

# 款冬花传统规格等级与芦丁含量的相关性分析

凌珊<sup>1</sup>, 易炳学<sup>1</sup>, 龚千锋<sup>1\*</sup>, 肖永庆<sup>2</sup>

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 探讨款冬花传统规格等级方法与芦丁含量的相关性。方法: 采用 HPLC 测定不同等级款冬花中芦丁含量, Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-1% 乙酸 (20:80), 检测波长 254 nm。建立不同等级款冬花的 HPLC 指纹图谱并进行相似度分析, 流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱, 检测波长 240 nm。结果: 优级款冬花样品中芦丁平均含量略高于统货样品, 但二者差别不大; 不同等级、产地与批次的生品与炮制品款冬花的指纹图谱相似度均 > 0.85, 优级样品共有 12 个相对峰面积平均值大于统货样品。结论: 建立的款冬花中芦丁含量测定及指纹图谱方法简单、重复性好。传统分级方法具有一定合理性, 但芦丁含量高低与传统等级相关性不大, 不应将其作为款冬花饮片分级的主要指标。

**[关键词]** 款冬花; 传统分级; 芦丁; 高效液相色谱法; 指纹图谱

**[中图分类号]** R282.7, R282.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0147-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013160147

## Relativity Analysis of Rutin Content and Traditional Specification Grade of Farfarae Flos

LING Shan<sup>1</sup>, YI Bing-xue<sup>1</sup>, GONG Qian-feng<sup>1\*</sup>, XIAO Yong-qing<sup>2</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

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

**[Abstract]** **Objective:** To investigate relativity between the content of rutin and traditional specification grade of Farfarae Flos. **Method:** The content of rutin from Farfarae Flos was performed by HPLC on Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile -1% acetic acid (20:80) as mobile phase and detection wavelength at 254 nm. HPLC fingerprint and similarity analysis of different specifications of Farfarae Flos was performed on Dikma Diamonsil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile -0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gradient elution and detection wavelength of 240 nm. **Result:** Average content of rutin in superior grade was slightly higher than gradeless samples with little difference; Similarity of fingerprint of Farfarae Flos from different grades, habitats and batches was more than 0.85. Average values of twelve relative peak area of superior samples were larger than that of gradeless samples. **Conclusion:** Quantification method of rutin and fingerprint analysis was feasible and reproductive. Traditional classification of Farfarae Flos had a certain rationality, but the content of rutin had little correlation with traditional classification, so to classify Farfarae Flos with the content of rutin as main index was unreasonable.

**[Key words]** Farfarae Flos; traditional classification; rutin; HPLC; fingerprint

**[收稿日期]** 20121224(019)

**[基金项目]** 国家中医药行业科研专项课题(201007012-2-9)

**[第一作者]** 凌珊, 硕士, 从事中药炮制研究, Tel: 15070823405, E-mail: viola8704@126.com

**[通讯作者]** \* 龚千锋, 教授, 从事中药炮制及质量标准研究, Tel: 13970809786, E-mail: gongqf2006@163.com

款冬花药材在市场销售时, 通常根据传统外观、规格对其进行分级<sup>[1]</sup>。传统的分级方法往往将芦丁含量作为款冬花质量控制的定量指标, 同时结合经验, 将款冬花分为优级、统货等级别。但传统分级方法是否与款冬花中芦丁含量具有相关性尚未见报

道。本实验对传统经验分级的款冬花药材,采用 HPLC 测定芦丁含量<sup>[2-5]</sup>,建立款冬花药材指纹图谱,从整体角度探究款冬花传统分级方法与药材内在成分含量的相关性,为款冬花的优质优价及制定不同等级的药材标准提供参考。

### 1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), UltiMate3000 型高效液相色谱仪(美国戴安), XPI05DR 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多仪器

有限公司),SZ-93A 型自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

芦丁对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-11040302),乙腈为色谱纯,液相用水为重蒸水,其他试剂为分析纯。

不同规格等级与产地的款冬花药材来源情况见表 1,经江西中医药大学药学科组范崔生教授鉴定为菊科植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾。

表 1 款冬花样品来源

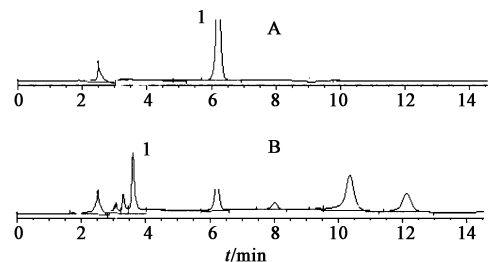
No.	等级	采集时间	产地	采购地	芦丁质量分数/%	相似度
S1-1	优	2010-11	甘肃	甘肃省陇东灵台县中台镇	0.42	0.986
S1-2	优	2011-11	甘肃	甘肃省陇西渭源县锹峪乡	0.13	0.909
S2-1	统	2010-11	甘肃	甘肃省陇西渭源县会川镇	0.33	0.963
S2-2	统	2011-11	甘肃	甘肃省陇西渭源县锹峪乡	0.35	0.968
S3-1	优	2010.12	河北	河北蔚县代王城镇张北堡村	0.25	0.967
S3-2	优	2011.12	河北	河北蔚县宋家庄镇小固城村	0.53	0.982
S4-1	优	2010-11	甘肃	甘肃陇西草源中药饮片厂	0.63	0.997
S4-2	优	2011-11			0.66	0.997
S5-1	统	2010-11	甘肃	甘肃陇西草源中药饮片厂	0.05	0.980
S5-2	统	2011-11			0.06	0.993
S6-1	优	2010-11	陕西	陕西龙山药业有限责任公司	0.10	0.978
S6-2	优	2011-11			0.11	0.934
S7-1	统	2010-11	陕西	陕西龙山药业有限责任公司	0.1	0.981
S7-2	统	2011-11			0.31	0.958
S8-1	统	2010.12	河北	江西樟树天齐堂中药饮片有限公司	0.41	0.855
S8-2	统	2011.12			0.41	0.895
S9-1	优(蜜)	2010-11	甘肃	铜陵禾田中药饮片有限公司	0.25	0.957
S9-2	优(蜜)	2011-11			0.25	0.965
S10-1	优(蜜)	2010-11	四川	四川中庸药业有限公司	0.36	0.978
S10-2	优(蜜)	2011-11			0.38	0.959
S11-1	统(蜜)	2010-11	河北	江西樟树天齐堂中药饮片有限公司	0.49	0.961
S11-2	统(蜜)	2011-11			0.51	0.972

## 2 方法与结果

### 2.1 芦丁的定量分析

**2.1.1 色谱条件** Dikma Technologies C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 偶联 Do-Chrom Column Guard C<sub>18</sub> 保护柱(4.6 mm × 20 mm, 下同), 流动相乙腈-1% 乙酸(20:80), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL, 检测波长 254 nm。理论塔板数按芦丁计不低于 2 000, 见图 1。

**2.1.2 对照品溶液的制备** 取芦丁对照品 6.75



A. 对照品; B. 供试品; 1. 芦丁

图 1 款冬花 HPLC

mg,精密称定,用甲醇制成  $0.27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  溶液。

**2.1.3 供试品溶液的制备**<sup>[6]</sup> 取款冬花粉末(过4号筛)0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇50 mL,称定质量,超声处理(250 W,40 kHz)30 min,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

**2.1.4 线性关系考察** 分别精密量取对照品溶液1,2,3,4,5 mL置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成系列对照品溶液,按上述色谱条件分别进样10  $\mu\text{L}$ ,测定,以对照品质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得芦丁的回归方程  $Y = 389\ 658X - 6\ 047.8$  ( $r = 0.999\ 1$ ),线性范围  $0.027 \sim 0.27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.1.5 精密度试验** 取  $0.27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  芦丁对照品溶液,按2.1.1项下条件测定,连续进样6次,结果芦丁峰面积RSD 1.55%,表明仪器精密度良好。

**2.1.6 重复性试验** 取样品S11-1粉末6份,每份约0.5 g,精密称定,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,测定,结果芦丁含量的RSD 1.51%,表明该方法重复性良好。

**2.1.7 稳定性试验** 取样品S11-1供试品溶液在室温下避光放置,分别于0,2,4,8,24 h进样,计算芦丁峰面积的RSD 0.674%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

**2.1.8 回收率试验** 取已知芦丁含量的样品6份,每份0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入  $0.27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  芦丁对照品溶液,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,测定,计算芦丁平均加样回收率99.68% (RSD 1.2%)。

**2.1.9 样品测定** 分别取不同产地样品,按2.1.3项下方法制备供试品溶液,测定芦丁含量,记录色谱图,按外标法计算,结果优级款冬花中芦丁平均质量分数0.339%,统货款冬花中0.325%。

## 2.2 HPLC 指纹图谱<sup>[7-9]</sup>

**2.2.1 色谱条件** Diamonsil  $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),偶联 Do- $\text{C}_{18}$  保护柱,流动相0.1%磷酸(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~30 min,90% A;30~40 min,75% A;40~50 min,25% A;50~60 min,0% A),检测波长240 nm,流速  $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量20  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.2 对照品溶液制备** 精密称取芦丁适量,加甲醇制成  $20.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液制备** 取款冬花药材粉末(过4号筛)1 g,精密称定,加乙醇(60%)20 mL超声0.5 h,滤过,用乙醇(60%)定容至25 mL,摇匀,精密量

取5 mL,水浴蒸干,用甲醇5 mL溶解,经0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.2.4 方法学考察** 按《中国药典》2010年版中药质量标准分析方法指导原则的要求,对上述方法进行方法学验证。稳定性试验表明供试品溶液在12 h内稳定性良好,精密度和重复性试验测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均  $< 3\%$ ,表明仪器精密度和方法重复性良好。

**2.2.5 指纹图谱相似度分析** 按“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”对款冬花样品的HPLC指纹图谱进行分析,采用中位数法进行多点校正生成对照图谱,确定了13个共有峰,作为基本特征峰,其中3号峰为芦丁,见图2,保留时间(峰面积)分别为11.46(10 546.81),12.324(926.841),22.35(2 565.813),24.275(963.515),27.307(14 427.21),28.943(11 664.06),30.12(568.046),31.276(8 427.136),45.995(345.121),49.794(562.823),54.189(146.651),54.523(175.918),55.171(1 140.615)。以S4-2样品的色谱图作为参照图谱,对不同商品等级的款冬花药材色谱图进行自动匹配,结果见图3,相似度分析见表2。

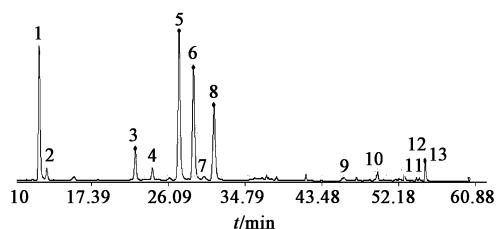
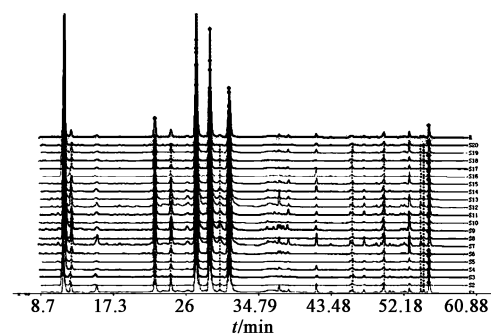


图2 款冬花样品指纹图谱共有峰



S1~S20.表1中前20批样品;R:对照样品

图3 款冬花样品指纹图谱

**2.2.6 共有峰相对峰面积的比较** 将优级款冬花样品与统货样品指纹图谱中13个共有峰相对应保留时间的峰面积进行平均值比较,结果见表2。

表 2 不同分级款冬花样品中 13 个共有峰相对峰面积的比较

No.	保留时间 /min	统货相对峰 面积平均值	优级相对峰 面积平均值
1	11.46	0.179	0.453
2	12.324	0.266	0.424
3	22.35	0.388	0.437
4	24.275	0.281	0.438
5	27.307	0.281	0.404
6	28.943	0.209	0.431
7	30.12	0.193	0.34
8	31.276	0.288	0.422
9	45.995	1.003	1.123
10	49.794	0.258	0.658
11	54.189	1.275	1.413
12	54.523	0.404	0.618
13	55.171	1.57	1.467

### 3 讨论

优级款冬花样品中芦丁含量略高于统货样品,但二者差异不大。S1-1, S1-2 和 S3-1, S3-2 分别为同产地不同批次的优级样品,但芦丁含量差异较大。其中 S1-2, S3-1 芦丁含量较低,甚至低于统货样品中芦丁平均含量,说明以芦丁含量高低作为款冬花药材分级的依据不充分。产生以上现象的原因很多,包括种植条件、栽培技术、采收时间等,因此需进行统一的规范。此外,通过产地调研发现,在进行产地加工时,部分药农仅依据药材外观即进行大致的等级划分,分成的优级与统货药材可能来源于同一款冬植株,其内在成分含量是否存在差异,差异是否显著均不明确,因此建议对传统规格的分级方法进行进一步研究与规范,以促进饮片分级标准的实施。

指纹图谱相似度表明,优级与统货药材相似度均 > 0.8,说明不同产地的优级与统货款冬花样品中

所含化学成分无明显差异。优级样品中 13 个共有峰有 12 个峰面积平均值大于统货样品,说明传统分级方法具有一定科学性。保留时间 22.35 min 的 3 号芦丁峰,优级与统货样品的差异较其他峰两者间的差异小,说明芦丁含量差异较其他成分小,不宜作为款冬花药材的主要分级依据;保留时间 55.171 min 的 13 号峰,优级样品峰面积平均值小于统货样品,说明该成分在优级样品中平均含量低于统货样品。

### [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,2010:312.
- [2] 张文懿,杨天寿,王旭鹏,等. HPLC 法测定款冬花中绿原酸和芦丁的含量[J]. 药物分析杂志,2008,28(12):2106.
- [3] 喻强,秦伟瀚,叶玉兰. 巫溪款冬花芦丁含量测定[J]. 重庆中草药研究,2007,56(2):18.
- [4] 耿旦,马雯芳,甄汉深,等. RP-HPLC 测定桑椹中芦丁的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):1.
- [5] 刘波,张浩科,宫海燕,等. 反相高效液相色谱法测定新疆枸杞叶茶中芦丁和槲皮素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):92.
- [6] 赵宇新. 芦丁分解速度与加热温度的相关性[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(18):101.
- [7] 曹娟,王福刚,刘克. 蜜炙款冬花 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材,2012,35(1):33.
- [8] 凌珊,易炳学,龚千锋,等. 生品和蜜炙款冬花不同提取物的镇咳祛痰作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):187.
- [9] 马致洁,董红红,李振宇,等. 不同款冬花药材中槲皮素和山奈素的定量分析及 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,40(8):1305.

[责任编辑 仝燕]