

## 鹿茸草药材的 HPLC 指纹图谱

李雪玲<sup>1</sup>, 黄德浩<sup>2</sup>, 刘志刚<sup>1</sup>, 左婷<sup>1</sup>, 李沙沙<sup>1</sup>, 刘强<sup>1\*</sup>, 黄志刚<sup>2</sup>

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515; 2. 惠州市九惠制药股份有限公司, 广东 惠州 516007)

**[摘要]** 目的: 建立鹿茸草的 HPLC 指纹图谱, 为鹿茸草的质量控制提供依据。方法: 采用 HPLC-UV 分析鹿茸草的指纹图谱, 色谱条件为 Agilent HC C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)-0.4% 磷酸水 (B) 梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版) 对不同批次鹿茸草的 HPLC 图进行比较分析。结果: 建立了鹿茸草的 HPLC 指纹图谱, 以木犀草素为参照峰, 确立了鹿茸草指纹图谱中的 13 个共有峰。结论: 所建立的指纹图谱稳定性和重复性均好, 可用于鹿茸草药材的常规质量控制。

**[关键词]** 鹿茸草; 木犀草素; 高效液相色谱; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0082-04

**[doi]** 10.11653/syfy2014050082

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1417.016.html>

**[网络出版时间]** 2013-12-18 14:17

### HPLC Fingerprint of *Monochasma sheareri*

LI Xue-ling<sup>1</sup>, HUANG De-hao<sup>2</sup>, LIU Zhi-gang<sup>1</sup>, ZUO Ting<sup>1</sup>, LI Sha-sha<sup>1</sup>,  
LIU Qiang<sup>1\*</sup>, HUANG Zhi-gang<sup>2</sup>

(1. Department of Traditional Chinese Medicine of Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Jiuhui Pharmaceutical Co. LTD, Huizhou 516007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the chromatographic fingerprint for *Monochasma sheareri*. by RP-HPLC. **Method:** The HPLC fingerprint of *M. sheareri* were determined on an Agilent HC C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.4% phosphoric acid in gradient mode, flow rate 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, column temperature 35 °C and the detection wavelength was set at 254 nm. The chromatograms of different batches of *M. sheareri*. were compared by the software of Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM (Version 2004A). **Result:** HPLC Fingerprint of *M. sheareri*. was established with luteolin as the reference compound. 13 common peaks were selected as the fingerprint peaks of *M. sheareri*. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint of *M. sheareri*. has desirable precision, reproducibility, and can be applied to routine quality control of *M. sheareri*.

**[Key words]** *Monochasma sheareri*; luteolin; fingerprint; HPLC

鹿茸草为玄参科植物绵毛鹿茸草的全草, 味苦涩性凉, 具有清热解毒、祛风止痛、凉血止血的功

效, 主治感冒、咳嗽、肺炎发热、疮疖臃肿等<sup>[1-2]</sup>。鹿茸草中含有黄酮类、生物碱类、皂苷类以及多糖类成分<sup>[3-5]</sup>, 张舒婷等<sup>[6]</sup>采用 HPLC 对鹿茸草中的木犀草素进行测定。现行的用 1~2 种化学成分表征中药质量的质控方法, 无法表征中药制剂的物质基础和化学成分群的整体性和复杂性, 难以全面控制鹿茸草药材的内在质量。同时, 由于采收时间及贮藏对药材质量具有重要影响<sup>[7]</sup>, 不同采收时间的鹿茸草药材是否存在显著的质量差异尚有待研究。本文采

**[收稿日期]** 20130617(023)

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2009B0308001002)

**[第一作者]** 李雪玲, 中药药剂学硕士, E-mail: lxl825528@163.com

**[通讯作者]** \* 刘强, 教授, 博士, 从事中药新剂型与新技术研究, E-mail: gzlq2002@163.com

用 HPLC 建立了鹿茸草药材的指纹图谱,并对所得图谱进行分析、解析,建立了鹿茸草指纹图谱的指标参数评判标准,为全面控制鹿茸草的质量提供了参考。

## 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1260 型高效液相色谱仪(真空脱气机、四元泵、二极管阵列检测器、自动进样器、智能恒温柱温箱、ChemStation 化学工作站),SB3200 型超声清洗仪(BRNSON),AB1352S 型电子天平(1/10 万,METT LER TOLEDO)。

**1.2 试药** 木犀草素(批号 111520-200504)购于中国药品生物制品检定所,流动相乙腈为色谱纯,水为二重蒸馏水,其他试剂为分析纯。

**1.3 药材** 鹿茸草由惠州市九惠制药股份有限公司提供,经南方医科大学中医药学院陈兴鉴定为玄参科植物绵毛鹿茸草 *Monochasma sheareri* Maxim. ex Franch. et Savat. 的全草,批号见表 1。

表 1 鹿茸草药材不同样品批号

No.	批号	No.	批号
1	20080801	6	20120108
2	20090103	7	20120501
3	20100702	8	20120505
4	20100802	9	20120910
5	20110321	10	20121010

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent HC C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A 为乙腈,B 为 0.4% 磷酸,梯度洗脱条件见表 2,流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 254 nm,柱温 35 °C,进样量 10 μL。

表 2 梯度洗脱程序

T/min	B/%	T/min	B/%
0	3	25	17
8	4	30	18
12	15	45	35
18	16	60	45

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品溶液的制备** 精密称取木犀草素对照品适量,加甲醇溶解并定容至 10 mL,制成木犀草素储备液。精密吸取木犀草素储备液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,制成木犀草素 0.011 2 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 将鹿茸草剪碎,称取样

品约 1 g 于 50 mL 锥形瓶中。加入 25 mL 甲醇,称定质量,超声 40 min。放冷后,称重,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

## 2.3 方法学考察<sup>[8-10]</sup>

**2.3.1 专属性试验** 取空白溶剂(甲醇)和鹿茸草供试品溶液各 1 份,按 2.1 项色谱条件,分别进样 10 μL,记录色谱图。比较两者的色谱图可知,空白溶剂对供试品溶液的测试不存在干扰,专属性良好。

**2.3.2 精密度试验** 取同一份鹿茸草供试品溶液,连续进样 6 次,记录 60 min 图谱。以木犀草素峰(13 号峰)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.86%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.23%,表明本方法精密度良好,符合指纹图谱的检测要求。

**2.3.3 稳定性试验** 取同一批鹿茸草供试品溶液,在 0,2,4,6,8,12,24 h 检测特征指纹图谱,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 2.17%,相对峰面积的 RSD 均 < 2.93%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好,符合指纹图谱的检测要求。

**2.3.4 重复性试验** 平行制备同一批 5 份鹿茸草供试品溶液,测定,结果各共有峰相对保留时间的 RSD 1.45%,相对峰面积的 RSD 2.09%,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱的检测要求。

**2.4 鹿茸草药材 HPLC 指纹图谱的建立及相似度计算<sup>[11]</sup>**

**2.4.1 指纹图谱的建立及共有峰的标定** 依上述方法测定了 10 批不同采收时间鹿茸草药材的指纹图谱,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 A 版》软件导入 10 批次鹿茸草的 HPLC 图谱数据,以中位数法生成对照指纹图谱的共有模式,建立对照指纹图谱。10 批鹿茸草药材的指纹图谱见图 1,指纹图谱共有模式见图 2。

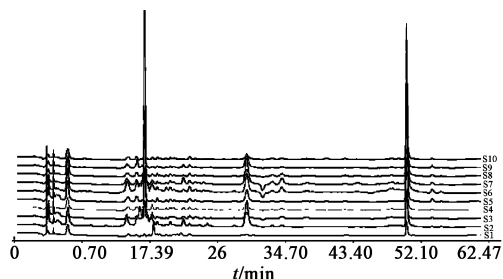


图 1 10 批鹿茸草药材的指纹图谱

根据 10 批供试品溶液 HPLC 指纹图谱给出的数据,比较供试品图谱,其中 13 个峰是各批供试品所共有的,因此,确定这 13 个峰为 10 个不同采收时

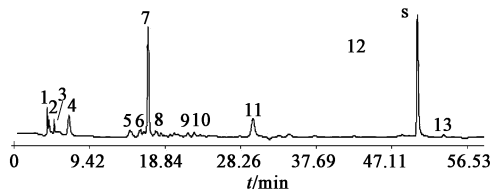


图 2 鹿茸草药材指纹图谱共有模式

间鹿茸草药材的共有峰,并指认了 12 峰为木犀草素,确定其为参比峰,标号为 S,其他特征峰依次标号为 1,2……S,13,根据指纹图谱相似度评价结果得出各样品的相似度,结果见表 3。

由表 3 可以看出, S1, S2, S3 相似度均 < 0.9, S4 ~ S10 相似度良好,均 > 0.9,说明不同采收时间对鹿茸草中化学成分含量影响较大。

**2.4.2 鹿茸草药材各样品指纹图谱共有峰的相对保留时间及相对峰面积值** 以 12 号峰为参照峰,对鹿茸草药材指纹图谱共有模式中已标定的 13 共有峰进行计算,各样品的指纹图谱共有峰相对保留时间及相对峰面积值数据见表 4,5。由表 4 可以看出,所建立的鹿茸草药材指纹图谱的 13 个共有峰非常吻合,保留时间稳定,无明显差异。由表 5 可知,不同批次鹿茸草样品各成分的含量则存在明显差异。

表 3 10 批鹿茸草相似度数据

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1	0.362	0.53	0.713	0.724	0.497	0.562	0.666	0.619	0.715	0.66
S2	0.362	1	0.674	0.763	0.631	0.947	0.746	0.712	0.800	0.603	0.749
S3	0.53	0.674	1	0.827	0.794	0.766	0.857	0.773	0.837	0.749	0.826
S4	0.713	0.673	0.827	1	0.989	0.855	0.933	0.979	0.959	0.981	0.985
S5	0.724	0.631	0.794	0.989	1	0.825	0.911	0.980	0.944	0.989	0.977
S6	0.497	0.947	0.766	0.855	0.825	1	0.893	0.891	0.937	0.811	0.912
S7	0.562	0.746	0.857	0.933	0.911	0.893	1	0.929	0.973	0.890	0.956
S8	0.666	0.712	0.773	0.979	0.980	0.891	0.929	1	0.965	0.982	0.993
S9	0.619	0.800	0.837	0.959	0.944	0.937	0.973	0.965	1	0.922	0.984
S10	0.715	0.603	0.749	0.981	0.989	0.811	0.89	0.982	0.922	1	0.968
对照指纹图谱	0.66	0.749	0.826	0.985	0.977	0.912	0.956	0.993	0.984	0.968	1

表 4 鹿茸草指纹图谱共有峰相对保留时间

No.	相对保留时间												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	S	13
S1	0.051 8	0.082 6	0.086 8	0.099 7	0.136 3	0.332 2	0.364 4	0.387 2	0.406 7	0.446 5	0.592 5	1.000	1.065 2
S2	0.051 8	0.082 8	0.086 5	0.100 0	0.135 9	0.332 1	0.364 2	0.387 3	0.406 8	0.446 6	0.593 0	1.000	1.065 1
S3	0.051 9	0.082 5	0.086 5	0.099 5	0.136 1	0.332 3	0.364 2	0.387 3	0.406 8	0.446 8	0.592 7	1.000	1.065 1
S4	0.051 6	0.082 6	0.086 8	0.099 5	0.136 1	0.332 3	0.364 4	0.378 2	0.406 6	0.446 6	0.592 4	1.000	1.065 3
S5	0.051 7	0.082 7	0.086 9	0.099 8	0.136 2	0.331 9	0.364 3	0.387 4	0.406 5	0.446 7	0.592 5	1.000	1.065 2
S6	0.051 6	0.082 7	0.086 6	0.099 9	0.136 0	0.332 4	0.364 2	0.387 1	0.406 7	0.446 4	0.592 6	1.000	1.065 4
S7	0.051 5	0.082 8	0.086 8	0.099 7	0.136 2	0.332 3	0.364 0	0.387 1	0.406 4	0.446 5	0.592 6	1.000	1.065 1
S8	0.051 7	0.082 5	0.086 7	0.099 6	0.136 3	0.332 3	0.364 5	0.387 3	0.406 5	0.446 5	0.592 7	1.000	1.065 3
S9	0.051 7	0.082 6	0.086 7	0.099 8	0.163 2	0.332 1	0.364 5	0.387 2	0.406 6	0.446 3	0.592 4	1.000	1.065 2
S10	0.051 8	0.082 7	0.086 5	0.099 7	0.136 0	0.332 1	0.364 3	0.387 4	0.406 8	0.446 8	0.592 8	1.000	1.065 2
RSD%	1.24	0.11	0.72	0.10	0.12	0.20	0.04	0.04	0.27	0.03	0.05	0.00	0.01

### 3 讨论

**3.1 提取条件的考察** 对不同提取溶剂如 60% 乙醇、乙醇、70% 甲醇和甲醇进行考察,同时比较了超声

提取、加热回流、冷浸等不同提取方法,结果表明以甲醇为提取溶剂超声提取 40 min 的方法提取率较优。

**3.2 色谱条件的优化** 考察了甲醇-水,乙腈-水,

表 5 鹿茸草指纹图谱共有峰相对峰面积

No.	相对保留时间												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	S	13
S1	0.341 2	0.278 5	0.217 3	0.150 3	0.107 2	0.146 6	0.100 3	0.074 7	0.161 7	0.062 4	0.184 4	1.000	0.050 1
S2	0.488 5	0.123 7	0.158 1	0.045 1	0.325 0	2.705 8	0.028 2	0.025 7	0.021 2	0.031 1	0.754 0	1.000	0.015 0
S3	0.349 4	0.343 8	0.639 9	0.310 7	0.077 5	0.628 6	0.059 2	0.024 6	0.107 1	0.012 8	0.846 0	1.000	0.068 4
S4	0.514 1	0.074 1	0.140 4	0.108 1	0.256 9	0.377 5	0.052 2	0.021 8	0.052 5	0.046 8	0.306 9	1.000	0.034 1
S5	0.412 1	0.081 1	0.120 2	0.039 9	0.277 5	0.307 9	0.030 0	0.015 8	0.005 4	0.037 8	0.255 3	1.000	0.044 5
S6	0.299 0	0.047 2	0.068 7	0.022 2	0.189 7	1.239 4	0.017 2	0.022 9	0.005 8	0.037 7	0.423 1	1.000	0.029 0
S7	0.216 8	0.043 6	0.056 7	0.019 3	0.106 3	0.531 0	0.017 3	0.011 9	0.025 1	0.028 7	0.673 6	1.000	0.024 3
S8	0.312 1	0.047 7	0.056 9	0.029 8	0.210 6	0.441 6	0.020 1	0.011 5	0.005 5	0.029 4	0.205 0	1.000	0.028 4
S9	0.420 2	0.070 1	0.072 9	0.042 9	0.206 6	0.620 0	0.020 3	0.011 2	0.013 9	0.047 5	0.491 5	1.000	0.044 8
S10	0.514	0.079 7	0.072 3	0.042 1	0.231 7	0.285 7	0.021 8	0.015 5	0.014 7	0.052 0	0.156 1	1.000	0.078 8
RSD/%	17.68	32.47	49.56	49.47	46.76	115.72	32.6	60.66	64.30	32.69	56.84	0.00	51.52

甲醇-0.1%磷酸溶液,乙腈-0.1%磷酸溶液,甲醇-0.4%磷酸溶液和乙腈-0.4%磷酸溶液6个流动相系统。结果由于大比例甲醇会导致柱压较高,而且以甲醇作为流动相系统,洗脱的物质较少,分离度不理想。采用乙腈-0.4%磷酸溶液作为流动相系统,得到的色谱峰总数多,各峰分离度有所改善,而且色谱峰峰形好且稳定。

**3.3 检测波长的选择** 使用二极管阵列检测器对样品进行190~400 nm的全波长扫描,并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明指标成分木犀草素有3个吸收带,分别在210,254,350 nm处均有较大吸收,而且在254 nm下检测到的峰的数目较多,各峰分离良好,特征峰明显且峰形较好,从图谱中可以尽可能的获取色谱组分信息以反映体系组成的全貌,因此选定254 nm为测定波长。

**3.4 10批药材的质量评价** 在生药学鉴定的基础上,建立了鹿茸草药材的HPLC指纹图谱,并采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统A版软件,对不同批次的鹿茸草药材的HPLC指纹图谱进行相似度评价,结果发现不同批次的鹿茸草药材的含量差距较大,可能是因为采收时间以及贮藏影响鹿茸草药材中化学成分的含量,鹿茸草药材采收后放置越久,由于药材受外界因素和自身因素的影响,质量不断发生变化,其变化的性质和程度各有不同,因此,对鹿

茸草药材的质量控制应从源头严格监控,从而保证鹿茸草药材成分中有效成分的含量相对稳定。

#### [参考文献]

- [1] 中科院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第68卷[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 第7册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [3] 杨蓓芬,崔敏燕. 绵毛鹿茸草的次生代谢产物含量与抑菌活性分析[J]. 浙江中医药大学学报,2009,33(3):265.
- [4] 钟仙龙. 绒毛鹿茸草多糖提取工艺优化及多糖体外抗氧化研究[J]. 养殖与饲料:饲料世界,2010(3):34.
- [5] 郑巍,谭兴起,郭良君,等. 鹿茸草的化学成分[J]. 中国天然药物,2012,3(12):102.
- [6] 张舒婷,任恒鑫,吴洪斌,等. 鹿茸草中木犀草素含量测定[J]. 黑龙江医药科学,2012,35(3):32.
- [7] 黄兆胜. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [8] 罗洁,范旭航,崔思娇,等. 知母的UPLC指纹图谱及聚类分析[J]. 中国现代应用药学,2013,30(1):28.
- [9] 宋桂萍,陈国宝,郑礼娟,等. 不同产地茯苓饮片的HPLC指纹图谱研究[J]. 世界中西医结合杂志,2013,8(1):36.
- [10] 孙庆文,王悦云,徐文芬,等. 地道药材黔党参的HPLC指纹图谱研究[J]. 中国药房,2013(7):628.
- [11] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求[S]. 2000.

[责任编辑 顾雪竹]