

款冬花药材的 HPLC 化学成分指纹图谱研究

刘玉峰, 杨秀伟*

(北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京大学药学院天然药物学系, 北京 100191)

摘要: 建立款冬花药材的高效液相色谱 (HPLC) 化学成分指纹图谱, 为科学评价其质量提供可靠方法。建立了不同产地和/或商品药材款冬花的 HPLC 指纹图谱; 测定了 10 批款冬花样品, 指纹图谱有 25 个共有色谱峰, 并指认了 16 个。对各产地药材指纹图谱进行聚类分析, 根据聚类分析结果将款冬花样品分为 2 类, 选定第 2 类 6 批样品建立共有模式, 并应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004B 版)”对各产地药材进行了评价。所建立款冬花的指纹图谱特征性和专属性强, 方法简便、可靠, 可定性用于全面控制款冬花的质量。

关键词: 款冬花; 色谱指纹图谱; 高效液相色谱法; 二极管阵列检测器

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 05-0510-05

HPLC fingerprint of chemical constituents of Flos Farfarae

LIU Yu-feng, YANG Xiu-wei*

(State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University; Department of Natural Medicines, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: This paper is aimed to establish the method of fingerprint analysis of chemical constituents by reversed-phase high-performance liquid chromatographic (HPLC) with diode array detector (DAD) for the quality control of the flower buds of *Tussilago farfara* L. (Flos Farfarae). The method was performed on a Dikma DiamonsilTM C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm) with a mixed mobile phase of 0.03% trifluoroacetic acid solution and acetonitrile in a gradient mode. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the wavelength of measurement was 240 nm. Ten batches of the Flos Farfarae were determined. The HPLC chromatographic fingerprint of chemical constituents was established from the 10 batches of the Flos Farfarae and showed 25 characteristic common peaks, among which 16 peaks were recognized and 18 compounds (adenosine, uridine, gallic acid, 3-*O*-caffeoylquinic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *trans*-caffeic acid, phthalic acid, rutin, hyperoside, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, kaempferol-3-*O*-β-*D*-glucopyranoside, isoferulic acid, ferulic acid, quercetin, 2,2-dimethyl-6-acetyl chromanone, dibutylphthalate, tussilagone, 7β-(3'-ethylcrotonoyloxy)-1α-(2'-methylbutyryloxy)-3,14-dehydro-*E*-notonipetranone) were determined by comparison with chromatographic behaviors and UV spectra of the authentic compounds. The 10 batches of samples were classified as 2 clusters by cluster analysis and 6 samples were confirmed to establish the mutual model. The samples' quality was assessed by Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (2004 B version). The convenient and high specific method can be used to identify and evaluate the quality of the Flos Farfarae.

Key words: Flos Farfarae; chromatographic fingerprint; HPLC; diode-array detector

款冬花为常用中药, 系菊科植物款冬 (*Tussilago*

farfara L.) 的干燥花蕾 (Flos Farfarae)。款冬分布于河南、河北、湖北、四川、山西、陕西、甘肃、青海、内蒙古、新疆、西藏等省; 多生于河边沙地、山谷沟旁湿地; 主产陕西、山西、河南、河北、甘肃、青海、四川、内蒙古等省, 以河南和山西产量最大; 我国在山西省大同市广灵县建立了“国家中药款冬花 GAP

收稿日期: 2008-11-23.

基金项目: 国家高新技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2004AA2Z3730-07); 《中国药典》标准研究 (YD-077; YD-078) 资助项目。

*通讯作者 Tel: 86-10-82805106, Fax: 86-10-82802724,
E-mail: xwyang@bjmu.edu.cn

种植基地”。款冬花主要含有三萜皂苷、倍半萜、黄酮、生物碱、苯二甲酸酯类、绿原酸、挥发油等^[1-4]。传统应用上款冬花具有润肺、止咳化痰等功效^[1, 5]，历版《中国药典》皆收录了款冬花，但无化学成分的定性和定量质量标准。由于中药具有化学成分多样性和生物活性多样性的特点^[6]，建立全面、系统地控制款冬花质量的分析方法十分必要。指纹图谱技术作为一种多组分化学成分复杂样品的有效质量控制方法，能够反映出待测样品的整体性、特征性，目前已被广泛用于中草药及其各种制剂的质量控制。中药化学成分指纹图谱质量控制模式可以综合反映药材中各主要成分及其相对含量，能提供更加全面丰富的质量评价信息^[7, 8]。作为建立款冬花质量的高效液相色谱 (HPLC) 化学成分指纹图谱评价方法的基础研究部分，系统报道了款冬花非挥发性^[2, 3]和挥发性^[4]化学成分的研究；应用 HPLC 法、流动相为恒速流速，对特征性化学成分款冬酮进行了含量测定^[9]。本文采用二元梯度洗脱模式，建立了款冬花药材 HPLC 化学成分指纹图谱分析和定性质量评价方法。不同来源款冬花样品中化学成分得到很好分离，确定了款冬花药材指纹图谱中的 25 个峰为共有特征色谱峰，并采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2004 B 版）软件，对不同产地和/或商品药材款冬花质量进行了定性质量评价，取得了较理想的结果；为新版《中国药典》款冬花质量标准的制定提供了科学依据。

材料与方 法

仪器、试剂和样品 美国 Agilent 1100 HPLC 系统，配置 G1397A 在线真空脱气机，G1311A 四元梯度泵，G1313A 自动进样器，G1316A 柱温箱，G1315B 二极管阵列检测器和色谱工作站。国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2004 版）软件。色谱用乙腈、甲醇（天津市西华特种试剂厂）和三氟乙酸（Merck Schuchardt 公司），其他试剂均为分析纯。水为二次蒸馏水，用前经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。10 批款冬花药材 [1: 山西大同（收集日期：2004 年 10 月），2: 陕西西安（2005 年 10 月），3: 辽宁沈阳（2005 年 12 月），4: 新疆乌鲁木齐（2005 年 12 月），5: 广西南宁（2005 年 12 月），6: 河北石家庄（2005 年 10 月），7: 河北安国（2005 年 12 月），8: 河南郑州（2005 年 12 月），9: 内蒙古呼和浩特（2005 年 12 月），10: 山东济南（2005 年 12 月）] 直接从产地收集或购于各地药店，经北京大学医学部药学院杨秀伟教授鉴定。样

品 1 采自山西省大同市广灵县加斗乡“国家中药款冬花 GAP 种植基地”，所有生药样品凭证标本存北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室。对照品腺嘌呤核苷（adenosine, 1）、尿嘧啶核苷（uridine, 2）、没食子酸（gallic acid, 3）、3-*O*-咖啡酰基奎宁酸（3-*O*-caffeoylquinic acid, 4）、对羟基苯甲酸（*p*-hydroxybenzoic acid, 5）、反式咖啡酸（*trans*-caffeic acid, 6）、邻苯二甲酸（phthalic acid, 7）、芦丁（rutin, 8）、金丝桃素（hyperoside, 9）、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸（3,5-*O*-dicafeoylquinic acid, 10）、山柰酚-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷（kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside, 11）、异阿魏酸（isoferulic acid, 12）、阿魏酸（ferulic acid, 13）、槲皮素（quercetin, 14）、2,2-二甲基-6-乙酰基苯并二氢吡喃酮（2,2-dimethyl-6-acetylchromanone, 15）、邻苯二甲酸二丁酯（dibutylphthalate, 16）、款冬酮（tussilagone, 17）和甲基丁酰-3,14-*Z*-去氢款冬素酯 [7 β -(3'-ethylcrotonoyloxy)-1 α -(2'-methyl-butyryloxy)-3,14-dehydro-*E*-notonipetranone, 18] 为本课题组从款冬花中分离、纯化^[2]，HPLC 归一化法测定其纯度皆在 98% 以上。

色谱条件和系统适用性 色谱柱：Dikma DiamonsilTM C₁₈ 柱（250 mm $\times$ 4.60 mm ID, 5 μm ），偶联 Dikma EasyGuard C₁₈ 保护柱（20 mm $\times$ 4.6 mm ID）；柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ ，流速 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ，检测波长为 240 nm，进样量 10 μL 。流动相 A 为 0.03% 三氟乙酸水溶液，流动相 B 为乙腈；梯度洗脱：0 min, 15% B；25 min, 30% B；35 min, 75% B；60 min, 80% B；70 min, 90% B；80~85 min, 100% B。以款冬酮的色谱峰 17（图 1）计算理论塔板数不低于 140 000。

对照品溶液的制备 精密称取对照品 1~18 适量，甲醇溶解并定容，摇匀，作为对照品溶液，备用。

供试品溶液的制备 精确称取款冬花粉末（过 40 目筛）1 g，置具塞三角瓶中，精密加入 95% 乙醇 20 mL，密塞，称重，超声振荡 1 h，加 95% 乙醇补足失重，过滤。取续滤液 5 mL，减压蒸干，用适量甲醇溶解并转移至 2 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，用 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液作为供试品溶液。

结 果

1 方法学考察

1.1 仪器精密度 取样品 1 供试品溶液连续进样 6 次，按样品分析条件项 HPLC 条件测定，计算各色谱峰（单峰面积大于 5% 总峰面积）的相对峰面积与保留时间。结果相对峰面积与相对保留时间的 RSD 均

小于 3%，说明精密度良好，符合指纹图谱的检测要求。

1.2 方法精密度 取样品 1 共 5 份，按供试品溶液制备方法制备供试液，分别进行 HPLC 测定，计算各色谱峰（单峰面积大于 5%总峰面积）的相对峰面积与保留时间。结果相对峰面积与相对保留时间的 RSD 均小于 3%，说明重现性良好，符合指纹图谱的检测要求。

1.3 样品稳定性考察 将样品 1 供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12 和 24 h 进样，计算各共有峰的相对峰面积与相对保留时间。结果共有峰的相对峰面积与相对保留时间的 RSD 均小于 3%，说明样品在 24 h 内稳定。

2 款冬花药材 HPLC 指纹图谱的建立

通过对 10 批款冬花样品的测定，确定 25 个峰为共有特征色谱峰。特征峰的选取原则为：主要的特征峰与相邻峰的分离度达到 1.2 以上，其他特征峰也达到一定分离，峰尖到峰谷的距离至少大于该峰高的 2/3 以上，如果未达到，则两个峰可以合并为一个峰计算^[10]。山西款冬花 GAP 基地产款冬花样品色谱图见图 1。供试品在该 HPLC 条件下可分离出 114 个色谱峰，经 10 批样品色谱图比较后，从中选定了相对含量较高的 25 个峰作为共有峰，保留时间分别为 2.50, 2.77, 3.89, 5.38, 7.60, 9.55, 11.08, 15.12, 17.02, 18.12, 19.11, 20.87, 22.52, 26.64, 32.50, 35.18, 39.81, 41.95, 46.83, 56.27, 57.71, 59.86, 66.76, 68.74, 71.73 min。在同样色谱条件下，测定对照品 1~18 溶液，与样品指纹图谱中相应色谱峰进行比较，归属样品指纹图谱中的色谱峰（图 1），并计算其面积所占总色谱峰面积的比例（表 1）。

3 款冬花质量评价方法的确立

首先根据 10 批款冬花样品 HPLC 化学成分色谱指纹图谱特征对其进行聚类分析，并结合聚类分析和专家鉴定结果，选定其中 6 批样品建立共有模式，然后进一步应用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”（2004 版）对各产地药材进行定性质量评价。

3.1 系统聚类分析 将 10 批款冬花样品的指纹图谱各色谱峰面积相对药材称样量之比，即单位质量药材峰面积进行量化，得到 25×10 阶的数据矩阵，应用 SPSS 软件，将 10 批样品分为 2 类，聚类谱系图见图 2。

3.2 指纹图谱相似度评价 结合聚类分析结果，选取第 2 类的 6 批样品（No 1, 2, 5, 6, 9 和 10）建立共有模式。将 6 批样品色谱图导入中药色谱指纹图

谱相似度评价系统研究版（2004 A），选取“时间窗”宽度为 0.50 min，以中位数的方法生成“对照图谱”。进行校正后，得出样品与对照图谱的匹配图（图 3）。再将对照图谱和 10 批样品色谱图全谱导入

Table 1 The proportion of each identified chromatographic peak shared in total area^a

No.	Retention time/min	Peak area	Identified peak No	Identified peak area
1	2.50	209.08	1	209.08
2	2.77	316.74	2	316.74
3	3.89	283.17	3	283.17
4	7.60	12 180.45	4	12 180.46
5	9.55	1 997.32	5	1 997.32
6	11.08	297.87	6/7	297.87
7	15.12	2 971.67	8	2 971.67
8	17.02	1 704.65	9	1 704.66
9	19.11	9 057.50	10	9 057.50
10	20.87	9 829.64	11	9 829.64
11	21.55	6 152.57		
12	22.52	4 773.24		
13	26.64	728.48	12/13	728.48
14	32.50	672.59	14	672.59
15	35.18	187.79	15	187.79
16	41.95	736.46	16	736.46
17	46.83	1 849.12	17	1 849.12
18	71.73	2 249.51	18	2 249.51
Total area				45 272.06
In the ratio of identified peak area to total area				65.42%

^aTested crude drug was sample No. 1 collected from Datong city of Shanxi province

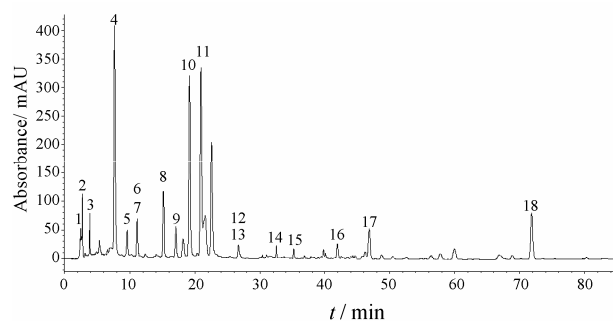


Figure 1 Typical HPLC fingerprint graph of the Flos Farfarae produced in the China National GAP Base of Chinese Materia Medica for *Tussilago farfara* L. in Datong city of Shanxi province. Peak 1: Adenosine; Peak 2: Uridine; Peak 3: Gallic acid; Peak 4: 3-*O*-Caffeoylquinic acid; Peak 5: *p*-Hydroxybenzoic acid; Peak 6: *trans*-Caffeic acid; Peak 7: Phthalic acid; Peak 8: Rutin; Peak 9: Hyperoside; Peak 10: 3,5-*O*-Dicafeoylquinic acid; Peak 11: Kaempferol-3-*O*- β -D-glucopyranoside; Peak 12: Isoferulic acid; Peak 13: Ferulic acid; Peak 14: Quercetin; Peak 15: 2,2-Dimethyl-6-acetylchromanone; Peak 16: Dibutylphthalate; Peak 17: Tussilagone; Peak 18: 7 β -(3'-Ethylcrotonoyloxy)-1 α -(2'-methyl-butyryloxy)-3,14-dehydro-*E*-notonipetranone. Compounds 6 and 7, and compounds 12 and 13 had the same retention time

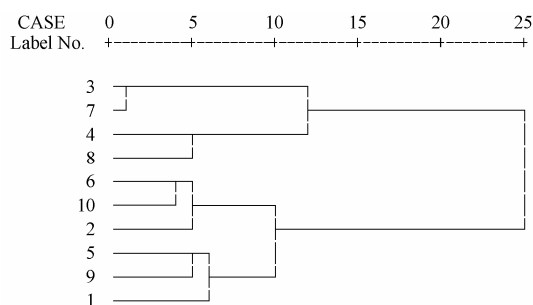


Figure 2 The results of dendrograms analysis. Dendrograms resulting from average linkage within groups hierarchical cluster analysis. A method named as within-groups linkage was applied, and squared Euclidean distance was chosen as measurement

“中药色谱指纹图谱相似度评价系统检验版 (2004 B)”, 软件即可计算出样品与对照谱图的相似度数据 (表 2)。若相似度在 0.900 以上, 则判定为优质药材; 若相似度在 0.800~0.900, 则药材质量一般; 若相似度低于 0.800, 则判定为劣品。本研究相似度分析结果显示: 10 批药材未见伪品, 相似度均高于 0.900, 相似度分析结果与专家鉴定结果一致。在应用 SPSS 软件进行聚类分析的过程中, 聚类方法及测度的选择可以直接影响样品聚类的结果, 本研究使用类内平均链锁法 (within-groups linkage), 并利用欧氏距离平方 (squared Euclidean distance) 作为样品测度, 这种聚类方法和测度在指纹图谱研究中较为常用^[11], 而且在本研究中, 应用此方法和测度的聚类结果与专家生药鉴别结果、直观分析和指纹图谱研究结果都最为一致。不同于其他测度, 在以单位质量药材峰面积为量化进行聚类时, 以欧氏距离平方为测度, 聚类分析结果侧重于体现各药材之间“量”的差异。在研究中发现, 由于样品 No 1, 2, 5, 6, 9 和 10 参与了共有模式的建立, 所以其相似度较高; 其余样品虽然在“量”上与参与共有模式的样品之间有差异, 但从相似模式上说, 并没有太大差别。

讨论

由于等度洗脱分离效果较差, 本研究以梯度洗脱模式在 85 min 内获得款冬花药材化学成分指纹图谱, 图谱指纹性强, 且各色谱峰大部分都得到了基线分离。每个色谱峰的纯度均采用紫外色谱法鉴定, 未发现干扰物质存在。虽然反式咖啡酸和邻苯二甲酸、款冬酮和甲基丁酰-3,14-Z-去氢款冬素酯没有得到分离, 但指认的 16 个共有峰基本反映了款冬花中 5 个类型化合物 (挥发性化学成分除外), 能够综合反映款冬花的化学成分质量。

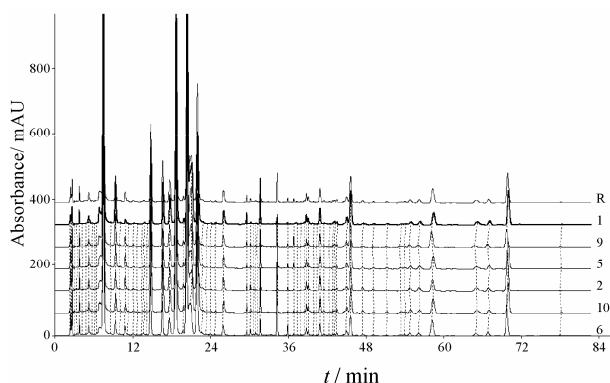


Figure 3 The chromatographic peaks matching result of Flos Farfarae from different merchandise sources and of the reference

Table 2 The similarity evaluation result of materia medica from different merchandise sources ($n = 2$)

Batch	Sample source	Similarity
1	Datong, Shanxi	0.981
2	Xi'an, Shaanxi	0.986
3	Shenyang, Liaoning	0.986
4	Urumqi, Xinjiang	0.988
5	Nanning, Guangxi	0.998
6	Shijiazhuang, Hebei	0.977
7	Anguo, Hebei	0.982
8	Zhengzhou, Henan	0.995
9	Hohehot, Inner Mongolia Autonomous Region	0.991
10	Jinan, Shandong	0.992

采用二极管阵列检测器做全波长扫描, 考察不同吸收波长图谱, 重点考察了 220, 240, 254 和 270 nm 处的谱图特征。结果表明, 240 nm 处各成分具有较好的紫外吸收, 色谱信息丰富, 基线平稳, 而且避免了溶剂末端吸收的影响。

分别用甲醇、70%乙醇、95%乙醇作为提取溶剂, 0.5, 1.0 和 1.5 h 作为提取时间, 超声、回流、冷浸作为提取方式, 采用 20、40 和 60 倍量 ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$) 作为提取体积, 使用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 进行正交试验考察所获得的谱图。结果表明, 使用 20 倍量、95%乙醇、以超声为提取方式、提取时间为 1 h 的提取效率最高, 谱图特征性较强, 分离效果好。

一般来说, 中药质量随产地不同而差异较大, 所以在利用色谱指纹图谱评价中药质量的过程中选择何种药材建立共有模式颇为重要。本文选取了 6 批有代表性的款冬花药材建立共有模式, 且参与共有模式建立的药材均为专家鉴定质量合格的相互独立的药材样本, 并结合系统聚类分析结果, 保证了共有模式建立的代表性和科学性。

References

- [1] Jiangsu College of New Medicine. Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977: 2301.
- [2] Liu YF, Yang XW, Wu B. Chemical constituents from buds of *Tussilago farfara* L. [J]. J Chin Pharm Sci, 2007, 16: 288–293.
- [3] Liu YF, Yang XW, Wu B. Studies on chemical constituents in the buds of *Tussilago farfara* L. [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 2378–2381.
- [4] Liu YF, Yang XW, Wu B. GC-MS analysis of essential oils constituents from the flower buds of *Tussilago farfara* L. [J]. J Chin Pharm Sci, 2006, 15: 10–14.
- [5] Wang YM. Pharmacological studies of extracts of *Tussilago farfara* L. (II). Effects on the cardiovascular system [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1979, 14: 268–275.
- [6] Yang XW. Studies on chemical constituents in Chinese herbal medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 38: 961–969.
- [7] Nie L, Luo GA, Cao J, et al. Pattern recognition applied to the fingerprint of traditional Chinese medicine characterized by two-dimension information data [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39: 136–139.
- [8] Liu RX, Wang Q, Bi KS, et al. Chromatographic fingerprint of *Dalbergia odorifera* and its application in the identification of the crude drugs of different origins [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 1008–1012.
- [9] Liu YF, Yang XW. RP-HPLC determination of tussilagone in *Flos Farfarae* [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2009, 29: 31–34.
- [10] Wang X, Wang WY, Zhang KR, et al. Approaching the study on the similarity analysis of HPLC fingerprint spectra for traditional Chinese medicines [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2003, 20: 360–366.
- [11] Wang TT, Chen XH, Hu QQ, et al. RP-HPLC fingerprint for quality assessment of *Radix Angelicae dahuricae* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 747–751.