

红花显微特征常数与化学成分相关性

厉妲, 张静, 张建逵, 许亮, 康廷国*
(辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600)

[摘要] **目的:**研究红花花粉粒显微特征常数的测定方法并测定红花中指标性成分羟基红花黄色素 A 的含量,分析两者的相关性,建立评价红花质量的新方法。**方法:**采用容量分析法对红花粉末中花粉粒的显微特征常数值进行测定,采用高效液相法对红花中羟基红花黄色素 A 的含量进行测定,将两组数据用统计方法进行相关性分析。**结果:**红花中花粉粒的显微特征常数与羟基红花黄色素 A 具有显著的相关性(正相关)。即红花花粉粒的显微特征常数的数值愈大,羟基红花黄色素 A 的含量愈大。**结论:**利用显微定量法测定红花显微特征常数值来评价其质量是科学、可行的。该研究初步建立了一种基于花粉粒显微特征常数测定的中药材质量评价新方法及技术,可为红花的质量控制提供新的技术手段,为其质标准制定提供参考依据。

[关键词] 红花; 显微定量; 花粉粒; 羟基红花黄色素 A; 相关性

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0057-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190057

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140819.0921.007.html>

[网络出版时间] 2014-08-19 9:21

Correlation Between Microscopic Characteristic Constants and Chemical Components of Carthami Flos

LI Da, ZHANG Jing, ZHANG Jian-kui, XU Liang, KANG Ting-guo*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this article was to study on the determination method of microscopic characteristic constants of pollen grains in Carthami Flos and detect the content of hydroxysafflor yellow A, and analysis of the correlation between the two sides were analyzed. **Method:** Capacity analysis was used to quantify pollen grains of Carthami Flos and the content of hydroxysafflor yellow A was determined by HPLC. The data were analyzed by SPSS statistics software. **Result:** The microscopic characteristic constants of pollen grains and the content of hydroxysafflor yellow A in Carthami Flos were significantly correlated (positive correlation). In other words, results indicated that herbal samples with more pollen grains would contain greater amounts of the pharmacologically active components in Carthami Flos, thus be of better quality in clinical application. **Conclusion:** It is scientific and feasible to determine the quality of Carthami Flos is by the microscopic quantitative method. The method of based on the microscopic characteristic constants of pollen grains has been preliminarily established. It can be applied to the quality control of Carthami Flos. This approach can be further applied to other medicinal herbs, extending the use of microscopic techniques to the field of quality control of medicinal materials.

[Key words] Carthami Flos; microscopic quantitative method; pollen grain; hydroxysafflor yellow A; correlation

[收稿日期] 20140319(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173499)

[第一作者] 厉妲,在读硕士,从事中药鉴定与品质评价,Tel:18004012786,E-mail:lida.lnzydx@163.com

[通讯作者] *康廷国,教授,博士研究生导师,从事中药鉴定与品质评价,Tel:0411-87586018,E-mail:kangtg@lnutcm.edu.cn

红花作为我国传统的活血化瘀类中药,具有活血通经、祛瘀止痛之功效。用于跌打损伤、痛经、冠心病、脑血栓等心脑血管疾病的治疗。红花粉末中花粉粒为深黄色,直径 39 ~ 60 μm,呈类圆球形、椭圆形或橄榄形,外壁上有短刺及疣状雕纹,具有 3 个萌发孔,且孔口类圆形或长圆形^[1-2]。花粉粒是红花粉末中较为明显且稳定的显微特征,其数量众多、便于观察计数的特点有利于在显微镜下进行显微定量^[3]。

显微定量法是采用质量分析法或容量分析法测定中成药中某种药材含量的一种传统方法,这种中药材的特点是本身具有显微特征且显微特征具有固定常数^[4]。有关红花花粉粒的显微特征常数与其化学成分相关性的研究未见报道。红花黄色素是红花起活血化瘀作用的主要成分,而其指标性成分为羟基红花黄色素 A。本实验选用红花粉末中的花粉粒为研究对象,采用容量分析手段测定其显微特征常数,采用高效液相法测定羟基红花黄色素 A 含量,将得到的两组数据利用统计学方法进行了相关性分析,旨在为评价红花的质量提供一种新的可行的方法^[5]。

1 材料

1.1 仪器 Olympus 显微摄影系统(包括 BX-51 型研究级万能显微镜,配 DP-72 型显微镜数码相机,日本奥林巴斯株式会社),CP225D 型电子分析天平(德国赛多利斯集团),1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司)。

1.2 试剂 水合氯醛、丙三醇均为分析纯,甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯,以上试剂均由天津市科密欧化学试剂有限公司提供,水为重蒸水。羟基红花黄色素 A 对照品(批号 111637-201207)购于中国食品药品检定研究院。水合氯醛、稀甘油试液依照《中国药典》2010 年版一部附录配制。

1.3 药材 红花样品 1 ~ 7 均购自药店,7 ~ 14 为盛开时采集(9 ~ 14 为同一采集地不同批次),所有样品均经辽宁中医药大学康廷国教授鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,具体来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 红花药材水分的测定 按照 2010 年版《中国药典》中烘干法来测定各红花样品的含水量,结果见表 2。

2.2 红花中花粉粒显微特征常数测定优化条件的选择 显微特征常数值测定结果的准确性与样品混

表 1 红花药材来源

No.	产地/采集地
1	河南省开封市通许县
2	新疆维吾尔自治区吉木萨尔县
3	四川省简阳市
4	浙江省宁波市
5	新疆维吾尔自治区乌什县
6	河南省新乡市
7	北京市中国医学科学院药用植物研究所植物园
8	辽宁省沈阳市沈阳药科大学药草园
9 ~ 14	河南省新乡市卫辉市安都乡庄和村种植基地

表 2 红花样品水分测定

No.		含水量 %	
1	11.90	8	11.25
2	9.42	9	9.2
3	8.69	10	9.11
4	9.54	11	9.92
5	11.85	12	8.81
6	12.96	13	9.33
7	12.40	14	9.51

悬效果有直接关系,其中影响样品混悬效果的主要因素有样品质量、样品的粉碎粒度、混悬剂的用量。根据预试验结果,采用三因素六水平均匀设计法对显微定量法的优化条件进行考察^[6]。

取 1 号红花样品,粉碎后分别按均匀设计方案表中对应值过 80 目或 100 目筛,精密称定 5,10,15,20,25,30 mg 共 6 份样品,分别用水合氯醛试液多次水飞后移入 25 mL 量瓶中,加入相应量的甘油,最后用水合氯醛液定容。充分摇匀后,分别对上述各混悬液进行显微装片,即用微量移液器精密吸取 20 μL 混悬液置于洁净的载玻片上,盖好盖玻片。6 份溶液各平行装片 50 张,于显微镜下对红花的花粉粒进行观察计数。将得到的结果随机分为 5 组,分别计算每组平均值的 RSD,具体实验设计及结果见表 3。

以每份红花样品平均值的 RSD 为考察指标。通过数据统计软件 SPSS 19.0 中多元线性回归分析(STEPWISE)得到的均匀设计结果 $Y = 9.428 - 0.221X_1 (r = 0.988), F = 162.779, Y_{\min} = 2.798$ (即 2.80%)。其中 Y 为 RSD(%); X_1 为样品的质量; X_2 为药材粉碎的粒度; X_3 为加入的甘油量。根据所得方程,影响 RSD 的主要因素是 X_1 样品质量,排除的变量是 X_2 粉碎粒度和 X_3 加入甘油量。 X_2 和

表3 红花中花粉粒显微特征常数测定
均匀设计方案 $U_6(6^3)$ 及测定

No.	X_1 质量/mg	X_2 粒度/目	X_3 甘油 加入量/mL	RSD /%
1	5.00	80	5.0	8.47
2	9.99	100	8.0	7.14
3	15.01	100	4.0	6.34
4	19.98	80	7.0	4.39
5	25.02	80	3.0	4.07
6	30.03	100	6.0	2.96

X_3 与 Y 无显著的相关性,因此 X_2 和 X_3 可依试验具体情况选择。

由上所得优化条件,样品的称样量为 30 mg,粉碎过 100 目筛,加入甘油量为 6 mL。

均匀设计的验证:取 3 份(30.02, 30.01, 29.97 mg)1 号红花样品按上述所得优化条件配制,3 份样品所测得的显微特征常数平均值为 59.53, 60.04, 59.96 个/mg,其中各样品的 RSD(2.74%, 2.54%, 2.72%) 均小于优化条件给出的最小 RSD(2.80%),说明本均匀设计方案合理可行。

2.3 红花各样品中花粉粒的显微特征常数值测定

取(2~14 号)共 13 批次的红花药材粉末(每批平行 3 次),按照上述所得均匀优化的条件配制后用水合氯醛试液多次水飞,分别定容于 25 mL 量瓶中,充分摇匀后,对上述各混悬液分别进行显微装片,即用微量移液器精密吸取 20 μ L 混悬液置于洁净的载玻片上,盖好盖玻片。每份溶液平行装片 50 张,于显微镜下观察花粉粒,计数并取其 3 份的平均值,按照公式(1)计算花粉粒显微特征常数值,1 号样品的数据取均匀设计验证试验的结果。见表 4。

表4 红花各样品显微特征常数测定 个/mg

No.	显微特征常数	No.	显微特征常数
1	2 807.18	8	3 754.81
2	2 966.10	9	3 558.70
3	2 572.90	10	3 490.66
4	3 207.95	11	3 429.46
5	2 105.16	12	2 494.45
6	2 514.92	13	3 978.96
7	2 695.15	14	3 482.89

$$P = (X \times V) / (V' \times W) \quad (1)$$

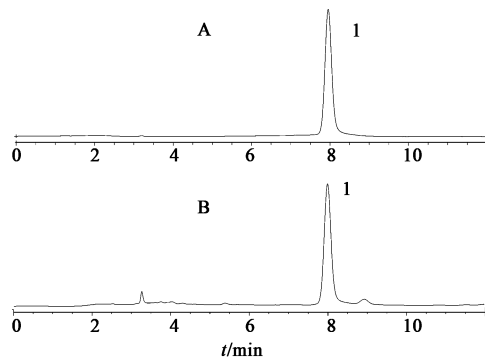
P : 定量药材的显微特征常数(个/mg), X : 每片盖玻片下药材的显微特征数, V : 定量药材混悬液的总体积(mL), V' : 盖玻片下药材混悬液的体积

(mL), W : 药材的质量(mg,按干燥品计算)。

本试验中测定红花花粉粒显微特征常数时对其进行了方法学考察,其中线性关系考察:样品质量在 21.00~36.00 mg(30.00 mg 的 70%~120%) 呈良好的线性关系,回归方程 $Y = 2.874 2X - 18.463$, ($r = 0.992$);精密度考察: $\bar{X} = 2 796.04$ 个/mg, RSD 1.89%;重复性考察: $\bar{X} = 2 799.79$ 个/mg, RSD 2.1%;回收率测定:回收率均在 95.00%~105.00%,回收率的 RSD 1.8%。

2.4 HPLC 测定红花中羟基红花黄色素 A 的含量

2.4.1 色谱条件与系统适应性^[1] Waters Symmetry C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),流动相甲醇-乙腈-0.7% 磷酸溶液(26:2:72),流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 403 nm,柱温 30 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L。在上述色谱条件下得到的对照品及样品色谱见图 1。



A. 对照品; B. 红花样品; 1. 羟基红花黄色素 A

图1 红花中羟基红花黄色素 AHPLC

2.4.2 对照品溶液的制备 精密称取羟基红花黄色素 A 对照品适量,加 25% 甲醇溶液配制成 0.13 g \cdot L⁻¹的对照品贮备液。

2.4.3 供试品溶液的制备 分别取 14 批红花样品粉末约 0.4 g(过三号筛),精密称定后置具塞锥形瓶中,精密加入 25% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 50 kHz)40 min,放冷,再称定质量,用 25% 甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,过微孔滤膜(0.45 μ m),即得供试品溶液。

2.4.4 测定方法 分别精密吸取供试品、对照品溶液各 10 μ L,在上述色谱条件下注入液相色谱仪,记录峰面积,每个样品平行测定 3 次,以均值作为结果见表 5。

3 相关性分析

SPSS 19.0 分析两组数据(经检验均符合相关性分析的条件)的相关性。结果 $Y = 0.000 5X -$

表 5 红花中羟基红花黄色素 A 含量测定 %

No.	羟基红花黄色素 A	No.	羟基红花黄色素 A
1	1.17	8	1.98
2	1.05	9	1.77
3	1.11	10	1.67
4	1.15	11	1.76
5	1.01	12	1.63
6	1.03	13	1.85
7	1.02	14	1.78

0.223 7, $r=0.802$, $F=21.667$, $P=0.001 < 0.01$, 有极显著的统计学意义 (Y 为羟基红花黄色素 A 含量, X 为红花花粉粒显微特征常数)。两组数据不仅有显著的相关性, 且呈正相关, 即红花花粉粒的显微特征常数的数值愈大, 羟基红花黄色素 A 的含量愈大。

《中国药典》2010 年版规定, 红花按干燥品计算, 含羟基红花黄色素 A 不得少于 1.0%。由所得回归方程可知, 含量达到《中国药典》标准的红花粉末中花粉粒的显微特征常数应不低于 2 447.4 个/mg。

4 讨论

红花由于粉碎后过 100 目筛, 有的花粉粒较完整, 有的已破碎。观察时对完整的花粉粒计为一个单位; 破碎的花粉粒大于 1/2 计为一个单位; 其他情况忽略不计。

目前 2010 年版《中国药典》一部中, 以羟基红花黄色素 A 的含量作为红花质量控制的指标, 但

HPLC 分析耗费试剂、仪器。根据本实验统计分析结果, 可通过红花花粉粒显微特征与化学含量相关性来评价红花的质量, 从而提供了一种可行的、简单的显微测定方法来评价红花的质量。

根据本课题组研究结果, 建议《中国药典》将显微特征常数与化学成分具有显著相关性的药材项下增加显微常数测定项; 同时将中成药中含有此药材(原粉入药)项下增加显微定量项目。这样不仅丰富了药材品质评价内容, 亦为制定其质量标准提供新的参考依据^[8-9]。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:141.

[2] 康廷国. 中药鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012:285.

[3] 康廷国. 中药鉴定学专论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009:146.

[4] 苑冬敏, 刘扬, 栾晓静, 等. 黄柏的显微定量研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(5):964.

[5] 梁鹏, 赵中振, 李娜, 等. 槐米显微特征常数与化学成分相关性研究[J]. 中药材, 2013, 36(4):572.

[6] 刘明芝, 周仁郁. 中医药统计学与软件应用[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011:312.

[7] 陈常莲, 胡斯乐. HPLC 测定蒙药德都红花七味丸中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23):3673.

[8] 刘歆韵, 刘丽, 李斌, 等. 白芍显微特征常数与化学成分相关性研究[J]. 中药材, 2010, 33(4):559.

[9] 陈聪慧, 康廷国. 金银花显微特征常数与化学成分相关性研究[J]. 中药材, 2011, 34(9):1373.

[责任编辑 顾雪竹]

