

· 指纹图谱研究 ·

白芍硫磺熏蒸前后的桂枝汤 HPLC 特征图谱比较研究

宋晓庆^{1,2}, 蔡 皓^{1,2}, 屠鹏飞³, 刘 晓^{1,2}, 裴 科^{1,2}, 乔凤仙^{1,2}, 赵莹莹^{1,2}, 娄雅静^{1,2,4}(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 江苏 南京 210023; 3. 北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 4. 江苏正大丰海制药有限公司药物研究所, 江苏 南京 210046)

摘要: **目的** 采用高效液相色谱法建立并分析比较含未硫磺熏蒸白芍和硫磺熏蒸白芍的桂枝汤特征图谱。**方法** 采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱; 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 280 nm, 进样量 20 μL。**结果** 通过对 13 批(5 批含未硫熏白芍和 8 批含硫熏白芍)桂枝汤的 HPLC 特征图谱研究, 共标定了 22 个特征峰。运用计算机辅助相似性评价系统、聚类分析及主成分分析对所建 13 批桂枝汤的 HPLC 特征图谱进行分析比较, 结果显示含未硫熏白芍和硫熏白芍的桂枝汤能明显分成两类, 且含硫熏白芍的桂枝汤中有新的成分产生。**结论** HPLC 特征图谱的建立与主成分分析和聚类分析的联合使用是区分含未硫熏白芍和硫熏白芍的桂枝汤的有效方法。该研究为快速鉴别桂枝汤中所用白芍是否为硫熏饮片提供了一定的参考。

关键词: 硫磺熏蒸白芍; 桂枝汤; 特征图谱; 聚类分析; 主成分分析; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0082-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.020

Comparative Study on HPLC Specific Chromatograms of *Guizhi* Decoction Containing Sun-dried or Sulfur-fumigated *Radix Paeoniae Alba*

SONG Xiaoqing^{1,2}, CAI Hao^{1,2}, TU Pengfei³, LIU Xiao^{1,2}, PEI Ke^{1,2}, QIAO Fengxian^{1,2}, ZHAO Yingying^{1,2}, LOU Yajing^{1,2,4}(1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023 Jiangsu, China; 2. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023 Jiangsu, China; 3. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 4. Pharmaceutical Research Institute, Jiangsu Chia Tai Fenghai Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210046 Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To establish and compare HPLC specific chromatograms of *Guizhi* Decoction containing sun-dried or sulfur-fumigated *Radix Paeoniae Alba*(RPA). **Methods** The separation was performed on a Kromasil C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a gradient elution with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% aqueous formic acid. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 30℃. The detection wavelength was set at 280 nm and 20 μL of the sample was injected for analysis. **Results** Twenty-two compounds were selected as the characteristic peaks of HPLC specific chromatograms of *Guizhi* Decoction after analyzing thirteen batches of *Guizhi*

收稿日期: 2014-10-22

作者简介: 宋晓庆, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药炮制及中药分析。Email: allendream2012@sina.com。通讯作者: 蔡皓, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 中药分析及中药质量控制。Email: haocai_98@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173546、30940093); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2009495); 江苏省国际科技合作计划资助项目(BZ2011053); 国家药典委员会资助项目; 江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目(KYLX_0975); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2011ZYX2-001)。

Decoction samples, which included of five batches containing sun-dried RPA and eight batches containing sulfur-fumigated RPA. HPLC specific chromatograms of *Guizhi* Decoction containing sun-dried RPA or sulfur-fumigated RPA could be easily divided into two categories after investigation with computer-aided similarity evaluation software combined with cluster analysis and principal component analysis. And new components were produced in *Guizhi* Decoction containing sulfur-fumigated RPA. **Conclusion** The combined utilization of HPLC specific chromatograms coupled with cluster analysis and principal component analysis is quite effective for the discrimination of *Guizhi* Decoction containing sun-dried RPA or sulfur-fumigated RPA. The established method provides certain reference for rapid identification of sulfur-fumigated RPA in *Guizhi* Decoction.

Keywords: Sulfur-fumigated *Radix Paeoniae Alba*; *Guizhi* Decoction; Specific chromatogram; Cluster analysis; Principal component analysis; High performance liquid chromatography

桂枝汤出自张仲景的代表作《伤寒论》，被誉为“仲景群方之冠”，具有解肌发表、调和营卫的功效，主要用于治疗外感风寒表虚证和中医诊断的多见于恶风发热、汗出头痛、鼻鸣干呕、苔白不渴、脉浮缓或浮弱等症状。该方由桂枝 9 g、白芍 9 g、生姜 9 g、炙甘草 6 g 和大枣 3 枚组成，是临床常用的、具有代表性的解表方。硫磺熏蒸作为中药材的传统养护方法，已有近百年的用于中药材产地加工的历史。然而，近年来，硫磺熏蒸被肆意滥用，很多不法商贩过量使用工业硫磺对药材进行熏蒸，以达到快速干燥药材、节省时间、减少成本和使药材更加美观的目的。据报道^[1]，硫磺熏蒸不仅会导致中药材及饮片的化学成分发生变化，而且对中药材及饮片的药理和药效作用也会产生影响，甚至有可能对机体产生不可修复的损伤。桂枝汤中的白芍即为目前药材市场上普遍采用硫磺熏蒸加工的主要对象之一。目前硫磺熏蒸对于白芍质量影响的研究报道较多^[2-7]，本课题组前期也开展了硫磺熏蒸对白芍化学成分、药效及毒性影响的研究，而桂枝汤的特征图谱研究以及硫磺熏蒸白芍所引起桂枝汤特征图谱变化的研究一直未见报道。基于此，本研究首次通过比较含未硫熏白芍和硫熏白芍的桂枝汤 HPLC 特征图谱之间的差异，并采用系统聚类分析及主成分分析对含有两种类型白芍的桂枝汤进行区分，以期临床用药安全提供参考。

1 仪器与试剂

Waters e2695-2998 型高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；AG 285 型电子天平，瑞士 Mettler Toledo 公司；超纯水制备仪，南京易普易达科技发展有限公司。

没食子酸、白芍苷、芍药苷、儿茶素、甘草苷、

6-姜酚对照品，成都瑞芬思生物科技有限公司，批号分别为：M-017-120911、S-011-121206、S-010-130429、E-011-121116、G-009-121124、J-019-130215；桂皮醇、桂皮酸、桂皮醛、甘草酸对照品，南京泽朗医药有限公司，批号分别为：ZL1209ASD、ZL2013112AQ、ZL20121020QW、ZL2012865GCS，纯度均大于 98 %；乙腈和甲醇，色谱纯，美国 Tedia 公司；甲酸，分析纯，南京化学试剂有限公司；水为实验室自制超纯水，其他试剂均为分析纯。

用于实验中组成桂枝汤的白芍饮片经酸蒸蒸馏碘滴定法(GB/T 5009.34)检测，其中 5 批为未硫磺熏蒸饮片，5 批为硫磺熏蒸饮片。另取其中 3 批未硫磺熏蒸饮片经实验室自熏作为对照硫磺熏蒸饮片。依据白芍饮片是否硫磺熏蒸将桂枝汤分为 2 个大组：含未硫熏白芍饮片的桂枝汤组(S1~S5，白芍饮片编号 1~5)、含硫熏白芍饮片的桂枝汤组(S6~S13，白芍饮片编号 6~13，其中编号 6~10 来源于饮片公司，编号 11~13 为实验室自制硫熏饮片)，白芍饮片的产地、批号及来源见表 1。其他饮片的来源：桂枝(产地广西，批号：130810)和炙甘草(产地内蒙古，批号：139510)，安徽亳州永刚中药饮片有限公司；生姜和大枣，南京市苏果超市(仙林大学城店)，经同法检测均为未硫磺熏蒸饮片。桂枝、炙甘草、白芍、生姜、大枣经南京中医药大学药学院中药鉴定教研室陈建伟教授鉴定，分别为源于对应药材的樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的新鲜根茎、鼠李科植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill. 的干燥成熟果实。

表 1 白芍饮片的产地、批号及来源

Table 1 Source of Radix Paeoniae Alba			
样品编号	产地	批号	来源
1	安徽	130101	浙江中医药大学中药饮片有限公司(未硫熏饮片)
2	安徽	120501	南京海源中药饮片有限公司(未硫熏饮片)
3	安徽	120505	南京海源中药饮片有限公司(未硫熏饮片)
4	安徽	130527	南京海源中药饮片有限公司(未硫熏饮片)
5	安徽	130723	亳州市永刚饮片厂有限公司(未硫熏饮片)
6	安徽	111101	南京海源中药饮片有限公司(硫熏饮片)
7	安徽	110729	南京海源中药饮片有限公司(硫熏饮片)
8	安徽	20130201	安徽惠隆中药饮片有限公司(硫熏饮片)
9	安徽	121001	湖北金贵中药饮片有限公司(硫熏饮片)
10	安徽	120422	南京海源中药饮片有限公司(硫熏饮片)
11	安徽	130101	实验室自制硫熏饮片(原料为编号 1 样品)
12	安徽	120501	实验室自制硫熏饮片(原料为编号 2 样品)
13	安徽	120505	实验室自制硫熏饮片(原料为编号 3 样品)

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 0.1 %甲酸水溶液(A)- 乙腈(B), 梯度洗脱, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 280 nm, 柱温: 30℃, 进样量: 20 μL。见表 2。

表 2 桂枝汤 HPLC 特征图谱的流动相洗脱梯度

Table 2 Mobile phase elution gradient for HPLC specific chromatogram of Guizhi Decoction																	
t/min	0	15	20	30	45	47	57	60	65	70	73	75	85	90	95		
B/%	5	8	15	20	20	25	30	32	35	40	45	50	70	5	5		

2.2 混合对照品溶液制备 分别精密称取干燥至恒质量的没食子酸、儿茶素、白芍苷、芍药苷、甘草苷、桂皮醇、桂皮酸、甘草酸、桂皮醛、6- 姜酚对照品适量, 置于同一个 10 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成一定浓度的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 分别称取同批次未硫熏桂枝饮片 13 份(每份 9 g)、同批次未硫熏炙甘草饮片 13 份(每份 6 g)、同批次未硫熏生姜饮片 13 份(每份 9 g)、同批次未硫熏大枣饮片 13 份(每份 3 枚), 再分别称取 13 个批次的未硫熏和硫熏白芍饮片各 1 份(每份 9 g)。将上述 13 份未硫熏的饮片(桂枝、炙甘草、生姜、大枣)与 13 个批次的未硫熏和硫熏白芍饮片分别按表 1 一一对应混合组成 13 组复方, 按照本课题组前期研究已确定的桂枝汤最佳煎煮工艺(即加 10 倍量的水、浸泡 30 min、武火煮沸后继续用文火保持微沸煎煮 45 min、煎煮 2 次)分别进行砂锅煎煮, 纱布过滤, 合并 2 次煎煮滤液, 定容至 500 mL。混

匀后取 2 mL, 5000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 上清液加水补足并定容至 2 mL, 过 0.45 μm 水相微孔滤膜, 即得 13 组桂枝汤供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取 S1 供试品溶液 20 μL, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以桂皮酸为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积。结果显示, 各特征峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.5 %, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.0 %, 表明仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 分别称取表 1 中编号 1 未硫熏白芍饮片 6 份(每份 9 g)及未硫熏饮片(桂枝每份 9 g、炙甘草每份 6 g、生姜每份 9 g、大枣每份 3 枚)各 6 份, 共混合组成复方 6 份, 按 2.3 项下中“供试品溶液制备”方法共制备 S1 供试品溶液 6 份, 分别精密吸取 20 μL 进样分析, 以桂皮酸为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果显示, 各特征峰的相对保留时间的 RSD 均小于 2.0 %, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.0 %, 表明供试品溶液的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取 S1 供试品溶液 20 μL, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 以桂皮酸为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果显示, 各特征峰的相对保留时间的 RSD 均小于 1.3 %, 相对峰面积的 RSD 均小于 3.0 %, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 特征图谱的建立及聚类分析和主成分分析

2.5.1 桂枝汤 HPLC 特征图谱的建立 分别精密吸取 13 批桂枝汤供试品溶液 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 采集 95 min 的 HPLC 色谱图。采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”^[8] 进行数据分析处理, 按照白芍饮片是否硫熏将含未硫熏白芍饮片的桂枝汤组(S1~S5)和含硫熏白芍饮片的桂枝汤组(S6~S13)分别进行分析, 首先设定 S1 为参照图谱, 将 S2~S5 与参照图进行自动匹配, 生成含未硫熏白芍的桂枝汤 HPLC 特征图谱, 见图 1-a, 该 5 批桂枝汤 HPLC 色谱对比图见图 1-b, 计算得到 S1~S5 供试品与 HPLC 特征图谱的相似度分别为 0.971, 0.974, 0.995, 0.982, 0.976, 各批含未硫熏白芍的桂枝汤与 HPLC 特征图谱之间的相似度均大于 0.97, 表明相似度良好; 其次设定 S6 为参照图谱, 将 S7~S13 与参照图进行自动匹配, 生成含硫熏白芍的桂枝汤 HPLC 特征图谱, 见图 2-a, 该 8 批桂枝汤

HPLC 色谱对比图见图 2-b, 计算得到 S6~S13 供试品与 HPLC 特征图谱的相似度分别为 0.927, 0.959, 0.982, 0.989, 0.996, 0.943, 0.973, 0.997, 各批含硫熏白芍的桂枝汤与 HPLC 特征图谱之间的相似度均大于 0.92, 表明相似度良好。将含未硫熏白芍的桂枝汤 HPLC 特征图谱与含硫熏白芍的桂枝汤 HPLC 特征图谱进行比较, 发现含硫熏白芍的桂枝汤 HPLC 特征图谱中在保留时间为 19.97 min 处出现一个“峰包”, 即使改变不同的洗脱梯度, 都无法将该“峰包”在高效液相色谱仪上实现分离, 推测可能是由于多种性质相似的成分聚集而成。本课题组在前期对白芍硫磺熏蒸前后化学成分变化的研究中也发现, 在硫熏白芍的 HPLC 特征图谱中也出现了类似的“峰包”, 且同样无法将此“峰包”的色谱峰实现分离, 而未硫熏白芍的 HPLC 特征图谱中却没有此“峰包”出现。通过对比单味白芍和桂枝汤二者 HPLC 特征图谱的色谱条件, 发现此两个“峰包”洗脱梯度一致, 峰形也一致, 由此可以推断, 含硫熏白芍的桂枝汤中的“峰包”极有可能来源于硫熏白芍。此“峰包”可以作为鉴别桂枝汤中白芍是否经过硫磺熏蒸的重要参考依据之一。

2.5.2 特征峰的标定 根据 13 批桂枝汤的 HPLC 特征图谱检测结果, 选择桂枝汤中主要成分、单峰面积占

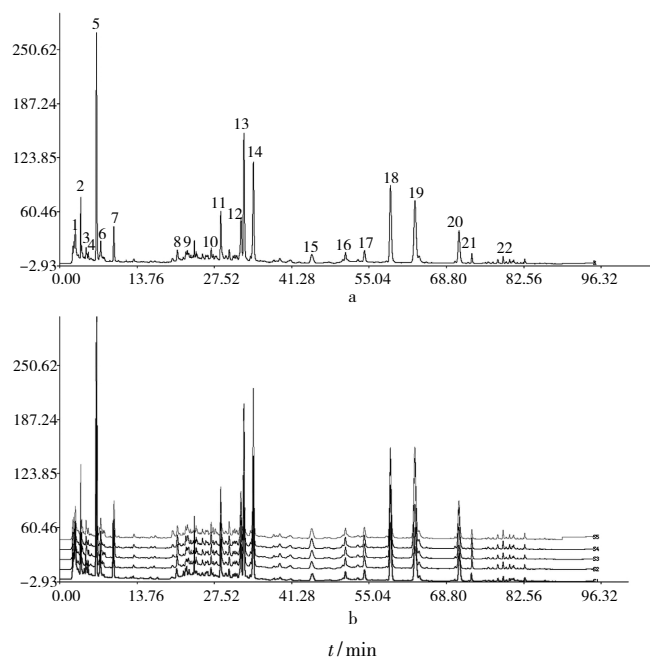


图 1 以 S1 桂枝汤供试品为参照的共有模式图谱(a)和 S1~S5 桂枝汤供试品 HPLC 特征图谱(b)

Figure 1 Reference HPLC specific chromatogram of S1 *Guizhi* Decoction(a) and original HPLC specific chromatograms of S1~S5 *Guizhi* Decoction(b)

总峰面积大于 0.8 %、出峰稳定且分离度良好的色谱峰作为特征峰, 共标定了 22 个特征峰, 见图 1 和图 2。经与对照品比对, 5 号峰为没食子酸(6.517 min), 9 号峰为儿茶素(22.61 min), 10 号峰为白芍苷(26.95 min), 11 号峰为芍药苷(28.65 min), 13 号峰为甘草苷(32.78 min), 17 号峰为桂皮醇(54.25 min), 18 号峰为桂皮酸(58.91 min), 19 号峰为桂皮醛(63.29 min), 21 号峰为甘草酸(73.27 min), 22 号峰为 6-姜酚(78.95 min)。

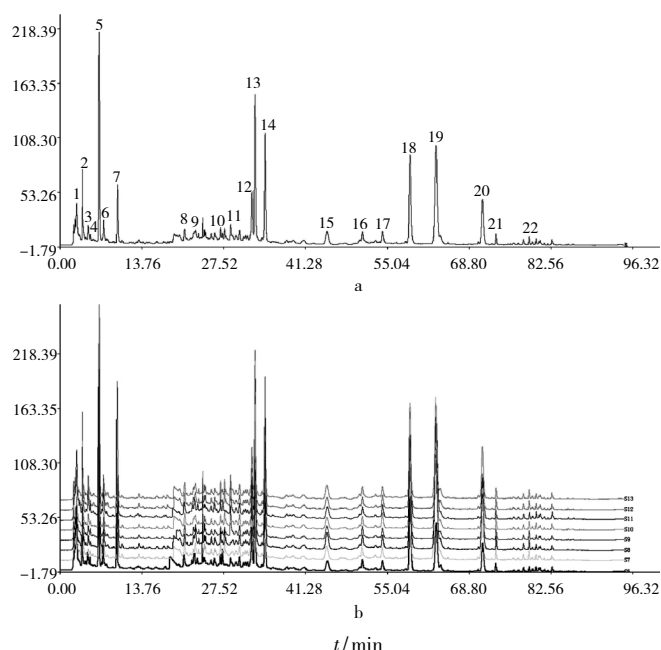


图 2 以 S6 桂枝汤供试品为参照的共有模式图谱(a)和 S6~S13 桂枝汤供试品 HPLC 特征图谱(b)

Figure 2 Reference HPLC specific chromatogram of S6 *Guizhi* Decoction(a) and original HPLC specific chromatograms of S6~S13 *Guizhi* Decoction(b)

2.5.3 聚类分析 采用平均距离关联法, 以 13 批桂枝汤为变量, 计算供试品之间的欧式距离, 对桂枝汤供试品进行聚类分析, 见图 3。结果显示, 含硫熏白芍的 6~13 号(即 S6~S13)桂枝汤供试品聚为一类, 含未硫熏白芍的 1~5 号(即 S1~S5)桂枝汤供试品聚为另一类。白芍硫熏前后对桂枝汤中的化学成分会产生一定的影响, 进而能够将含未硫熏白芍的桂枝汤和含硫熏白芍的桂枝汤进行明显的区分。

2.5.4 主成分分析^[9] 采用 SPSS 15.0 软件对数据进行分析。首先对数据进行标准化处理, 以降低数据间的差异。以 22 个标定的特征峰为变量, 13 批供试品为样本, 对数据进行分析, 共提取出 4 个特征值大于 6.0 的主成分, 占方差贡献率的 80.953 %。以提取的

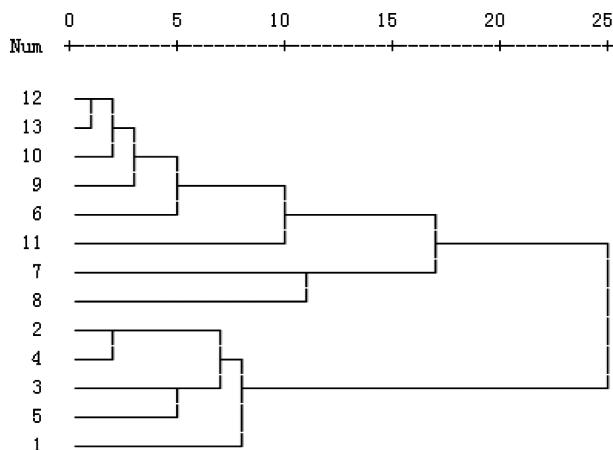


图3 13批桂枝汤 HPLC 特征图谱的系统聚类分析

Figure 3 Cluster analysis of HPLC specific chromatograms of thirteen batches of *Guizhi* Decoction

前3个主成分为XYZ坐标得到三维分布散点图,见图4。从图中可以看出,含未硫熏白芍的桂枝汤(1~5号,即S1~S5)和含硫熏白芍的桂枝汤(6~13号,即S6~S13)分别分布在两个区域内,且第一主成分对分类的贡献最大。由因子载荷矩阵可知,第一主成分与5、8、11号标定的特征峰高度正相关,通过与对照品比对,发现5号和11号标定的特征峰分别为没食子酸和芍药苷,这两种成分也是白芍的主要成分。本课题组的前期研究表明,这两种成分的变化与白芍是否经过硫磺熏蒸有密切关系。因此,白芍经过硫磺熏蒸后不仅对其自身所含成分产生影响,而且也会对桂枝汤的成分产生影响。

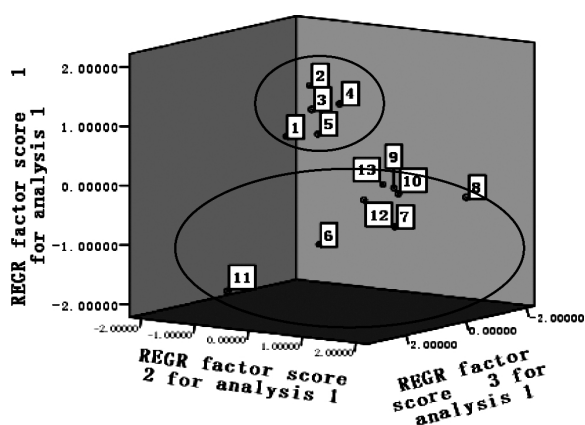


图4 13批桂枝汤 HPLC 特征图谱的主成分分析

Figure 4 PCA plot of HPLC specific chromatograms of thirteen batches of *Guizhi* Decoction

3 讨论

本实验考察了不同的流动相洗脱系统,如甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.1%

甲酸水溶液、乙腈-0.2%甲酸水溶液,并对洗脱梯度、柱温、流速、进样量和检测波长等进行了考察,目的是使供试品溶液的出峰较多,色谱峰达到较好的分离,且基线较为平稳。通过优选和比较,最终确定了本研究中的色谱条件。

有关桂枝汤特征图谱的研究较少有文献报道,本研究采用高效液相色谱法首次建立了传统煎煮法所制桂枝汤的特征图谱。通过比较含未硫熏白芍和硫熏白芍的桂枝汤特征图谱发现,二者最明显的区别在于19.97 min处的“峰包”。据文献报道^[7],白芍经硫磺熏蒸后会新产生6个亚硫酸酯化合物,分别为oxypaeoniflorin sulfonate(氧化芍药苷亚硫酸酯)、paeoniflorin sulfonate(芍药苷亚硫酸酯)、benzoylpaeoniflorin sulfonate(苯甲酰芍药苷亚硫酸酯)、mudanpioside E sulfonate(牡丹皮苷E亚硫酸酯)、isomaltopaeoniflorin sulfonate(异麦芽糖芍药苷亚硫酸酯)、galloypaeoniflorin sulfonate(没食子酰基芍药苷亚硫酸酯),而这6个成分是否是“峰包”里的成分,还有待进一步研究确定。

由于高效液相色谱法的分辨率相对较低,对于复杂中药成分的识别存在一定的局限性。在所设定的色谱条件下无法将硫熏白芍对桂枝汤中其他成分的影响(产生的新成分或消失的原有成分)全部显示出来,因此,后续的成分变化将会借助高分辨率的UHPLC-Q-TOF-MS开展进一步的研究与验证。

参考文献:

- [1] 刘静静, 刘晓, 李松林, 等. 硫磺熏蒸中药材及饮片的研究现状[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1403-1406.
- [2] Zhang JD, Cai H, Cao G, et al. Exploring potential chemical transformation by chemical profiling approach for rapidly evaluating chemical consistency between sun-dried and sulfur-fumigated *Radix Paeoniae Alba* using ultraperformance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, Article ID 763213: 9.
- [3] 孟祥松, 刘文革, 李军, 等. 硫磺熏蒸时间对白芍中芍药苷含量影响[J]. 安徽医药, 2010, 14(11): 1278-1279.
- [4] Wu J, Shen H, Xu J, et al. Detection of sulfur-fumigated *Paeoniae Alba Radix* in complex preparations by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Molecules, 2012, 17(8): 8938-8954.
- [5] 刘静静, 蔡皓, 刘晓, 等. ICP-AES法分析硫磺熏蒸前后白芍中有害重金属、硫及主要微量元素的变化[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13): 1790-1793.
- [6] 蔡皓, 张科卫, 刘晓, 等. 硫磺熏蒸前后白芍 HPLC-UV 特征图谱的比较研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(1): 128-132.

[7] Li SL, Song JZ, Choi FF, et al. Chemical profiling of Radix Paeoniae evaluated by ultra-performance liquid chromatography/photo-diode-array/quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 49(2): 253-266.

[8] 张子龙, 刘东辉, 黄月纯, 等. 关黄柏、黄柏及其精制提取物

HPLC 指纹图谱的相关性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 549-553.

[9] 王黎, 高苏亚, 李华. 不同产地粉葛的指纹图谱及 PCA 模式识别分析研究[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(4): 448-451.

(编辑: 邓响潮)

三黄汤 HPLC 指纹图谱初步研究

李 强¹, 朱晓红^{1,2}(1. 辽宁医学院, 辽宁 锦州 121000; 2. 解放军二〇二医院, 辽宁 沈阳 110000)

摘要: **目的** 通过 HPLC 指纹图谱探索三黄汤的药效物质基础。**方法** 采用迪马公司 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇(A)-1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30℃, 检测波长 277 nm, 对 10 批三黄汤样本进行检测分析, 建立三黄汤 HPLC 指纹图谱, 对比相同条件下体外复方图谱、单味药材图谱、药材阴性图谱及混合对照品图谱, 初步确认三黄汤主要有效成分及来源。**结果** 在该色谱条件下, 三黄汤指纹图谱中标示出 44 个共有峰, 7 个成分得到认定, 其中绿原酸来源于茵陈; 盐酸小檗碱来源于黄柏; 黄芩苷来源于黄芩; 甘草酸铵来源于甘草; 大黄酸、大黄素、大黄酚来源于大黄。**结论** 该方法准确可靠, 重复性好, 为三黄汤有效成分的确定提供了一定的实验依据。

关键词: 三黄汤; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0087-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.021

Preliminary Studies on HPLC Fingerprint of *Sanhuang* Decoction

LI Qiang¹, ZHU Xiaohong^{1,2}(1. Liaoning Medical University, Jinzhou 121000 Liaoning, China; 2. No.202 Hospital of PLA, Shenyang 110000 Liaoning, China)

Abstract: **Objective** To explore the active components in *Sanhuang* decoction (SHD) based on the establishment of SHD fingerprint. **Methods** The method was established on a Diamonsil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase composed of methanol(A) -1% aqueous phosphoric acid(B) in gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30℃ and the detection wavelength was 277 nm. By analysis of 10 batches of SHD samples, HPLC fingerprinting was established. The main effective ingredients and their material sources in SHD were identified after comparing the in-vitro fingerprint of SHD under the same conditions, fingerprint of single herb medicine, fingerprint of negative patterns and fingerprint of mixed reference. **Results** Under the chromatographic conditions, 44 common peaks were presented in SHD fingerprint, and 7 components were identified, including chlorogenic acid from *Herba Artemisiae Scopariae*, berberine from *Cortex Phellodendri*, baicalin from *Radix Scutellariae*, ammonium glycyrrhizinate from *Radix Glycyrrhizae*, and rhein, emodin and chrysophanol from *Radix et Rhizoma Rhei*. **Conclusion** The method is accurate and reproducible, which provides experimental evidence for the determination of the effective components of SHD.

Keywords: *Sanhuang* decoction; High performance liquid chromatography; Fingerprint

收稿日期: 2014-06-18

作者简介: 李强, 男, 硕士研究生。研究方向: 中药物质基础研究。Email: liqiang607@yeah.net。通讯作者: 朱晓红, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 天然药物的提取与分离及临床药学。Email: zxh3688@sina.com。

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(201102234)。