

红花药材的质量评价

王若菁, 杨 滨*, 付梅红

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 对红花中色素类成分、腺苷及黄酮类化合物等成分进行分析, 建立红花药材质量评价方法。方法: 采用高效液相色谱-电化学检测技术, 对和指纹图谱红花中羟基红花黄色素 A 的含量进行研究: Agilent ZORBAX Sb C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以磷酸盐缓冲液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 35 ℃, 参比电极 ISAAC (in-situ Ag/AgCl), 工作电极为玻碳电极; 辅助电极为铂电极; 检测电位 + 800 mV。采用高效液相色谱-紫外检测技术, 分析红花中腺苷的含量: Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相水-乙腈 (95/5), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 40 ℃, 检测波长 260 nm; 采用紫外分光光度法, 测定红花红色素的吸光度。结果: 以 21 个共有峰为指标, 建立了红花高效液相色谱指纹图谱, 鉴定出 7 个色谱峰。32 个红花样品中羟基红花黄色素 A 的质量分数为 0.35% ~ 3.58%; 腺苷的质量分数为 0.03% ~ 0.49%。结论: 该方法可用于红花质量评价。

[关键词] 红花; 高效液相色谱-电化学检测; 高效液相色谱-紫外检测; 含量测定; 指纹图谱

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2008)22-2642-05

中药红花 *Flos Carthami* 为菊科一年生草本植物红花 *Carthamus tinctorius* L 的干燥花, 别名草红花。我国主产区在新疆, 其次为四川、云南、河南、河北、山东、浙江、江苏等省^[1]。红花中主要含有色素、黄酮类化合物、酚酸、脂肪酸、挥发油、多炔等成分^[2], 药理报道^[3-4] 红花中色素类、黄酮类和腺苷为红花扩张血管、增加冠脉流量、抑制血小板聚集、改善心脑血管循环的主要有效成分。目前有关红花质量的研究多见于红花中单一成分, 如羟基红花黄色素 A^[5]、6-羟基山柰酚-3-O-葡萄糖苷^[6] 等的含量测定, 以及红花指纹图谱的研究, 如周晓英等以山柰酚为基准物, 建立了红花指纹图谱^[7]; 赵明波等以羟基红花黄色素 A 为基准物, 对不同产地的红花药材进行指纹图谱分析^[8]。但在指纹图谱研究中, 尚未有对色谱峰进行指认的研究。本研究从全国主产区收集了 32 批红花, 从色素、腺苷的含量和黄酮类化合物的指纹图谱研究 3 个方面对红花药材的质量进行评价。

1 材料

1.1 试药与试剂

本实验所用的红花药材经本所生药室何希荣主

管药师鉴定为菊科植物红花 *C. tinctorius* 的干燥花。乙腈 (HPLC 级), 甲醇、乙醇、磷酸、氯化钠、磷酸氢二钠 (AR), 重蒸馏水 (本所自制)。羟基红花黄色素 A 对照品 (批号 111637-200503)、腺苷对照品 (110879-200202) 含量测定用, 购于中国药品生物制品检定所; 芦丁、槲皮素、山柰酚 (日本和光纯药工业株式会社); 槲皮素-3-O-葡萄糖苷 (日本关东化学株式会社)、6-羟基山柰酚-3-O-葡萄糖苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷 (本所王智民、张启伟研究员惠赠)。

1.2 仪器

Waters Alliance 高效液相色谱仪 (包括 2695 Separation Module 四元泵、在线真空脱气机、自动进样器、柱温箱、Waters 2996 二极管阵列检测器 (UV)、Waters 2465 安培检测器 (ECD)、Empower 色谱工作站, 美国 Waters 公司)、Agilent 1100 HPLC-Q trapTM 四极杆线性离子阱串联质谱仪 (AB 公司); 紫外可见分光光度计 (T6 新世纪, 北京谱析通用仪器有限公司)。

2 方法

2.1 指纹图谱研究

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Sb C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 A 磷酸盐缓冲液 (含有 0.1 mol·L⁻¹ 的磷酸氢二钠、0.02 mol·L⁻¹ 的氯化钠, 磷酸调 pH 1.68)-B 乙腈; 梯度洗脱: 0~10 min (5% ~ 11% B), 10~16 min (11% ~ 14% B),

[收稿日期] 2008-05-09

[基金项目] 科研院所社会公益研究专项 (2000 B2 J062); 国际科技合作项目 (2006DFB31720)

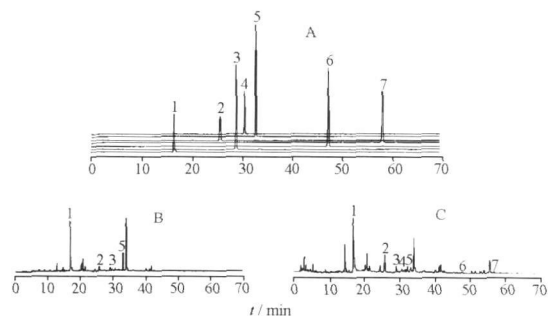
[通讯作者] * 杨滨, Tel (010) 64014411-2848

16~23 min (14%~14% B), 23~30 min (14%~20% B), 30~70 min (20%~35% B)。流速 1 mL·min⁻¹; 柱温 35℃; 参比电极 ISAAC (in-situ Ag/AgCl), 工作电极 玻碳电极; 辅助电极 铂电极; 检测电位 +800 mV。

2.1.2 供试品溶液的制备 取样品粉末 1.00 g 精密称定, 置 50 mL 三角瓶中, 精密加入 60% 乙醇 10 mL, 称重, 50℃ 超声 1 h, 冷却, 补足失重。滤过, 取续滤液过 0.2 μm 滤膜, 即得。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别取羟基红花黄色素 A、6-羟基山柰酚-3-O-葡萄糖苷、芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰酚对照品 5 mg 甲醇定容至 10 mL, 即得对照品溶液。

2.1.4 色谱峰的归属及参照物的选择 分别取各个对照品溶液和红花供试品溶液, 按上述色谱条件进行分析, 得到各对照品和红花的 HPLC 指纹图谱 (图 1)。根据各个色谱峰保留时间和紫外吸收光谱特征确定红花药材色谱图中色谱峰的归属。由于红花图谱中 1 号羟基红花黄色素 A 色谱峰峰面积较大、出峰时间适中, 被选作参照峰。



A 对照品; B 红花 HPLC-UV 图 (360 nm); C 红花 HPLC-ECD 图
1. 羟基红花黄色素 A; 2. 6-羟基山柰酚-3-O-葡萄糖苷; 3. 芦丁;
4. 槲皮素-3-O-葡萄糖苷; 5. 山柰酚-3-O-芸香糖苷;
6. 槲皮素; 7. 山柰酚

图 1 对照品及红花 HPLC 图

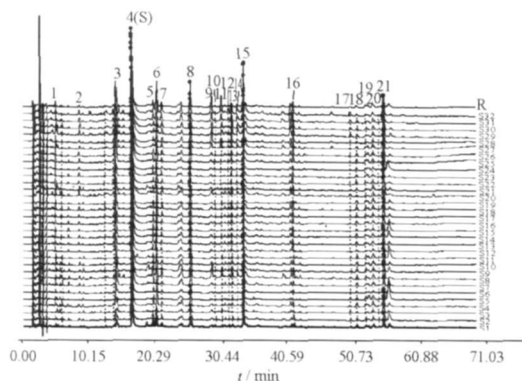
2.1.5 精密度试验 供试品溶液在上述色谱条件下连续进样 5 次, 各主要峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.3%, 相对峰面积的 RSD 均小于 5.8%。

2.1.6 重复性试验 取同一批红花粉末, 按供试品溶液的制备方法操作, 平行制备 5 份样品, 在上述色谱条件下分别进样。各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 1.0%, 相对峰面积的 RSD 均小于 14%。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液在

Q 4 8 12 24 h 进样分析。24 h 内供试品各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.30%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 5.6%。说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.8 样品测定 分别精密称取表 1 中的 32 批样品, 按 2.1.2 项下供试品制备方法制备并测定, 记录色谱图 (图 2)。



1~21. 共有峰; 4. 羟基红花黄色素 A; 8. 6-羟基山柰酚-3-O-葡萄糖苷; 10. 芦丁; 11. 槲皮素-3-O-葡萄糖苷;
14. 山柰酚-3-O-芸香糖苷

图 2 32 批红花样品 HPLC-ECD 指纹图

2.2 羟基红花黄色素 A 的含量测定

2.2.1 色谱条件 同 2.1.1。

2.2.2 供试品溶液的制备 同 2.1.2。

2.2.3 线性关系考察 精密称取羟基红花黄色素 A 对照品 2.20 mg 甲醇溶解, 定容至 25 mL 量瓶中, 即得对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1.0 μL, 5.0 μL, 7.0 μL, 10.0 μL, 15.0 μL, 以峰面积对进样量进行回归, 得到线性回归方程 $Y = 4E + 06X + 8\ 640.6$, $r = 0.999\ 4$ 在 0.088~1.32 μg 有良好线性关系, 其最小检测限 ($S/N = 3$) 0.88 ng, 定量限 ($S/N = 3$) 为 4.40 ng。

2.2.4 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 5 次, 每次 1 μL, 羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 3.5%。结果表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 分别在 Q 4 8 12 24 h 精密吸取同一供试品溶液进样 1 μL, 注入高效液相色谱仪测定, 结果表明羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 3.5%。说明样品在室温条件下 24 h 稳定。

2.2.6 重复性试验 取同一红花药材样品五份, 按供试品溶液制备方法下制备样品, 精密吸取供试品溶液 1 μL, 注入高效液相色谱仪测定, 羟基红花黄色素 A 质量分数平均值为 1.24%, RSD 2.5%。

2.2.7 回收率试验 精密吸取 0.337 g·L⁻¹的羟基红花黄色素 A 对照品溶液 20 mL×6 吹干;再精密称定已知羟基红花黄色素 A 含量的红花样品 0.50 g×6 份,按供试品溶液制备项下制备,在上述色谱条件下测定,羟基红花黄色素 A 平均回收率为 99.9%,RSD 2.3%,结果见表 1。

表 1 羟基红花黄色素 A 加样回收率

Na	样品中量 /μg	测得值 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD %
1	0.658	1.306	96.1	99.9	2.3
2	0.651	1.314	98.4		
3	0.652	1.327	100.1		
4	0.632	1.321	102.2		
5	0.633	1.312	100.7		
6	0.626	1.313	101.9		

注:加入量为 0.674 μg

2.2.8 样品测定 分别精密称取表 1 中的 32 批样品,按 2.1.2 项下供试品制备方法制备并在上述色谱条件下测定,羟基红花黄色素 A 的含量。

2.3 腺苷的含量测定

2.3.1 色谱条件 采用 HPLC-UV 检测, Diamonsil C18 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相水-乙腈 (95:5),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 40℃,检测波长 260 nm。腺苷和红花样品的色谱图见图 3。

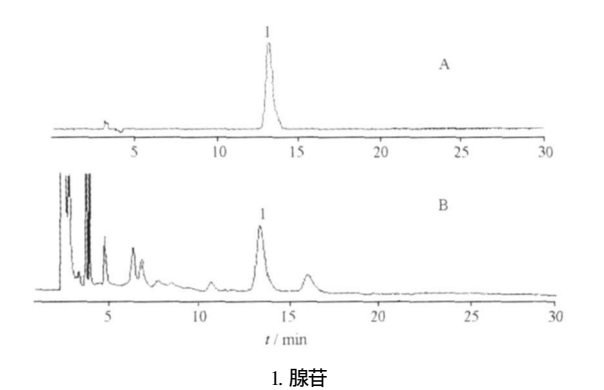


图 3 腺苷对照品 (A) 和红花样品 (B) 的色谱图

2.3.2 供试品溶液的制备 取样品粉末 1.00 g 精密称定,置 50 mL 三角瓶中,精密加入稀乙醇 10 mL,称重,室温超声 30 min,冷却,补足失重。滤过,取续滤液过 0.2 μm 滤膜,即得供试品溶液。

2.3.3 线性关系考察 精密称取腺苷对照品 5.37 mg 用甲醇溶解,定容至 100 mL 量瓶中,进样体积分别为 0.5 1.0 5.0 7.0 10.0 μL,以峰面积对进样量进行回归,得到线性回归方程: $Y = 3E + 0.6X + 4137.7$, $r = 0.9991$, 0.027~0.537 μg 有良好线性

关系,其最小检测限 (S/N=3) 为 13.43 ng 定量限 (S/N=10) 为 107.40 ng

2.3.4 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 5 次,每次 5 μL,腺苷峰面积的 RSD 2.8%。结果表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 分别在 0 4 8 12 24 h 精密吸取同一供试品溶液 5 μL,注入高效液相色谱仪测定,结果表明,腺苷峰面积的 RSD 2.3%。说明样品在室温条件下 24 h 稳定。

2.3.6 重复性试验 取同一红花药材样品 5 份,按供试品溶液制备项下制备样品,精密吸取供试品溶液 5 μL,注入高效液相色谱仪测定,得到腺苷含量的平均值为 0.27%,RSD 1.9%。

2.3.7 回收率试验 精密吸取 0.053 7 mg·mL⁻¹ 的腺苷对照品溶液 2 mL×6 吹干;再精密称定已知腺苷含量的红花样品 0.50 g×6 份,按供试品溶液制备项下制备,在上述色谱条件下测定,腺苷平均回收率为 100.6%,RSD 2.3%,见表 2。

表 2 腺苷加样回收率

样品中量 /μg	测得值 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD %
0.066	0.121	102.4	100.6	2.3
0.068	0.123	102.4		
0.062	0.116	100.6		
0.060	0.113	98.7		
0.056	0.111	102.4		
0.059	0.111	96.8		

注:加入量为 0.053 7 μg

2.3.8 样品测定 分别精密称取表 3 中的 32 批样品,按 2.3.2 项下制备方法制备供试品溶液,并按 2.3.1 项下色谱条件测定,腺苷的含量见表 3。

2.4 红色素的吸光度的测定

取各产地红花样品粉末约 0.25 g 精密称定,置锥形瓶中,加 80% 丙酮溶液 50 mL,连接冷凝器,置 50℃ 水浴上温浸 90 min 放冷,用 3 号玻璃垂熔漏斗滤过,收集滤液于 100 mL 量瓶中,用 80% 丙酮溶液 25 mL 分次洗涤,洗液并入量瓶中,加 80% 丙酮溶液至刻度,摇匀,照分光光度法,在 518 nm 的波长处测定吸光度。结果见表 3。

3 结果与讨论

从图 2 中看出红花中化合物按水溶性色素类,黄酮苷类,脂溶性色素类和黄酮苷元依次洗脱。以药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价

表 3 红花样品羟基红花黄色素、腺苷质量分数及红色系吸光度 (n = 2)

No	购买地 /采收地	采 /收集日期	产地	羟基红花黄色素 A %	腺苷 ‰	红色素 A
1	新疆乌鲁木齐	2006- 05	新疆	1.81	0.21	0.367
2	河南驻马店	2006- 01	新疆	2.02	0.26	0.423
3	河北保定	2006- 01	新疆	1.49	0.16	0.390
4	河北安国	2006- 01	新疆	2.30	0.33	0.460
5	四川盐源	2006- 01	四川	0.35	0.14	0.487
6	江苏南京	2006- 01	新疆	1.27	0.16	0.308
7	山东冠县	2006- 01	新疆	2.58	0.24	0.447
8	云南昆明	2006- 01	云南	2.62	0.28	0.289
9	广西柳州	2006- 01	河南	1.27	0.18	0.547
10	陕西宝鸡	2006- 01	不详 1)	2.44	0.36	0.404
11	河南西峡	2006- 05	河南西峡	0.81	0.11	0.424
12	江西进贤	2007- 02	新疆	2.23	0.26	0.276
13	安徽南京	2007- 02	新疆	1.98	0.29	0.326
14	江西南昌	2007- 02	新疆	3.01	0.39	0.371
15	湖南益阳	2007- 02	不详 1)	1.95	0.28	0.339
16	山东郓城	2007- 02	不详 1)	2.48	0.32	0.339
17	河南息县	2007- 02	河北安国	2.19	0.32	0.265
18	北京	2007- 02	河南	3.58	0.49	0.395
19	福建黄塘	2007- 02	四川	0.99	0.20	0.276
20	河南延津	2006- 07	河南延津	3.50	-	0.298
21	河南新乡	2007- 04	河南新乡	0.68	0.03	0.468
22	河南新乡	2007- 04	新疆	1.24	0.40	0.311
23	河南开封	2007- 04	河南开封	1.21	0.30	0.337
24	河南杞县	2007- 04	河南杞县	0.81	0.21	0.339
25	北京	2007- 05	河南	1.54	0.42	0.353
26	北京	2007- 05	河南	1.41	0.42	0.360
27	云南大理	2007- 05	云南大理	1.41	0.19	0.385
28	云南昆明	2007- 05	云南	1.79	0.21	0.305
29	四川农业科学院	2007- 07	四川简阳	1.61	0.21	0.634
30	四川农业科学院	2007- 07	四川简阳	1.85	0.12	0.426
31	云南大理	2007- 07	云南大理	1.52	0.18	0.202
32	云南大理	2007- 07	云南大理	1.40	0.25	0.221

系统(A版)”对上述 32批红花样品指纹图谱进行分析,根据匹配结果确定了 21个共有峰,峰 4 8 10, 11和 14分别为羟基红花黄色素 A、6羟基山柰酚-3-O-葡萄糖苷、芦丁、槲皮素-3-O-葡萄糖苷和山柰酚-3-O-芸香糖苷的色谱峰,其中羟基红花黄色素 A 的峰面积最大。峰 15经高效液相色谱-质谱分离测定得到分子离子峰 593[M - H]⁻, 碎片峰 *m/z* 285 284 257, 167, 163 147, 145 根据文献初步判定为红花黄色素 A₀。各色谱图中共有峰总面积占有色谱峰峰面积 84% 以上。各共有峰保留时间的 RSD在 0.01% ~ 0.74%。除了第 5批(四川产,相似系数为 0.478)和第 11批(河南产,相似系数为 0.863)样品外,其余 30批样品色谱图与对照指纹图谱相似度均大于 0.914。另外,云南产红花槲皮素-3-O-葡萄糖苷和山柰酚-3-O-芸香糖苷的峰面积比其

他产地样品大。在部分样品中可检出槲皮素 (*t_R* 47.378)和山柰酚 (*t_R* 58.696)。

32批红花样品羟基红花黄色素 A 的质量分数为 0.35% ~ 3.58%;腺苷的质量分数为 0.03‰ ~ 0.49‰;红色素的吸光度在 0.202 ~ 0.634 与文献报道^[8-10]的大致相同。样品中所测成分的质量分数与产地有一定的关系:河南、四川产的红花(18号除外)羟基红花黄色素 A 的质量分数均低于 1.8%;云南、四川产的红花腺苷质量分数较低,均不高于 0.28‰,而河南、新疆产的红花腺苷含量则有高有低,无规律性;云南产的红花红色素吸光度较低。

本试验中作者采用了 2种检测器,紫外检测器主要用于指纹图谱中色谱峰的鉴别和腺苷的含量测定;由于电化学检测器的灵敏度要优于紫外检测器,如羟基红花黄色素 A 电化学检测的最小检测限为

0.88 ng 紫外检测为 8.24 ng 含量较低的黄酮化合物在电化学检测器下能被检出,故采用高效液相色谱-电化学检测技术建立了指纹图谱和羟基红花黄色素 A 含量同时测定的方法。

以羟基红花黄色素 A 为对照品,在 0 ~ +1 050 mV 检测电位下测定其电流值,描绘电流-电位曲线图。结果表明,羟基红花黄色素 A 在 +600 mV 处开始氧化,在 +1 000 mV 时氧化电流达最高值,因检测电位的升高使得噪音值加大,且基线不稳,故选择 +800 mV 作为检测电位。

对料液比、提取溶剂、提取方法、提取温度和提取时间等因素进行了考察,虽然 25% 甲醇和水对羟基红花黄色素 A 的提取率均高于 60% 乙醇,鉴于 60% 乙醇提取信息量较大,故选用 60% 乙醇作为提取溶剂。根据文献报道^[8]选择了磷酸-乙腈为流动相,比较了 10 余个梯度条件及不同酸碱度的影响,根据结果确定了液相色谱条件。

[致谢] 本所林淑芳、邵爱娟、陈敏、何希荣、杨洪军、王祝举等帮助收集样品。

[参考文献]

- [1] 赵钢,王安虎.红花的资源及药用价值[J].中国野生植物资源,2004,23(3):24
- [2] 肖培根.新编中药志.第2卷[M].北京:化学工业出版社,2002:689
- [3] 戎惠珍.红花的化学成分及药理研究概况[J].江西中医学院学报,1997,9(4):45.
- [4] 吴伟,金鸣,杨树东,等.红花总黄素抑制血小板激活因子所致毛细血管通透性增加的研究[J].心肺血管病杂志,1999,18(4):281
- [5] 刘月庆,王睿,毕开顺.HPLC 法测定红花中红花黄色素 A 的含量[J].药物分析杂志,2004,24(4):356.
- [6] 陈新发,张林海.RP-HPLC 法测定红花中 6-羟基山柰酚-3-O-葡萄糖苷含量[J].中华现代临床医学杂志,2003,1(8):73.
- [7] 周晓英,张立新,张良,等.红花的 HPLC 指纹图谱分析方法研究[J].中成药,2002,24(5):325.
- [8] 赵明波,邓秀兰,王亚玲,等.红花 RP-HPLC 指纹图谱的建立及其质量研究[J].药科学报,2004,39(3):212
- [9] 孙沂,郭涛,隋因,等.高效毛细管电泳法同时测定红花中腺苷、芦丁和槲皮素的含量[J].药科学报,2003,38(4):283
- [10] 中国药典.一部[S].2005:103

Quality evaluation of Flos Carthami

WANG Ruo-jing YANG Bin*, FU Meihong

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective** To develop methods for qualitative and quantitative analyses of Flos Carthami from three aspects, pigments, flavonoids and adenosine. **Method** A method using HPLC coupled with electrochemical detector was developed to determine the content of hydroxysafflor yellow A and fingerprint of Flos Carthami. The chromatographic separation was performed on a Zorbax SB C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution with phosphate buffer and acetonitrile at a flow-rate of 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was 35 °C, the reference electrode was SAAC (in-situ silver/silver chloride), the working electrode was glassy carbon, the counter electrode was Pt and the applied potential was +800 mV. Concentration of adenosine was determined by HPLC-UV on an Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with water-acetonitrile (95:5) as mobile phase, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the column temperature was 40 °C and the detection wavelength was 260 nm. The content of carthamin was detected using a spectrophotometric method. **Result** Twenty-one common chromatographic peaks were selected as characteristic peaks in the chromatogram of sample solution of Flos Carthami. Seven peaks were identified as hydroxysafflor yellow A, 6-hydroxykaempferol-3-O-glucoside, rutin, quercetin-3-O-glucoside, kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin, kaempferol. The contents of hydroxysafflor yellow A and adenosine were from 0.35% to 3.58% and from 0.03% to 0.49%, respectively. **Conclusion** The methods can be used to evaluate the quality of Flos Carthami.

[Keywords] Flos Carthami; HPLC-electrochemical detector; HPLC-UV; determination; fingerprint

[责任编辑 王亚君]