

## 百蕊草药材的指纹图谱研究

汤超<sup>1</sup>, 许伏新<sup>2\*</sup>, 徐国兵<sup>3</sup>, 韩玲玲<sup>3</sup>, 方成武<sup>4</sup>, 刘守金<sup>4</sup>, 梁益敏<sup>4</sup>

(1. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032; 2. 安徽省食品药品监督管理局, 安徽 合肥 230023; 3. 安徽省食品药品检验所, 安徽 合肥 230051; 4. 安徽中医学院, 安徽 合肥 230038)

**摘要:**目的 采用高效液相色谱法建立来自14个不同产地的15批百蕊草样品的指纹图谱。方法 甲醇加热回流提取1h获得百蕊草提取液,采用HPLC分析百蕊草的指纹图谱。色谱柱 Inertsil OSD-SP(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 甲醇-0.4%磷酸水溶液梯度洗脱; 分析时间 75 min; 检测波长 365 nm; 柱温 30 °C; 体积流量 0.8 mL/min。结果 建立了百蕊草的指纹图谱, 5号山柰素峰为对照峰, 确定了8个共有峰。结论 该指纹图谱方法简单, 重现性好, 可作为百蕊草药材质量控制的重要方法。

**关键词:** 百蕊草; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2011)07-1102-04

## HPLC fingerprint of *Thesium chinese* Turcz.

TANG Chao<sup>1</sup>, XU Fu-xin<sup>2\*</sup>, XU Guo-bing<sup>3</sup>, HAN Ling-ling<sup>3</sup>, FANG Cheng-wu<sup>4</sup>, LIU Shou-jin<sup>4</sup>, LIANG Yi-min<sup>4</sup>

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Anhui Provincial Food and Drug Administration, Hefei 230023, China; 3. Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China; 4. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To establish chromatographic fingerprints of fifteen batches of *Thesium chinese* Turcz. from fourteen different habitats by HPLC. **METHODS** The extract of *Thesium chinese* Turcz. was obtained with methyl hydrate by thermal reflux for an hour. Analysis was performed on Inertsil OSD-SP column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with gradient mobile phase of methanol-0.4% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. The fingerprint finished in 75 min, the detection wavelength was at 365 nm and the column temperature was 30 °C with the flow rate of 0.8 mL/min. **RESULTS** Establishing the fingerprints of *Thesium chinese* Turcz., marker peak was kaempferide (No. 5 peak), eight common peaks were found in the HPLC fingerprints from different habitats. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, with good reproducibility, and it can be used specifically for the quality control of *Thesium Chinese* Turcz.

**KEY WORDS:** *Thesium chinese* Turcz.; fingerprint; HPLC

百蕊草 *Thesium chinese* Turcz. 为檀香科 Santalaceae 植物百蕊草的干燥全草,其性味平缓、微苦、涩、寒,具有清热解毒、消肿之功能。临床上多用于治疗急性乳腺炎、肺炎、扁桃体炎、咽喉炎、疖肿等病症<sup>[1-2]</sup>。现代药理研究表明:百蕊草具有显著的抗炎、解热、镇痛和抗菌作用,其所含的黄酮类化合物为其抗菌的有效成分<sup>[3-6]</sup>。目前对百蕊草药材的质

量控制方法主要是总黄酮的测定<sup>[7]</sup>,以及山柰素的薄层鉴别和测定<sup>[8-9]</sup>等,为更有效的控制其质量,本实验应用梯度洗脱法建立了百蕊草的 HPLC 指纹图谱的分析方法,对安徽省各主要百蕊草产地所产药材进行比较性的研究,并以百蕊草药材对照图谱与湖北省采集的百蕊草药材指纹图谱进行了对比研究。

收稿日期: 2010-08-31

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(06-07ZP25); 安徽省学术和技术带头人及后备人选科研活动经费资助项目(2009年)

作者简介: 汤超(1986—),男,硕士生。Tel: 13966766557, E-mail: tiankong611@yahoo.com.cn

\* 通信作者: 许伏新(1968—),男,硕士,从事药事管理研究。Tel: (0551) 2999221, E-mail: fuxin@ada.gov.cn

### 1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪( DAD 检测器, 岛津 LC solution 色谱工作站); 色谱柱为 Inertsil OSD-SP( 4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”( 版本 2004); Mettler AE-240 型电子天平( 万分之一, 瑞士 Mettler); 超声清洗机( 美国 Elmasonic)。

1.2 试剂 山柰素对照品( 批号: 110861-200808) 购自中国药品生物制品检定所; 甲醇( 色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水为自制重蒸水; 其它试剂均为分析纯。

1.3 百蕊草药材 各百蕊草药材样品具体来源见表 1, 经安徽中医学院刘守金教授鉴定为檀香科植物百蕊草 *Thesium chinese Turcz.*。

表 1 样品来源  
Tab. 1 Sources of sample

样品号	来源	采集日期	样品号	来源	采集日期
1	安徽省池州市贵池区棠溪乡	2007-06-25	9	安徽省淮南市舜耕山	2008-05-25
2	安徽省池州市青阳县陵阳镇	2007-06-25	10	安徽省和县娘娘庙乡山村	2008-06-09
3	安徽省合肥市紫蓬山	2008-05-02	11	安徽省滁州市明光市	2008-03-12
4	安徽省六安市舒城县舒茶镇	2008-05-03	12	安徽省滁州市明光市	2008-04-22
5	安徽省六安市霍邱县漫水口	2008-05-03	13	安徽省滁州市明光市	2008-05-06
6	安徽省安庆市潜山县( 海拔 500 米)	2008-05-11	14	湖北英山赵归乡( 一年生)	2008-06-17
7	安徽省安庆市潜山县( 海拔 700 米)	2008-05-11	15	湖北英山赵归乡( 两年生)	2008-06-17
8	安徽省淮南市舜耕山	2008-04-13			

### 2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 称取 0.5 g 的百蕊草药材粉末( 过 80 目筛) 精密称定, 精密加入甲醇 25 mL 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 15 mL, 置平底烧瓶中, 精密加入 50% 盐酸 5 mL, 摇匀, 置水浴中加热水解 30 min, 立即冷却, 转移至 25 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取山柰素对照 0.5 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 0.45 μL 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 色谱条件 色谱柱: Inertsil OSD-SP ( 4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇( A 相) -0.4% 磷酸水溶液( B 相) 梯度洗脱条件: B 0 ~ 40 min ( 80% ~ 60%); 40 ~ 70 min ( 60%); 70 ~ 75 min ( 60% ~ 80%); 体积流量: 0.8 mL/min, 柱温: 30 °C, 检测波长: 365 nm, 分析时间: 75 min, 进样量: 20 μL。

#### 2.4 方法学考察

2.4.1 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 5 次, 检测指纹图谱。各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%, 相对峰面积 RSD 均小于 5%。

2.4.2 重复性实验 取同一批样品 5 份, 按供试品溶液的制备方法制备, 连续进样进行分析。各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%, 相对峰面积 RSD 均小于 5%。

2.4.3 稳定性实验 取同一样品, 按供试品溶液的制备方法制备, 分别于 0、2、4、8、24 h 进样 5 次, 考察色谱峰相对峰面积的一致性。各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 2%, 相对峰面积 RSD 均小于 5%, 结果表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

#### 2.5 样品指纹图谱分析及结果

2.5.1 不同产地百蕊草药材指纹图谱的建立 取各百蕊草药材, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取 20 μL 注入液相色谱仪, 按 2.3 项下的色谱条件分别进样, 记录色谱图, 根据测定结果, 制定以山柰素为参照物的指纹图谱。对照品图谱见图 1, 百蕊草不同产地指纹图谱见图 2。

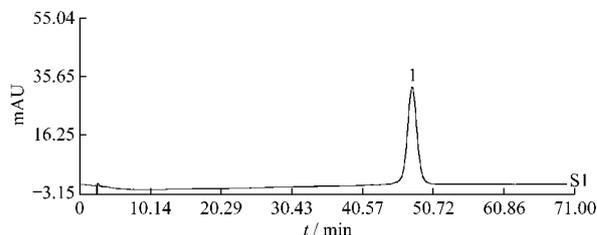


图 1 对照品溶液 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substances

1. 山柰素 1. kaempferide

2.5.2 百蕊草药材共有指纹峰的建立 通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”( 版本 2004) 软件对安徽的 13 批药材的色谱数据进行处理, 经过比对, 将时间窗宽度设为 0.5, 选择山柰素的色谱峰进行校正及自动匹配, 以中位数法生成百蕊草共有模式指纹图谱( 见图 3)。13 批样品有 8 个共有峰, 其

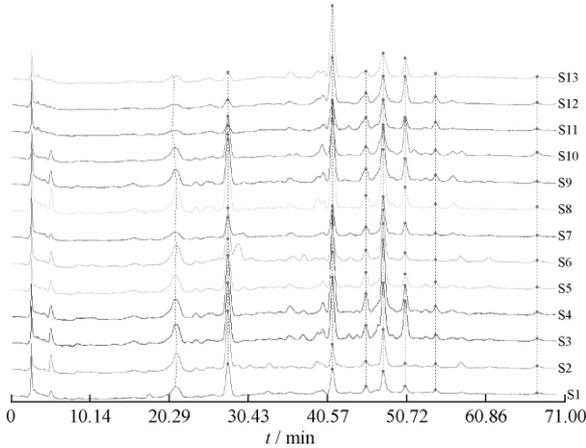


图2 百蕊草 HPLC 色谱图

Fig. 2 Fingerprint of *Thesinn Chinese Turcz.* from Anhui province

S1 ~ S13. 1 ~ 13 号安徽产百蕊草药材样品

中 5 号峰为山柰素。以 3 号色谱峰(保留时间为 41.209 min) 作为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,具体数据见表 2、表 3。各样品出峰总数占总峰面积百分比见表 4。

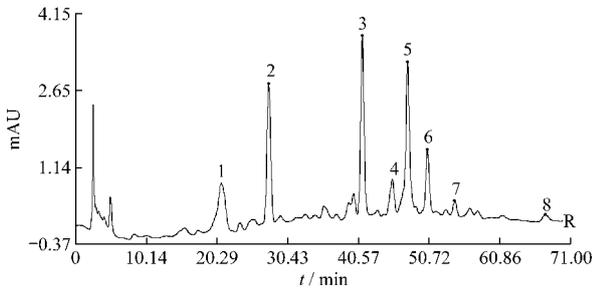


图3 共有模式图

Fig. 3 Common pattern

表 2 各样品共有峰相对保留时间  
Tab. 2 Relative retention time of common peaks for various samples

样品号	相对保留时间/min							
	1	2	3(s)	4	5	6	7	8
1	0.512	0.676	1.000	1.105	1.159	1.225	1.322	1.645
2	0.516	0.677	1.000	1.103	1.159	1.226	1.321	1.653
3	0.513	0.676	1.000	1.105	1.159	1.225	1.320	1.644
4	0.512	0.675	1.000	1.104	1.159	1.226	1.322	1.642
5	0.509	0.675	1.000	1.105	1.158	1.226	1.323	1.640
6	0.513	0.675	1.000	1.100	1.158	1.227	1.324	1.638
7	0.508	0.674	1.000	1.101	1.157	1.227	1.322	1.635
8	0.514	0.675	1.000	1.101	1.157	1.227	1.320	1.635
9	0.509	0.673	1.000	1.106	1.157	1.227	1.323	1.639
10	0.506	0.672	1.000	1.102	1.156	1.227	1.322	1.638
11	0.498	0.670	1.000	1.108	1.156	1.229	1.324	1.632
12	0.503	0.671	1.000	1.107	1.155	1.227	1.322	1.633
13	0.503	0.671	1.000	1.108	1.156	1.229	1.322	1.630

表 3 各样品共有峰相对峰面积

Tab. 3 Relative areas of common peaks for various samples

样品号	相对峰面积							
	1	2	3(s)	4	5	6	7	8
1	0.932	1.599	1.000	0.255	0.930	0.264	0.129	0.080
2	1.707	3.021	1.000	0.271	1.762	0.167	0.132	0.161
3	0.660	1.066	1.000	0.266	0.945	0.645	0.059	0.052
4	0.434	0.705	1.000	0.190	0.728	0.249	0.063	0.039
5	1.055	1.683	1.000	0.519	1.886	0.380	0.161	0.074
6	1.226	1.477	1.000	0.309	1.269	0.168	0.038	0.092
7	0.588	0.754	1.000	0.334	1.339	0.340	0.052	0.063
8	0.589	0.932	1.000	0.185	0.806	0.261	0.050	0.054
9	0.471	0.729	1.000	0.217	0.918	0.318	0.075	0.034
10	0.799	1.242	1.000	0.290	1.223	0.958	0.119	0.142
11	0.330	0.306	1.000	0.380	1.041	0.364	0.215	0.075
12	0.225	0.172	1.000	0.210	0.789	0.546	0.122	0.051
13	0.221	0.134	1.000	0.073	0.458	0.247	0.042	0.026

表 4 各样品共有峰面积

Tab. 4 Common peak area for various sample

样品号	总峰数	共有峰面积 占总峰面积/%	样品号	总峰数	共有峰面积 占总峰面积/%
2	19	80.07	9	15	87.83
3	22	77.92	10	18	83.76
4	15	88.20	11	17	84.71
5	18	86.67	12	14	90.93
6	18	76.45	13	15	87.65
7	15	88.43			

2.5.3 百蕊草药材相似度评价 通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(版本 2004)对安徽 13 批百蕊草药材的色谱数据进行处理,以共有峰为对照模板,计算各色谱图整体的相似度,具体数据见表 5。

2.5.4 对其它产地百蕊草药材进行的评价 在相似度计算软件中以百蕊草药材的共有模式图为参照图谱,导入湖北省采集的 1 年生和 2 年生药材各 1 批的指纹图谱,以对照品色谱峰进行校正,自动匹配后计算相似度,结果两批药材相似度分别为 0.974、0.914。

### 3 讨论

3.1 流动相及波长的选择 实验研究过程中,通过考察甲醇-水、甲醇-0.4% 磷酸水、乙腈-水、乙腈-0.4% 磷酸水溶液等多种流动相体系,通过比较,以甲醇-0.4% 磷酸水溶液系统洗脱可使色谱峰出峰较好,故选用该流动相系统。本实验前期阶段结合了 190~400 nm 波段的三维扫描图,对 HPLC-DAD 色谱图进行分析,选择指标成分山柰素和其它成分紫

表5  
Tab. 5

样品相似度  
Similarity of samples

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	R
S1	1.000	0.968	0.941	0.934	0.953	0.925	0.896	0.965	0.927	0.923	0.782	0.722	0.711	0.983
S2	0.968	1.000	0.880	0.847	0.937	0.922	0.840	0.905	0.851	0.868	0.677	0.588	0.560	0.949
S3	0.941	0.880	1.000	0.957	0.942	0.882	0.935	0.968	0.965	0.973	0.882	0.857	0.809	0.970
S4	0.934	0.847	0.957	1.000	0.926	0.874	0.959	0.986	0.993	0.931	0.922	0.902	0.903	0.953
S5	0.953	0.937	0.942	0.926	1.000	0.918	0.959	0.948	0.946	0.940	0.861	0.779	0.706	0.981
S6	0.925	0.922	0.882	0.874	0.918	1.000	0.886	0.910	0.879	0.864	0.762	0.692	0.681	0.926
S7	0.896	0.840	0.935	0.959	0.959	0.886	1.000	0.950	0.977	0.924	0.949	0.901	0.845	0.946
S8	0.965	0.905	0.968	0.986	0.948	0.910	0.950	1.000	0.986	0.941	0.880	0.848	0.846	0.976
S9	0.927	0.851	0.965	0.993	0.946	0.879	0.977	0.986	1.000	0.947	0.939	0.914	0.889	0.960
S10	0.923	0.868	0.973	0.931	0.940	0.864	0.924	0.941	0.947	1.000	0.865	0.851	0.767	0.964
S11	0.782	0.677	0.882	0.922	0.861	0.762	0.949	0.880	0.939	0.865	1.000	0.966	0.911	0.846
S12	0.722	0.588	0.857	0.902	0.779	0.692	0.901	0.848	0.914	0.851	0.966	1.000	0.953	0.797
S13	0.711	0.560	0.809	0.903	0.706	0.681	0.845	0.846	0.889	0.767	0.911	0.953	1.000	0.750
R	0.983	0.949	0.970	0.953	0.981	0.926	0.946	0.976	0.960	0.964	0.846	0.797	0.750	1.000

外吸收相对均较强的波长,结果在 365 nm 处山柰素的吸收较强,且色谱图各色谱峰信号较丰富,所以选定 365 nm 为检测波长。

3.2 样品提取条件的筛选 对百蕊草药材提取方法进行试验时,试验了不同提取溶剂<sup>[10]</sup>(95%乙醇、50%乙醇、30%乙醇、50%甲醇、甲醇),以及超声提取、回流提取、索氏提取等不同提取方式,同时还考察了不同提取时间的提取效果<sup>[11-12]</sup>。通过一系列的实验表明,用甲醇回流提取 1 h 提取液的成分最多,信息量最丰富,因此选用甲醇回流提取 1 h 的方法进行提取。

3.3 百蕊草指纹图谱的相似度分析 采用了 HPLC 法对百蕊草药材甲醇提取物进行分析,各样品 HPLC 指纹图谱虽存在一定差异,但均具有相同的色谱特征峰;除安徽滁州三批药材相似度评价结果小于 0.9 外,安徽其它产地 10 批样品相似度均大于 0.9,说明本研究所的百蕊草色谱指纹图谱共有模式具有较强的专属性。

应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(版本 2004)对滁州三批进行相似度评价,相似度分别为 0.959, 0.990, 0.972,说明滁州产百蕊草药材与安徽其它产地的百蕊草药材质量存在一定的差异。

在指纹图谱相似度大于 0.9 的药材色谱图上,各峰的归一化峰面积结果表明,不同产地百蕊草药材主要成分的质量分数仍然存在明显差异,建议在色谱指纹图谱相似度评价的基础上,结合质量标准

中的鉴别、检查、浸出物、主成分定量测定等项目,进行百蕊草药材的综合评价,以保证临床用药的安全有效。

参考文献:

- [1] 卫生部药典委员会. 中国药典:一部[S]. 北京:人民卫生出版社,1977:215-216.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:595-597.
- [3] 曹明成. 百蕊草提取工艺研究[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(1):57-58.
- [4] 刘永松,潘玲,祁克宗,等. 百蕊草有效提取成分对七种细菌的敏感性试验[J]. 贵州医药, 2006, 30(6):564-566.
- [5] 丁秀年,张三军,明亮. 百蕊草含片对小鼠的镇痛作用[J]. 淮海医药, 2001, 19(1):17-18.
- [6] 杨军,王静,高美华. 百蕊草片药理作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(6):367-369.
- [7] 徐雷鸣,汪素兰. 紫外分光光度法测定百蕊草总黄酮含量[J]. 基层中药杂志, 1995, 9(4):29-31.
- [8] 徐国兵,黄万著,王德群,等. 百蕊草药材中山柰酚和总黄酮的含量测定[J]. 中医药学报, 2008, 36(1):39-41.
- [9] 刘本俊,武承英. 百蕊草口服液制备工艺比较研究[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(8):688-689.
- [10] 钟方丽,王晓林,纪萍萍,等. 百蕊草中总黄酮的提取工艺研究[J]. 吉林化工学院学报, 2008, 25(4):5-7.
- [11] 冯年平,范广平,吴春兰,等. 微波萃取技术在中药提取中的应用[J]. 世界科学技术:中药现代化, 2002, 4(2):49-52.
- [12] 王平,刘川生,章银军,等. 微波辅助萃取姜黄素的研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(5):319-320.