

苦荞的 HPLC 指纹图谱分析*

宾婕¹, 刘洁¹, 张春勇¹, 陈克嶙², 陈丹³, 周劲³, 郭荣富², 郭亚东^{1**}

(1. 昆明医学院药学院, 昆明 650500; 2. 云南农业大学动物科技学院, 昆明 650201;

3. 云南侨通包装印刷有限公司, 昆明 657000)

摘要 目的: 建立苦荞的 HPLC 指纹图谱分析方法。方法: 采用岛津 ODS 柱(4.6 mm × 150 mm 5 μm), 流动相为乙腈-水(含 2% 的醋酸), 梯度洗脱, 检测波长 280 nm, 流速: 1 mL · min⁻¹。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A) 版》, 计算不同产地苦荞样品的 HPLC 指纹图谱的整体相似度。结果: 共有 12 个共有峰, 16 批被测样品的色谱指纹图谱的整体相似度在 0.927 ~ 0.999。结论: 该指纹图谱检测方法简便、重现性好, 可作为苦荞药材质量控制的重要方法。

关键词: 苦荞; 指纹图谱; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)10-1961-04

HPLC fingerprint of buckwheat*

BIN Jie¹, LIU Jie¹, ZHANG Chun-yong¹, CHEN Ke-lin²,
CHEN Dan³, ZHOU Jing³, GUO Rong-fu², GUO Ya-dong^{1**}

(1. School of Pharmacy, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

2. Institute of College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3. Yunnan Overseas Package Printing Co., Ltd, Kunming 657000, China)

Abstract Objective: To establish the analysis method of fingerprint for buckwheat by HPLC. **Methods:** A column of Shimadzu ODS(4.6 mm × 150 mm 5 μm) was used. The mobile phase consisted of acetonitrile - water (containing 2% acetic acid) with gradient elution. The detective wavelength was at 280 nm, and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. The similarity of different origin buckwheat sample were compared by Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of CMM Version 2004A. **Results:** The fingerprint consisted of 12 common peaks, and the similarity was in the range of 0.927 - 0.999. **Conclusion:** This method is simple, accurate with good reproducibility and can be used specifically for the quality control of buckwheat.

Key words: buckwheat; fingerprint; HPLC

在现阶段, 指纹图谱技术是全面、整体地控制中药质量最有效的方法^[1~3]。至目前, 曾未见有关苦荞指纹图谱方面的文献报道, 为更有效地控制苦荞的质量, 本试验应用 RP-HPLC 方法, 建立了苦荞的 HPLC 指纹图谱分析方法, 为其药材鉴别和质量控制提供实验依据。

1 材料、试剂与仪器

1.1 材料与试剂 苦荞样品的产地具体情况见表 1。

芦丁对照品(批号: 09072231, 上海同田生物技术有限公司) 槲皮素对照品(批号: 09120411, 上海同田生物技术有限公司)。

表 1 16 批苦荞样品的产地

Tab 1 Origins of 16 batch buckwheat sample

编号 (serial number)	产地 (origins)	编号 (serial number)	产地 (origins)
S1	罗平马街(Majie Luoping)	S9	会泽野马(Yema Huize)
S2	罗平老厂(Laochang Luoping)	S10	大理凤仪(Fengyi Dali)
S3	文山(Wenshan)	S11	大理澜剑(Lanjian Dali)
S4	会泽五星(Wuxing Huize)	S12	永善连峰(Lianfeng Yongshan)
S5	云南大山包(Dashanbao Yunnan)	S13	会泽火红(Huohong Huize)
S6	云南会兴(Hexing Yunnan)	S14	永善园苦荞(Yuankunjiao Yongshan)
S7	罗平中腊村(Zhongnacun Luoping)	S15	四川凉山(Liangshan Sichang)
S8	罗平初纳村(Cunacun Luoping)	S16	罗平牛街(Niujie Luoping)

* 云南侨通包装印刷有限公司资助项目(kx140564)

** 通讯作者 Tel: (0871) 5922809; E-mail: yadong_guo@yahoo.com.cn

乙腈(色谱纯,美国 Mallinckrodt Baker 公司),水(娃哈哈饮用纯净水),其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器 日本岛津 LC-2010 型高效液相色谱仪,包括四元梯度泵,自动进样器,柱温箱,紫外检测器和色谱工作站,岛津 ODS 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),超声提取器(上海仪器制造厂,SK3200H),电子天平(德国赛多利斯 CP-224S)。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱:岛津 ODS 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),以乙腈-水(含 2% 醋酸)为流动相,梯度洗脱(表 2),流速:1 mL · min⁻¹,柱温:25 °C,检测波长:280 nm。

表 2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution sequence

时间 (time) /min	乙腈 (acetonitrile) /%	含 2% 醋酸的水 [water (containing 2% acetic acid)]
0	17	83
18	40	60
50	90	10
60	90	10

表 3 共有峰峰面积和保留时间的 RSD (%)

Tab 3 Relative standard deviation of peak area and retention time in common peaks

峰号 (peak signal)	共有峰面积(peak area in common peaks)			共有峰保留时间(retention time in common peaks)		
	精密度 (precision)	重复性 (repeatability)	稳定性 (stability)	精密度 (precision)	重复性 (repeatability)	稳定性 (stability)
1	2.0	2.9	1.9	0.37	0.53	1.0
2	2.3	2.7	0.98	0.41	1.6	1.2
3	0.74	2.5	1.7	0.69	1.8	0.91
S	1.3	0.91	2.8	0.13	1.0	0.45
4	0.64	1.2	1.7	0.14	0.42	0.35
5	2.2	1.7	2.6	0.14	0.40	0.28
6	2.1	2.1	0.23	0.18	0.44	0.26
7	0.85	1.7	2.0	0.17	0.42	0.27
8	0.33	1.1	1.4	1.9	1.2	1.2
9	1.5	1.6	1.9	1.7	0.51	0.36
10	1.3	3.0	2.2	0.21	0.33	0.28
11	0.96	1.3	2.1	0.88	0.22	0.16

3.1.2 重复性试验 取同一批样品 6 份,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样测定各共有峰保留时间的 RSD < 1.8%,峰面积的 RSD < 3.0%。说明重复性好(见表 3)。

3.1.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,室温放

2.2 供试品溶液的配制 分别取苦荞粉末(过 60 目筛)约 100 mg,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加入 60% 乙醇 2 mL,在常温下超声(250 W, 40 kHz)提取 20 min,用乙醇稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。进样前取适量溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.3 对照品溶液的配制 精密称取芦丁和槲皮素对照品各 0.4 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得芦丁和槲皮素浓度均为 0.04 mg · mL⁻¹ 的单一成分对照品溶液。分别精密量取芦丁和槲皮素的对照品溶液各 1.0 mL 混匀,即得芦丁和槲皮素的对照品混合溶液。

3 结果与分析

3.1 方法的验证

3.1.1 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,分别对共有峰的保留时间和峰面积比值进行考察。结果表明,各共有峰保留时间的 RSD < 1.9%,峰面积的 RSD < 2.3%。说明精密度良好(见表 3)。

置,分别于 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样,测定各共有峰保留时间的 RSD < 1.2%,峰面积的 RSD < 2.8%。说明稳定性好(见表 3)。

3.2 指纹图谱及技术参数

3.2.1 指纹图谱及共有指纹峰的标定 按照对照

品溶液和供试品溶液的制备方法制备样品溶液,并对对照品(见图1)和16个批次供试品的HPLC图进行检测。结果表明1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11峰在16批次样品的色谱图中均出现,以槲皮素为参照,即S峰,计算各共有指纹峰相对保留时间的RSD为0.43%~3.3%($n=16$)之间(见表4);其共有指

纹峰相对峰面积的RSD为21.8%~83.1%($n=16$)之间(见表5);共有指纹峰峰面积之和占总峰面积比值均大于90%,符合中药指纹图谱研究技术指南(试行)^[4]的要求。因此标定此12个峰为共有指纹峰,并据此建立了苦荞的HPLC指纹图谱(见图2)。

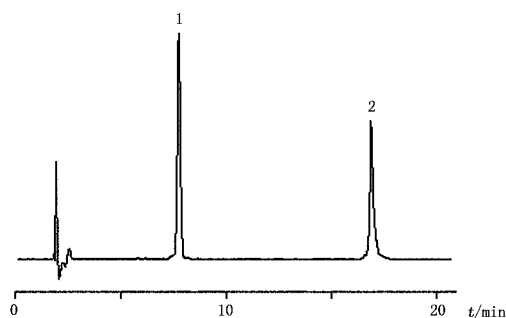


图1 对照品的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC of reference substance

1. 芦丁(rutin) 2. 槲皮素(quercetin)

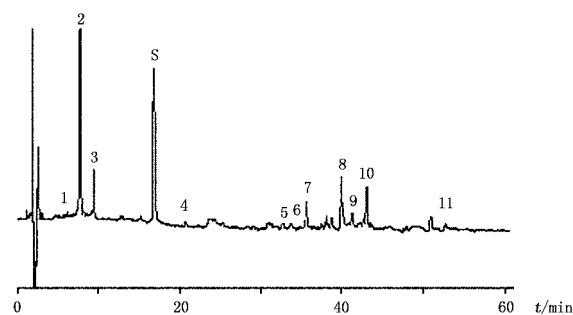


图2 12个共有指纹峰的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC of 12 common fingerprint peaks

表4 16批次苦荞共有指纹峰的相对保留时间

Tab 4 Relative retention time of common fingerprint peaks in 16 batch buckwheat sample

批次 (batch)	峰号(peak signal)											
	1	2	3	S	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.366	0.456	0.563	1.000	1.229	1.930	1.987	2.091	2.362	2.440	2.546	3.117
2	0.37	0.458	0.561	1.000	1.229	1.943	1.999	2.107	2.378	2.458	2.564	3.189
3	0.374	0.466	0.572	1.000	1.243	1.950	2.007	2.112	2.382	2.459	2.537	3.142
4	0.373	0.464	0.568	1.000	1.228	1.922	1.977	2.081	2.347	2.425	2.530	3.092
5	0.366	0.462	0.572	1.000	1.233	1.931	1.989	2.097	2.365	2.445	2.543	3.119
6	0.37	0.464	0.567	1.000	1.234	1.953	2.004	2.109	2.388	2.465	2.568	3.149
7	0.394	0.461	0.562	1.000	1.224	1.916	1.975	2.077	2.345	2.421	2.683	3.093
8	0.369	0.458	0.562	1.000	1.230	1.933	1.989	2.094	2.364	2.441	2.546	3.123
9	0.370	0.458	0.564	1.000	1.226	1.924	1.983	2.084	2.352	2.428	2.535	3.001
10	0.365	0.452	0.557	1.000	1.229	1.935	1.993	2.098	2.370	2.448	2.555	3.127
11	0.358	0.446	0.554	1.000	1.236	1.967	2.021	2.128	2.405	2.48	2.600	3.176
12	0.354	0.446	0.554	1.000	1.234	1.966	2.019	2.184	2.407	2.489	2.600	3.179
13	0.350	0.438	0.546	1.000	1.239	1.978	2.036	2.144	2.425	2.507	2.614	3.205
14	0.349	0.437	0.546	1.000	1.239	1.973	2.033	2.139	2.419	2.501	2.609	3.198
15	0.352	0.437	0.546	1.000	1.238	1.846	2.029	2.136	2.414	2.498	2.603	3.195
16	0.349	0.442	0.547	1.000	1.235	1.975	2.029	2.132	2.414	2.497	2.600	3.189
平均值 (average value)	0.364	0.453	0.559	1.000	1.233	1.940	2.004	2.113	2.384	2.463	2.577	3.140
RSD/%	3.28	2.28	1.63	0.00	0.43	1.67	1.04	1.36	1.14	1.20	1.59	1.67

3.2.2 相似度比较 采用中药指纹图谱相似度评价系统软件,对16批苦荞样品图谱进行相似度比较。以生成对照指纹图谱为模板,16批样品与对照

指纹图谱之间相似度为0.927~0.999。同时,对16批药材的色谱分离图进行叠加比较,见图3。

表 5 16 批次苦荞共有指纹峰的峰面积与 S 峰的比值
Tab 5 Ratio of peak area of common fingerprint peaks with the peak S in 16 batch buckwheat sample

批次 (batch)	峰号(peak signal)											
	1	2	3	S	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.018	1.950	0.178	1.000	0.045	0.064	0.055	0.179	0.310	0.058	0.172	0.026
2	0.015	0.226	0.188	1.000	0.040	0.064	0.095	0.240	0.091	0.054	0.227	0.054
3	0.020	1.074	0.124	1.000	0.048	0.026	0.034	0.093	0.178	0.036	0.095	0.018
4	0.017	1.577	0.102	1.000	0.032	0.056	0.075	0.182	0.351	0.067	0.181	0.043
5	0.018	1.956	0.174	1.000	0.045	0.059	0.054	0.174	0.306	0.057	0.173	0.025
6	0.016	2.269	0.181	1.000	0.040	0.064	0.019	0.235	0.410	0.084	0.229	0.054
7	0.050	1.268	0.082	1.000	0.031	0.065	0.073	0.236	0.426	0.080	0.104	0.037
8	0.024	1.931	0.095	1.000	0.036	0.086	0.068	0.194	0.406	0.076	0.199	0.058
9	0.027	0.934	0.149	1.000	0.037	0.057	0.047	0.147	0.257	0.045	0.177	0.027
10	0.022	1.842	0.091	1.000	0.057	0.081	0.077	0.245	0.430	0.076	0.165	0.029
11	0.137	2.437	0.162	1.000	0.065	0.079	0.046	0.268	0.624	0.165	0.094	0.032
12	0.050	2.284	0.248	1.000	0.042	0.051	0.105	0.306	0.390	0.124	0.105	0.045
13	0.083	2.352	0.349	1.000	0.039	0.062	0.096	0.300	0.435	0.118	0.114	0.039
14	0.123	3.479	0.205	1.000	0.056	0.075	0.111	0.411	0.563	0.169	0.143	0.071
15	0.058	1.957	0.262	1.000	0.053	0.051	0.083	0.238	0.328	0.095	0.077	0.031
16	0.083	2.315	0.247	1.000	0.039	0.062	0.103	0.306	0.440	0.125	0.107	0.040
平均值 (average value)	0.048	1.866	0.177	1.000	0.044	0.063	0.071	0.035	0.372	0.089	0.039	0.148
RSD/%	83.13	40.01	41.26	0.00	21.65	22.65	37.99	32.23	35.31	45.21	36.29	33.29

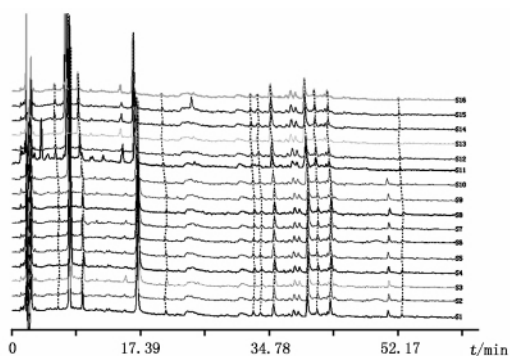


图 3 16 批次苦荞样品的高效液相色谱叠加图

Fig 3 Stacking chart of HPLC in 16 batch buckwheat sample

4 讨论

4.1 本实验对乙腈-水、乙腈-0.05% 醋酸水溶液、乙腈-1% 醋酸水溶液、乙腈-1.5% 醋酸水溶液和乙腈-2% 醋酸水溶液系统进行了考察。结果发现只有在乙腈-2% 醋酸水溶液系统下保留时间较适合且峰形较好, 所以将乙腈-2% 冰醋酸水溶液系统确定为色谱条件。

4.2 本实验采用 PDA 检测器对检测波长进行了考察, 记录并比较了不同波长的指纹图谱, 结果在 280 nm 检测波长下, 指纹图谱中色谱峰较多, 信息较丰富, 所以选择 280 nm 为检测波长。

4.3 从表 4 和表 5 可以看出, 各共有指纹峰的相对保留时间 RSD 为 0.43% ~ 3.3% 之间, 相对峰面积 RSD 为 21.7% ~ 83.1% 之间。即相对峰面积相差

较大, 认为可能是因此 16 批苦荞样品生长环境和期限不同所导致各组分的含量存在差异。

4.4 本实验采用 HPLC 技术对苦荞样品中黄酮类化合物进行了检测, 通过 16 批次苦荞样品的色谱峰保留时间和峰面积百分比的比较和分析, 对共有指纹峰进行了标定, 并据此成功建立了苦荞药材的 HPLC 指纹图谱。经过对不同产地的苦荞样品的 HPLC 图谱的比较, 结果表明, 实验获得的色谱指纹图谱在不同产地苦荞样品中具有极大的相似性, 从而可以有效反映同一物种个体间的相似性, 可以作为苦荞专属性的指纹图谱。为苦荞的药材鉴别和质量控制提供依据。

参考文献

- 1 Yan XJ, Zhou J, Xie J, et al. Traditional Chinese Medicines: Molecular Structures, Natural Sources and Applications, Aldershot, Ashgate, 1999. 1
- 2 Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. Biology of Plants. 6th ed. W. H. Freeman: New York, 1999. 48
- 3 CHENG Yi-yu(程翼宇), CHEN Min-jun(陈闽军), WU Yong-jian(吴永江). Chemical fingerprint similarity measure and its evaluation methods(化学指纹图谱的相似性测度及其评价方法). Chin J Chem(化学学报) 2002 60(11): 2017
- 4 ZHOU Yu-xin(周玉新). Study on Fingerprint of Traditional Chinese Medicine Technology(中药指纹图谱研究技术). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社). 2002. 671

(本文于 2010 年 7 月 19 日收到)