 0.005	0.231 ± 0.002
		1999	4.72 ± 0.01		0.061 ± 0.009		0.169 ± 0.001	
17	亳州红花	1998	5.99 ± 0.01	6.54 ± 0.01	0.107 ± 0.004	0.106 ± 0.001	0.361 ± 0.003	0.563 ± 0.011
		1999	5.44 ± 0.01		0.112 ± 0.004		0.338 ± 0.001	
18	鱼台红花	1998	6.95 ± 0.01	6.22 ± 0.01	0.041 ± 0.001	0.108 ± 0.002	0.858 ± 0.037	0.448 ± 0.005
		1999	6.90 ± 0.01		0.053 ± 0.001		0.802 ± 0.018	
19	合肥红花	1998	6.96 ± 0.01	7.82 ± 0.08	0.053 ± 0.009	0.062 ± 0.001	0.671 ± 0.032	0.786 ± 0.022
		1999	6.58 ± 0.01		0.073 ± 0.002		0.721 ± 0.015	
20	吴忠红花	1998	4.30 ± 0.02	4.35 ± 0.02	0.055 ± 0.001	0.031 ± 0.001	0.232 ± 0.007	0.198 ± 0.002
		1999	4.26 ± 0.01		0.048 ± 0.003		0.195 ± 0.064	
21	余姚红花	1998	4.98 ± 0.01	4.58 ± 0.01	0.047 ± 0.003	0.054 ± 0.001	0.194 ± 0.003	0.126 ± 0.004
		1999	4.24 ± 0.01		0.049 ± 0.003		0.230 ± 0.001	
22	无刺大红袍	1998	5.19 ± 0.02	5.16 ± 0.01	0.057 ± 0.001	0.068 ± 0.002	0.275 ± 0.002	0.131 ± 0.004
		1999	4.93 ± 0.01		0.067 ± 0.003		0.278 ± 0.003	

结果表明,红花的品种中黄酮类成分的含量主要由遗传因素决定,而环境因素的影响居次要地位。

3.2 在山西种植的芮城红花,其总黄酮及芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷含量均显著高于同年在新疆种植的,而不同年份同一地区种植时,其总黄酮及芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量变化不明显,说明环境因素的适宜与否,对其所含黄酮类成分的含量影响较大,有待进一步研究。

3.3 研究表明,山柰酚-3-O-芸香糖苷具有较好的药理活性(另文发表),建议作为红花药材质量评价的指标之一。

3.4 优良的种质资源是进行中药材优良品种选育及 GAP 生产的前提,本研究结果为红花优良品种的选育及 GAP 生产提供依据。

References

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M] Shanghai: Shanghai Scientific

and Technical Publishers, 1999.

- [2] Tzeng S H, Ko W C, Ko F N, *et al.* Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids [J]. *Thromb Res*, 1991, 64: 91-100.
- [3] Chen W M, Jin M, Wu W, *et al.* Inhibitory effect of flavonols of *Carthamus tinctorius* L. against rabbit platelet

activation induced by platelet activating factor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(12): 881-885.

- [4] Zhang G, Guo M L, Zhang H M, *et al.* Study on the chemical constituents of *Carthamus tinctorius* L. (I) [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2002, 23(1): 109-110.

RP-HPLC 法测定荆芥穗中胡薄荷酮的含量

张 丽, 单鸣秋, 孔 铭, 丁安伟*

(南京中医药大学, 江苏 南京 210029)

荆芥穗为唇形科一年生草本植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* (Benth.) Briq. 的干燥地上部分。荆芥穗性温、味辛; 其生品具有解表散风、透疹之功效, 主治风寒感冒、咽喉肿痛及多种皮肤病, 为中医临床常用药物。荆芥穗炒炭后专功止血, 可用于吐血、便血、崩漏、产后血晕等。《中华人民共和国药典》2000 年版中尚无荆芥穗药材指标性成分的含量测定方法, 本实验以 RP-HPLC 法对其挥发油中的主要成分胡薄荷酮的含量进行了测定, 方法回收率高、分离度好, 结果满意。

1 仪器和试剂

PE-100 高效液相色谱仪, Waters-2487 紫外检测器, 岛津 LBROR AEL-40SM 电子分析天平 (精确度为十万分之一)。

胡薄荷酮对照品由美国 Aldrich 公司提供 (供含量测定用, 批号: 10529PO)。按《中华人民共和国药典》2000 年版一部附录 VI D 高效液相色谱法中的“不加校正因子的主成分自身对照法”进行对照品纯度检查, 图谱积分时间大于胡薄荷酮保留时间的 2 倍, 结果表明胡薄荷酮对照品纯度为 98% 以上。改变流动相比例使保留时间增减 1 倍以上, 色谱中未

出现杂质峰。

甲醇为色谱醇 (淮安精细化工研究所), 水为亚沸蒸馏水, 其余试剂均为分析纯。

荆芥穗购于安徽亳州药材市场, 产地为安徽, 共 3 批。经南京中医药大学吴启南教授鉴定为唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* (Benth.) Briq. 的干燥花穗。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: 中国科学院大连化学物理所, Kromasil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (80:20); 体积流量 1.0 mL/min; 测定波长 252 nm; 柱温为 30℃; 进样量: 10 μL; 理论板数以胡薄荷酮峰计不得低于 3 000。

2.2 内标溶液的制备: 取萘 150 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 (含萘 6.0 mg/mL)。色谱图见图 1。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 药材供试品溶液的制备: 取药材粗粉 1.0 g, 精密称定, 置 25 mL 具塞锥形瓶中, 加入 10 mL 甲醇, 超声处理 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 20 min, 滤过; 滤渣和滤纸再加 10 mL 甲醇, 超声处理 (功率

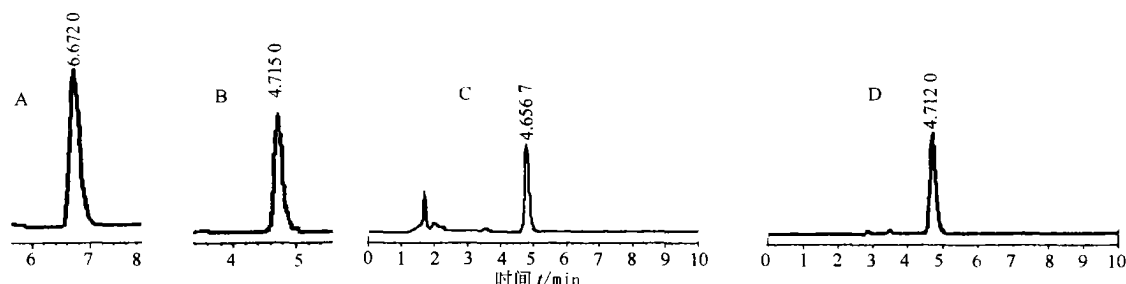


图 1 内标物萘(A)、胡薄荷酮(B)、荆芥穗(C)、荆芥穗挥发油(D)的 HPLC 图

Fig. 1 Chromatograms of naphthalene (A), pulegone (B), Spica Schizonepeta (C), volatile oil of Spica Schizonepeta (D)