

# 胡芦巴提取物黄酮类成分的HPLC指纹图谱研究

卢金清\*, 杨小金, 李雨玲, 张锐, 唐瑶兴, 戴艺(湖北中医药大学/湖北省药用植物研发中心, 武汉 430065)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0265-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.24

**摘要** 目的:建立胡芦巴提取物黄酮类成分的指纹图谱。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为ZORBAX SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为339 nm。以牡荆苷为参照物,对10批胡芦巴提取物进行指纹图谱分析。结果:建立了胡芦巴提取物黄酮类成分的HPLC指纹图谱共有模式,标定了11个共有指纹峰,10批提取物的相似度均>0.9。结论:该方法简便、准确、重复性好,可为胡芦巴提取物的品质评价和质量控制提供科学依据。

**关键词** 胡芦巴提取物;高效液相色谱法;黄酮类成分;指纹图谱

## Study on HPLC Fingerprints of Flavonoids in Extract of *Trigonella foenum-graecum*

LU Jin-qing, YANG Xiao-jin, LI Yu-ling, ZHANG Rui, TANG Yao-xing, DAI Yi (Hubei University of TCM/Medicinal Plants R&D Center of Hubei Province, Wuhan 430065, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the fingerprint of flavonoids in extract of *Trigonella foenum-graecum*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with methanol and 0.4% phosphoric acid as mobile phase in gradient mode at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 339 nm. By vitexin as control, the fingerprints of 10 batches of extract of *T. foenum-graecum* were analyzed by HPLC. RESULTS: The common mode of HPLC fingerprints were set up. There were 11 common peaks in the fingerprint of 10 samples, and the similarity of the 10 samples was more than 0.9. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and has a good repeatability. It provides scientific evidence for quality evaluation and quality control of the extract of *T. foenum-graecum*.

**KEYWORDS** *Trigonella foenum-graecum* extract; HPLC; Flavonoids; Fingerprint

胡芦巴为豆科植物胡芦巴 *Trigonella foenum-graecum* L. 的干燥成熟种子<sup>[1]</sup>,始载于《嘉祐本草》,味苦,性温,归肾经,具有温肾助阳、祛寒止痛等功效<sup>[2]</sup>。它主要分布于亚洲、非洲和地中海地区,在我国主产于河南、安徽、陕西、宁夏等地<sup>[3]</sup>。胡芦巴中含有丰富的黄酮类成分,主要有牡荆苷、小麦黄素、柚皮素等<sup>[4]</sup>。现代药理研究表明,胡芦巴中黄酮类成分对心血管系统疾病、糖尿病及其并发症有较好的治疗作用<sup>[5]</sup>;其中的牡荆苷还具有显著抗肿瘤、抗炎、解痉、降压等作用<sup>[6-7]</sup>。胡芦巴作为一种重要的经济作物,集食用、药用、香料、饲料、工业原料于一身<sup>[8]</sup>,其提取物已广泛应用于医药、保健品、饮料食品添加剂等行业,国际市场需求空间很大。为了有效控制胡芦巴提取物的质量,笔者首次对胡芦巴提取物黄酮类成分的指纹图谱进行了研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

ULTIMATE 3000型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Dionex公司);UP5200H型超声波清洗机(熊猫集团南京电子计量有限公司);BSI型电子天平( $d=0.01$  mg,北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

### 1.2 试剂

牡荆苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111687-200602);甲醇(色谱纯,美国Tedia公司);水为三蒸水,其他试剂均为分析纯。

### 1.3 药材及提取物

胡芦巴药材共10批,由武汉黄鹤楼香精香料有限公司提供,产地均为安徽,经湖北中医药大学陈科力教授鉴定均为豆

- [5] 邢立志,暴春艳.HPLC法测定紫草中的左旋紫草素的含量[J].亚太传统医药,2008,4(5):41.
- [6] Sevimli-Gur C, Akgun IH, Deliloglu-Gurhan I, et al. Cytotoxic naphthoquinones from *Alkanna cappadocica*[J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(5): 860.
- [7] Lu L, Qin A, Huang H, et al. Shikonin extracted from medicinal Chinese herbs exerts anti-inflammatory effect

via proteasome inhibition[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 658(2/3):242.

- [8] Shen CC, Syu WJ, Li SY, et al. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*[J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(12):1 857.

- [9] 赵海青,刘军锋,刘珂.新疆紫草羟基萘醌类化学成分的研究及对PDE4的抑制作用[J].中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10):96.

\*教授,硕士研究生导师。研究方向:中药及其制剂有效成分。  
E-mail: lj951969@sohu.com

(收稿日期:2013-01-15 修回日期:2013-08-27)

科植物胡芦巴 *T. foenum-graecum* L. 的干燥成熟种子。将胡芦巴药材用8倍量60%乙醇回流提取3次,每次2 h,滤过,合并滤液,减压浓缩至浸膏状,真空干燥,粉碎,即得胡芦巴提取物。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.4%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 0.8 ml/min; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 339 nm; 进样量: 10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0~12	25	75
>12~17	25→30	75→70
>17~40	30	70

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取牡荆苷对照品适量,加70%甲醇溶解并稀释,制成每1 ml含150 μg的溶液,即得。

### 2.3 供试品溶液的制备

取胡芦巴提取物(过三号筛)约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入70%甲醇50 ml,摇匀,称定质量,超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理40 min,放冷,再次称定质量,用70%甲醇补足缺失的质量,滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批次胡芦巴提取物适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项下色谱条件下重复进样5次,记录色谱图。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积差异无统计学意义, RSD<3%,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 稳定性试验 取同一批次胡芦巴提取物制备的供试品溶液适量,在“2.1”项下色谱条件下分别于0、2、4、8、16、24、36 h进样分析,记录色谱图。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积差异无统计学意义, RSD<3%,表明供试品溶液在36 h内基本稳定,符合指纹图谱技术要求。

2.4.3 重复性试验 取同一批次胡芦巴提取物适量,共6份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项下色谱条件下进样分析,记录色谱图。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积差异无统计学意义, RSD<3%,表明本方法重复性良好。

### 2.5 指纹图谱的建立

精密吸取10批供试品溶液各适量,在“2.1”项下色谱条件下进样分析,记录色谱图。根据10批样品测定结果给出的峰数、峰值(相对峰面积)和峰位(相对保留时间)等相关参数,通过分析比较制定出优化的指纹图谱,详见图1、图2。

### 2.6 指纹图谱的分析与评价

从胡芦巴提取物指纹图谱中分离出14个共有指纹峰,通过与牡荆苷参照物对照比较,最终选取其中11个共有指纹峰作为指纹图谱的特征峰。1~11号共有指纹峰的保留时间

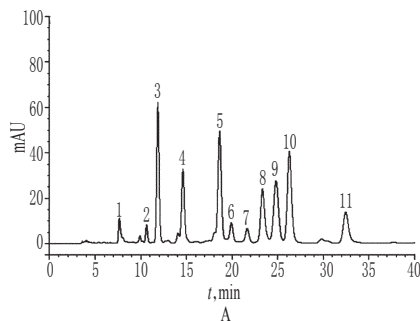


图1 胡芦巴提取物的HPLC指纹图谱

11. 牡荆苷

Fig 1 HPLC fingerprint of *T. foenum-graecum* extract

11. vitexin

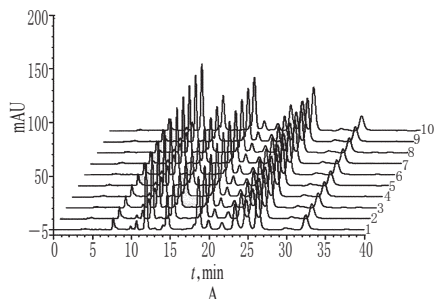


图2 10批胡芦巴提取物的叠加指纹图谱

Fig 2 Superposition fingerprints of 10 batches of *T. foenum-graecum* extract

(min)/峰面积依次为7.65/3.233、10.64/1.928、11.87/19.003、14.62/12.935、18.64/18.828、19.92/3.165、21.66/3.023、23.33/12.930、24.82/17.448、26.28/22.304、32.45/9.686。

2.6.1 共有指纹峰的标定 根据10批样品的测定结果来标定共有指纹峰,结果显示,胡芦巴提取物的HPLC指纹图谱中,共有指纹峰有11个。与牡荆苷参照物(11号峰)相比,其他10个共有指纹峰的相对保留时间依次为0.236、0.328、0.366、0.451、0.574、0.614、0.667、0.719、0.765、0.810。

2.6.2 共有指纹峰的面积比 11个共有指纹峰的总面积占整个峰面积的90%以上。

2.6.3 相似度评价 将所得的图谱数据导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》(2004A版)软件,经过选峰,设定其匹配模板,将谱峰进行自动匹配;并设定标准模板,进行谱峰差异性评价和整体相似度评价。通过相似度评价系统软件得出胡芦巴提取物HPLC指纹图谱的共有模式,经过与共有模式比较,10批胡芦巴提取物共有指纹峰的相对保留时间与相对峰面积差别均较小。10批胡芦巴提取物的相似度均>0.9,说明10批样品的相关性良好。10批胡芦巴提取物指纹图谱共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积分别见表2、表3。

## 3 讨论

本研究对供试品溶液的制备及色谱条件进行了筛选。通过对不同提取溶媒(甲醇、乙醇等)、不同体积分数(50%、60%、70%、80%)的甲醇及提取方法进行试验考察,结果表明:70%甲醇提取率最高;超声法比回流法的提取效率高。按

表2 10批胡芦巴提取物指纹图谱共有指纹峰的相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of common peaks for 10 batches of *T. foenum-graecum* extract

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$	RSD, %
1	0.239	0.237	0.239	0.238	0.237	0.237	0.238	0.239	0.237	0.239	0.238	0.40
2	0.330	0.328	0.327	0.328	0.326	0.325	0.328	0.327	0.328	0.330	0.328	0.48
3	0.369	0.365	0.367	0.366	0.368	0.369	0.366	0.367	0.365	0.369	0.367	0.43
4	0.451	0.450	0.447	0.445	0.452	0.453	0.445	0.447	0.450	0.451	0.449	0.64
5	0.577	0.575	0.573	0.576	0.572	0.574	0.576	0.573	0.575	0.577	0.575	0.30
6	0.610	0.609	0.610	0.613	0.607	0.605	0.613	0.610	0.609	0.610	0.610	0.40
7	0.666	0.662	0.668	0.663	0.667	0.663	0.663	0.668	0.662	0.666	0.665	0.37
8	0.717	0.719	0.714	0.712	0.716	0.714	0.713	0.714	0.719	0.717	0.716	0.34
9	0.766	0.762	0.765	0.764	0.761	0.766	0.764	0.765	0.762	0.766	0.764	0.24
10	0.825	0.828	0.827	0.822	0.826	0.823	0.822	0.827	0.828	0.825	0.825	0.28
11(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0

表3 10批胡芦巴指纹图谱共有指纹峰的相对峰面积

Tab 3 Relative peak areas of common peaks for 10 batches of *T. foenum-graecum* extract

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}$	RSD, %
1	0.332	0.337	0.332	0.332	0.336	0.337	0.336	0.332	0.337	0.332	0.334	0.73
2	0.197	0.195	0.196	0.195	0.193	0.192	0.195	0.196	0.195	0.196	0.195	0.76
3	1.960	1.965	1.961	1.963	1.968	1.970	1.963	1.961	1.965	1.960	1.964	0.17
4	1.333	1.338	1.337	1.333	1.330	1.331	1.333	1.337	1.338	1.333	1.334	0.22
5	1.942	1.944	1.946	1.948	1.942	1.941	1.948	1.946	1.944	1.942	1.944	0.13
6	0.328	0.323	0.328	0.329	0.324	0.325	0.329	0.328	0.323	0.328	0.327	0.75
7	0.313	0.317	0.314	0.313	0.319	0.317	0.313	0.314	0.317	0.313	0.315	0.72
8	1.336	1.337	1.333	1.332	1.339	1.338	1.332	1.333	1.337	1.336	1.335	0.19
9	1.802	1.809	1.800	1.808	1.804	1.802	1.808	1.800	1.813	1.768	1.801	0.69
10	2.301	2.300	2.309	2.309	2.308	2.310	2.309	2.300	2.301	2.302	2.305	0.19
11(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0

拟定的供试品溶液制备方法操作,所得指纹图谱出峰数目多,因此选取70%甲醇超声提取作为制样方法。

试验过程中考察了多种流动相系统(甲醇/乙腈-水、甲醇/乙腈-0.2%磷酸溶液、甲醇/乙腈-0.4%磷酸溶液等)进行梯度洗脱的分离效果。结果发现,采用甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱的效果最佳,且各色谱峰分离较好、峰形尖锐。

## 国家卫生和计划生育委员会副主任孙志刚在中国医学科学院医学信息研究所和天坛医院调研

本刊讯 2013年12月12日,国家卫生和计划生育委员会副主任、国务院医改办主任孙志刚赴中国医学科学院医学信息研究所(以下简称信息所)和首都医科大学附属北京天坛医院(以下简称北京天坛医院)调研,实地考察了信息所新型农村合作医疗(以下简称新农合)国家级信息平台 and 北京天坛医院门诊病房、实验室、信息中心等,并听取了有关工作情况汇报。

在信息所,孙志刚副主任高度评价了该所在国家医学信息资源战略保障、卫生发展政策研究以及新农合国家级信息平台建设等方面取得的成效。他要求信息所继续发挥团队优势,开展卫生政策研究,不断提高决策支撑水平,为卫生事业

科学发展服务。同时加快完善新农合国家级信息平台,扩大联通省份覆盖范围,尽快实现参合人员异地就医即时结算。

在北京天坛医院,孙志刚副主任详细询问了医院药品招标采购和运行管理等情况,充分肯定了医院近年来发展建设以及医药分开试点等医改工作实行1年来取得的成绩。他指出,北京天坛医院通过信息化完善电子病历,做到精细化追踪管理,有力地保障了医疗质量和安全,值得推广和借鉴。他希望北京天坛医院要进一步发挥优质资源的作用,并对医改后医院运行管理的财政补偿和成本核算进行深入分析,进一步提高内控水平。同时,要认真总结北京市医改经验,继续将改革向纵深推进,为全国公立医院改革做出有益探索。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010版.北京:中国医药科技出版社,2010:225.
- [2] 荆宇,胡芦巴化学成分的研究[D].沈阳:辽宁中医学院,2004.
- [3] 黄文哲,段金,杨柳.不同产地胡芦巴中薯蓣皂苷元的含量测定[J].中国中药杂志,1999,24(10):595.
- [4] 荆宇,赵余庆.胡芦巴化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2003,34(12):1146.
- [5] 许旭东,杨俊山.黄酮类化学成分现代药理学研究概况[C]//北京地区药学会学术年会报告集,2004:39-48.
- [6] 顾关云,程彰华.牡荆素的药理研究[J].国外药学植物药分册,1982,3(5):46.
- [7] 朱登祥,安芳,王书华.牡荆苷对人食管癌EC-109细胞生长及凋亡的影响[J].中草药,2012,43(9):1781.
- [8] 隋宏,张霞,马真,等.中心复合设计优化胡芦巴种子多糖的超声提取工艺[J].中国药房,2010,21(43):4066.

(收稿日期:2013-06-26 修回日期:2013-08-21)