

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.03.002

扁豆花高效液相色谱指纹图谱研究*

曹素梅,袁卫斌,陈洪英

(仲景宛西制药股份有限公司,河南 郑州 450003)

摘要:目的 建立扁豆花的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法 以芦丁为参照物,色谱柱采用 Luna C₁₈ 100A 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 358 nm,柱温为 30 ℃。采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012.1 版本)对扁豆花指纹图谱进行相似度计算。结果 以芦丁对照品为参照物,确定了 12 个共有峰,其相对保留时间的 RSD 均小于 0.33%。10 批不同产地扁豆花药材的相似度为 0.964~0.997。结论 该方法简便可行,精密性、稳定性均良好,可为扁豆花药材的质量控制提供参考。

关键词:扁豆花;高效液相色谱;指纹图谱;质量控制

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)03-0007-03

Study on HPLC Fingerprint of *Flos Dolichoris*

CAO Sumei, YUAN Weibin, CHEN Hongying

(Zhongjing Wanxi Pharmaceutical Co., Ltd., Zhengzhou, Henan, China 450003)

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint of *Flos Dolichoris*. **Methods** Lutin was taken as the reference substance, the chromatographic column was C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 358 nm, and the column temperature was 30 ℃. The similarity of the fingerprint of *Flos Dolichoris* was calculated by using a software "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM" (Version 2012.1). **Results** With rutin as the reference substance, 12 common peaks were identified, and RSD of relative retention time was less than 0.33%. The similarity of 10 batches of *Flos Dolichoris* from different habitats in the range of 0.964-0.997. **Conclusion** The method is simple, feasible, precise and stable, which can provide a reference for the quality control of *Flos Dolichoris*.

Key words: *Flos Dolichoris*; HPLC; fingerprint; quality control

扁豆花为豆科扁豆属植物扁豆 *Dolichos lablab* L. 的干燥花,其性味甘、平,归脾、胃、大肠经,具有消暑、化湿、和中的功效,用于暑湿泄泻、痢疾,主产于河南、安徽、浙江等地^[1]。其主要含有原花青苷黄酮类、花青素、香豆精^[2-3]、芦丁^[4]、木犀草素、大波斯菊苷、木犀草素-4'-O-葡萄糖苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、野漆树苷和甘露醇^[5]等。目前对扁豆花的质量控制主要是采用定性鉴别和含量测定的方法^[4-9]。中药指纹图谱研究技术更符合中药的特点,在研究中药有效成分、控制中药质量及鉴别方面已日趋完善,且得到了国际广泛认可^[10-12]。为了系统、完整地反映扁豆花药材的内在质量,参考了药材指纹图谱的建立方法^[13-18],建立了扁豆花的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012.1 版本,以下简称评价软件)进行相似度评价,为扁豆花药材的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪(DAD 检测器,在线脱气

机,四元梯度泵,柱温箱,化学工作站,安捷伦公司); MS-105 型电子分析天平、AL104 型电子天平(Mettler Toledo 公司)。

1.2 试剂

芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,纯度为 90.2%,批号为 100080-201408);水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,扁豆花药材经河南中医药大学代丽萍教授鉴定为豆科扁豆属植物扁豆 *Dolichos lablab* L. 的干燥花,产地信息见表 1。

表 1 10 批扁豆花产地信息

编号	产地	编号	产地	编号	产地	编号	产地
S1	河南	S4	浙江	S7	江西	S10	陕西
S2	河南	S5	河北	S8	安徽		
S3	浙江	S6	山西	S9	安徽		

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Luna C₁₈ 100A 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流速:1.0 mL/min;检测波长:358 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL;流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度

*基金项目:国家科技重大专项重大新药创制[2013zx09508-105]。

第一作者:曹素梅,女,助理工程师,研究方向为中药新药研发,(电子信箱)langping_hi@163.com。

洗脱(见表2)。分别吸取溶液和供试品溶液各10 μ L,注入高效液相色谱仪进行分析,在拟订色谱条件下,供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上有相应的色谱峰,经二极管阵列检测器纯度测试,二者一致,各色谱峰均达到了基线分离。

表2 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	时间(min)	流动相 A(%)
0 ~ 10	10→12	68 ~ 75	32→50
10 ~ 30	12→15	75 ~ 85	50→90
30 ~ 43	15→17	85 ~ 92	90
43 ~ 48	17→19	92 ~ 93	90→10
48 ~ 68	19→32	93 ~ 100	10

2.2 溶液制备

称取芦丁对照品,精密称定,用甲醇溶解并制成每1 mL含0.1 mg的溶液,即得对照品溶液。取药材粉末(过40目筛)约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入60%甲醇25 mL,称定质量,超声处理30 min,取出,放冷,再称定质量,用60%甲醇补足减失的质量,摇匀,取上清液,用0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

精密度试验:取同一供试品粉末,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件下连续进样6次,记录色谱图,考察色谱峰相似度的一致性,用指纹图谱软件计算。以7号峰为参照物,各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.5% ($n=6$),相对峰面积RSD均小于3.0% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:精密取同一供试品粉末,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样,记录色谱图,考察色谱峰相似度的一致性,用指纹图谱软件计算。以7号峰为参照物,各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.5% ($n=6$),相对峰面积的RSD均小

于4.0% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一供试品粉末,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件,分别于0,2,4,6,8,10,12 h时进样,记录色谱图,考察色谱峰相似度的一致性,用指纹图谱软件计算。以7号峰为参照物,各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.4% ($n=6$),相对峰面积的RSD均小于3.0% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.4 样品测定

分别取10批扁豆花药材样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按拟订色谱条件分别测定,记录色谱图。

2.5 扁豆花指纹图谱分析

共有峰确定:根据10批扁豆花样品分析结果,确定了12个共有峰,其中7号峰为芦丁。以芦丁峰为参照,各共有峰的相对保留时间见表3。色谱图见图1。

相似度计算及扁豆花对照图谱的生成:采用评价软件中位数法分析,以10批扁豆花生成的共有模式为对照,计算各批样品相似度,计算结果见表4。10批样品HPLC指纹图谱共有模式图及生成的对照图谱见图2和图3。

3 讨论

提取方法选择:为了最大程度提取扁豆花中的化学成分,试验中考察了甲醇、60%甲醇、95%乙醇的提取效果。结果表明,60%甲醇提取得到的信息最丰富。同时比较了超声和回流提取,结果表明,两者的提取效果差异不明显,从操作简便角度出发,选择了超声提取。

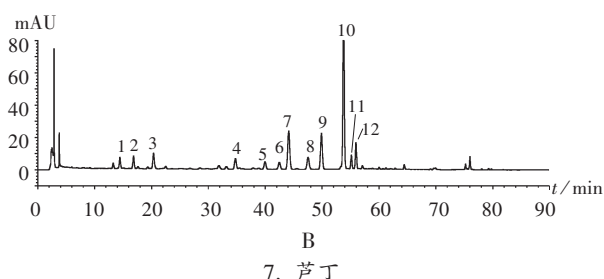
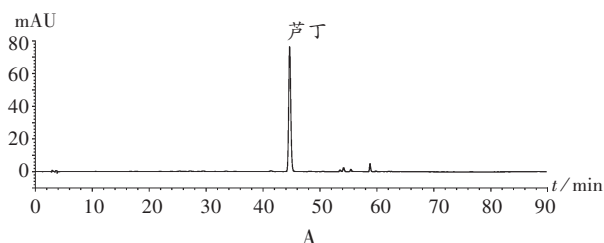
检测波长选择:本试验中采用二极管阵列检测器对扁豆花HPLC指纹图谱进行全波长扫描,考察了257,310,358 nm波长处的图谱特征。结果显示,358 nm波长条件下,各成分峰峰形较好,峰面积适中,因此设定358 nm为检测波长。

表3 10批扁豆花指纹图谱共有峰的相对保留时间(min)

编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12
S1	0.328	0.382	0.462	0.788	0.906	0.963	1	1.077	1.129	1.216	1.246	1.265
S2	0.327	0.382	0.461	0.788	0.906	0.963	1	1.077	1.130	1.219	1.250	1.268
S3	0.327	0.381	0.461	0.787	0.905	0.962	1	1.077	1.131	1.220	1.251	1.270
S4	0.327	0.382	0.462	0.788	0.906	0.964	1	1.078	1.129	1.214	1.244	1.263
S5	0.328	0.383	0.463	0.788	0.907	0.964	1	1.077	1.128	1.213	1.243	1.262
S6	0.328	0.382	0.462	0.788	0.906	0.963	1	1.078	1.128	1.213	1.243	1.262
S7	0.328	0.382	0.462	0.788	0.906	0.964	1	1.078	1.127	1.213	1.241	1.261
S8	0.328	0.382	0.462	0.788	0.907	0.964	1	1.078	1.127	1.212	1.241	1.260
S9	0.328	0.382	0.462	0.788	0.907	0.964	1	1.077	1.127	1.211	1.240	1.259
S10	0.328	0.382	0.463	0.788	0.907	0.964	1	1.078	1.127	1.210	1.239	1.259
RSD(%)	0.15	0.12	0.14	0.04	0.07	0.07	0	0.05	0.16	0.27	0.33	0.30

表4 10批扁豆花药材相似度测定结果

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.997	S4	0.985	S7	0.993	S10	0.976
S2	0.989	S5	0.978	S8	0.964		
S3	0.982	S6	0.964	S9	0.987		



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液
图1 高效液相色谱图

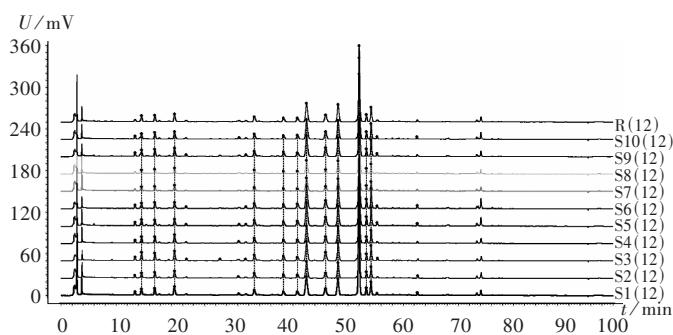


图2 10批扁豆花高效液相色谱指纹图谱共有模式图

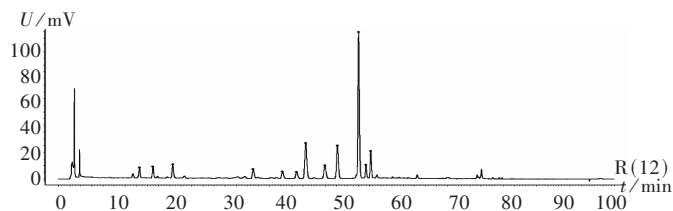


图3 扁豆花高效液相色谱对照指纹图谱

流动相选择:在色谱条件选择过程中,共比较了乙腈-0.1%磷酸溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.5%磷酸溶液和乙腈-1%冰乙酸溶液4种流动相体系,结果显示,不同的流动相体系对峰的分离效果差异较大。甲醇-0.1%磷酸溶液分离效果较差,乙腈-0.1%磷酸溶液分离效果较好,基线平稳,故被选为本试验的流动相。

柱温选择:为了保持色谱分析的一致性,设定柱温考察不同试验环境下的色谱分析,分别考察了25,30,

35℃3种柱温。结果显示,在30℃下,分离效果较好,故选择30℃作为柱温。

综上所述,通过对10批扁豆花药材的指纹图谱分析,可见各主要色谱峰的相对保留时间基本一致,色谱峰的整体面貌基本一致,但峰面积有差异,说明了其成分含量的差异性。从相似度评价结果来看,相似度均大于0.9,说明地域差异不明显。本研究中建立了扁豆花药材的HPLC指纹图谱分析方法,为扁豆花药材质量的客观评价提供了参考。

参考文献:

- [1] 河南省食品药品监督管理局. 河南省中药饮片炮制规范(2005年版)[M]. 郑州:河南人民出版社,2005:382.
- [2] 国家中医药管理局. 中华本草(第四册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:458-461.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典(下册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:2439.
- [4] 李正国,刘桂银,常虹. 白扁豆花中芦丁含量测定方法的研究[J]. 中国药事,2013,27(3):308-311.
- [5] 梁侨丽,丁林生. 扁豆花化学成分研究[J]. 中国药科大学学报,1996,27(4):205-207.
- [6] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一九七七年版)[M]. 北京:人民卫生出版社,1978:444.
- [7] 徐魁,李正国,卞艳晶. 白扁豆花药材鉴别方法的研究[J]. 齐鲁药事,2012,31(10):581-582.
- [8] 陈永林,霍德兰,程秀民,等. 槐花、刺槐花、扁豆花与葛花的紫外光谱鉴别[J]. 中国药学杂志,1995,30(8):491.
- [9] 李仕海,刘训红. 白扁豆及其变种的理化鉴别[J]. 时珍国医国药,2001,12(6):508-509.
- [10] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [11] 李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药,2013,44(22):3095-3104.
- [12] 袁琴琴. 中药材指纹图谱研究进展[J]. 安徽农业科学,2017,45(4):132-134.
- [13] 魏惠珍,王信,王跃生,等. 炒苦杏仁饮片指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):71-74.
- [14] 丹参药材化学成分HPLC指纹图谱研究[J]. 北京中医药大学学报,2006,29(3):188-192.
- [15] 卢红梅,梁逸曾. 枸杞的高效液相色谱指纹图谱[J]. 中南大学学报(自然科学版),2005,36(2):248-252.
- [16] 徐长根,李涛,傅强. 女贞子药材HPLC指纹图谱的初步研究[J]. 中药新药与临床药理,2005,16(5):368-371.
- [17] 刘丽梅,陈琳,王瑞海,等. 秦皮药材HPLC指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(24):2932-2935.
- [18] 李钟,胡海蓉. 桑叶药材HPLC指纹图谱的研究[J]. 世界中西医结合杂志,2007,2(5):280-283.

(收稿日期:2018-05-04;修回日期:2018-08-04)