

# 多波长融合玄参饮片 HPLC 指纹图谱研究

徐思思, 朱月月, 聂诗明\*

(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

**[摘要]** **目的:**建立玄参多波长融合 HPLC 指纹图谱,为玄参的质量提供新方法。**方法:**采用多波长融合 HPLC 测定不同产地玄参饮片。色谱条件:Thermo C<sub>18</sub>柱,乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相梯度洗脱。多波长检测(0~5 min 为 230 nm,5~13 min 为 210 nm,13~23 min 为 320 nm,23~50 min 为 278 nm,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>),柱温 30 ℃。**结果:**建立了多波长融合玄参饮片 HPLC 指纹图谱共有模式,确认 25 个共有峰,标定其中 6 个峰,10 批玄参样品相似度均 >0.90。**结论:**建立的指纹图谱色谱峰数较多,色谱信息量大,适用于玄参饮片的质量评价。

**[关键词]** 玄参饮片;多波长融合;高效液相色谱法;指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)08-0055-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014080055

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000027.html>

**[网络出版时间]** 2014-02-07 15:07

## Study on the Multi-wavelength HPLC Fingerprinting of Scrophulariae Radix

XU Si-si, ZHU Yue-yue, NIE Shi-ming\*

(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** Using the multi-wavelength high performance liquid chromatography (HPLC) for testing 10 Scrophulariae Radix samples from Zhejiang Panan, Hubei Enshi, ect. To provide a new method for scientific evaluation and effective control of its quality, and establish the multi-wavelength HPLC fingerprinting of Scrophulariae Radix from different places. **Method:** Chromatographic conditions: Thermo C<sub>18</sub> column, gradient elution was applied with acetonitrile and 0.1% methane acid as the mobile-phase. Ultraviolet (UV) was used combined with multiple wavelength to detect the chromatographic peaks that cannot be displayed in the same channel. The wavelength timetable was as follows, from 0 to 5 min the wavelength was 230 nm; from 5 to 13 min was 210 nm; from 13 to 23 min was 320 nm; from 23 to 50 min was 278 nm. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup> and the column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** A HPLC fingerprinting pattern was set up based on multi-wavelength combined with UV, which demarcated 25 common peaks and confirmed 6 peaks. The index similarity of those Scrophulariae Radix fingerprinting which analysed through similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM (Version 2004 A) were all greater than 0.90. **Conclusion:** The approach of multi-wavelength HPLC will help to differentiate and evaluate the quality of Scrophulariae Radix. The method is highly sensitive, characteristic peaks of large quantity, chromatographic large amount of information that will help evaluate the quality of Scrophulariaceae Radix.

**[Key words]** Scrophulariae Radix; multi-wavelength; HPLC; fingerprinting

**[收稿日期]** 20131128(013)

**[基金项目]** 2010 年度中医药行业科研专项(201007012-2-3)

**[第一作者]** 徐思思, 硕士, 从事中药新制剂、新剂型的研究, Tel:027-68890231, E-mail:869180129@qq.com

**[通讯作者]** \* 聂诗明, 教授, 从事中药新制剂、新剂型研究, Tel:027-68890231, E-mail:163nsm@163.com

玄参为玄参科植物玄参的干燥根<sup>[1]</sup>,主产于浙江、四川、湖北、安徽、江苏等地,具滋阴降火、解毒、利咽等功效。玄参含量测定波长常用的有 210 nm<sup>[2]</sup>,278 nm<sup>[3,4]</sup>,280 nm<sup>[2,5]</sup>。单波长建立玄参的 HPLC 指纹图谱已有报道,采用的检测波长分别有 290 nm<sup>[6]</sup>,280 nm<sup>[7-8]</sup>,260 nm<sup>[9]</sup>,210 nm<sup>[10-11]</sup>。以上的含量测定和单波长指纹图谱均存在玄参某些重要成分信息特征无法显示或基线严重漂移的现象。采用多波长融合检测,能使更多的活性成分显示出良好的图谱信号,从而丰富其色谱信息。作者根据玄参的主要活性成分的紫外光谱特征,采用四波长融合法研究并建立了玄参饮片 HPLC 指纹图谱,为玄参质量的评价提供了新的方法。

## 1 材料

**1.1 仪器** Dionex P680 型高效液相色谱仪、BS110S 1/10 万分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)、SK7200HP 型超声波清洗器、JC202-1 SA 型数显恒温干燥器(广州兴兴微波能设备有限公司)、具塞锥形瓶、Thermo C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm)。

**1.2 试剂** 哈巴昔对照品(购于中国药品生物制品检定所,批号 111729-200602)、哈巴俄昔对照品(购于中国药品生物制品检定所,批号 111730-200605)、桃叶珊瑚昔对照品(购于日本和光纯药工业株式会社,批号 016-10351,纯度 ≥ 98%)、梓醇对照品(购于中国药品生物制品检定所,批号 0808-9803)、肉桂酸对照品(购于国药集团化学试剂有限公司,纯度 ≥ 99.5%,批号 F20090915)、安格洛昔-C(购于上海同田生物技术股份有限公司,纯度 ≥ 98%,批号 09090332)。

Fisher 公司提供的色谱乙腈、色谱甲醇。水为二次重蒸水,其他试剂均为分析纯。

**1.3 供试样品** 玄参饮片:供试饮片共 10 批,其中一部分来源于玄参基地的药材,委托饮片生产企业加工而成;一部分为市售饮片。玄参饮片样品经湖北中医药大学药教研室陈科力教授鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根。文章中 10 批玄参供试饮片由 30 多批样品中筛选的质量较优者,其质量检测均符合《中国药典》2010 年版一部玄参质量标准,即哈巴昔和哈巴俄昔总含量不少于 0.45%。10 批玄参饮片信息见表 1,含量测定的结果见表 2。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

表 1 玄参饮片采集情况

No.	采集地点	产地	加工或市售饮片	采集时间
1	浙江磐安玄参药材基地	浙江	加工饮片	2011-12-22
2	浙江磐安玄参药材基地	浙江	加工饮片	2011-12-22
3	重庆南川玄参药材基地	重庆	加工饮片	2012-02-15
4	重庆南川玄参药材基地	重庆	加工饮片	2012-02-15
5	重庆南川玄参药材基地	重庆	加工饮片	2012-02-15
6	湖北恩施玄参药材基地	湖北	加工饮片	2012-04-10
7	湖北恩施玄参药材基地	湖北	加工饮片	2012-04-10
8	四川中药材市场	四川	市售饮片	2012-07-07
9	北京同仁堂福州东大药店	浙江	市售饮片	2012-07-08
10	山西国大万民药房连锁有限公司	浙江	市售饮片	2012-07-10

表 2 玄参饮片平均含量测定(n=3)

No.	哈巴昔	哈巴俄昔	总量	%
1	2.81	0.14	2.95	
2	2.56	0.16	2.72	
3	2.91	0.08	2.97	
4	2.62	0.13	2.75	
5	2.55	0.10	2.65	
6	2.82	0.12	2.94	
7	2.67	0.12	2.79	
8	2.25	0.18	2.43	
9	2.64	0.12	2.76	
10	3.00	0.12	3.12	

**2.1.1 流动相的选择** 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B)溶液,按表 3 规定的梯度洗脱,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 ℃,结果显示色谱峰分离度良好。

表 3 流动相梯度洗脱条件

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0 ~ 15	3 ~ 10	97 ~ 90
15 ~ 30	10 ~ 25	90 ~ 75
30 ~ 45	25 ~ 35	75 ~ 65
45 ~ 50	35 ~ 3	65 ~ 97

**2.1.2 检测波长的选择** 基于玄参中不同的成分紫外光谱特征,如环烯醚萜类成分基本为末端吸收,具苯丙酰基的成分最大吸收波长约 278 nm,具阿魏酰基成分的最大吸收波长约 320 nm。波长设置:0 ~ 5 min,230 nm;5 ~ 13 min,210 nm;13 ~ 23 min,320 nm;23 ~ 50 min,278 nm。上述波长条件基线波

动较小、出峰多、峰信号较强,特征成分梓醇,哈巴苷、桃叶珊瑚苷、安格洛苷-C、哈巴俄苷、肉桂酸等峰信号显著。

**2.2 供试品溶液制备** 取玄参饮片制成的粉末(过三号筛)2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 50 mL,密塞,称定质量,浸泡 1 h,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

**2.3 参照物及对照品溶液制备** 取哈巴俄苷、哈巴苷、梓醇、桃叶珊瑚苷、安格洛苷-C、肉桂酸对照品适量,精密称定,以甲醇制成对照品溶液。以哈巴俄苷作为参照物,参照物溶液每 1 mL 含哈巴俄苷 20  $\mu\text{g}$ 。其他对照品浓度分别为哈巴苷 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、梓醇 40  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、桃叶珊瑚苷 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、安格洛苷-C 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、肉桂酸 60  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.4 色谱测定法** 分别精密吸取供试品溶液和空白溶剂各 20  $\mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,按 2.1 项下条件测定,记录色谱图,即得。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 精密度试验** 取同一批次供试品溶液(样品 1 号),连续进样 5 次,记录色谱图。对其共有的 25 个主要色谱峰分别进行差异性评价,结果表明各共有峰保留时间 RSD 0.02% ~ 0.74%,各共有峰面积 RSD 0.28% ~ 1.55%,符合指纹图谱的要求。

**2.5.2 稳定性试验** 取同一批次供试品溶液(样品 1 号),分别于制备后 0,3,6,10,15,24 h 进样,记录色谱图。对其共有的 25 个主要色谱峰分别进行差异性评价,结果表明各共有峰保留时间 RSD 0.01% ~ 0.50%,峰面积 RSD 0.61% ~ 1.48%,证明供试液在 24 h 内稳定。

**2.5.3 重复性试验** 取同一供试品 5 份,分别制备供试品溶液,进样,记录色谱图。对其共有的 25 个主要色谱峰分别进行差异性评价,结果表明,各共有峰保留时间 RSD 0.02% ~ 0.50%,峰面积 RSD 0.31% ~ 1.46%,表明该方法重复性较好。

**2.6 玄参饮片相似度评价及 HPLC 指纹图谱共有模式的建立**

**2.6.1 供试品 HPLC 参数的测定** 将 10 批玄参饮片,按 2.2 项下方法分别制备供试品溶液,进样,记录 HPLC 图。通过 10 批玄参饮片指纹图谱的比较,确定特征峰 25 个。其中,出峰时间为 38.21 min 的 23 号峰(哈巴俄苷)保留时间适中,峰面积较大且稳定,峰形较好,为各样品中所共有的色谱峰,故选择

23 号峰为内参照峰 S。

**2.6.2 共有特征峰的确定及相似度** 将 10 批饮片的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版相似度软件,对 10 批饮片色谱图的原始数据进行分析,制定以哈巴俄苷为参照物的玄参饮片指纹图谱,对共有的特征峰 1 ~ 25 编号。多点校正后自动匹配见图 1。根据 10 批玄参饮片指纹图谱检测结果,10 个样品相似度均 > 0.90,平均相似度为 0.963。10 批饮片 HPLC 指纹图谱相似度见表 4。

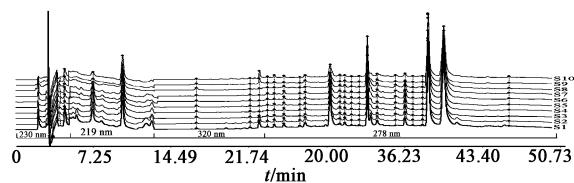
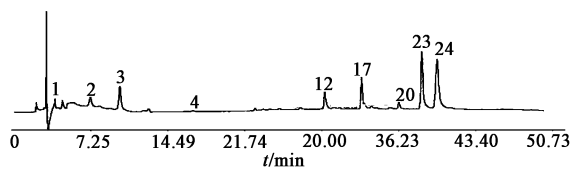


图 1 10 批玄参饮片 HPLC 指纹图谱

**2.6.3 HPLC 指纹图谱共有模式的建立及主要特征峰的标定** 将 10 批玄参饮片的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版相似度软件进行数据处理,选择色谱峰进行多点校正、色谱峰自动匹配后,以中位数法生成 HPLC 指纹图谱共有模式,见图 2。按供试品色谱相同条件测定对照品色谱,根据对照品色谱相应峰位标定 6 个特征峰的归属:1 梓醇;2 桃叶珊瑚苷;3 哈巴苷;17 安格洛苷-C;23 哈巴俄苷;24 肉桂酸。对照品色谱见图 3。10 批相同玄参饮片 278 nm 波长下 HPLC 指纹图谱共有模式见图 4。



1. 梓醇;2. 桃叶珊瑚苷;3. 哈巴苷;  
17. 安格洛苷-C;23. 哈巴俄苷(S);24. 肉桂酸

图 2 玄参饮片 HPLC 指纹图谱共有模式

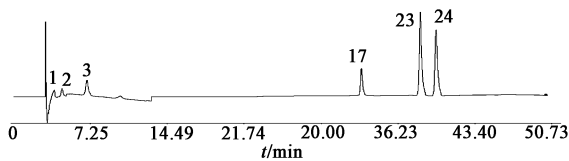
## 3 讨论

**3.1 玄参饮片样品的选择** 构建该指纹图谱的 10 批样品,均来源于玄参的主要产区,其质量检测均符合《中国药典》2010 年版一部玄参质量标准,饮片质量较优,以保证建立的 HPLC 指纹图谱适合评价玄参饮片的质量。

**3.2 多波长的选择** 玄参的活性成分包括多种化学成分,如哈巴苷、桃叶珊瑚苷、梓醇、哈巴俄苷、6'-O-乙酰基哈巴俄苷、安格洛苷-C、8-O-阿魏酰基哈巴

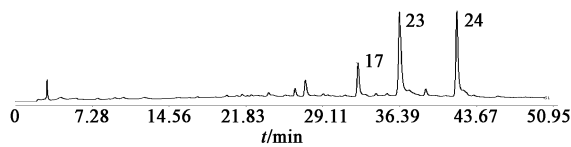
表 4 10 批饮片指纹图谱相似度

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹
S1	1.000	0.971	0.912	0.898	0.904	0.909	0.930	0.940	0.904	0.945	0.943
S2	0.971	1.000	0.916	0.909	0.914	0.912	0.929	0.928	0.904	0.945	0.944
S3	0.912	0.916	1.000	0.996	0.993	0.978	0.929	0.947	0.894	0.919	0.986
S4	0.898	0.909	0.996	1.000	0.995	0.978	0.924	0.936	0.885	0.907	0.984
S5	0.904	0.914	0.993	0.995	1.000	0.972	0.922	0.935	0.882	0.909	0.981
S6	0.909	0.912	0.978	0.978	0.972	1.000	0.969	0.946	0.891	0.908	0.983
S7	0.930	0.929	0.929	0.924	0.922	0.969	1.000	0.929	0.880	0.928	0.949
S8	0.940	0.928	0.947	0.936	0.935	0.946	0.929	1.000	0.948	0.964	0.973
S9	0.904	0.904	0.894	0.885	0.882	0.891	0.880	0.948	1.000	0.939	0.934
S10	0.945	0.945	0.919	0.907	0.909	0.908	0.928	0.964	0.939	1.000	0.948
对照指纹	0.943	0.944	0.986	0.984	0.981	0.983	0.949	0.973	0.934	0.948	1.000



1. 梓醇; 2. 桃叶珊瑚苷; 3. 哈巴苷;  
17. 安格洛昔-C; 23. 哈巴俄昔; 24. 肉桂酸

图 3 玄参中各对照品色谱图



17. 安格洛昔-C; 23. 肉桂酸; 24. 哈巴俄昔

图 4 单波长 (278 nm) 玄参饮片 HPLC 指纹图谱共有模式

苷、4-O-乙酰基-2-O-阿魏酰基- $\alpha$ -L-鼠李糖、肉桂酸、对甲氧基肉桂酸等。由于不同成分具不同的光谱特征,故单一波长在展现多种化学成分的色谱信息特征方面存在较大的缺陷。采用多波长融合色谱信息,可使较多的成分展示较好的色谱峰信号,从而提高灵敏度、减少干扰、丰富色谱信息,其指纹图谱更能体现饮片的内在质量。

**3.3 流动相的选择** 分别对 0.1% 甲酸-甲醇、乙腈-甲醇系统进行了 3% ~ 97% 的梯度洗脱。结果表明,在乙腈-甲醇系统下,按 2.1.1 项中流动相梯度洗脱条件色谱峰出峰稳定,峰形较好,分离度较高。

**3.4 检测波长的确定** 分别测定了 210, 230, 250, 260, 278, 300, 320 nm 不同波长对玄参 HPLC 信号的影响。根据特征成分的光谱特征与试验考察,最终确定 4 个检测波长: 0 ~ 5 min 为 230 nm (基线波动比 210 nm 小); 5 ~ 13 min 为 210 nm (哈巴苷、桃叶珊瑚苷等特征性峰较强); 13 ~ 23 min 为 320 nm (显示的峰多,且峰信号较强); 23 ~ 50 min 为 278 nm (安格洛昔-C、哈巴俄昔、肉桂酸等特征性峰较强)。

**3.5 多波长 HPLC 指纹图谱共有模式优点** 图 4

为单波长 HPLC 指纹图谱共有模式,单波长 HPLC 指纹图谱只能标定出 3 个色谱峰,哈巴苷、梓醇、桃叶珊瑚苷在该波长下无法显示。图 2 为多波长融合建立的玄参饮片 HPLC 指纹图谱共有模式,具 25 个共有峰,标定其中 6 个峰。与单波长 HPLC 法相比,该方法稳定可靠,专属性强,可为玄参饮片的鉴别和质量评价提供参考。

[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: 108.  
[2] 白云娥, 袁鹏飞, 王庆辉, 等. HPLC-UV 波长转换法测定玄参药材及饮片中哈巴苷与哈巴俄昔的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2696.  
[3] 蔡光先, 蔡萍, 张水寒, 等. HPLC 测定湖南道地药材玄参中哈巴俄昔的研究[J]. 湖南中医杂志, 2006, 22(2): 86.  
[4] 胡北, 马宏达, 赵庆春, 等. HPLC 法测定参芪养心滴丸中哈巴俄昔和肉桂酸的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(12): 1703.  
[5] 耿莹莹, 阙慧卿, 师怡, 等. 玄通胶囊中哈巴俄昔的 HPLC 测定[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1187.  
[6] 白志川. 玄参药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中药材, 2006, 29(12): 1295.  
[7] 王敏娟, 李静, 李杨, 等. 玄参饮片 HPLC 特征图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 657.  
[8] 孙国祥, 史香芬. 基于高效液相色谱指纹谱的系统指纹定量法鉴定玄参药材质量[J]. 中南药学, 2009, 7(8): 618.  
[9] 周雯, 蒋林, 王晓娟, 等. 西南产玄参药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2012, 35(8): 1230.  
[10] 刘洪宇, 蔡铁全. 玄参 HPLC 指纹图谱的比较研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(7): 1277.  
[11] 张雪梅, 王瑞, 安睿, 等. HPLC 同时测定玄参中 5 种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 709.

[责任编辑 顾雪竹]