

## 红花标准汤剂的质量评价

董青<sup>1,2</sup>, 赵嵘<sup>2</sup>, 代云桃<sup>2\*</sup>, 李琦<sup>3</sup>, 友田健久<sup>4</sup>, 范自全<sup>5</sup>, 王丹丹<sup>5</sup>, 马玉芹<sup>1</sup>

(1. 长春理工大学 化学与环境工程学院, 长春 130022; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;  
3. 上海市药材有限公司, 上海 200002; 4. 日本株式会社津村, 东京 107-8521;  
5. 沃特世科技(上海)有限公司, 上海 201206)

**[摘要]** **目的:**建立红花标准汤剂的质量控制方法。**方法:**收集有代表性的14批红花,制备红花标准汤剂,计算出膏率、指标成分转移率和溶液pH等参数,评价工艺的稳定性;建立指标成分含量测定和指纹图谱方法,采用UPLC-Q-TOF/MS对主要色谱峰进行结构确认,明确红花标准汤剂中的主要化学成分。**结果:**标准汤剂出膏率32.6%,羟基红花黄色素A的转移率61.2%,pH 4.1;标准汤剂中羟基红花黄色素A平均质量浓度 $3.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,指纹图谱相似度均 $>0.9$ ,标准汤剂的主要成分为黄酮类。**结论:**建立了系统评价红花标准汤剂的质量评价方法,为所有源于红花水煎液的制剂的质量标准制定提供参考,所得红花标准汤剂的指标成分转移率高、质量均一性良好。

**[关键词]** 红花; 标准汤剂; 水煎液; 羟基红花黄色素A; 指纹图谱; 黄酮类; 出膏率; 转移率

**[中图分类号]** R283.6;R284.1;R944.6+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0012-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2017070012

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1159.032.html>

**[网络出版时间]** 2017-01-09 11:59

## Quality Evaluation of Standard Decoction of Carthami Flos

DONG Qing<sup>1,2</sup>, CHAO Jung<sup>2</sup>, DAI Yun-tao<sup>2\*</sup>, LI Qi<sup>3</sup>, YOUTIAN Jian-jiu<sup>4</sup>,  
FAN Zi-quan<sup>5</sup>, WANG Dan-dan<sup>5</sup>, MA Yu-qin<sup>1</sup>

(1. School of Chemistry and Environmental Engineering, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Shanghai Traditional Chinese Medicine Co. Ltd., Shanghai 200002, China; 4. Tsumura&Co., Tokyo 107-8521, Japan;  
5. Waters Technologies (Shanghai) Co. Ltd., Shanghai 201206, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish quality control methods for standard decoction of Carthami Flos. **Method:** Standard decoction of Carthami Flos was prepared, its dry extract rate, transfer rate of index components and pH were calculated to evaluate the stability of the process. A quality control method containing determination of hydroxysafflor yellow A and UPLC-UV fingerprint was established, the main common peaks in fingerprint were identified to clarify the main chemical constituents in standard decoction of Carthami Flos. **Result:** The concentration of hydroxysafflor yellow A in the standard decoction was  $3.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The similarities of fingerprints of samples were  $>0.9$ . The dry extract rate of the standard decoction was 32.6%, the transfer rate of hydroxysafflor yellow A was 61.2%, pH was 4.1. **Conclusion:** Methods for evaluating the quality of standard decoction of Carthami Flos is presented, they can provide reference for the quality control of products which are

**[收稿日期]** 20161230(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81473340)

**[第一作者]** 董青,在读硕士,从事化学与环境工程研究,Tel:18443195911,E-mail:dongqing@ciac.ac.cn

**[通讯作者]** \*代云桃,博士,副研究员,从事中药药效物质基础研究,E-mail:ytdai@icmm.ac.cn

stemmed from the water extract of Carthami Flos.

[Key words] Carthami Flos; standard decoction; water extract; hydroxysafflor yellow A; fingerprint; flavonoids; dry extract rate; transfer rate

红花始载于《开宝本草》<sup>[1]</sup>,具有活血通经、散瘀止痛的功效,为传统活血化瘀中药,临床常用于治疗炎症、心脑血管疾病、骨质疏松等<sup>[2]</sup>。其主要化学成分包括黄酮类、生物碱类、木质素类、有机酸等<sup>[3]</sup>。黄酮类化合物被认为是红花的主要有效成分<sup>[4-5]</sup>。目前关于红花多指标成分含量测定及指纹图谱的研究已有报道<sup>[6]</sup>,但研究多针对醇提部位,未能反映传统用药方式——水煎液的质量。

红花为常用中药材,在复方中广泛使用。《中国药典》2015 年版收录的成方制剂中,源于红花水煎液的复方制剂共有 55 个,包括三七伤药胶囊、中风回春丸、祛风止痛丸消栓口服液等。其中胶囊剂 18 个、片剂 14 个、颗粒剂 13 个、丸剂 5 个、口服液 5 个,这些复方中红花药味均采用了水煎煮的制备工艺,说明红花水煎液质量标准的研究对这些复方的质量标准制定和提升具有重要意义。中药饮片标准汤剂是经标准化工艺制备而成的单味中药饮片水煎剂<sup>[1]</sup>,是配方颗粒等中药制剂的质量评价的基准。本实验主要目的是阐述红花标准汤剂的制备和质量评价方法<sup>[7]</sup>,对主要工艺参数进行标定,并对其指纹图谱的主要共有峰进行鉴定,为红花药材水煎液建立了系统的质量评价方法。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相系统和 Xevo G2-XS 型 Q-TOF 高分辨质谱仪(美国 Waters 公司)。14 批红花药材购于新疆、云南、安徽等地,经中国中医科学院中药研究所代云桃副研究员鉴定和 DNA 测序,鉴定为菊科植物红花 *Carthamus tinctorious* 的干燥花。羟基红花黄色素 A 对照品(北京世纪奥科生物技术有限公司,批号 78281-02-4,纯度 99.71%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 红花标准汤剂** 精密称取红花饮片 100 g 置于圆底烧瓶中,加 12 倍量水充分润湿,放置浸泡 30 min,加热煮沸后回流提取 30 min,趁热 3 层纱布过滤;滤渣加 10 倍量水回流提取 20 min,滤过,合并滤液,水浴浓缩至 500 mL,即得。

**2.1.2 供试品溶液** 取红花标准汤剂置于 2 mL 离心管中,加水稀释 10 倍,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液,即得。

**2.1.3 对照品溶液** 称取羟基红花黄色素 A 对照品适量,置于棕色量瓶中,加 25% 甲醇制成 1.0 g·L<sup>-1</sup> 对照品溶液。

### 2.2 羟基红花黄色素 A 的含量测定

**2.2.1 色谱条件** Silgreen C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),柱温 30 °C,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10 μL,流动相 0.7% 磷酸水溶液-甲醇-乙腈(72:26:2),检测波长 403 nm。

**2.2.2 方法学考察** 取羟基红花黄色素 A 对照品溶液适量,分别用 25% 甲醇稀释 2, 4, 8, 16, 32, 64 倍,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以进样量为横坐标,峰面积为纵坐标,得线性方程  $Y = 17\ 836X + 53.487 (r = 0.9997)$ 。取同一供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定 6 次,计算羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD < 3.0%。取供试品溶液放置 0, 1, 4, 6, 12, 24 h 后按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD 0.8%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。取同一批样品,按供试品制备方法平行制备 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果羟基红花黄色素 A 峰面积的 RSD < 3.0%。精密称取已知羟基红花黄色素 A 含量的供试品粉末 6 份,加水制成羟基红花黄色素 A 质量浓度为 0.10 g·L<sup>-1</sup> 的溶液,各加入羟基红花黄色素 A 对照品 0.10 mg,混匀,按供试品制备方法制备,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果平均加样回收率 98.38%,RSD 2.7%,表明该方法准确可靠。

**2.2.3 样品测定** 分别精密吸取 14 批供试品溶液 10 μL,按 2.2.1 项下色谱条件测定,见表 1。

### 2.3 UPLC 指纹图谱的测定

**2.3.1 检测条件** 采用 ACQUITY UPLC CORTECS T3 C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm),柱温 30 °C,流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 1 μL,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 1 min, 0% B; 1 ~ 5 min, 0% ~ 7.5% B; 5 ~ 10 min, 7.5% ~ 8.5% B; 10 ~ 23 min, 8.5% ~ 25% B; 23 ~ 29 min, 25% ~ 55% B; 29 ~ 32 min, 55% ~ 100% B; 32 ~ 35 min, 100% ~ 0% B),检测波长 270 nm。

表 1 红花标准汤剂的理化特征参数

Table 1 Physicochemical parameters of standard decoction of Carthami Flos

样品	产地	批号	出膏率/%	羟基红花黄色素 A 质量分数/%			转移率/%	pH
				饮片	汤剂	浸膏		
HH-1	新疆	140901	39	2.90	1.9	4.9	65.1	4.0
HH-2	云南	-	37	2.47	1.8	4.9	72.8	4.0
HH-3	新疆	-	38	2.72	1.8	4.7	65.6	4.0
HH-4	新疆	-	26	2.53	1.5	5.9	60.5	4.0
HH-5	云南	-	31	3.52	1.9	6.2	55.0	4.0
HH-6	新疆	-	31	3.11	1.8	5.7	56.5	4.0
HH-7	新疆	-	29	2.86	1.6	5.6	57.1	4.0
HH-8	新疆	-	31	2.21	1.6	5.1	72.2	4.0
HH-9	青海	-	34	3.42	2.0	5.8	57.3	4.0
HH-10	新疆	SAB301-1	34	2.90	1.8	5.2	61.3	5.0
HH-11	新疆	SAB301-2	27	3.21	1.7	6.4	53.4	4.0
HH-12	新疆	SAB301-3	33	3.30	1.8	5.3	53.2	4.0
HH-13	新疆	1607007	30	3.31	1.9	6.3	57.3	4.0
HH-14	新疆	1606006	37	3.19	2.2	6.0	69.4	4.0

**2.3.2 方法学考察** 取供试品溶液按 2.3.1 项下条件测定 6 次, 计算所有共有峰峰面积和保留时间的 RSD 均 < 3.0%。取供试品溶液放置 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 后按 2.3.1 项下条件测定, 计算所有共有峰峰面积和保留时间的 RSD 均 < 3.0%。取同一批样品, 按 2.1.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.3.1 项下条件测定, 计算所有共有峰峰面积和保留时间的 RSD 均 < 3.0%。

**2.3.3 指纹图谱的采集与分析** 分别精密吸取 14

批供试品溶液 1 μL, 按 2.3.1 项下条件测定, 结果见图 1。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)软件进行色谱峰匹配, 计算相似度, 见表 2。共找出 10 个峰面积比例 ≥ 2%, 峰形较好、稳定且易辨识的共有峰。以 4 号羟基红花黄色素 A 色谱峰作参照, 计算 10 个共有峰的相对保留时间等参数, 见表 3。

**2.4 质谱指认**

**2.4.1 质谱条件** 电喷雾电离离子源 (ESI), 离子

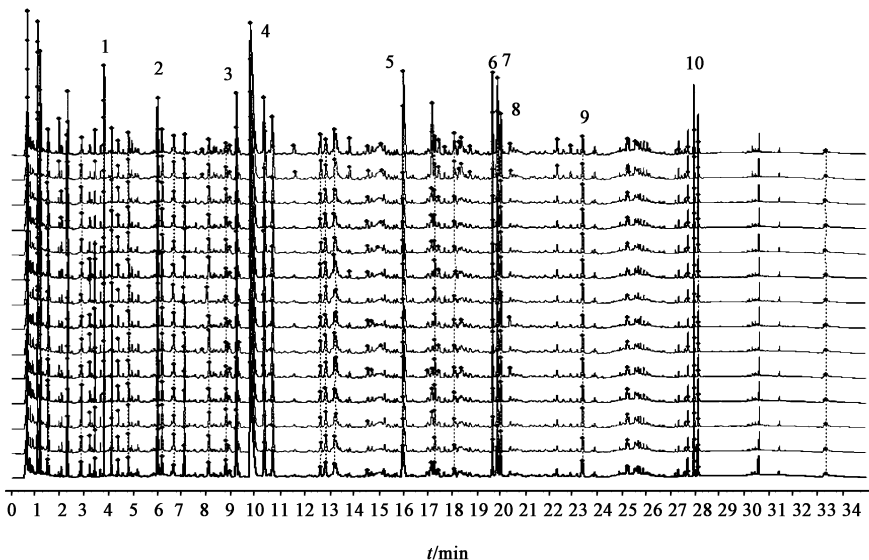


图 1 红花标准汤剂的 UPLC 指纹谱

Fig. 1 UPLC fingerprint chromatograms of standard decoction of Carthami Flos

表 2 红花标准汤剂的 UPLC 指纹图谱相似度

Table 2 UPLC chromatograms similarity evaluation of standard decoction of Carthami Flos

样品	HH-1	HH-2	HH-3	HH-4	HH-5	HH-6	HH-7	HH-8	HH-9	HH-10	HH-11	HH-12	HH-13	HH-14	对照指纹图谱
HH-1	1.000	0.995	0.998	0.992	0.991	0.991	0.991	0.985	0.994	0.997	0.997	0.998	0.975	0.970	0.998
HH-2	0.995	1.000	0.996	0.989	0.989	0.992	0.991	0.988	0.995	0.993	0.994	0.994	0.962	0.957	0.995
HH-3	0.998	0.996	1.000	0.991	0.991	0.990	0.991	0.985	0.993	0.996	0.997	0.998	0.970	0.965	0.997
HH-4	0.992	0.989	0.991	1.000	0.986	0.987	0.983	0.987	0.986	0.990	0.990	0.991	0.979	0.977	0.995
HH-5	0.991	0.989	0.991	0.986	1.000	0.989	0.995	0.987	0.991	0.991	0.990	0.990	0.967	0.964	0.994
HH-6	0.991	0.992	0.990	0.987	0.989	1.000	0.989	0.991	0.994	0.994	0.992	0.990	0.969	0.964	0.995
HH-7	0.991	0.991	0.991	0.983	0.995	0.989	1.000	0.984	0.991	0.991	0.990	0.990	0.962	0.958	0.993
HH-8	0.985	0.988	0.985	0.987	0.987	0.991	0.984	1.000	0.990	0.983	0.983	0.981	0.961	0.957	0.989
HH-9	0.994	0.995	0.993	0.986	0.991	0.994	0.991	0.990	1.000	0.993	0.992	0.992	0.967	0.962	0.995
HH-10	0.997	0.993	0.996	0.990	0.991	0.994	0.991	0.983	0.993	1.000	0.999	0.998	0.975	0.970	0.998
HH-11	0.997	0.994	0.997	0.990	0.990	0.992	0.990	0.983	0.992	0.999	1.000	0.999	0.973	0.968	0.997
HH-12	0.998	0.994	0.998	0.991	0.990	0.990	0.990	0.981	0.992	0.998	0.999	1.000	0.973	0.969	0.997
HH-13	0.975	0.962	0.970	0.979	0.967	0.969	0.962	0.961	0.967	0.975	0.973	0.973	1.000	0.998	0.982
HH-14	0.970	0.957	0.965	0.977	0.964	0.964	0.958	0.957	0.962	0.970	0.968	0.969	0.998	1.000	0.978
对照指纹图谱	0.998	0.995	0.997	0.995	0.994	0.995	0.993	0.989	0.995	0.998	0.997	0.997	0.982	0.978	1.000

表 3 红花标准汤剂的主要共有指纹峰指标参数

Table 3 Parameters of common peaks of standard decoction of Carthami Flos

No.	$t_R$ /min	相对保留时间	$t_R$ 的 RSD/%	峰面积	相对峰面积	峰面积比例/%	峰面积 RSD/%
1	3.781	0.39	0.6	75.7	0.14	3	9.0
2	5.988	0.61	0.3	96.9	0.18	4	8.6
3	9.199	0.94	0.2	87.5	0.16	4	17.5
4(S)	9.779	1.00	0.2	531.7	1.00	22	9.5
5	16.013	1.64	0.2	134.3	0.25	5	27.9
6	19.678	2.01	0.08	71.1	0.13	3	34.7
7	19.882	2.03	0.06	71.0	0.13	3	49.9
8	20.021	2.05	0.08	43.2	0.08	2	31.2
9	23.373	2.39	0.06	46.7	0.09	2	12.2
10	27.938	2.86	0.02	49.4	0.09	2	30.9

化模式为正、负离子,离子源温度 150 ℃,脱溶剂气体为高纯度氮气,温度 550 ℃,流速 800 L·h<sup>-1</sup>,毛细管电压 1.0 kV,锥孔电压 30 V,扫描范围  $m/z$  50 ~ 1 200。亮氨酸-脑啡肽( $m/z$  554.261 5)作为外标进行质量实时校正。

**2.4.2 色谱峰的指认** 吸取各供试品溶液 1 μL 注入 UPLC-Q-TOF/MS 系统,记录质谱信号。采用 MassLynx 4.1 软件对正、负离子模式总离子流图进行处理,采用 UNIFI 1.8 数据处理系统,通过比对精确相对分子质量、特征碎片峰,并结合

MassFragment™ 软件确定化合物的相对分子质量和可能分子式,比对已建立的目标数据库和文献[8],推测共有峰可能的化合物结构,相关离子推断见表 4,共鉴定出 8 个共有峰,HPLC 及质谱总离子流图见图 2,所有化合物的结构见图 3。

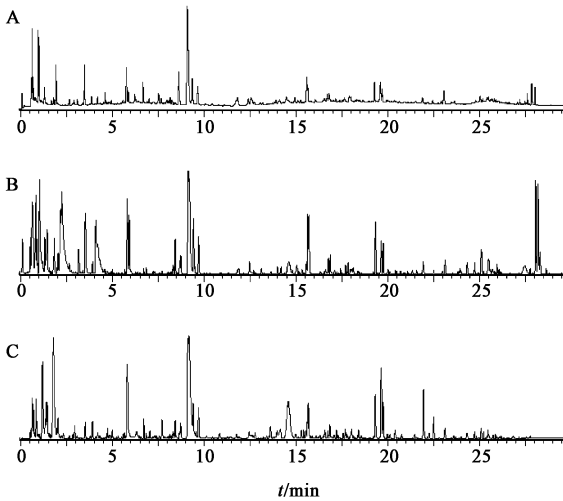
**2.5 红花标准汤剂过程稳定性评价指标参数的测定**

**2.5.1 出膏率** 量取各供试品溶液 50 mL,干燥,称定浸膏质量,计算出膏率,见表 1。结果 14 批样品的出膏率平均值 32.6%,不同批次的出膏率相差不大。

表 4 正、负离子模式下红花标准汤剂共有指纹峰的鉴定

Table 4 Identification of common peaks in fingerprint of standard decoction of Carthami Flos

No.	$t_R$ /min	相对保留 时间	分子式	相对分子 质量/Da	$m/z$	成分	相对分子 质量偏差 /mDa	MS/MS	加合物
1	3.52	0.39	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283.092	282.084 0 [M - H] <sup>-</sup>	鸟苷	-0.3	150.041 3, 133.015 6, 108.020 3	-H
2	5.81	0.64	$C_{27}H_{32}O_{16}$	612.169	611.161 7 [M - H] <sup>-</sup>	safflomin A	-0.1	611.161 7	-H
3	8.66	0.95	$C_{17}H_{24}O_9$	372.142	417.139 2 [M + HCOO] <sup>-</sup>	紫丁香苷	-1.0	417.140 2, 407.111 4, 209.081 9	+ HCOO, + Cl
4	9.12	1.00	$C_{27}H_{32}O_{16}$	612.169	611.162 4 [M - H] <sup>-</sup>	羟基红花黄色素 A	0.7	491.119 5, 403.103 5, 473.108 4	-H
5	15.63	1.71	$C_{27}H_{30}O_{17}$	626.148	625.140 7 [M - H] <sup>-</sup>	6-羟基山柰素-3,6- 二-O-葡萄糖苷/6-羟基 山柰素-6,7-二-O-葡萄 糖苷	-0.3	447.093 3, 285.040 5, 463.088 2	-H
6	19.33	2.11	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594.159	593.151 3 [M - H] <sup>-</sup>	山柰酚-3-O-芸香糖苷	0.1	285.039 4	-H
7	19.66	2.16	$C_{48}H_{52}O_{26}$	1 044.275	1 043.269 9 [M - H] <sup>-</sup>	羟基红花黄色素 B	2.5	1 025.256 8, 449.108 9, 923.225 1	-H
8	19.75	2.16	$C_{28}H_{32}O_{16}$	624.169	623.161 9 [M - H] <sup>-</sup>	异鼠李素-3-O-β-D- 芸香糖苷	0.1	623.161 8, 315.051 0, 300.027 6	-H



A. HPLC; B. 正离子模式; C. 负离子模式

图 2 红花标准汤剂的 HPLC 及质谱总离子流

Fig. 2 HPLC and TIC of standard decoction of Carthami Flos by UPLC-Q-TOF/MS

**2.5.2 转移率** 按转移率 = 标准汤剂中指标成分量 / 饮片中标记成分量 × 100% 计算, 见表 1, 结果平均转移率 61.2%。

**2.5.3 pH** 将 pH 精密试纸浸入供试品溶液中, 0.5 s 后取出与标准色版比较, 平行测定 3 次, 取平均值, 见表 1。结果 pH 4.1, 不同批次之间没有差异。

### 3 讨论

本文对红花标准汤剂的质量控制主要体现在 3 个方面: ①药材选择包括了红花的主产区和主要药材市场, 对药材鉴定精确到物种, 实验前对药材进行了检测, 符合《中国药典》2015 年版各项规定; ②标准汤剂的整个制备过程都完全遵守统一的标准化操作<sup>[1]</sup>; ③标准汤剂的质量控制采用化学指纹图谱和指标成分含量测定相结合的模式, 鉴定了 8 个主要共有峰对应的化学成分, 从整体定性和指标成分定量的角度标定红花标准汤剂的化学轮廓和含量标准。

关于红花标准汤剂中指标成分的定量分析参考了《中国药典》2015 年版, 选择羟基红花黄色素 A 为指标成分, 结果发现不同批次、不同产地红花标准汤剂中该成分的质量浓度相差不大。红花的主要化学成分包括黄酮类、生物碱类、木质素类和脂肪酸类等<sup>[6]</sup>。在 270 nm 处的质谱鉴定结果显示, 红花标准汤剂中主要检测到了 6 个黄酮类(羟基红花黄色素 A 及其同分异构体、羟基山柰素-3,6-二-O-葡萄糖苷/6-羟基山柰素-6,7-二-O-葡萄糖苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、红花黄色素 B 及异鼠李素-3-O-β-芸香糖苷等), 1 个鸟嘌呤核苷(鸟苷)和 1 个苯丙醇苷(紫丁香苷)。说明该波长下的图谱科学可信, 能全面呈现红花标准汤剂中的主要成分。

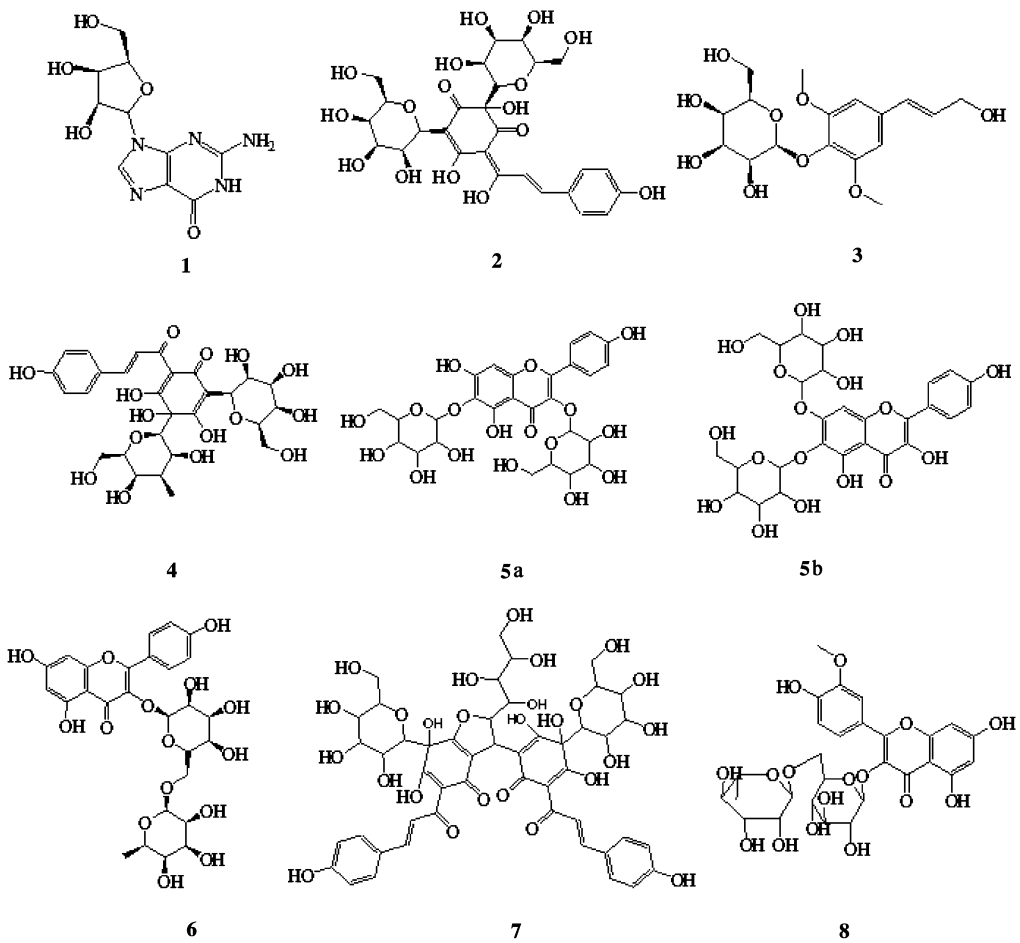


图 3 红花标准汤剂指纹图谱中指认成分的化学结构

Fig. 3 Chemical structures of identified compounds in fingerprint of standard decoction of Carthami Flos

[参考文献]

[ 1 ] 高丽娜,崔元璐,延阔,等. 丹参红花配伍研究进展 [J]. 中草药,2016,47(4):671-679.

[ 2 ] LI W C, WANG X Y, LIN P C, et al. Preparative separation and purification of four cis-trans isomers of coumaroyl spermidine analogs from safflower by high-speed counter-current chromatography [J]. J Chromatogr B, 2013, doi:10.1016/j.jchromb.2013.08.012.

[ 3 ] 王若菁,杨滨. 红花的化学成分及质量标准研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(5):65-68.

[ 4 ] 臧宝霞. 红花黄酮成分抗血小板作用和作用机理研究 [D]. 北京:北京中医药大学,2006.

[ 5 ] 李娜,鲁晓翔. 红花黄酮对酪氨酸酶的抑制及其机理研究 [J]. 食品科技,2010,35(12):176-179.

[ 6 ] 王若菁. 中药材红花质量及抗氧化有效部位研究 [D]. 北京:中国中医科学院,2008.

[ 7 ] 陈士林,刘安,朱广伟,等. 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志,2016,41(8):1367-1375.

[ 8 ] 范莉,濮润,赵海誉,等. 红花药材的 HPLC 指纹图谱及质量研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):37-39.

[责任编辑 刘德文]