

红花黄色素 HPLC 指纹图谱研究

张娟¹, 卿德刚², 倪慧^{2,*}, 付亚明²

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046 2. 新疆中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002)

摘要: 目的: 建立红花黄色素的 HPLC 指纹图谱分析法, 研究红花黄色素的质量。方法: 采用梯度洗脱的方法进行色谱分离, 对各色谱峰进行数据处理, 得出红花黄色素的指纹图谱。结果: 各批次的花红色素差异很小, 共有峰的重现性良好。结论: 采用 HPLC 方法作红花黄色素的指纹图谱, 可用于红花黄色素的质量评价。
关键词: 红花黄色素; HPLC; 指纹图谱

Study on HPLC Fingerprint Analysis of Safflor Yellow

ZHANG Juan¹, QING De-gang², NI Hui^{2,*}, FU Ya-ming²

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China; 2. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethical Materia Medica, Urumqi 830002, China)

Abstract: Objective: To establish chromatographic fingerprint of Safflor Yellow by HPLC in order to control its quality. Methods: The gradient elution mode was applied in chromatographic separation and data were analyzed to develop HPLC fingerprint analysis of Safflor Yellow. Results: Samples from different habitats are of high similarity, and the fingerprint is repeatable. Conclusion: The HPLC fingerprint can be used in quality assessment of Safflor Yellow.

Key words Safflor Yellow; HPLC; chromatographic fingerprint

中图分类号: TS264.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)01-0257-03

红花是药油两用作物, 性温、味辛, 能活血通经、祛瘀止痛。红花黄色素是从红花的花瓣中提取的天然食用色素, 具有良好的保健功能, 可抗凝、抗血栓形成、抗氧化、保护心肌并具有免疫抑制和脑保护等功能^[1]。红花黄色素是水溶性色素, 在 pH4~5 范围内光稳定性良好并有一定耐热性, 氧化剂、还原剂、盐、糖、金属离子(除铁外)对色素的色泽、色价无不良影响^[2]。食品工业中红花黄色素可广泛应用于高糖果汁(味)或果汁(味)型饮料, 碳酸饮料, 配置酒、糖果, 糕点上彩装、罐头、青梅、冰淇淋、冰棍、果冻、蜜饯等。

近年来, 指纹图谱技术被用于一些产品的质量的控制, 其优点在于可全面反映产品的化学成分及其相对比例, 有效表征产品质量。本实验采用高效液相色谱法, 建立了红花黄色素的指纹图谱, 并对其生产的十批样品进行了比较性的研究, 为红花黄色素的质量控制建立了有效的方法^[3]。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

LC-2010CHT 型高效液相色谱仪、UV-VIS 检测器、LCsolution 色谱工作站 日本岛津公司; Waters XTerra RP18(250mm×4.6mm, 5 μm) 色谱柱 美国 Waters 公司; KQ3200 型超声波清洗仪 昆山市超声仪器有限公司; Mettler AE163 电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司。

1.1.2 试剂

乙腈(色谱纯) 美国 Fisher 公司; 水(重蒸水); 磷酸(质量分数不低于 85%) 北京化工厂; 红花黄色素 新疆北庭红花色素厂; 羟基红花黄色素 A 中国药品生物制品检定所。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

流动相: A-乙腈和 B-0.5% 磷酸水, 梯度洗脱程序: 0~60min A(5%~25%)、B(95%~75%), 60~70min A(25%~5%)、B(75%~95%); 检测波长: 275nm; 流速: 1ml/min; 柱温: 25℃; 进样量: 10 μl。

收稿日期: 2006-11-10

作者简介: 张娟(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品工程。E-mail: ezhanguane76@sina.com

* 通讯作者: 倪慧(1964-), 女, 研究员, 硕士, 主要从事药物制剂与保健品研发。E-mail: xjnihui@163.net

1.2.2 对照品的选择和溶液的制备

1.2.2.1 对照品的选择

红花主要含黄酮类成分, 包括黄酮及其苷类、查耳酮及其苷类, 药理活性研究表明, 羟基红花黄色素 A 为其主要成分之一, 并且在红花中的含量也较高^[4], 本实验所用的红花黄色素中羟基红花黄色素 A 也有较高的含量。

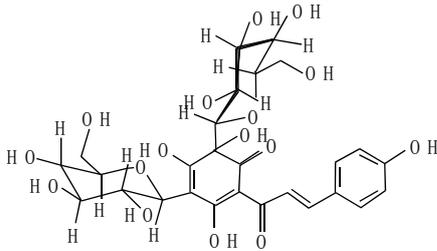


图1 羟基红花黄色素 A 结构式

Fig.1 Structural formula of hydroxy Safflor Yellow A

1.2.2.2 对照品溶液的制备

精密称取羟基红花黄色素 A 对照品适量, 加水制成 0.2mg/L 的对照品溶液。

1.2.3 样品溶液的制备

精密称取 20mg 红花黄色素, 置于烧杯中用 10ml 重蒸水超声溶解; 粗滤, 取续滤液 5ml 左右, 吸入注射器, 用孔径为 0.45 μm 的微孔滤头过滤, 装入进样瓶, 作为供试品溶液。

1.2.4 测定方法

高效液相仪自动吸取 10 μl 供试品溶液进样、分析, 记录 70min 的色谱图。

2 结果与分析

2.1 主要色谱峰的鉴定

在“1.2.1”项色谱条件下测定羟基红花黄色素 A 对照品, 并与红花、红花黄色素指纹图谱中相应色谱峰进行比较(见图 2), 发现红花、红花黄色素及羟基红花黄色素 A 在相同保留时间下具有共有峰, 说明从原红花中提取的红花黄色素主要成分为羟基红花黄色素 A, 以羟基红花黄色素 A 作为对照品是可行的。

2.2 红花黄色素的 HPLC 指纹图谱的特征峰

通过峰面积的计算, 特征峰峰面积占总峰面积的 96.24%。

根据对 10 批样品的指纹图谱的检测结果, 总结出供试品中指纹图谱的典型色谱峰共 17 个, 其中 9 号色谱峰为羟基红花黄色素 A 的色谱峰。部分共有峰的峰形为: 1、2 号峰未完全分开, 且 2 号有时表现为细而窄的尖峰; 3、4 号峰形较好, 但 3 号峰底部有肩峰; 9

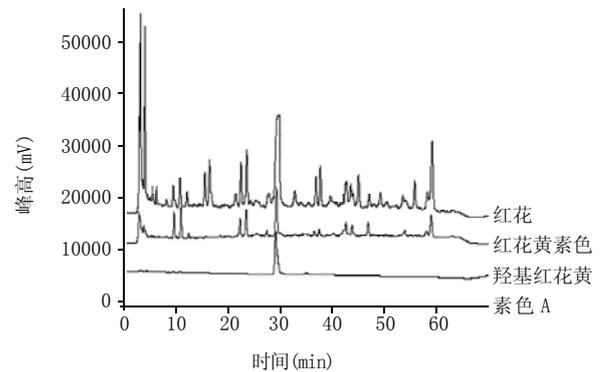


图2 红花、红花黄色素、羟基红花黄色素 A 的 HPLC 色谱图
Fig.2 HPLC chromatogram of Safflor, Safflor Yellow and hydroxy Safflor Yellow A

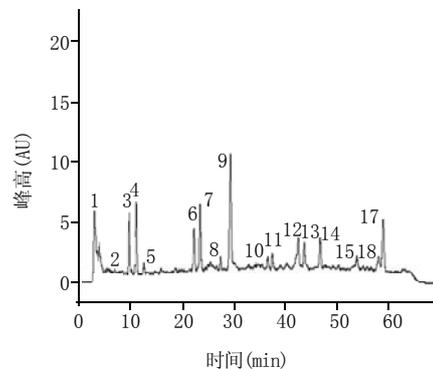


图3 各特征峰的峰形及峰位

Fig.3 Peak shape and peak position of various characteristics peaks

表1 各峰保留时间、相对于 9 号色谱峰的相对保留时间和峰面积
Table 1 Retention time, relative retention time opposite in chromatographic peaks 9 and peak area of various peaks

峰号	保留时间(min)	相对保留时间(min)	峰面积
1	2.840	0.0976	196598
2	3.646	0.1253	61190
3	9.330	0.3207	64960
4	10.688	0.3674	86466
5	12.272	0.4219	13452
6	22.041	0.7577	64305
7	23.197	0.7975	97707
8	27.174	0.9342	17349
9	29.086	1.0000	203360
10	36.480	1.2542	16598
11	37.364	1.2846	19859
12	42.363	1.4564	41775
13	43.568	1.4979	28860
14	46.669	1.6045	46056
15	53.792	1.8494	21270
16	57.987	1.9936	29763
17	58.896	2.0248	95444

号为最高峰, 是羟基红花黄色素 A 的色谱峰; 12 号峰由两小峰组成, 前峰低于后峰, 有时表现为肩峰; 16、17 号峰分离效果不太好, 尚未完全分开^[5-6]。

表2 各共有峰的保留时间、相对保留时间和相对峰面积
Table 2 Retention time, relative retention time and relative peak area of total peaks

峰号	相对峰面积					RSD (%)	相对保留时间(min)					RSD (%)
1	0.973	0.974	0.968	1.011	0.957	2.1	0.097	0.098	0.098	0.098	0.098	0.2904
2	0.391	0.379	0.402	0.388	0.398	2.3	0.126	0.125	0.125	0.125	0.125	0.2224
3	0.319	0.324	0.329	0.319	0.326	1.3	0.32	0.318	0.319	0.318	0.321	0.3843
4	0.456	0.453	0.457	0.456	0.452	0.5	0.367	0.365	0.366	0.365	0.367	0.2872
5	0.068	0.065	0.065	0.067	0.067	2.1	0.421	0.422	0.423	0.42	0.424	0.3816
6	0.336	0.325	0.317	0.338	0.319	3	0.758	0.757	0.757	0.757	0.757	0.0327
7	0.451	0.45	0.445	0.453	0.442	1.1	0.798	0.797	0.797	0.797	0.797	0.0436
8	0.092	0.09	0.086	0.089	0.087	2.7	0.934	0.934	0.934	0.934	0.934	0.0139
9	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
10	0.076	0.073	0.074	0.075	0.07	3	1.253	1.255	1.255	1.254	1.254	0.0489
11	0.1	0.098	0.099	0.102	0.098	1.9	1.284	1.285	1.285	1.285	1.284	0.0378
12	0.234	0.238	0.235	0.234	0.246	2.1	1.443	1.457	1.456	1.445	1.457	0.4935
13	0.152	0.157	0.156	0.156	0.15	2	1.497	1.499	1.499	1.498	1.498	0.0524
14	0.226	0.214	0.215	0.219	0.215	2	1.603	1.606	1.606	1.605	1.605	0.067
15	0.074	0.071	0.075	0.075	0.071	2.9	1.847	1.851	1.852	1.849	1.851	0.1091
16	0.119	0.113	0.115	0.114	0.112	2.6	1.993	1.996	1.996	1.994	1.996	0.0824
17	0.485	0.472	0.469	0.483	0.468	1.7	2.023	2.027	2.027	2.024	2.027	0.0883

2.3 供试品稳定性实验

取同一样品，按供试品溶液的制备方法制备，在0、8、16和24h不同时间内测定峰面积。结果表明样品溶液在24h内很不稳定，峰面积测定的相对标准偏差(RSD)为10.68%。可能是因为红花黄色素在水溶液中易发生变构，产生异构体。而且羟基红花黄色素A的水溶液稳定性也比较差。

2.4 精密度实验

取同一样品，按供试品溶液的制备方法制备，连续进样五次，测定峰面积，结果表明峰面积的RSD为1.96%，表明仪器精密度良好。

2.5 重现性实验

取北庭红花黄色素样品5份，按供试品溶液的制备方法制备，连续进样记录各个样品的色谱峰，对各共有峰的保留时间、相对保留时间和相对峰面积进行比较如图4所示。由图4相对保留时间和相对峰面积的RSD(相对标准偏差)可以看出重现性良好。

3 讨论

3.1 从以上10批的红花黄色素分析结果来看，其产品质量稳定。只是其水溶液的稳定性较差，24h内稳定性的RSD=10.68%，但是其8h内的稳定性却比较好，所以对生产和使用红花黄色素产品有一定的指导作用。

3.2 指纹图谱能更好地控制产品的内在质量，为提高产品的质量稳定性提供方法学依据。本实验采用HPLC色谱图法，建立了红花黄色素的指纹图谱和其分析方

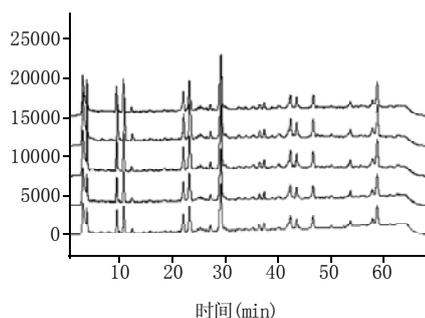


图4 重现性色谱峰图
Fig.4 Repeatable chromatograms

法，结果表明：方法稳定、可靠、重现性好。

参考文献：

- 黄镜娟. 红花的研究进展[J]. 淮海医药, 2006, 24(2): 3-4.
- 许钢. 天然红花黄色素稳定性研究[J]. 食品工业科技, 2000, 21(1): 16-18.
- 彭燕, 苗爱东, 王本富, 等. 红花注射液HPLC指纹图谱分析方法研究[J]. 西北药学杂志, 2003, 18(6): 249-251.
- 周晓蕊, 张立新, 张良, 等. 红花的HPLC指纹图谱分析方法研究[J]. 中成药, 2002, 24(5): 325-327.
- 赵明波, 邓秀兰, 王亚玲, 等. 红花RP-HPLC 指纹图谱的建立及其质量研究[J]. 药学学报, 2004, 39(3): 212-216.
- 赵明波, 邓秀兰, 王亚玲, 等. 高效液相色谱法测定红花中的羟基红花黄色素A[J]. 色谱, 2003, 21(6): 593-595.