

## 胡芦巴种子 70% 醇提物薄层色谱和高效液相色谱特征图谱的建立

孟凡恒<sup>1,2</sup>, 朱帅鸣<sup>2</sup>, 骆芙瑶<sup>2</sup>, 徐锐<sup>2</sup>, 单俊杰<sup>2</sup>

(1 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850)

**[摘要]** **目的:** 建立胡芦巴种子 70% 乙醇提取物的薄层色谱(TLC)和高效液相色谱(HPLC)特征图谱, 同时考察 11 批胡芦巴种子醇提物特征图谱的相似性和差异性。**方法:** ① 采用 G 型和 HF<sub>254</sub> 型薄层层析硅胶板, 以正丁醇-乙醇-水(2:6:2)为展开剂, 分别喷洒碘化铋钾-三氯化铁和 10% 硫酸-乙醇 2 种显色剂, 在日光、紫外波长 254 和 365 nm 下检视色谱斑点, 建立胡芦巴 70% 醇提物的 TLC 特征图谱。② 采用 Supersil ODS-B 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 磷酸溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.7 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 ℃, 检测波长 203 nm, 建立胡芦巴 70% 醇提物的 HPLC 特征图谱。**结果:** TLC 特征图谱显示该醇提物有 8 个明显斑点, 其中含抗糖尿病的活性成分胡芦巴碱和薯蓣皂苷。HPLC 特征图谱显示该醇提物含有 29 个共有色谱峰, 其中指认出 14 种色谱峰的化学成分。相似度评价表明 11 批胡芦巴醇提物相似度 > 0.9。聚类分析表明不同产地的胡芦巴药材之间存在一定的差异性, 其中安徽与河南产地的胡芦巴药材相似度较高。**结论:** 该方法稳定性和重复性良好, 而且具有较强的特征性, 可用于胡芦巴 70% 醇提物的质量控制。

**[关键词]** 胡芦巴; 醇提物; 薄层色谱; 高效液相色谱; 特征图谱**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)07-0752-09

## Establishment of thin layer chromatography and high performance liquid chromatography characteristic chromatograms of 70% ethanol extract from seeds of fenugreek

MENG Fan-heng<sup>1,2</sup>, ZHU Shuai-ming<sup>2</sup>, LUO Fu-yao<sup>2</sup>, XU Rui<sup>2</sup>, SHAN Jun-jie<sup>2</sup>

(1 College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2 Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) characteristic chromatography methods of 70% ethanol extract from seeds of fenugreek, and to investigate the similarities and differences among eleven batches of fenugreek extract. **Methods:** ① G and HF<sub>254</sub> silica gel plates were used for TLC, using a mixture of n-butanol-ethanol-water (2:6:2) as developer, bismuth potassium iodide-ferric chloride and 10% sulphuric acid-ethanol as color developing reagents. The sunlight and ultraviolet wavelength at 254 nm and 365 nm were used to identify the spots on TLC plates. ② A Supersil ODS-B column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for HPLC chromatography. The mobile phase was 0.1% phosphoric acid-acetonitrile with a gradient elution. The flow rate was 0.7 mL·min<sup>-1</sup>, the column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was 203 nm. **Results:** The TLC chromatogram of 70% ethanol extract from fenugreek

**[作者简介]** 孟凡恒, 女, 硕士研究生, 主要从事中药分析研究。联系电话: (010)66930644, E-mail: aheng1226@163.com。共同第一作者: 朱帅鸣, 男, 助理研究员, 主要从事中药新药研究和质量控制研究。联系电话: (010)66930644, E-mail: zhushuaiming@aliyun.com。

**[通讯作者]** 单俊杰, 女, 研究员, 主要从事中药和多糖类新药的研究和开发。联系电话: (010)66930644, E-mail: shanjunjie001@126.com。

indicated that there were eight spots containing trigonelline and dioscin as anti-diabetic active components. In HPLC chromatogram, there were twenty-nine common peaks in eleven batches of fenugreek, and fourteen components were identified. The similarity of the eleven batches of 70% ethanol extract were more than 0.9. The cluster analysis showed that there was variability among the samples of fenugreek from different origins. However, there are high similarity between Anhui and Henan provinces. **Conclusion:** These developed methods are reproducible and reliable. The two chromatograms showed strong characteristics, which can be used to control the quality of 70% ethanol-extract of fenugreek.

**[Key words]** fenugreek; ethanol-extract; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; characteristic chromatogram

胡芦巴药材为豆科植物胡芦巴 (*Trigonella foenum-graecum* L.) 的干燥成熟种子,具有温肾阳、祛寒、止痛的作用,主要用于治疗肾虚虚冷、小腹冷痛、小肠疝气、寒湿脚气等疾病<sup>[1]</sup>。多项国内外临床研究表明胡芦巴种子可显著降低 1 型和 2 型糖尿病患者血糖(包括空腹血糖和餐后血糖)、糖化血红蛋白和血脂,增加胰岛素敏感性<sup>[2-4]</sup>。胡芦巴种子对糖耐量异常的前糖尿病患者也有良好的预防作用,有利于延缓糖尿病发生,减轻胰岛素耐受<sup>[5]</sup>。临床研究发现胡芦巴种子的乙醇提取物能改善 2 型糖尿病血糖和胰岛素敏感性,减少胰岛素分泌,有利于高血糖的控制<sup>[6]</sup>。乙醇提取物中皂苷类成分(Fenfuro™)能有效降低 2 型糖尿病患者的空腹和餐后血糖,其中 48.8% 患者减少了降糖药的服用剂量<sup>[7]</sup>。

现代药理学研究证实胡芦巴种子乙醇提取物具有显著的抗糖尿病功效。胡芦巴醇提物灌胃(*ig*) 2 型糖尿病大鼠,能明显降低血糖、糖化血红蛋白、肝脏葡萄糖转运以及前炎症因子水平,提高肌肉和肝脏的糖原和总蛋白质量,同时还抑制脂质过氧化,恢复肝脏和胰腺谷胱甘肽(GSH)含量及超氧化歧化酶(SOD)活性,效果优于格列美脲<sup>[8]</sup>。胡芦巴乙醇提取物给予高果糖饲料诱导的 2 型糖尿病大鼠,能降低血糖、三酰甘油和游离脂肪酸,提高大鼠胰岛素敏感性和酪氨酸磷酸化,其效果与二甲双胍相当<sup>[9]</sup>。胡芦巴乙醇提取物中富含芹菜素黄酮苷、皂苷(薯蓣皂苷和呋甾皂苷为主)、胡芦巴碱及 4-羟基异亮氨酸等抗糖尿病活性成分<sup>[10-13]</sup>。

本课题组前期研究表明胡芦巴种子 70% 乙醇提取物对 1 型和 2 型糖尿病小鼠和大鼠均有显著降血糖和降血脂作用。将该醇提物进行进一步分离纯化和活性成分追踪,发现醇提物中富含芹菜素黄酮苷,且芹菜素黄酮苷能显著降低四氧嘧啶糖尿病小

鼠血糖,促进肝糖原合成,抑制糖原水解,是胡芦巴种子降血糖的主要活性成分之一<sup>[14]</sup>。

中药材或中药经适当处理后,采用多种分析技术,获得能够标示该中药材或中药特性的共有峰特征(或指纹)图谱。指纹图谱能全面地反映中药所包含的化学信息,是中药质量控制的有效手段。潘娟等<sup>[15]</sup>采用高效液相色谱(HPLC)技术研究胡芦巴药材、标准汤剂、黄酮类成分的指纹图谱,使用 Alltech C<sub>18</sub> 色谱柱,以乙腈-水为流动相,在 211 nm 波长下建立胡芦巴种子甲醇提取物的特征图谱,确定了 21 个共有峰(但均未对共有峰进行化学成分的指认)。吴琴等<sup>[16]</sup>采用 Agilent5Tc-C<sub>18</sub> 色谱柱,甲醇-0.05% 十二烷基磺酸钠溶液-冰醋酸溶液为流动相,在 265 nm 波长下建立胡芦巴标准汤剂(水煎剂)的指纹图谱,确定其含有 10 个特征共有峰,指认了其中异荛草苷和牡荆素 2 种成分。卢金清等<sup>[17]</sup>采用 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱和甲醇-0.4% 磷酸溶液流动相,检测波长为 339 nm,建立了黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱,标定出 11 个共有指纹峰,但仅指认其中牡荆苷 1 种成分。目前对胡芦巴种子乙醇提取物的特征或指纹图谱的研究尚未见报道。

本文拟同时采用薄层色谱(TLC)和 HPLC 技术,分别研究和建立胡芦巴种子 70% 乙醇提取物的特征图谱,从整体角度得到该提取物的较多化学成分信息。特征图谱的建立为胡芦巴的应用提供了可靠的质量标准控制方法。

## 材料与方法

### 1 药材、对照品和试剂

胡芦巴对照药材(批号:121609-201803,规格:1 g)购于中国食品药品检定研究院;11 批胡芦巴药材的采购信息见表 1。

表 1 11 批胡芦巴药材的来源信息

样品编号	药材名称	生产批号	产地	加工企业
S1	盐胡芦巴	2105001	安徽	安徽普仁中药饮片有限公司
S2	盐胡芦巴	81791001	河南	北京三和药业有限公司
S3	盐胡芦巴	2102262	安徽	安徽普仁中药饮片有限公司
S4	盐胡芦巴	11790301	河南	北京三和药业有限公司
S5	胡芦巴	210200081	安徽	康美药业股份有限公司
S6	胡芦巴	201210	河南	浙江桐君堂中药饮片有限公司
S7	胡芦巴	170901	山东	安徽济顺中药饮片有限公司
S8	胡芦巴	200101	安徽	洪雅县瓦屋山药业有限公司
S9	胡芦巴	200801	安徽	洪雅县瓦屋山药业有限公司
S10	胡芦巴	180706	江苏	亳州市佰世信中药饮片有限公司
S11	胡芦巴	161205	安徽	安徽孟氏中药饮片有限公司

胡芦巴碱(批号:110883-202105,纯度:78.4%)、牡荆素(批号:111687-202105,纯度:99.1%)、荳蔻苷(批号:11777-202003,纯度:98.0%)、异荳蔻苷(批号:111974-201401,纯度:94.0%)均购于中国食品药品检定研究院;原薯蓣皂苷(批号:B21621-20 mg,纯度:98.1%)、异牡荆素(批号:B21544-20 mg,纯度:99.7%)、芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-木糖苷(批号:B24396-10 mg,纯度:99.5%)、芹菜素-6-C-木糖-8-C-葡萄糖苷(批号:B50197-5 mg,纯度:99.8%)均购于上海源叶生物科技有限公司;薯蓣皂苷(北京普天同创生物科技有限公司,批号:PCS-210321,纯度:98.6%);HLB-36{(25*R*)-26-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖基-Δ<sup>5</sup>(6)-烯-呋甾-2α,3β,22α,26-四羟基 3-*O*-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→4)-α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→4)-[α-*L*-吡喃鼠李糖基-(1→2)]-β-*D*-吡喃葡萄糖苷},HLB-25(trigoneoside XIIIa),HLB-9(trigoneoside IVa),HLB-8b(glycoside F)和HLB-P10(aigigiberoside A1)均由军事医学研究院马百平教授赠送,纯度均≥98%。甲醇、乙腈(Fisher Scientific公司,色谱纯);甲酸、乙酸和磷酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);超纯水(自制)。G型薄层层析硅胶板(规格:20 cm×10 cm,青岛海洋化工有限公司);HF<sub>254</sub>薄层层析硅胶板(规格:20 cm×10 cm,烟台德信生物科技有限公司)。

## 2 仪器

Agilent Technologies 1100 series 高效液相色谱仪(配有四元泵、在线脱气机、手动进样器、DAD 检测器和 Chemstation 工作站,美国安捷伦科技有限公司);Agilent Technologies 1200 series 高效液相色谱仪(配有四元泵、在线脱气机、自动进样器、VWD 检

测器和 Chemstation 工作站,美国安捷伦科技有限公司);BS 124S 型和 BT 25S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);Master-DHV 型实验室超纯水机(上海和泰仪器有限公司);KM-1030B 型超声波清洗机(广州市科洁盟实验仪器有限公司);CH-300 型超声波清洗机(北京创新德超声电子研究所);ZF-20D 暗箱式紫外分析仪(巩义市予华仪器有限公司);H1650 高速台式离心机(长沙湘仪离心仪器有限公司);DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

## 3 胡芦巴药材和对照药材 70% 醇提浸膏的制备

将胡芦巴种子粉碎成细粉,过 20 目筛,称取 100 g 置于 2 L 烧杯中,加入 8 倍量 70% 乙醇(*w/v*),浸泡 30 min,于 50 ℃~55 ℃ 条件下搅拌提取 2 次,每次 4 h,合并提取液,过滤,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>×10 min),上清液 50 ℃~55 ℃ 减压浓缩。浓缩后的流浸膏置于 60 ℃ 烘箱中进行干燥,再转移到真空干燥箱干燥至恒重,即得胡芦巴药材 70% 醇提浸膏。

取胡芦巴对照药材粉末 1.0 g 置于 10 mL 试管中,加入 8 mL 70% 乙醇浸泡 30 min,于 50 ℃~55 ℃ 条件下搅拌提取 2 次,每次 4 h,合并提取液,过滤,离心,上清液置于 60 ℃ 烘箱中干燥,再转移到真空干燥箱干燥至恒重,即得胡芦巴对照药材 70% 醇提浸膏。

## 4 胡芦巴醇提物供试品溶液的配制

### 4.1 TLC 供试品溶液

精确称取 11 批胡芦巴药材和对照药材的 70% 醇提浸膏各 50.0 mg,各置于 1.5 mL 离心管中,分别加入 70% 乙醇溶液 1 mL,超声溶解 5 min,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>×10 min),取上清,即得 TLC 供试品溶液。

## 4.2 HPLC 供试品溶液

精确称取 11 批胡芦巴药材 70% 醇提浸膏和对照药材 70% 醇提浸膏各 25.0 mg, 各置于 5 mL 容量瓶中, 分别加入 70% 甲醇溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 0.45  $\mu\text{m}$  有机系微孔滤膜过滤, 即得 HPLC 供试品溶液。

## 5 对照品溶液的配制

### 5.1 TLC 对照品溶液

精确称取薯蓣皂苷对照品 1.08 mg 置于 2 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 即得 0.54  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  薯蓣皂苷对照品溶液。

精确称取胡芦巴碱对照品 1.00 mg 置于 2 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解, 定容至刻度, 摇匀, 即得 0.50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  胡芦巴碱对照品溶液。

### 5.2 HPLC 对照品溶液

精确称取对照品各适量, 分别置于 2 mL 容量瓶中, 各加入甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得 0.50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  胡芦巴碱、0.56  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  牡荆素、0.70  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  荭草苷、0.61  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  异荭草苷、0.94  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  原薯蓣皂苷、0.55  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  异牡荆素、0.51  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-木糖苷、0.54  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  薯蓣皂苷、0.52  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  芹菜素-6-C-木糖-8-C-葡萄糖苷、0.34  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  HLB-36、0.40  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  HLB-25、0.15  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  HLB-9、0.30  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  HLB-8b 和 0.40  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  HLB-P10 对照品溶液。

精密移取上述胡芦巴碱、牡荆素、荭草苷、异荭草苷、原薯蓣皂苷、异牡荆素、芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-木糖苷、薯蓣皂苷、芹菜素-6-C-木糖-8-C-葡萄糖苷对照品溶液各 30  $\mu\text{L}$ , 以及 HLB-36, HLB-25, HLB-9, HLB-8b, HLB-P10 对照品溶液各 65  $\mu\text{L}$ , 置于同一 1.5 mL 离心管内, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

## 6 胡芦巴醇提物 TLC 特征图谱的建立

### 6.1 方法 1

移取 11 批胡芦巴药材醇提浸膏供试品溶液 (分别标为 S1 ~ S11) 和对照药材醇提浸膏供试品溶液 (标为 S 对) 各 2  $\mu\text{L}$  以及薯蓣皂苷对照品溶液 2  $\mu\text{L}$  和胡芦巴碱对照品溶液 1  $\mu\text{L}$ , 点样于 HF<sub>254</sub> 薄层层析硅胶板 (20 cm  $\times$  10 cm)。同样采用正丁醇-乙醇-水 (2:6:2) 为展开剂进行展开, 取出, 晾干, 分别在日光、紫外波长 254 和 365 nm 下检视色谱斑点, 然后喷 10% 硫酸-乙醇溶液, 105  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中加热 5 min, 至斑点显色清晰, 在日光、紫外波长 254 和 365 nm 下检视色谱斑点, 测定斑点的比移值 (Rf)。

## 6.2 方法 2

移取方法 1 的所有样品溶液, 分别点样于 G 薄层层析硅胶板 (20 cm  $\times$  10 cm)。采用正丁醇-乙醇-水 (2:6:2) 为展开剂进行展开, 取出, 晾干, 然后再放入稀碘化铯钾-三氯化铁试液中浸润显色后, 在日光下检视色谱的斑点, 测定斑点的 Rf 值。

## 7 胡芦巴醇提物 HPLC 特征图谱的建立

### 7.1 色谱条件

色谱柱: Supersil ODS-B 柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 0.1% 磷酸水溶液 (A)-乙腈 (B); 检测波长: 203 nm; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速: 0.7  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 梯度洗脱程序: 0 ~ 50 min, 9% ~ 18% B; 50 ~ 90 min, 18% ~ 25% B; 90 ~ 105 min, 25% ~ 35% B; 105 ~ 120 min, 35% ~ 70% B; 120 ~ 130 min, 70% ~ 100% B; 130 ~ 140 min, 100% B。

### 7.2 方法学考察

**7.2.1 专属性实验** 移取 8 号胡芦巴醇提物供试品溶液 (S8)、混合对照品溶液和阴性对照溶液 (流动相) 各 20  $\mu\text{L}$ , 按“7.1”项下色谱条件注入液相色谱仪, 检视色谱峰的专属性。

**7.2.2 精密度实验** 移取 S8 胡芦巴醇提物供试品溶液, 按“7.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 注入液相色谱仪, 记录色谱图、各色谱峰保留时间和峰面积, 以出峰时间靠近中间、峰面积较大为选取标准, 确定 12 号峰 (牡荆素) 为参照峰 (S), 计算 RSD 值。

**7.2.3 重复性实验** 平行称取 S8 胡芦巴醇提物浸膏 6 份, 按“4.2”方法配制 6 份供试品溶液, 分别按“7.1”项下色谱条件注入液相色谱仪, 以 12 号峰 (牡荆素) 为参照峰 (S), 记录色谱图、各色谱峰保留时间和峰面积, 计算 RSD 值。

**7.2.4 稳定性实验** 称取 8 号胡芦巴醇提物浸膏 1 份, 按“4.2”方法配制供试品溶液, 按“7.1”项下色谱条件, 分别于配制后第 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 和 72 h 注入液相色谱仪, 以 12 号峰 (牡荆素) 为参照峰 (S) 进行测定, 记录色谱图、各色谱峰保留时间和峰面积, 计算 RSD 值。

### 7.3 色谱峰的指认

分别移取 11 批胡芦巴药材和对照品药材醇提浸膏供试品溶液、14 个对照品溶液 (胡芦巴碱、牡荆素、荭草苷、异荭草苷、原薯蓣皂苷、异牡荆素、芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-木糖苷、薯蓣皂苷、芹菜素-6-C-木糖-8-C-葡萄糖苷、HLB-36、HLB-25、HLB-9、HLB-8b 和 HLB-P10) 以及混合对照品溶液注入液相色谱

仪。通过比对胡芦巴醇提取物供试品色谱峰的保留时间及对应的紫外吸收光谱与对照品的一致性,指认供试品中所含的化学成分。

#### 7.4 特征图谱相似性评价

分别移取 11 批胡芦巴药材和对照药材的醇提取物供试品溶液,按照“7.1”项下色谱条件注入液相色谱仪,记录色谱图。将所得数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》软件中,以 S1 为参照,对色谱峰进行多点校正,全谱峰匹配,以平均数法建立对照特征图谱 R,并进行相关分析。

#### 7.5 系统聚类分析(CA)

采用 SPSS 22.0 软件,以 11 批胡芦巴药材及对照药材醇提取物的 HPLC 特征图谱中 29 个共有峰的峰面积为变量,采用组间联接的聚类方法,以平方欧式距离为样品间距离进行聚类分析。

#### 7.6 主成分分析(PCA)

采用 SPSS 22.0 软件对共有峰峰面积进行标准化处理后,对 11 批胡芦巴药材及对照药材醇提取物特征图谱的 29 个共有峰进行 PCA 分析。

## 结 果

### 1 胡芦巴 70% 醇提取物 TLC 特征图谱

11 批胡芦巴药材及其对照药材 70% 醇提取物、薯蓣皂苷和胡芦巴碱对照品按照“6.1”和“6.2”项下的 TLC 展开条件和显色方法,结果见图 1 和图 2。

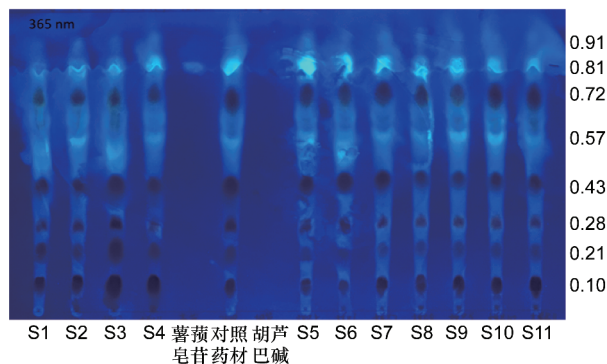
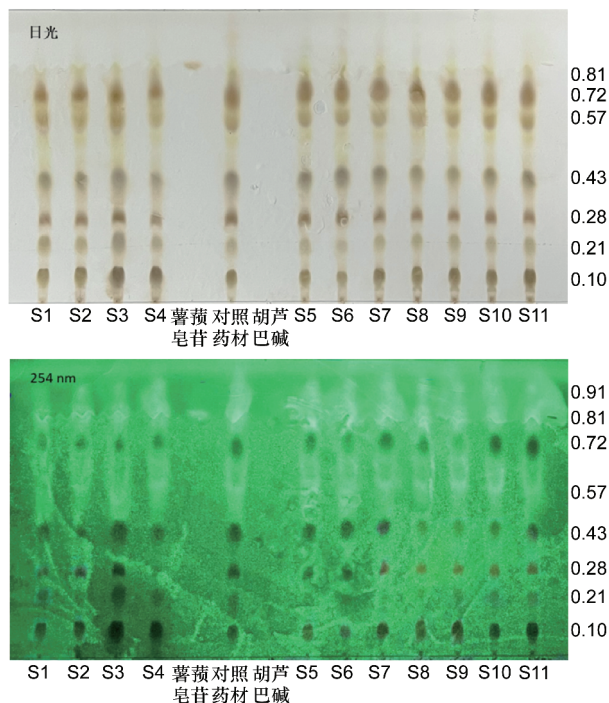


图 1 11 批胡芦巴药材及对照药材 70% 醇提取膏的 TLC 特征图谱(方法 1)

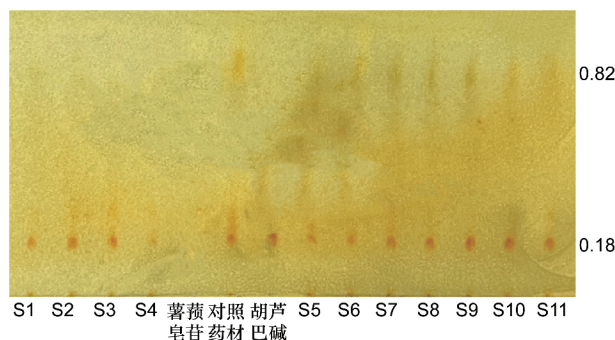


图 2 11 批胡芦巴药材及对照药材 70% 醇提取膏的 TLC 特征图谱(方法 2)

采用方法 1 进行展开,图谱显示:① 日光检视有 7 个明显斑点, Rf 值分别为 0.10, 0.21, 0.28, 0.43, 0.57, 0.72 和 0.81, 而且 11 批胡芦巴药材及对照药材的斑点基本一致,无明显差异。② 254 和 365 nm 波长下检出 8 个斑点,其中有 3 个淡蓝色荧光斑点(Rf 值分别为 0.57, 0.81 和 0.91)。11 批胡芦巴药材及对照药材的斑点也基本一致。但在 Rf=0.28 处,盐胡芦巴(S1~S4)的斑点颜色有一定加深,提示炮制可能有利于该成分的增加。薯蓣皂苷在 254 和 365 nm 波长下均显示斑点(Rf=0.81),而胡芦巴碱无法检出。

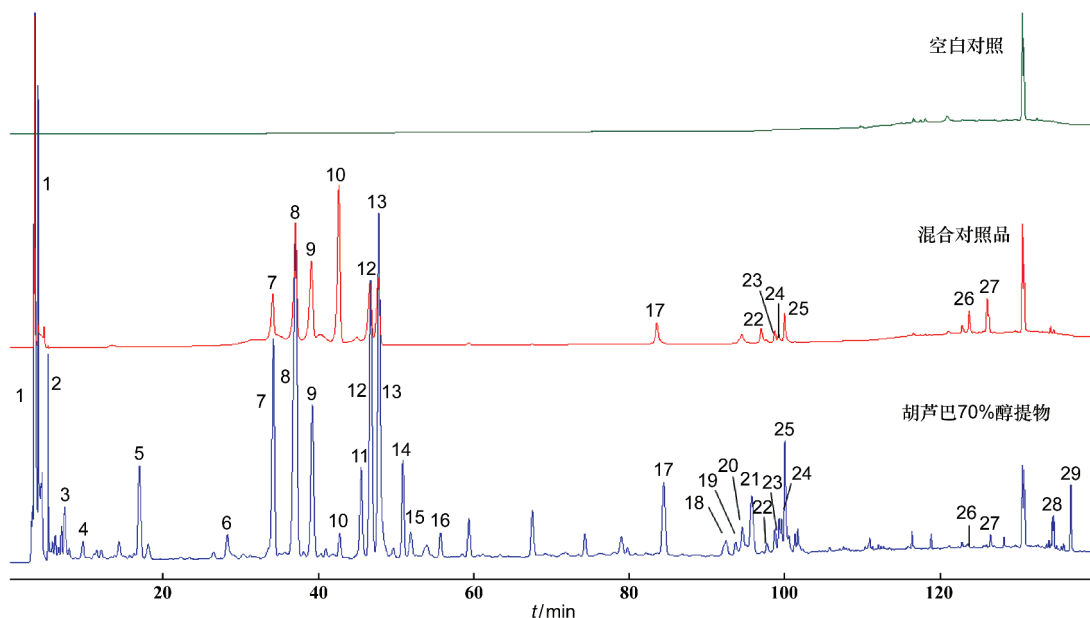
方法 2 检视胡芦巴碱成分,从图 2 可以看出 TLC 图谱中 11 种胡芦巴药材及对照药材醇提取物均含有胡芦巴碱(色谱斑点 Rf=0.18),其中 S4 样品斑点较浅,提示 S4 样品中胡芦巴碱含量较少。从图 2 也只看到胡芦巴生品醇提取物在 Rf=0.82 处均有明显斑点,而盐炒胡芦巴样品(S1~S4)则斑点不明显,提示炮制可能引起该化学成分的变化。

## 2 胡芦巴 70% 醇提取物 HPLC 的特征图谱

### 2.1 色谱峰的专属性

将空白对照液、混合对照品溶液和胡芦巴 70% 醇提取物 S8 供试品溶液分别按“7.1”项下色谱条件

进样,其特征图谱专属性确认结果见图 3。结果显示对照品溶液色谱中 14 个特征峰和 S8 图谱中 29 个特征峰的保留时间在空白对照溶液色谱图中均无显示,提示专属性良好。



1: 胡芦巴碱; 7: 芹菜素-6-C-木糖-8-C-葡萄糖苷; 8: 异荭草苷; 9: 荭草苷; 10: 芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-木糖苷; 12: 牡荆素; 13: 异牡荆素; 17: HLB-36; 22: HLB-25; 23: HLB-9; 24: HLB-8b; 25: 原薯蓣皂苷; 26: 薯蓣皂苷; 27: HLB-P10

图 3 胡芦巴 70% 醇提取物供试品特征图谱的专属性色谱图

### 2.2 方法学考察

**2.2.1 精密度** 胡芦巴 70% 醇提取物 S8 供试品溶液,按“7.1”项下色谱条件连续进样 6 次,以 12 号峰(牡荆素)为参照峰(S),其相对保留时间 RSD < 0.5%,相对峰面积 < 5%,表明仪器精密度良好。

**2.2.2 重复性** 平行配制 6 份胡芦巴 70% 醇提取物 S8 供试品溶液,按“7.1”项下色谱条件进样,以 12 号峰(牡荆素)为参照峰(S),其相对保留时间 RSD < 0.5%,相对峰面积 < 5%,表明该方法重复性良好。

**2.2.3 稳定性实验** 胡芦巴 70% 醇提取物 S8 号供试品溶液分别于配制后第 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60 和 72 h 按“7.1”项下色谱条件进样,以 12 号峰(牡荆素)为参照峰(S)进行测定,其相对保留时间 RSD < 0.5%,相对峰面积 < 5%,表明供试品溶液在 72 h 内稳定性良好。

### 2.3 色谱峰的指认

将 14 个单一对照品(胡芦巴碱、芹菜素-6-C-木糖-8-C-葡萄糖苷、异荭草苷、荭草苷、芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-木糖苷、牡荆素、异牡荆素、HLB-36、HLB-25、HLB-9、HLB-8b、原薯蓣皂苷、薯蓣皂苷和 HLB-

P10) 及其混合对照品溶液按“7.1”项下色谱条件分别进样,通过比对其相对保留时间和紫外光谱图,确认混合对照品色谱图中 14 个色谱峰分别所对应的对照品成分。

将混合对照品溶液与 S8 供试品溶液分别进样,通过比对混合对照品色谱图中 14 个对照品与 S8 供试品溶液色谱图所对应色谱峰的保留时间(见图 3)及其紫外光谱,确认了 S8 供试品溶液中含有 1 种生物碱成分(1 号峰:胡芦巴碱)、6 种黄酮苷成分(7 号峰芹菜素-6-C-木糖-8-C-葡萄糖苷、8 号峰异荭草苷、9 号峰荭草苷、10 号峰芹菜素-6-C-葡萄糖-8-C-木糖苷、12 号峰牡荆素、13 号峰异牡荆素)和 7 种皂苷成分(其中 5 种呋甾皂苷和 2 种螺甾皂苷成分,17 号峰 HLB-36、22 号峰 HLB-25、23 号峰 HLB-9、24 号峰 HLB-8b、25 号峰原薯蓣皂苷、26 号峰薯蓣皂苷、27 号峰 HLB-P10)。

### 2.4 相似度评价

采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》,时间窗宽度设为 0.3 min,进行多点校正,全谱峰匹配,以平均数法生

成对照图谱,计算相似度,结果见图 4 和表 2。结果表明 11 批胡芦巴药材及对照药材 70% 醇提物的特征图谱与所生成的对照图谱其相似度均在 0.9 以

上,表明这 11 批胡芦巴药材的化学成分相似度较高,相似度平均值为 0.968。

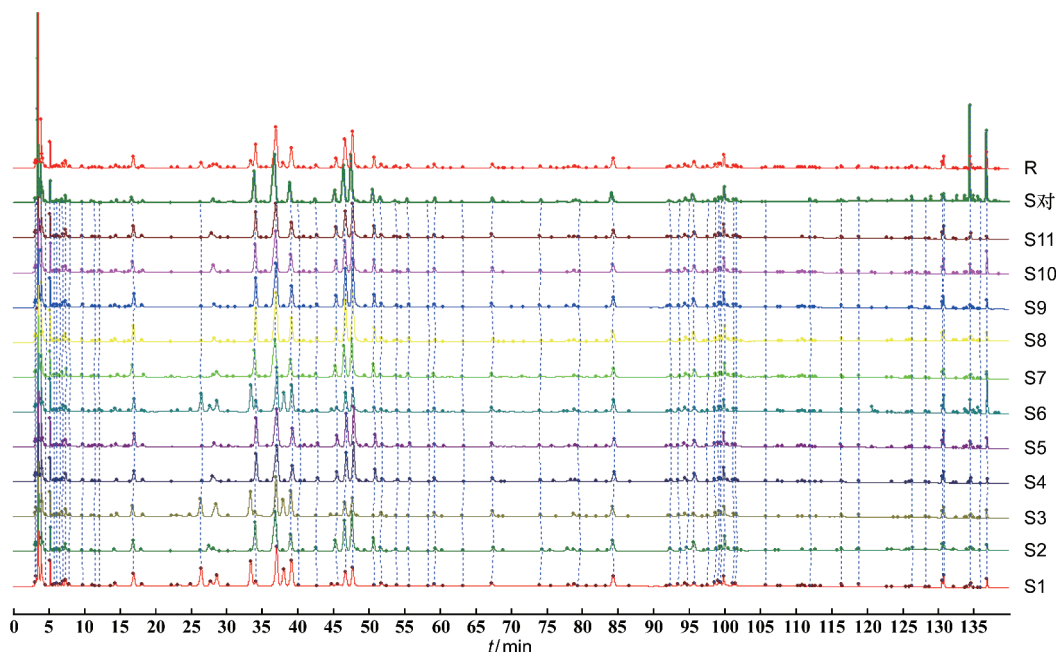


图 4 11 批胡芦巴及对照药材 70% 醇提物的 HPLC 特征图谱和对照图谱

表 2 11 批胡芦巴及其对照药材 70% 醇提物特征图谱的相似度

编号	产地	相似度	相似度平均值	RSD/%
S1	安徽	0.915	0.968	3.42
S2	河南	0.985		
S3	安徽	0.902		
S4	河南	0.986		
S5	安徽	0.992		
S6	河南	0.938		
S7	山东	0.992		
S8	安徽	0.993		
S9	安徽	0.992		
S10	江苏	0.992		
S11	安徽	0.988		
S 对	—	0.939		

微产 S1 和 S3 与河南产 S6 聚为一类,安徽产 S5, S8, S9 和 S11 与河南产 S2 和 S4 聚为一类,山东产 S7 和江苏徐州产 S10 各为单独一类,胡芦巴对照药材也为单独一类。聚类结果表明相同产地的胡芦巴药材醇提物有较高的相似性,炮制品与生品醇提物也相似;安徽和河南产胡芦巴药材醇提物相似性良好,其他不同产地存在一定的差异性。

### 2.5 系统聚类分析

采用 SPSS 22.0 软件,以胡芦巴 70% 醇提物的 HPLC 特征图谱中 29 个共有峰的峰面积为变量,采用组间联接的聚类方法,以平方欧式距离为样品间距离进行聚类分析,结果见图 5。图中显示:①平方欧式距离为 25 时,11 批样品可聚为 2 类,即江苏徐州产的 S10 聚为一类,其余 10 批聚为一类。②平方欧式距离为 10 时,11 批样品可聚为 5 类,其中安

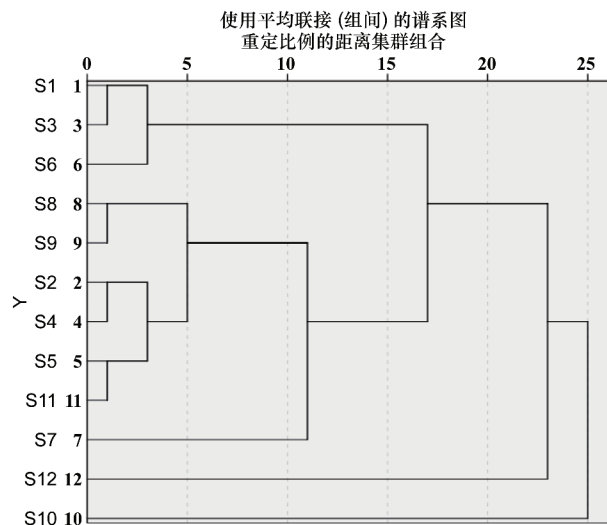


图 5 12 批不同产地胡芦巴聚类分析树状图

## 2.6 PCA 分析

以特征值 > 1 为提取标准, 提取出 5 种主成分, 其累计方差贡献率为 91.144%, 可代表胡芦巴指纹图谱共有峰的大部分信息, 结果见表 3。根据主成分矩阵计算出主成分得分, 将标准化后的原始数据带入主成分表达式计算 12 批胡芦巴样品的主成分得分 ( $Z_1, Z_2, Z_3, Z_4, Z_5$ ), 再根据各主成分的贡献率, 计算出综合得分, 其公式为  $Z = 0.42482 \times Z_1 + 0.17751 \times Z_2 + 0.16215 \times Z_3 + 0.10591 \times Z_4 + 0.04105 \times Z_5$ , 主成分得分和综合得分结果见表 4。进行排序后显示安徽产地胡芦巴药材综合得分较

高, 说明安徽省胡芦巴药材中主成分含量明显高于其他产地; 盐制后胡芦巴药材综合得分明显降低, 提示盐制后这些成分含量有所降低。

表 3 5 个主成分因子的特征值和累计方差贡献率

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	12.320	42.482	42.482
2	5.148	17.751	60.233
3	4.702	16.215	76.448
4	3.071	10.591	87.039
5	1.190	4.105	91.144

表 4 12 批胡芦巴的主成分因子得分、综合得分和排序

样品编号	名称	产地	$Z_1$	$Z_2$	$Z_3$	$Z_4$	$Z_5$	Z	排序
S8	胡芦巴	安徽	8.939	2.666	6.873	1.230	-0.193	5.508	1
S9	胡芦巴	安徽	4.786	0.609	4.134	-0.738	0.427	2.751	2
S10	胡芦巴	江苏	4.524	-0.002	-0.465	0.382	-0.262	1.876	3
S 对	胡芦巴	—	-1.449	2.826	4.465	6.715	0.001	1.321	4
S5	胡芦巴	安徽	1.801	-0.054	-1.411	-0.399	0.063	0.487	5
S6	胡芦巴	河南	1.417	-4.061	-0.468	1.817	0.260	0.008	6
S2	盐胡芦巴	河南	-4.389	0.922	5.338	-0.033	1.508	-0.777	7
S11	胡芦巴	安徽	-2.708	0.579	-3.250	-2.118	0.163	-1.792	8
S7	胡芦巴	山东	-3.593	0.795	-1.415	-2.015	-0.696	-1.857	9
S4	盐胡芦巴	河南	-3.368	-0.694	-2.501	-1.062	0.988	-2.032	10
S1	盐胡芦巴	安徽	-1.527	-2.051	-5.663	-1.695	-1.136	-2.157	11
S3	盐胡芦巴	安徽	-4.433	-1.533	-5.636	-2.084	-1.124	-3.336	12

## 讨 论

本文采用 HF<sub>254</sub> 薄层层析硅胶板和正丁醇-乙醇-水 (2:6:2) 展开剂, 再喷以 10% 硫酸-乙醇溶液, 在日光、紫外波长 254 和 365 nm 下检视, 建立了分离度好和多成分的 TLC 特征图谱, 但抗糖尿病活性成分胡芦巴碱采用此条件无法显示斑点。因此本文又选择 G 薄层层析硅胶板和胡芦巴碱专属的显色剂进行显色。该 2 种薄层方法互为补充, 可以更加全面地反映胡芦巴中含量较高的化学成分以及生品与炮制品醇提物的差异性。从本文建立的 TLC 特征图谱中显示含有 8 个明显斑点, 其中含有活性成分胡芦巴碱和薯蓣皂苷。11 批胡芦巴药材及对照药材的 70% 醇提物的图谱斑点基本相同, 具有良好的相似性。但也可以看出 S4 样品中胡芦巴碱含量偏少, 4 批炮制的胡芦巴药材 (S1 ~ S4) 缺少 Rf = 0.82 的主要成分, 但在 Rf = 0.28 处的斑点颜色加

深, 提示炮制有利于该成分溶出。

HPLC 特征图谱的建立过程中, 考察了不同流动相 (甲醇-水、乙腈-水)、不同酸 (甲酸、乙酸、磷酸)、不同磷酸浓度 (0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%)、不同极性色谱柱 (Supersil ODS 2, Supersil ODS-B, SinoChrom ODS-BP)、不同温度 (25 °C, 30 °C, 35 °C 和 40 °C)、不同检测波长 (203, 254, 280, 330 和 360 nm) 和不同流速 (0.4, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 和 1.2 mL·min<sup>-1</sup>) 分别对基线、色谱峰数目和分离度的影响, 最终确定最佳色谱条件为: Supersil ODS-B 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸溶液-乙腈和梯度洗脱程序, 检测波长 203 nm, 柱温 30 °C, 流速: 0.7 mL·min<sup>-1</sup>。在此条件下, 该提取物色谱峰信息最多, 分离度最好, 能够较好地体现胡芦巴 70% 醇提物中的化学成分信息。

本研究建立的胡芦巴 70% 醇提物 HPLC 特征图谱, 与已报道文献的指纹图谱相比, 色谱峰信息更

丰富,共标定了 29 个共有峰,指认其中 14 种化学成分,包括 1 种生物碱、6 种黄酮苷和 7 种皂苷成分。11 批胡芦巴药材及其对照药材的指纹图谱与所生成的对照图谱的相似度均在 0.9 以上。聚类分析结果也表明相同产地胡芦巴药材醇提物有较高的相似性,即使炮制后也相似。主成分分析结果提示安徽省胡芦巴药材成分含量高于其他产地,且药材盐制后含量有所降低。

综上所述,本文所建立的 TLC 和 HPLC 特征图谱可直观、快速、有效地鉴别胡芦巴 70% 乙醇提取物的化学成分特征,可以为胡芦巴药材、中间提取物以及未来新药制剂的质量控制与评价提供实验依据,其实验数据详实,方法较先进,具有一定的实际应用价值。

### [ 参 考 文 献 ]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020:253.

[2] SHARMA RD, RAGHURAM TC, RAO NS. Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes[J]. *Eur J Clin Nutr*, 1990, 44(4):301-306.

[3] 赵杰,李婧,王尉,等. 胡芦巴对 2 型糖尿病患者血糖和血脂的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(1):92-93.

[4] RAFRAF M, MALEKIYAN M, ASGHARI-JAFARABADI M, et al. Effect of fenugreek seeds on serum metabolic factors and adiponectin levels in type 2 diabetic patients[J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 2014, 84(3-4):196-205.

[5] ARPANA G, CHANDRAKALA G, SREENIVAS T, et al. Role of fenugreek in the prevention of type 2 diabetes mellitus in prediabetes[J]. *J Diabetes Metabolic Disorders*, 2015, 14:74-83.

[6] GUPTA A, GUPTA R, LAL B. Effect of Trigonella foenum-grae-

cum (fenugreek) seeds on glycaemic control and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: a double blind placebo controlled study[J]. *J Assoc Physicians India*, 2001, 49:1057-1061.

[7] VERMA N, USMAN K, PATEL N, et al. A multicenter clinical study to determine the efficacy of a novel Fenugreek seed (Trigonella foenum-graecum) extract (Fenuro™) in patients with type 2 diabetes[J]. *Food Nutr Res*, 2016, 60:1-8.

[8] JOSHI DV, PATIL RR, NAIK SR. Hydroalcohol extract of Trigonella foenum-graecum seed attenuates markers of inflammation and oxidative stress while improving exocrine function in diabetic rats[J]. *Pharm Biol*, 2015, 53(2):201-211.

[9] KANNAPPAN S, ANURADHA CV. Insulin sensitizing actions of Fenugreek seed polyphenols, quercetin & metformin in a rat model[J]. *Indian J Med Res*, 2009, 129(4):401-408.

[10] NAIDU PB, PONMURUGAN P, BEGUM MS, et al. Diosgenin reorganises hyperglycaemia and distorted tissue lipid profile in high-fat diet-streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *J Sci Food Agric*, 2015, 95(15):3177-3182.

[11] PETIT PR, SAUVAIRE YD, HILLAIRE-BUYS DM, et al. Steroid saponins from Fenugreek seeds; extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol[J]. *Steroids*, 1995, 60(10):674-680.

[12] SWAROOP A, BAGCHI M, KUMAR P, et al. Safety, efficacy and toxicological evaluation of a novel, patented anti-diabetic extract of Trigonella foenum-graecum seed extract (Fenuro)[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2014, 24(7):495-503.

[13] 陈世丰,袁磊. 咖啡及其成分胡芦巴碱对 2 型糖尿病大鼠的抗糖尿病作用[J]. *中国医学创新*, 2015, 12(17):1-3.

[14] 单俊杰,任晋玮,武春密,等. 胡芦巴黄酮苷及其降血糖活性的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2008, 43(19):1457-1460.

[15] 潘娟,赵陆华,陈林霖,等. 胡芦巴药材 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(5):335-337.

[16] 吴琴,郑传奎,李文兵,等. 不同产地胡芦巴标准汤剂制备及 UPLC 特征图谱研究[J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(1):75-81.

[17] 卢金清,杨小金,李雨玲,等. 胡芦巴提取物黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱研究[J]. *中国药房*, 2014, 25(3):265-267.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-11-28