

• 色谱指纹图谱研究 •

苦参黄酮类成分 HPLC 指纹图谱研究

刘 怡¹, 孟 江², 陈 磊² (1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 2. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 建立苦参药材中黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱方法, 为科学全面评价该药材质量提供依据。**方法** 采用 HPLC 法对不同产地的苦参药材进行分析。色谱条件为 Alltech Apollo C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2 % 甲酸水溶液系统, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 310 nm, 柱温 25 ℃。**结果** 确定了 13 个色谱峰(或峰组)为各产地药材特征共有峰, 并利用对照品对照和 LC-MS 法对其中的 6 个共有峰进行了成分指认。**结论** 该方法简便可靠, 重复性好, 能够表征苦参药材的内在信息, 可用于苦参药材中黄酮类成分的质量控制。

关键词: 苦参; 黄酮类成分; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0282-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.020

Study on HPLC Fingerprint of Flavonoids in Radix Sophorae

LIU Yi¹, MENG Jiang², CHEN Lei² (1. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515 Guangdong; China; 2. College of Chinese Herbal Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a fingerprint analysis method of flavonoids in herbal medicine of Radix Sophorae by HPLC. **Methods** The analysis was performed on Alltech Apollo C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a gradient mobile phase of methanol-0.2 % formic acid solution system at flow rate of 1.0mL/min. The detection wavelength was 310 nm. The column temperature was set at 25 ℃. **Results** The fingerprint of flavonoids in Radix Sophorae was established, and 13 common peaks were obtained. Among them, 6 peaks were identified by comparison with the references and by LC-MS. **Conclusion** The method is quick, simple and reproducible, and can be used as an effective means of quality evaluation of flavonoids in herbal medicine of Radix Sophorae.

Keywords: Radix Sophorae; Flavonoids; Fingerprint; High performance liquid chromatography

苦参为豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根, 始载于《神农本草经》, 其性苦、寒, 归心、肝、大肠、胃、膀胱经, 具有清热燥湿、杀虫利尿的功效。苦参中主要含有生物碱类、黄酮类、皂苷类、醌类、二烷基色原酮衍生物等多种化学成分。既往研究均以苦参生物碱为其活性成分, 近年来随着对其黄酮类成分研究的深入, 苦参黄酮类成分广泛的药理作用才逐渐为人们所知。总结近年国

内外研究^[1-3]发现, 苦参黄酮类成分的药理作用包括降低血糖、治疗糖尿病, 杀虫抗菌, 抗心律失常, 抗肿瘤等。然而, 对苦参黄酮类成分的质量控制目前仍未见于《中国药典》或地方标准当中。

中药指纹图谱是一种综合的可量化的评价方法, 它实现了中药由单一成分测定上升为对内在质量的全面控制, 已经成为目前中药质量控制主要和重要的方法^[4]。本文建立了苦参药材黄酮类成分的 HPLC

收稿日期: 2012-12-25

作者简介: 刘怡, 女, 助教, 主要从事中药活性与质量控制研究。Email: liuyi099@163.com。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(S2012040006855); 广东高校优秀青年创新人才培养计划项目(LYM10095, 2012LYM_0038); 广东省中医药管理局科研项目(20122091)。

指纹图谱分析方法,并对不同产地苦参药材进行检测,为该药材的质量控制研究提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 美国安捷伦公司 Agilent 1100 LC-MSD TRAP XCT/plus 系统,含在线真空脱气机,高压二元梯度泵,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器,电喷雾(ESI)接口, HP Chemstation Rev A0.803 色谱工作站。Sartorius BT 25S 型 1/100000 电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司), Alltech Apollo C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);旋转蒸发器(上海亚荣仪器厂); DGB/20-002 立式粉碎机(天津泰斯特试验仪器厂);中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A 版国家药典委员会)。

1.2 试药 Trifolirhizin、Isoxanthohumol、Kurarinone、Norkurarinone、Kuraridine 对照品均为自制^[5],分别经 ¹H NMR、¹³C NMR、APT、HMBC、ESI-MSⁿ 等方法鉴定,结构和纯度均大于 95 %。Isokurarinone 液相用对照品溶液由北京中医药大学姜艳艳博士提供。甲醇,色谱纯, Fisher 公司;屈臣氏重蒸水(液相用水); Milli-Q 系统纯化水(液质用水)。甲酸、磷酸等其他试剂均为分析纯,购自北京北化精细化学品有限责任公司。

6 个产地苦参药材,共 10 批,经广东药学院中药学院标本馆王红刚讲师鉴定均来源于豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根。来源分别为河南南阳(HN-1)、山东临淄(SD-1、2)、山西沁县(SX-1、2)、河北承德(HB-1)、内蒙赤峰(NM-1、2、3)、辽宁沈阳(LN-1)。样品标本保存于广东药学院分析教研室。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Alltech Apollo C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 310 nm。流动相^[6]: 甲醇(A)-0.2 % 甲酸水溶液(B)。梯度洗脱 55 %A(0 min), 55 %A→60 %A(0~10 min), 60 %A→63 %A(10~15 min), 63 %A→65 %A (15~25 min), 65 %A→70 %A (25~30 min), 70 %A→75 %A (30~40 min), 75 %A→100 %A(40~50 min), 100 %A (50~60 min)。进样量: 10 μL。质谱条件: 电喷雾离子化(ESI)源; 检测方式: 正、负离子模式; 雾化气压力: 60 kPa; 干燥气流速: 12 L/min; 干燥气温度: 350 °C; 喷雾电压: 4 kV;

多级扫描碰撞气: 氮气。

2.2 对照品溶液的制备 取 Trifolirhizin、Isoxanthohumol、Kurarinone、Norkurarinone、Kuraridine 各对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释成浓度约为 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 苦参药材,粉碎,过 40 目筛。取粉末 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 95 %乙醇 50 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,放冷,再称定质量,用 95 %乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 SX-1 号苦参药材供试品溶液,连续进样 5 次,考察色谱峰的相对保留时间和峰面积比值的一致性。结果表明,各色谱峰的相对保留时间 RSD 值小于 1.61 %,相对峰面积 RSD 值均小于 3.07 %,表明进样的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 SX-1 号苦参药材样品 5 份,按照供试品的制备和检测方法制备供试品并进行检测。考察色谱峰的相对保留时间和峰面积比值的一致性,结果表明,各色谱峰的相对保留时间 RSD 值小于 0.89 %,相对峰面积 RSD 值均小于 3.47 %,表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 SX-1 号苦参药材供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 检测,记录色谱图。结果表明,各色谱峰的相对保留时间 RSD 值小于 1.47 %,相对峰面积 RSD 值均小于 2.90 %,表明供试品溶液在室温 24 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立及共有峰的指认

2.5.1 指纹图谱的建立 分别取 10 批苦参药材的供试品溶液,按照 2.1 项下色谱条件进行检测,记录色谱图,见图 1。将不同产地苦参药材供试品的指纹图谱数据输入国家药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)》中,生成了对照指纹图谱。按照特征指纹峰的选择条件最终选择了 13 个共有色谱峰作为特征指纹峰。保留时间约为 29 min 的色谱峰与其它峰分离良好,在各批样品中峰形稳定,保留时间适中,故采用此峰作为参照物峰(Kurarinone)。计算各产地药材指纹峰的保留时间和相对峰面积,结果见表 1。

采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统,建立对照指纹图谱,测得各批次样品与共有模式间的相似度,分别为 0.925, 0.936,

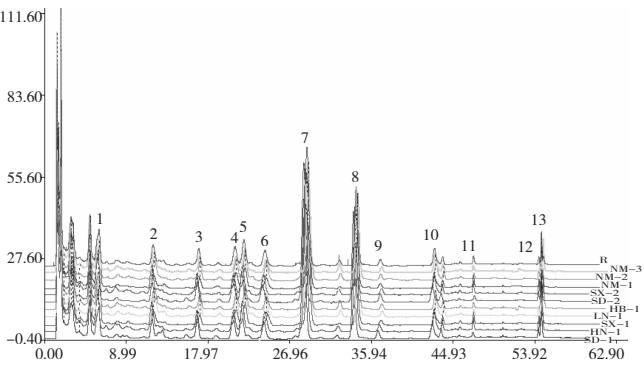


图 1 不同产地苦参药材的 HPLC 图谱
Figure 1 Fingerprint of flavonoids in Radix Sophorae flavescens from various habitats

表 1 10 批样品共有峰的相对峰面积及保留时间

样品号	相对峰面积												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.337	0.198	0.159	0.267	0.302	0.185	1.000	0.478	0.067	0.176	0.031	0.026	0.097
2	0.292	0.139	0.161	0.198	0.312	0.121	1.000	0.486	0.057	0.172	0.023	0.021	0.132
3	0.347	0.219	0.132	0.329	0.252	0.223	1.000	0.403	0.066	0.114	0.032	0.016	0.151
4	0.394	0.259	0.201	0.336	0.242	0.356	1.000	0.605	0.045	0.143	0.051	0.025	0.134
5	0.225	0.171	0.112	0.278	0.405	0.228	1.000	0.329	0.046	0.155	0.024	0.015	0.086
6	0.455	0.381	0.142	0.377	0.355	0.118	1.000	0.589	0.069	0.175	0.047	0.028	0.086
7	0.484	0.589	0.162	0.328	0.392	0.124	1.000	0.557	0.058	0.183	0.024	0.021	0.138
8	0.501	0.388	0.152	0.436	0.306	0.223	1.000	0.587	0.067	0.174	0.033	0.020	0.102
9	0.575	0.338	0.151	0.464	0.387	0.125	1.000	0.606	0.050	0.163	0.043	0.016	0.141
10	0.535	0.440	0.121	0.405	0.397	0.124	1.000	0.689	0.058	0.168	0.040	0.023	0.149
RSD/%	27.38	45.14	16.83	23.89	18.08	42.26	0.00	20.29	15.28	12.76	28.98	21.34	21.23
保留时间平均值/min	5.13	12.37	17.51	21.50	22.46	24.82	29.65	34.76	37.49	43.39	47.31	54.58	54.95

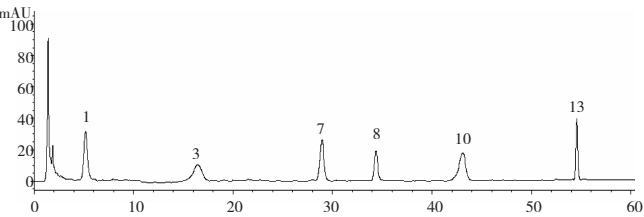


图 2 对照品色谱图
Figure 2 Chromatogram of mixed reference substances

LC-MS 法对共有指认峰进行确认：取 SX-1 号供试品溶液，进行质谱检测，进一步确认所指认色谱峰信息，见表 2。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 根据文献报道，结合本研究结果，发现苦参中黄酮类成分最大紫外吸收波长范围主要在 280 nm~320 nm，经过比较 290，300，310 nm 下苦参药材乙醇提取液的液相色谱图，结果发现在 310 nm 波长下，基本包括了所有色谱峰，峰形较

0.926，0.917，0.930，0.946，0.963，0.953，0.942，0.934。由此可见，苦参指纹图谱相似度较高，均大于 0.91。

2.5.2 共有峰的指认 对照品对照法对共有峰进行指认：取混合对照品溶液，按照 2.1 项下色谱条件分别进样，得出对照品的保留时间与 13 个共有峰中的 6 个色谱峰相一致，由此可确定 1 号峰为 Trifolirhizin、3 号峰为 Isoxanthohumol、7 号峰为 Kurarinone、8 号峰为 Norkurarinone、10 号峰为 IsoKurarinone、13 号峰为 Kuraridine，见图 2。

表 2 主要色谱峰分析

峰号	保留时间/min	推测结构	阳离子	阴离子	分子量
1	5.12	Trifolirhizin	469[M+Na] ⁺	445	446
3	17.49	Isoxanthohumol	355[M+1] ⁺ 377[M+Na] ⁺	353	354
7	29.58	Kurarinone	439[M+1] ⁺ 461[M+Na] ⁺	437	438
8	34.85	Norkurarinone	425[M+1] ⁺ 447[M+Na] ⁺	423	424
10	43.33	IsoKurarinone	439[M+1] ⁺ 461[M+Na] ⁺	437	438
13	54.91	Kuraridine	-	437	438

好且吸光度较大。因此，最终确定了 310 nm 为供试品溶液紫外检测波长。

在指纹图谱流动相选择上，比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(0.2 %甲酸)、甲醇-水(0.2 %磷酸)等多个系统进行梯度洗脱，结果表明，甲醇-水、乙腈-水系统中色谱峰分离效果较差，甲醇-水(0.2 %磷酸)系统洗脱时基线漂移较大。同时，由于磷酸水溶液较难挥发，易污染质谱检测器，不适宜作为 LC-MS 联用时的流动相，故最终选择了甲醇

-0.2 %甲酸水溶液系统,在该系统下,全部分析时间为 60 min,各产地苦参药材指纹图谱上各色谱峰分离情况均较好。

3.2 提取溶剂与提取方法 考察了回流提取与超声提取方式,以及 95 %、70 %、50 %乙醇提取溶剂,结果表明,超声处理优于回流,95 %乙醇提取的色谱峰最为完全。提取时间优选的结果表明,30 min 提取较为完全。

3.3 色谱峰的归属 采用对照品对照和 LC-MS 法共同对共有峰进行指认,确定了 13 个共有峰中的 6 个色谱结构信息,其他共有峰的结构有待进一步研究。通过比较 10 批不同产地苦参样品的图谱发现,指纹图谱相似度均在 0.91 以上,但是共有峰的相对峰面积差异较大。说明不同产地药材化学成分含量存在较大的差异,该差异的产生与药材的种植环境等有关。采用指纹图谱方法可以表征苦参药材的内在信息,可用于苦参药材中黄酮类成分的质量控制。

参考文献:

- [1] Ryu SY, Choi SU, Kim SK, et al. In vitro antitumour activity of flavonoids from *Sophora flavescens* [J]. *Phytother Res*, 1997, 11(1): 51-53.
- [2] Ding PL, Chen DF, Kenneth FB, et al. Cytotoxic isoprenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* [J]. *Helv Chim Acta*, 2004, 87(10): 2574-2580.
- [3] Jung HA, Jin SE, Park JS, et al. Antidiabetic complications and anti-Alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structure activity relationship [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(5): 709-715.
- [4] 张铁军. 中药质量认识与质量评价[J]. *中草药*, 2011, 42(1): 1-9.
- [5] 陈磊, 刘怡, 梁生旺. 苦参化学成分研究[J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(5): 471-473.
- [6] 朱丽君, 刘斌, 石任兵. 高效液相色谱法测定苦参药材及其黄酮部位中降苦参酮、黄腐醇和苦参啉的含量[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(1): 32-35.

(编辑: 宋威)

白术 4 种炮制品 HPLC 指纹图谱比较

梁永枢, 庄义修, 段 启, 姚丽梅(广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520)

摘要: **目的** 建立并比较 4 种白术炮制品高效液相指纹图谱。**方法** 采用外标法。Dikma Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈-水梯度洗脱(45 %~100 %乙腈),体积流量为 1.0 mL/min,柱温 25 ℃,检测波长为 242 nm。通过中药指纹图谱计算机辅助相似度软件,计算相似度等相关参数。**结果** 通过对白术 4 种炮制品指纹图谱的比较分析,各种炮制品共有指纹明显不同。**结论** 本研究所建立的方法可靠,简便易行,为更好地控制不同白术炮制品质量提供科学依据。

关键词: 炮制; 白术; 指纹图谱; 高效液相色谱; 比较

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0285-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.021

Fingerprints Comparison of Four Processed Products of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae by HPLC

LIANG Yongshu, ZHUANG Yixiu, DUAN Qi, YAO Limei (Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520 Guangdong, China)

Abstract: Objective To establish a HPLC fingerprint method for four processed products of Rhizoma Atractylodis Macrocephalae. **Methods** External standard was used. The procedure of HPLC analysis was performed on Kromasil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase composed of acetonitrile and water(45 %~100 % Acetonitrile) in gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min and detection wavelength was set at 242nm. The column temperature was maintained at 25 ℃. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine was used for data analysis. **Results** The comparison results showed great variety in fingerprints of four processed

收稿日期: 2012-12-18

作者简介: 梁永枢,男,副主任中药师,主要从事中药质量标准研究。Email: liangys@gdyzy.edu.cn。通讯作者: 姚丽梅,副教授,主要从事中药药理的教学与科研工作。Email: yaolm@gdyzy.edu.cn。