

表2 13批款冬花药材相似度计算结果

Table 2 Results of similarity of 13 batches of Flos Farfarae samples

| 编号 | 产地        | 来源          | 相似度  | 编号 | 产地        | 来源          | 相似度  |
|----|-----------|-------------|------|----|-----------|-------------|------|
| 1  | 甘肃        | 购买于同仁堂药店    | 0.95 | 8  | 山西灵丘(野生2) | 采集于山西灵丘种植基地 | 0.95 |
| 2  | 河北蔚县      | 购买于荣华大药房    | 0.98 | 9  | 山西灵丘(种植1) | 采集于山西灵丘种植基地 | 0.98 |
| 3  | 河南        | 万民大药房       | 0.94 | 10 | 山西        | 购买于太原长城大药房  | 0.97 |
| 4  | 河南        | 山西华阳药业有限公司  | 0.98 | 11 | 山西        | 黄河药店        | 0.99 |
| 5  | 河南        | 购买于太原长城大药房  | 0.98 | 12 | 山西        | 万民大药房       | 0.97 |
| 6  | 河南        | 购买于太原万民大药房  | 0.96 | 13 | 山西灵丘(种植2) | 采集于山西灵丘种植基地 | 0.95 |
| 7  | 山西灵丘(野生1) | 采集于山西灵丘种植基地 | 0.97 |    |           |             |      |

2.2.6 PLS-DA 分析:对 13 批药材指纹数据经 PLS-DA 分析,所得结果见图 5。由图 5 可知,各产地药材分散较明显,其中 7 批山西产药材与 4 批河南产药材聚集较集中,甘肃产药材与河南产药材聚集在一起,说明这两个产地之间无明显差异,河北药材与其他几产地有差异。从整体上看,不同产地药材之间有一定的差异性。

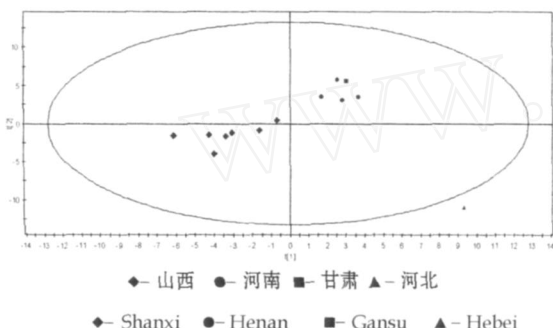


图5 13批药材 PLS-DA 分析结果

Fig. 5 PLS-DA Analysis of 13 batches of samples

### 3 结论与讨论

3.1 所建立的 HPLC 同时测定款冬花中槲皮素和山柰素方法简便、准确、重现性好,可用于款冬花药材中黄酮醇苷类成分的质量控制;通过对不同主产区不同品种款冬花药材指纹图谱研究,得到了对照指纹图谱,该图谱可代表款冬花的特性成分,作为款冬花药材鉴别依据。

3.2 13 批药材的指纹图谱用中药色谱指纹图谱相

似度评价软件分析,结果显示相似度均大于 0.8,说明各产地款冬花其所含化学成分无明显差异;而 PLS-DA 分析结果显示,不同产地分组较好,药材之间有一定的差别。

3.3 不同产地款冬花药材槲皮素和山柰素质量分数比较,本研究收集了 4 个主产区的款冬花药材,由表 1 的数据可知,山西所产的药材槲皮素和山柰素的量都最高,而甘肃所产的药材槲皮素和山柰素的量最低。

3.4 不同生长方式款冬花药材槲皮素和山柰素量的比较,本研究收集了山西灵丘种植和野生两种不同生长方式的药材,由表 1 可知,两种药材中槲皮素和山柰素的量无明显差异,所以生长方式不是款冬花中槲皮素和山柰素量的主要影响因素。

3.5 炮制与不炮制款冬花药材槲皮素和山柰素量比较,从甘肃蜜炙与生品所得结果可以看出,蜜炙品中槲皮素的量降低,只有生品的 70%,山柰素的量基本不变,可知蜜炙对款冬花药材槲皮素影响较大。

#### 参考文献:

- [1] 肖培根. 新编中药杂志 [M]. II. 北京:化学工业出版社, 2002.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2005.
- [3] 李 仲, 郭 玫, 余晓晖, 等. 用高效液相色谱法测定款冬花中芦丁的含量 [J]. 甘肃中医学院学报: 2000, 17(3): 20-21.
- [4] 喻 强, 叶玉兰, 秦伟瀚, 等. 不同产地款冬花总黄酮的测定 [J]. 重庆中草药研究, 2007, 1: 18-20.

## 太子参 HPLC 指纹图谱研究

易智彪<sup>1,2</sup>, 薄雯映<sup>1</sup>, 许冬瑾<sup>1</sup>, 赖小平<sup>2\*</sup>

(1. 康美药业股份有限公司, 广东 普宁 515300; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

**摘要:**目的 建立太子参 HPLC 指纹图谱共有模式,并进行方法学考察。方法 采用 HPLC 分析方法,色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub>柱;流动相:乙腈-水梯度洗脱;时间为 70 min。体积流量:1.0 mL/min;柱温:25 °C;检测波长:

\* 收稿日期:2008-11-15

作者简介:易智彪(1979—),男,博士后,研究方向为系统生物学及中药质量控制。Tel: (0663) 3883713 E-mail: zhibiao@163.com

203 nm;进样体积:10  $\mu$ L。结果 标示出 21 个共有峰,构成太子参指纹图谱。结论 该方法准确可靠,所得指纹图谱共有模式可作为太子参药材质量控制的依据。

关键词:太子参; HPLC; 指纹图谱

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)08-1308-03

太子参是《中国药典》收载的常用中药之一,系石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根<sup>[1]</sup>。其性平,味微苦、甘;归脾、肺经<sup>[2]</sup>。具有“益气健脾、生津润肺”之功效<sup>[3]</sup>。其中多糖是其活性成分之一<sup>[4]</sup>。临床常用于脾虚体倦、食欲不振、病后虚弱、气阴不足、自汗口渴、肝燥干咳等症状,民间常作为强壮滋补品<sup>[5]</sup>。现代药理研究认为,太子参有抗疲劳、抗应激、增强免疫、有延长寿命、镇咳及抗菌抗病毒等作用<sup>[6]</sup>。本实验通过采用高效液相色谱法研究不同产区太子参药材的指纹图谱,获得其共有模式,为太子参的质量控制提供依据。

## 1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪,包括二元泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱,DAD 检测器。北京塞多利斯天平有限公司 Sartorius BS 400S-WEI 万分之一天平;MJ-600 超声波发生器(江苏无锡市美洁超声清洗设备有限公司)。乙腈(美国 Fisher 公司,色谱纯),甲醇、正丁醇均为分析纯(广州化学试剂厂)、乙醇(天津大茂化学试剂厂,AR),超纯水。HPLC 所用试剂均经过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过。

太子参药材分别收集于浙江、福建等地,共 10 批。太子参对照药材购于中国药品生物制品检定所。样品来源见表 1。

表 1 太子参样品来源

Table 1 Origins of Radix Pseudostellaria

| 编号 | 样品来源       | 采集时间       | 编号  | 样品来源      | 采集时间       |
|----|------------|------------|-----|-----------|------------|
| s1 | 浙江缙云       | 2005-12-25 | s6  | 福建宁德柘荣县山乡 | 2005-06-30 |
| s2 | 浙江金华东阳     | 2005-06-25 | s7  | 安徽郎溪县     | 2005-11-16 |
| s3 | 浙江泰顺       | 2005-12-08 | s8  | 安徽宣城黄渡乡   | 2005-12-01 |
| s4 | 浙江苍南       | 2005-06-29 | s9  | 江苏溧阳      | 2005-11-30 |
| s5 | 福建柘荣县太子参市场 | 2005-06-29 | s10 | 贵州施秉县牛大山镇 | 2005-03-09 |

## 2 方法与结果

2.1 HPLC 条件:色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> 柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈(A)-水(B)梯度洗脱,0~10 min:A 25%;10~15 min:A 25%~40%;15~20 min:A 40%~80%;20~30 min:A 80%~85%;30~40 min:A 85%;40~60 min:A 85%~100%;60~70 min:A 100%。记录时间为 70 min。体积流量:1.0 mL/min;柱温:25  $^{\circ}$ C;检测波长:203 nm;进样体积:10  $\mu$ L。

2.2 供试品溶液的制备:称取太子参粉末 5 g(粗粉),加醋酸乙酯 30 mL,300 W 超声提取 40 min,放冷,滤过,滤渣加醋酸乙酯 30 mL 分次洗涤,合并滤液及洗液,60  $^{\circ}$ C 蒸至近干,加 0.3 g 聚酰胺(60~80 目)拌匀,加置 1 g 聚酰胺柱(1.5 cm  $\times$  20 cm)上,分别用 50 mL 水、50 mL 30%乙醇,50 mL 80%乙醇洗脱,收集 80%乙醇洗脱液,蒸干,甲醇溶解并定容于 2 mL 量瓶中。临用前过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜,作为供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验:取 S10 供试品溶液,连续进样 6 次,分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,各共有峰的相对保留时间 RSD 小于 0.5%;相对峰面积 RSD 小于 5.0%,符合指纹图谱分析要求。

2.3.2 稳定性试验:取 S10 供试品溶液,分别于 0、2、4、6 h 进样分析,考察共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.5%,相对峰面积 RSD 小于 5.0%,表明供试品溶液在 6 h 内基本稳定。

2.3.3 重现性试验:取 S10 供试品药材粉末 5 份,按已确定指纹图谱方法制备供试品溶液,分别对共有峰的相对保留时间和相对峰面积进行考察。结果表明,各共有峰相对保留时间 RSD 小于 0.5%,相对峰面积 RSD 小于 5.0%,符合指纹图谱分析要求。

2.4 指纹图谱建立及相似度分析:取不同产地的太子参药材,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,各取 20  $\mu$ L 分别进样,按 2.1 的色谱条件进行 HPLC 分析,建立指纹图谱。以峰 15 为内参比峰标示出太子参的 HPLC 指纹图谱中 20 个共有峰作为构成指纹图谱稳定的特征峰,同时将所得到的色谱图数据导入指纹图谱评价系统,进行色谱峰匹配,建立太子参指纹图谱共有模式,并计算相似度。

按上述色谱条件分别将 10 批供试品进样分析,记录色谱图(图 1)。在指纹图谱软件中,经过保留时间校正后建立共有模式,由匹配结果可知,有 35 个峰为 10 批样品共有,去除峰面积 < 50 的共有峰,以 20 个峰作为太子参药材的特征峰,其总峰面积占所有峰总峰面积的 92%~97%。将共有特征峰编为 1~20,相似度分析结果见表 2。各共有峰在不同

产地中丰度差异较大,其中峰 1 的峰面积占总峰面积 10%~20%,因此限制其峰面积的比值与指纹图谱峰面积的比值差值变化应在  $\pm 30\%$  以内,其余峰面积均小于 10%,其比值范围不作要求。经统计共有峰面积占总峰面积百分比为 92%~97%,非共有峰面积与总峰面积的百分比为 3%~8%。符合指纹图谱研究的非共有峰占总峰面积百分比  $< 10\%$  的技术要求。

将 10 批药材图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件,自动匹配后生成对照图谱,以此作为太子参药材的对照指纹图谱,进行相似度评价,其计算结果见表 2,生成的共有模式对照指纹图谱见图 2。10 批样品的相似度计算结果均大于 0.9,说明各产地的药材有较好的一致性。

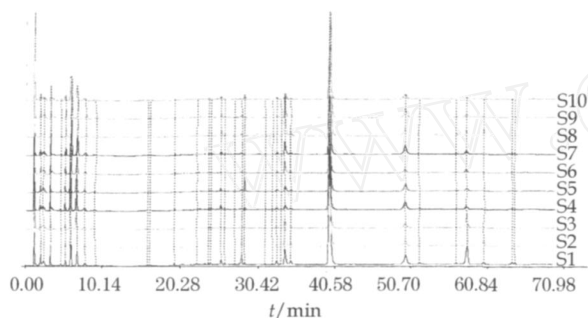


图 1 10 批太子参药材指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of ten batches of Radix Pseudostellaria

表 2 相似度分析结果

Table 2 Comparison of similarity in sample

| 样品号 | 相似度   | 样品号 | 相似度   |
|-----|-------|-----|-------|
| 1   | 0.992 | 6   | 0.978 |
| 2   | 0.992 | 7   | 0.990 |
| 3   | 0.974 | 8   | 0.967 |
| 4   | 0.989 | 9   | 0.992 |
| 5   | 0.981 | 10  | 0.984 |

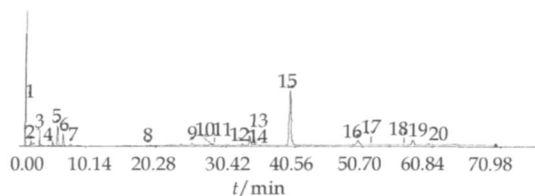


图 2 太子参共有模式

Fig. 2 Mutual mode of Radix Pseudostellaria in HPLC fingerprints

### 3 讨论

3.1 波长的选择:采用全波长对太子参样品进行测定,并采集其三维色谱图,通过综合考虑该三维色谱图在所有波长下出峰的多少,和各成分的分离情况以及各色谱峰的丰度,最后选定检测波长为 203 nm。

3.2 流动相的确定:选择了 3 种流动相系统及其

不同流动相比比例进行比较,包括甲醇-水、乙腈-水以及乙腈-0.1% 磷酸。结果表明,各种流动相中以乙腈-水系统为最佳,其图谱上各个色谱峰的分离度较好,保留时间适中,因此选此流动相系统作为太子参 HPLC 指纹图谱检测的流动相。

3.3 色谱柱的考察:选择了 3 种不同填料、规格及厂家的色谱柱进行比较,包括 Dikma Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Thermo ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 以及 Agilent Zorbax SB (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。结果表明,各种色谱柱中以 Dikma Kromasil C<sub>18</sub> 为最佳,所得色谱图峰数目较多,峰面积较大,分离度良好,因此选此色谱柱作为太子参 HPLC 指纹图谱检测的色谱柱。

3.4 提取溶剂的考察:选择了 4 种溶剂超声提取进行比较,包括甲醇、石油醚、醋酸乙酯以及正丁醇。结果表明,甲醇和正丁醇提取样品峰面积较小且杂质较多,而醋酸乙酯提取样品峰面积比石油醚提取样品大而且杂质少,因此选醋酸乙酯为提取溶剂。

3.5 与对照药材的比对:根据所得的共有模式,将太子参对照药材色谱图与共有模式进行相似度计算,以检查共有模式是否正确。经过同样的谱图处理后,计算了其共有模式的相似度。结果显示,两者之间的相似度为 0.990,说明该共有模式可用于太子参药材的检测。

### 4 结论

对不同产地太子参的 HPLC 指纹图谱进行比较分析,各产地太子参的 HPLC 图谱中均有此 20 个共有峰,各峰的相对保留时间比较一致,并且这 20 个峰占总峰面积的 90% 以上,故规定不同产地的太子参均应检出这 20 个共有峰。经中药色谱指纹图谱相似度评价软件处理结果表明,10 批太子参的相似度为 0.9 以上。同时,所获得的指纹图谱共有模式与太子参对照药材相似度为 0.990。因此,此方法所得指纹图谱可用于太子参药材的检测。

### 参考文献:

- [1] 胡海云,刘喜纯,胡海英.太子参多糖的研究进展[C].淄博:中华中医药学会炮制分会,2006.
- [2] 林光美.太子参研究进展[J].中国野生植物资源,2004,23(6):15-17.
- [3] 余永邦,秦民坚,余国奠.太子参化学成分、药理作用及质量评价研究进展[J].中国野生植物资源,2003,22(4):1-7.
- [4] 王西龙,王允,毕研平,等.太子参多糖提取工艺优选[J].现代医药卫生,2006,22(7):964-966.
- [5] 钟方晓,彭广芳,李贵海.山东太子参多糖含量对质量的影响[J].中草药,1997,28(7):428-430.
- [6] 刘训红,阚毓铭.太子参研究概述[J].时珍国医国药,2000,11(12):1131-1132.