

复叶叶柄可以产生体胚,而萌发 30 d 以后的叶柄在整个实验周期内均未见胚胎发生,产生的愈伤组织量也极少。

参考文献:

- [1] 吉林省中中医药研究所等编著. 长白山植物药志 [M]. 长春: 吉林人民出版社, 1982.
- [2] 祝宁, 卓丽环, 臧润国. 刺五加 (*Eleutherococcus senticosus*) 会成为濒危种吗? [J]. 生物多样性, 1998, 6(4): 253-259.
- [3] 赵淑兰, 沈育杰. 刺五加绿枝扦插繁殖研究 [J]. 特产研究, 2003, 25(3): 1-2.
- [4] 张喜春, 刘宏伟, 张弘, 等. 影响刺五加茎尖培养的因素 [J]. 东北林业大学学报, 1996, 24(6): 107-110.
- [5] 邢朝斌, 沈海龙, 赵丽娜, 等. 刺五加的体细胞胚胎发生研究 [J]. 中草药, 2006, 37(5): 769-772.
- [6] 李学宝, 金波. 刺五加愈伤组织的遗传转化 [J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 1995, 29(4): 494-497.
- [7] 宋永贤, 孙利, 孙金元. 刺五加离体培养中胚状体的诱导 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(5): 440-442.
- [8] 崔凯荣, 邢更生, 周攻克, 等. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节 [J]. 遗传, 2000, 22(5): 349-354.
- [9] Choi Y E, Yang D C, Yoon E S. Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings [J]. *Plant Cell, Tissue Org Cult*, 1999, 58: 93-97.

不同款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量分析及 HPLC 指纹图谱研究

马致洁^{1,2}, 董红红², 李振宇², 周玉枝², 秦雪梅^{1,2,*}, 郭小青², 孙海峰², 张丽增^{2,*}

(1. 山西大学化学化工学院, 山西太原 030006; 2. 山西大学化学生物学与分子工程国家教育部重点实验室中药现代研究中心, 山西太原 030006)

摘要:目的 建立款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量测定方法, 测定不同来源的药材中槲皮素和山柰素的量, 评价产地、生长方式及炮制对款冬花中槲皮素和山柰素量的影响; 并建立款冬花中黄酮醇苷类成分指纹图谱, 为款冬花质量控制的制定提供依据。方法 采用 HPLC 建立款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量测定方法, 色谱条件: Diamonsil C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (77:23), 检测波长: 365 nm。采用 HPLC 法建立款冬花药材中黄酮醇苷类成分指纹图谱, 色谱条件: ODS-BP C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% H₃PO₄ 水溶液梯度洗脱; 检测波长为 365 nm。结果 不同产地, 炮制品与生品之间, 其槲皮素和山柰素的量差异较大, 不同生长方式的药材之间无明显差异; 不同产地及批次的款冬花药材的指纹图谱相似度较高。结论 本研究建立的槲皮素和山柰素的定量测定方法简便、准确、重现性好, 可用于款冬花药材中黄酮醇苷类成分的质量控制; 不同来源的款冬花药材中的槲皮素和山柰素的量有明显差异; 所建立的黄酮醇苷类成分的指纹图谱方法操作性强、重现性好, 可作为款冬花黄酮醇苷类成分指纹图谱研究的基础。

关键词: 款冬花; 槲皮素; 山柰素; HPLC; 指纹图谱

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)08-1305-04

Quantitative analysis and HPLC fingerprint of quercetin and kaempferide from different *Flos Farfarae*

MA Zhi-jie^{1,2}, DONG Hong-hong², LI Zhen-yu², ZHOU Yu-zhi², QIN Xue-mei^{1,2,*}, GUO Xiao-qing², ZHANG Li-zeng²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Modern Research Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering Centre for Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract : Objective To establish the method for quantitative analysis of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae*, to determine the contents of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae* from various habitats, to evaluate the effects of habitats, growth way, and processing on the contents of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae*, and to establish the fingerprint of flavone glycosides in *Flos Farfarae*, so as to provide the information for quality control of *Flos Farfarae*. **Methods** Quantification of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae* was performed by HPLC on Diamonsil C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) using acetonitrile-H₂O (77:23) as mobile phase and detected at 365 nm. And fingerprint analysis of flavone glycosides in *Flos Farfarae* was performed by HPLC on ODS-BP C₁₈ column (200 mm × 4.6

* 收稿日期: 2008-10-17

作者简介: 马致洁(1983—), 天津人, 在读硕士, 主要从事中药质量控制及中药代谢组学研究。E-mail: zhijiesy@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 秦雪梅, 教授, 研究生导师。Tel: (0351) 7011202 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

mm, 5 μ m), eluted with acetonitrile-0.1% H_3PO_4 gradiently, and detected at 365 nm. **Results** The contents of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae* related to the habitats and processing obviously, but unrelated to growth way. The similarity of fingerprints of *Flos Farfarae* from different habitats and batches was higher. **Conclusion** The quantification method of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae* is convenient, accurate, stable, and could be used for quality control of flavone glycosides in *Flos Farfarae*. The contents of quercetin and kaempferide are obviously different from various *Flos Farfarae*. The method of the fingerprint analysis is feasible and reproducible, and could be used as the foundation for study on the fingerprints of flavone glycosides in *Flos Farfarae*.

Key words: *Flos Farfarae*; quercetin; kaempferide; HPLC; fingerprint

款冬花为菊科款冬属 (*Tussilago* L.) 植物款冬 *Tussilago farfara* L. 未开放的干燥头状花序, 又名冬花, 主产于陕西榆林地区^[1], 山西、河南、河北、甘肃等地均有分布, 始载于《本草纲目》, 为历版《中国药典》收载中药, 具润肺下气, 止咳化痰之功效^[2]。大量研究表明, 款冬花的主要化合物类型包括萜类、黄酮和生物碱。但对款冬花的质量控制研究报道较少, 仅有对芦丁等^[3]单一成分及总黄酮^[4]的定量测定, 对药材的质量控制专属性不强。而黄酮醇类物质对心血管系统具有明显的药理作用, 是其药效成分, 采用高效液相色谱法对黄酮醇苷类成分中槲皮素和山柰素同时进行测定, 可为其质量控制提供依据; 建立了款冬花中黄酮醇苷类成分指纹图谱, 可作为款冬花黄酮醇苷类成分指纹图谱研究的基础, 并对不同产地、不同生长方式及炮制品款冬花药材中槲皮素和山柰素的量进行测定。

1 仪器与试剂

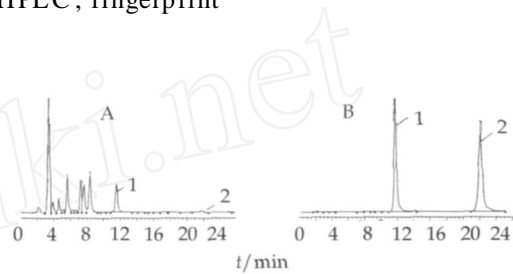
Waters 高效液相色谱仪 (1525 泵, 2487 紫外检测器); Breeze 工作站; 电子分析天平 (BS210S, 北京赛多利斯天平有限公司); 数控超声波清洗器 (KQ2200DB 型)。槲皮素、山柰素对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 供定量测定用); 乙腈: 色谱纯; 水: 重蒸水; 其他试剂均为分析纯。实验所用药材见表 1、2, 经山西大学秦雪梅教授鉴定为款冬未开放的干燥头状花序, 所有药材均留样于山西大学中医药现代研究中心。

2 方法与结果

2.1 槲皮素和山柰素的定量分析

2.1.1 色谱条件: 色谱柱为 Dikma Technologies (美国迪马公司), 流动相为乙腈-水 (77:23), 体积流量: 1 mL/min, 柱温: 25 $^{\circ}C$, 检测波长: 365 nm。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备: 精密称取槲皮素、山柰素对照品适量, 加甲醇制成分别含 27 μ g/mL, 17 μ g/mL 溶液即得。



1-槲皮素 2-山柰素
1-quercetin 2-kaempferol

图 1 款冬花药材 (A) 与对照品 (B) 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of *Flos Farfarae* (A) and reference substance (B)

2.1.3 供试品溶液的制备: 取款冬花药材 (过 2 号筛) 1.5 g, 精密称定, 加甲醇 30 mL, 超声提取 20 min, 滤过, 滤液加 25% 的 HC 溶液 8 mL, 水浴加热回流 30 min, 放冰水中迅速冷却至室温, 转移至 50 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.4 标准曲线与线性关系考察: 分别精密吸取质量浓度为 2.5、7.5、12.5、20.0、30.0、45.0、60.0 μ g/mL 的槲皮素对照品溶液各 20 μ L, 质量浓度为 0.15、0.30、0.60、1.50、7.50、15.00、20.00 μ g/mL 的山柰素对照品溶液 20 μ L, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 测定峰面积, 以峰面积 (Y) 对其质量 (X) 进行回归, 得槲皮素回归方程: $Y = 2E + 06 X - 22357.6$, $r = 0.9996$, 山柰素回归方程: $Y = 3E + 06 X - 7618.5$, $r = 0.9998$, 结果表明, 在 0.005 ~ 1.2 μ g 槲皮素峰面积与进样量呈良好的线性关系; 在 0.0003 ~ 0.4 μ g 山柰素峰面积与进样量呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验: 各精密吸取同一对照品溶液 20 μ L, 分别连续进样 5 次, 照 2.1.1 项下色谱条件测定, 槲皮素峰面积的 RSD 为 1.96%, 山柰素峰面积的 RSD 为 2.12%。

2.1.6 重现性试验: 精密称取同一批药材 6 份, 并制成供试品溶液, 照 2.1.1 项下色谱条件, 平行测定, 测得槲皮素质量分数的 RSD 为 2.11%, 山柰素质量分数的 RSD 为 2.31%。

2.1.7 加样回收率试验:取已测定的款冬花药材适量,精密称定,分别加入槲皮素和山柰素对照品,按样品制备方法制备溶液,平行测定 6 次,记录色谱图。按外标法进行计算,结果款冬花中槲皮素和山柰素的平均回收率分别为 101.1%、101.2%,RSD 分别为 1.12%、1.71%。

2.1.8 样品测定:分别精密吸取对照品溶液与样品溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪,7 个款冬花样品的测定结果见表 1。结果表明,不同款冬花药材中槲皮素和山柰素的量均较高。

表 1 不同产地药材的定量测定结果 (n=3)

Table 1 Contents of quercetin and kaempferol of Flos Farfarae from different habitats (n=3)

药材产地	来源	槲皮素/%	山柰素/%
山西灵丘种植	采集于山西灵丘种植基地	11.3	0.84
山西灵丘野生	采集于山西灵丘种植基地	11.5	0.83
山西(购买)	购买于太原药店	13.8	0.91
河南	山西华阳药业有限公司	10.7	0.76
河北	山西华阳药业有限公司	8.8	0.41
甘肃	购买于同仁堂药店	5.1	0.28
甘肃蜜炙	购买于同仁堂药店	3.6	0.28

2.2 黄酮醇苷类 HPLC 指纹图谱研究

2.2.1 色谱条件:ODS-BP C₁₈ (200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱;流动相:乙腈 (A)-0.1% H₃PO₄ (B),梯度洗脱 (0~30 min, 10%A;30~35 min, 10%A~20%A;35~45 min, 20%A;45~55 min, 20%A~30%A;55~60 min, 30%A;60~65 min, 30%A~40%A;65~70 min, 40%A;70~75 min, 40%A~60%A;75~80 min, 60%A;80~90 min, 60%A~10%A;90~100 min, 10%A);体积流量:1 mL/min;柱温 25 $^{\circ}$ C;检测波长为 365 nm。色谱图见图 2。

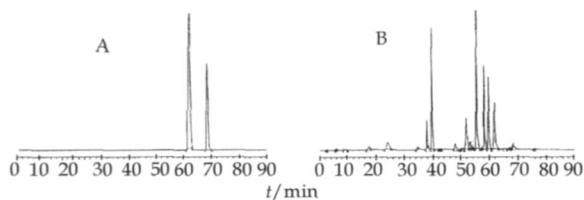


图 2 槲皮素、山柰素混合对照品(A)和山西样品(B) HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of mixture of quercetin and kaempferol (A) and Shanxi sample (B)

在选定条件下,色谱图相邻两峰分离度之和 R 与色谱峰总峰面积之和 S 均为最大,理论塔板数按槲皮素和山柰素峰计算,均不低于 2 000。

2.2.2 对照品溶液的制备:精密称取槲皮素、山柰素对照品适量,加甲醇制成各含 30、20 μ g/mL

即得。

2.2.3 供试品溶液的制备:取款冬花药材粗粉 1.5 g,精密称定,加甲醇 30 mL,超声提取 20 min,滤过,滤液加 25% 的 HCl 溶液 8 mL,80 $^{\circ}$ C 水浴加热回流 30 min,放冰水中迅速冷却至室温,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得。取 20 μ L 进样。

2.2.4 方法学考察:按照《中国药典》2005 年版一部中药质量标准分析方法验证指导原则的要求,对上述方法进行方法学验证。稳定性实验表明样品在 16 h 内稳定性良好;精密度和重现性试验测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明精密度和重现性良好。

2.2.5 指纹图谱分析结果和相似度分析:按照确定的方法,对所选 13 批款冬花药材进行分析,结果共有 12 个共有峰,其色谱图见图 3,保留时间 (min) 分别为:17.433、24.116、34.596、37.848、39.537、47.777、51.767、55.279、57.984、59.541、61.640。以甘肃的色谱图作为参照谱对 13 批不同产地款冬花药材的色谱图进行自动匹配,匹配结果见图 4;相似度分析见表 2。

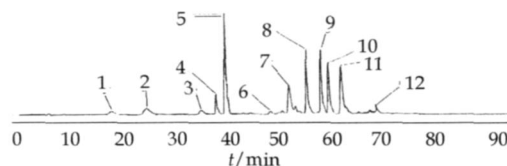
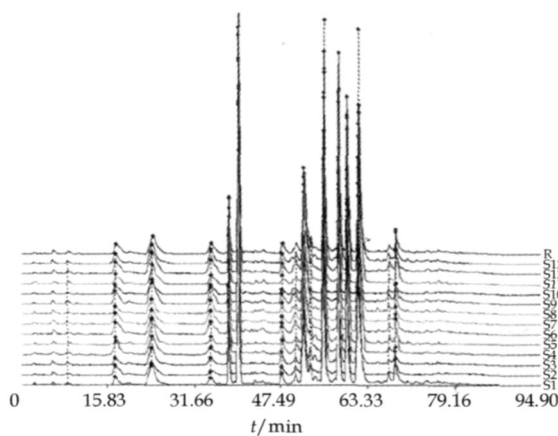


图 3 13 批药材指纹图谱共有峰

Fig. 3 Common peaks of 13 batches of samples



S1~S13-为表 2 中对应的 13 批款冬花药材指纹图谱 R-对照指纹图谱

S1-S13-Fingerprint of corresponding to Table 2 R-reference fingerprint

图 4 13 批药材指纹图谱

Fig. 4 Fingerprint of 13 batches of samples

表 2 13 批款冬花药材相似度计算结果

Table 2 Results of similarity of 13 batches of Flos Farfarae samples

编号	产地	来源	相似度	编号	产地	来源	相似度
1	甘肃	购买于同仁堂药店	0.95	8	山西灵丘(野生 2)	采集于山西灵丘种植基地	0.95
2	河北蔚县	购买于荣华大药房	0.98	9	山西灵丘(种植 1)	采集于山西灵丘种植基地	0.98
3	河南	万民大药房	0.94	10	山西	购买于太原长城大药房	0.97
4	河南	山西华阳药业有限公司	0.98	11	山西	黄河药店	0.99
5	河南	购买于太原长城大药房	0.98	12	山西	万民大药房	0.97
6	河南	购买于太原万民大药房	0.96	13	山西灵丘(种植 2)	采集于山西灵丘种植基地	0.95
7	山西灵丘(野生 1)	采集于山西灵丘种植基地	0.97				

2.2.6 PLS-DA 分析:对 13 批药材指纹数据乾地 PLS-DA 分析,所得结果见图 5。由图 5 可知,各产地药材分散较明显,其中 7 批山西产药材与 4 批河南产药材聚集较集中,甘肃产药材与河南产药材聚集在一起,说明这两个产地之间无明显差异,河北药材与其他几产地有差异。从整体上看,不同产地药材之间有一定的差异性。

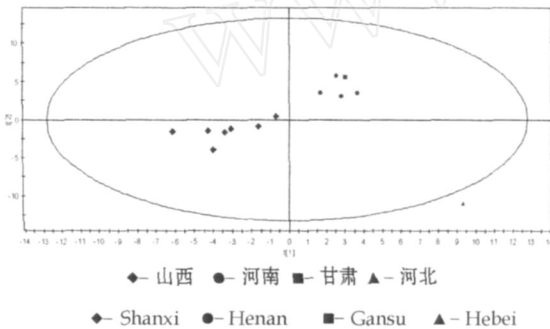


图 5 13 批药材 PLS-DA 分析结果

Fig. 5 PLS-DA Analysis of 13 batches of samples

3 结论与讨论

3.1 所建立的 HPLC 同时测定款冬花中槲皮素和山柰素方法简便、准确、重现性好,可用于款冬花药材中黄酮醇苷类成分的质量控制;通过对不同主产区不同品种款冬花药材指纹图谱研究,得到了对照指纹图谱,该图谱可代表款冬花的特性成分,作为款冬花药材鉴别依据。

3.2 13 批药材的指纹图谱用中药色谱指纹图谱相

似度评价软件分析,结果显示相似度均大于 0.8,说明各产地款冬花其所含化学成分无明显差异;而 PLS-DA 分析结果显示,不同产地分组较好,药材之间有一定的差别。

3.3 不同产地款冬花药材槲皮素和山柰素质量分数比较,本研究收集了 4 个主产区的款冬花药材,由表 1 的数据可知,山西所产的药材槲皮素和山柰素的量都最高,而甘肃所产的药材槲皮素和山柰素的量最低。

3.4 不同生长方式款冬花药材槲皮素和山柰素量的比较,本研究收集了山西灵丘种植和野生两种不同生长方式的药材,由表 1 可知,两种药材中槲皮素和山柰素的量无明显差异,所以生长方式不是款冬花中槲皮素和山柰素量的主要影响因素。

3.5 炮制与不炮制款冬花药材槲皮素和山柰素量比较,从甘肃蜜炙与生品所得结果可以看出,蜜炙品中槲皮素的量降低,只有生品的 70%,山柰素的量基本不变,可知蜜炙对款冬花药材槲皮素影响较大。

参考文献:

- [1] 肖培根. 新编中药杂志 [M]. 北京:化学工业出版社, 2002.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [3] 李仲, 郭玫, 余晓晖, 等. 用高效液相色谱法测定款冬花中芦丁的含量 [J]. 甘肃中医学院学报: 2000, 17(3): 20-21.
- [4] 喻强, 叶玉兰, 秦伟瀚, 等. 不同产地款冬花总黄酮的测定 [J]. 重庆中草药研究, 2007, 1: 18-20.

太子参 HPLC 指纹图谱研究

易智彪^{1,2}, 薄雯映¹, 许冬瑾¹, 赖小平^{2*}

(1. 康美药业股份有限公司, 广东 普宁 515300; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 建立太子参 HPLC 指纹图谱共有模式,并进行方法学考察。方法 采用 HPLC 分析方法,色谱柱为 Kromasil C₁₈柱;流动相:乙腈-水梯度洗脱;时间为 70 min。体积流量:1.0 mL/min;柱温:25℃;检测波长:

* 收稿日期:2008-11-15

作者简介:易智彪(1979—),男,博士后,研究方向为系统生物学及中药质量控制。Tel:(0663) 3883713 E-mail: zhibiao@163.com