

# 蛇床子药材指纹图谱及4种香豆素类成分含量测定方法的建立<sup>△</sup>

潘晓君\*, 吕渭升, 杨文惠, 罗宇琴, 梁月仪, 魏梅, 孙冬梅, 陈向东, 霍文杰, 李振雨<sup>#</sup>(广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东佛山 528244)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)02-0185-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.02.10



**摘要** 目的 建立蛇床子药材的指纹图谱及其中4种香豆素类成分的含量测定方法。方法 采用超高效液相色谱法,利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》建立21批蛇床子药材的指纹图谱,并进行相似度评价,与对照品比对指认共有峰。以10个共有峰峰面积为变量,采用组间连接法对21批蛇床子药材进行系统聚类分析。采用相同超高效液相色谱法,以蛇床子素为内参物,计算花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素的相对校正因子,采用一测多评法计算其含量,并与外标法测定结果进行比较。结果 21批蛇床子药材的指纹图谱中共标识出10个共有峰,相似度为0.997~1.000;指认出峰4为花椒毒素,峰8为佛手柑内酯,峰9为欧前胡素,峰10为蛇床子素。21批样品被划分为3类,其中S7为一类,S14为一类,其余19批为一类。一测多评法与外标法测定的花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素含量的相对偏差分别为0.88%~1.07%、2.22%~2.29%、0.67%~2.93%。结论 成功建立了蛇床子药材的超高效液相色谱指纹图谱及4种香豆素类成分含量测定的一测多评法。

**关键词** 蛇床子;超高效液相色谱法;指纹图谱;香豆素类成分;一测多评法

## Establishment of the fingerprint of *Cnidium monnieri* and a method for the content determination of 4 kinds of coumarins

PAN Xiaojun, LYU Weisheng, YANG Wenhui, LUO Yuqin, LIANG Yueyi, WEI Mei, SUN Dongmei, CHEN Xiangdong, HUO Wenjie, LI Zhenyu (Guangdong Provincial Enterprise Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Guangdong Foshan 528244, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To establish the fingerprint of *Cnidium monnieri* and a method for the content determination of 4 kinds of coumarins. **METHODS** Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) method was adopted to establish the fingerprints of 21 batches of *C. monnieri*; their similarities were evaluated with *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 edition); common peaks were identification by comparison with reference substance. Using 10 common peak areas as variables, cluster analysis was performed for 21 batches of *C. monnieri* by the method of between groups. The relative correction factors of xanthotoxin, bergapten and imperatorin were calculated by the same UPLC method with osthole as the internal reference. The contents of them were calculated by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS), and compared with the results of external standard method. **RESULTS** Totally 10 common peaks were identified in the fingerprints of 21 batches of *C. monnieri*; the similarities ranged from 0.997 to 1.000. Peak 4 was identified as xanthotoxin, peak 8 as bergapten, peak 9 as imperatorin and peak 10 as osthole. A total of 21 batches of samples were divided into 3 categories, of which S7 was clustered into one category, S14 was clustered into one category, and the other 19 batches were clustered into one category. The relative deviations of the contents of xanthotoxin, bergapten and imperatorin determined by QAMS and external standard method were in the range of 0.88%~1.07%, 2.22%~2.29%, 0.67%~2.93%, respectively. **CONCLUSIONS** UPLC fingerprint of *C. monnieri* is successfully established, and QAMS method for content determination of 4 coumarins is also established.

**KEYWORDS** *Cnidium monnieri*; ultra-high performance liquid chromatography; fingerprint; coumarins; quantitative analysis of multi-components by single marker

蛇床子为伞形科植物蛇床 *Cnidium monnieri* (L.) Cuss. 的干燥成熟果实<sup>[1]</sup>,又名蛇粟、蛇米、蛇珠等,主要分布于我国江苏、山东、浙江、陕西等地<sup>[2]</sup>。蛇床子的主要活性成分为香豆素类,以简单型香豆素(如蛇床子素)和呋喃型香豆素(如佛手柑内酯、花椒毒素、欧前胡素)为

主<sup>[3]</sup>。有研究发现,不同产地蛇床子所含香豆素的种类相差不大,但不同类型香豆素的含量差异明显,这种差异与不同产地温度、降雨量和日照时长的相关性较高<sup>[4]</sup>。现代药理学研究表明,香豆素类成分是蛇床子的主要活性成分,可有利于心脑血管系统、神经系统、免疫系统、生殖系统等疾病以及骨质疏松的治疗<sup>[5-8]</sup>。2020年版《中国药典》(一部)以蛇床子素为单一含量测定指标,难以全面地反映蛇床子药材的内在质量;而多指标检测则常因对照品昂贵或不易获得,导致检测成本较高。一测多评法可采用同一对照品实现对多种成分的同时测定,实用性和经济性较强。基于此,本文以超高

<sup>△</sup> 基金项目:广东省省级科技计划项目(No.2018B030323004);“广东特支计划”科技创业领军人才项目(No.2017TY04R197)

\* 学士。研究方向:中药饮片及中药配方颗粒的质量控制。电话:0757-85128602。E-mail:947443994@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:主管中药师,硕士。研究方向:中药饮片及中药配方颗粒。电话:0757-85128602。E-mail:1083656123@qq.com

效液相色谱法为手段,建立21批蛇床子药材的指纹图谱,并进行相似度评价和系统聚类分析,结合一测多评法,以常见、易得的蛇床子素为内参物,同时测定蛇床子药材中佛手柑内酯、花椒毒素、欧前胡素的含量,旨在为提高蛇床子药材质量标准提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括H-Class型超高效液相色谱仪(美国Waters公司),Vanquish型超高效液相色谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),1290型超高效液相色谱仪(美国Agilent公司),ME204E型万分之一天平、XP26型百万分之一天平[梅特勒-托利多(中国)有限公司],HWS-28型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

花椒毒素对照品(批号17111503,纯度98%)、佛手柑内酯对照品(批号17120501,纯度98%)均购自成都普菲德生物技术有限公司;欧前胡素对照品(批号110826-201616,纯度99.6%)、蛇床子素对照品(批号110822-201710,纯度99.5%)均购自中国食品药品检定研究院;实验用乙醇(分析纯)、甲醇(分析纯)均购自西陇科技股份有限公司;液相用甲醇为色谱级,水为超纯水。

21批蛇床子药材分别采集自我国江苏、山东、河南、湖北、黑龙江等地,经广东一方制药有限公司魏梅主任中药师鉴定,均为伞形科植物蛇床*C. monnieri*(L.)Cuss.的干燥成熟果实,其产地信息详见表1。

表1 21批蛇床子药材产地信息

| 编号  | 批号       | 产地     | 编号  | 批号       | 产地       |
|-----|----------|--------|-----|----------|----------|
| S1  | G1706141 | 江苏省徐州市 | S12 | G1712162 | 山东省滨州市   |
| S2  | G1706142 | 江苏省徐州市 | S13 | G1712150 | 河南省南阳市   |
| S3  | G1706143 | 江苏省徐州市 | S14 | G1712158 | 河南省南阳市   |
| S4  | G1712145 | 江苏省盐城市 | S15 | G1712160 | 河南省南阳市   |
| S5  | G1712148 | 江苏省盐城市 | S16 | G1712151 | 湖北省宜昌市   |
| S6  | G1712149 | 江苏省盐城市 | S17 | G1712153 | 湖北省宜昌市   |
| S7  | G1712152 | 山东省日照市 | S18 | G1712156 | 湖北省宜昌市   |
| S8  | G1712157 | 山东省日照市 | S19 | G2104599 | 黑龙江省哈尔滨市 |
| S9  | G1712161 | 山东省日照市 | S20 | G2104600 | 黑龙江省哈尔滨市 |
| S10 | G1712147 | 山东省滨州市 | S21 | G2104601 | 黑龙江省哈尔滨市 |
| S11 | G1712159 | 山东省滨州市 |     |          |          |

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用H-Class型超高效液相色谱仪,以YMC Trait C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)为色谱柱,以甲醇(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱(0~15 min, 39% A→40% A; 15~20 min, 40% A→45% A; 20~25 min, 45% A→60% A; 25~30 min, 60% A→80% A; 30~34 min, 80% A);流速为0.20 mL/min;柱温为30℃;指纹图谱检测波长为310 nm,定量分析检测波长为248 nm;进样量为1 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 分别取花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素对照品适量,精密称定,加

甲醇制成每1 mL含花椒毒素10 μg、佛手柑内酯5 μg、欧前胡素35 μg、蛇床子素35 μg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取蛇床子药材粉末(过三号筛,下同)约0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇20 mL,密塞,称定质量,超声(功率300 W,频率50 kHz)处理30 min,放冷,再次称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 精密度试验 取蛇床子药材(编号S8)供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以蛇床子素峰为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,10个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.05%~0.25%、0.08%~0.61%(n=6),均小于3.0%,表明该方法精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同批次蛇床子药材粉末(编号S8)6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以蛇床子素峰为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,10个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.08%~0.36%、0.23%~2.35%(n=6),均小于3.0%,表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取蛇床子药材(编号S8)供试品溶液,分别在室温下放置0、2、4、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以蛇床子素峰为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,10个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为0.05%~0.36%、0.27%~1.58%(n=7),均小于3.0%,说明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.3.4 指纹图谱的建立及相似度评价 取21批蛇床子药材粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,以S8样品图谱为参照进行保留时间校正和全峰匹配。结果显示,21批蛇床子药材指纹图谱中共有10个共有峰(图1)。以平均数法生成蛇床子药材对照指纹图谱(图2)。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》计算21批蛇床子药材指纹图谱与对照指纹图谱的相似度。结果显示,21批样品中大多数批次样品(编号S7和S14除外)的相似度均不低于0.999,详见表2。

2.3.5 共有峰的指认 查阅文献[3],在与混合对照品(同法测定,见图3)比对的同时,结合色谱峰的紫外吸收光谱对10个共有峰进行指认,共指认了4个共有峰,即峰4为花椒毒素、峰8为佛手柑内酯、峰9为欧前胡素、峰10为蛇床子素。

### 2.4 系统聚类分析

以10个共有峰峰面积为变量,采用组间连接法进行系统聚类分析,设欧氏距离为20,采用Z得分法对数据

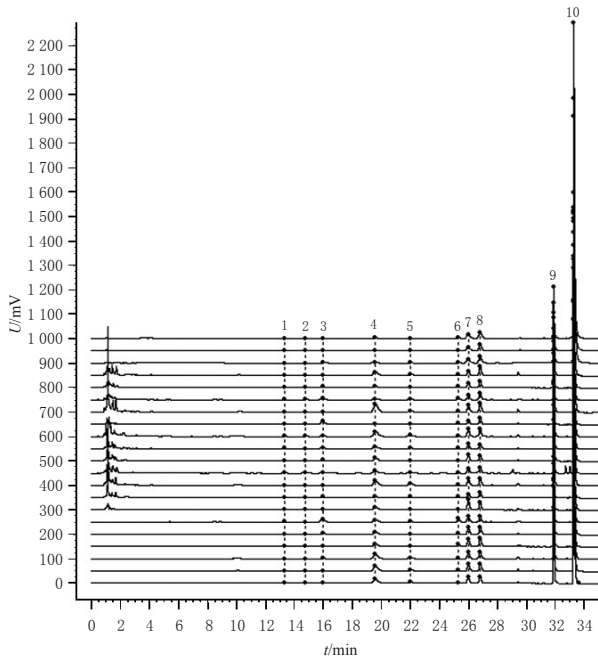


图1 21批蛇床子药材的超高效液相色谱叠加指纹图谱

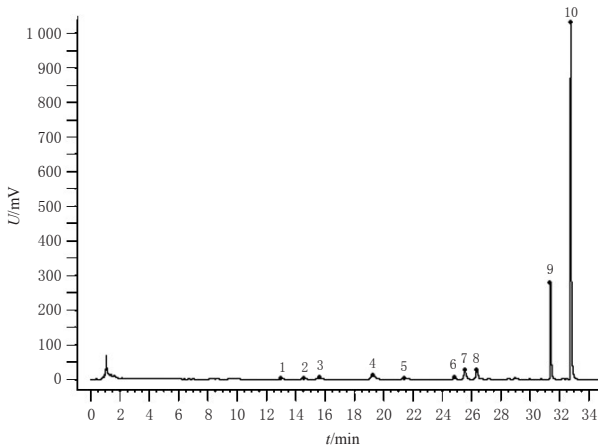
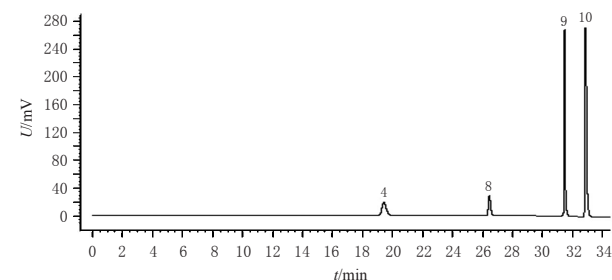


图2 蛇床子药材的超高效液相色谱对照指纹图谱

表2 21批蛇床子药材的相似度评价结果

| 编号 | 相似度   | 编号  | 相似度   | 编号  | 相似度   |
|----|-------|-----|-------|-----|-------|
| S1 | 1.000 | S8  | 0.999 | S15 | 0.999 |
| S2 | 1.000 | S9  | 0.999 | S16 | 0.999 |
| S3 | 1.000 | S10 | 0.999 | S17 | 0.999 |
| S4 | 0.999 | S11 | 0.999 | S18 | 0.999 |
| S5 | 1.000 | S12 | 1.000 | S19 | 0.999 |
| S6 | 0.999 | S13 | 1.000 | S20 | 0.999 |
| S7 | 0.997 | S14 | 0.997 | S21 | 0.999 |



4: 花椒毒素; 8: 佛手柑内酯; 9: 欧前胡素; 10: 蛇床子素

图3 花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素混合对照品的超高效液相色谱图

进行标准化处理,结果见图4。图4显示,21批蛇床子药材样品被划分为3类,其中S7为一类,S14为一类,其余19批为一类。

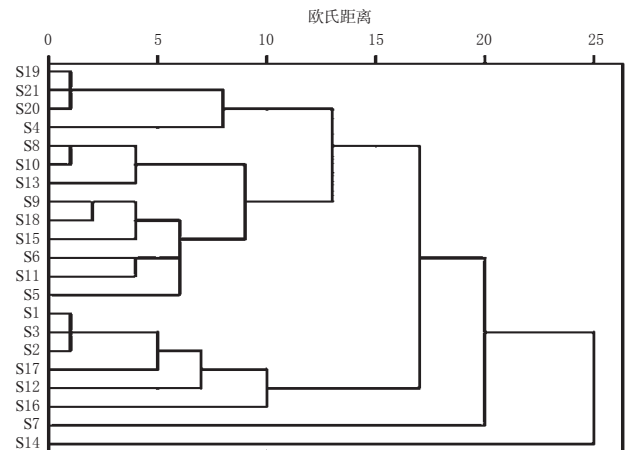
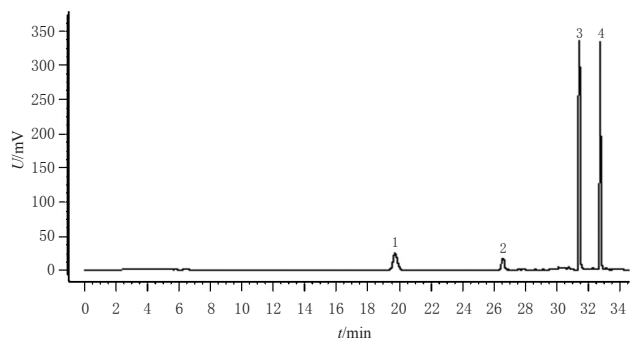


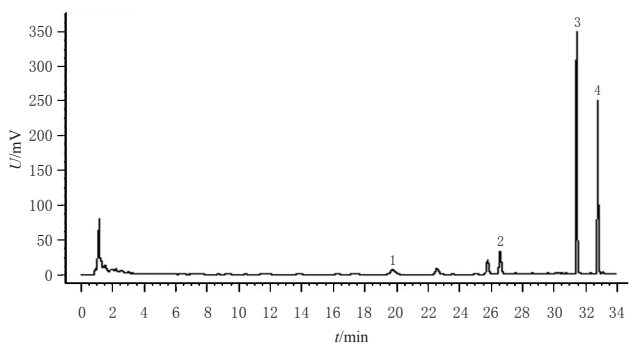
图4 21批蛇床子药材的系统聚类分析树状图

## 2.5 4种香豆素类成分含量的测定

2.5.1 专属性考察 取“2.2.1”项下混合对照品溶液、“2.2.2”项下供试品溶液(编号S8)、空白溶剂(80%甲醇),按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图5,空白溶剂图略)。结果显示,花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的保留时间分别约为19.4、26.4、31.4、32.8 min,与相邻色谱峰的分度均大于2.5,理论板数均大于20 000,空白溶剂对测定无干扰,表明该方法专属性良好。



A. 混合对照品溶液



B. 蛇床子供试品溶液

1: 花椒毒素; 2: 佛手柑内酯; 3: 欧前胡素; 4: 蛇床子素

图5 混合对照品溶液和蛇床子供试品溶液的超高效液相色谱图

2.5.2 线性关系考察 精密称取花椒毒素对照品 0.745 mg、佛手柑内酯对照品 2.838 mg、欧前胡素对照品 7.771 mg、蛇床子素对照品 35.594 mg,置于 20 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,作为混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液 5、2、1、0.4、0.2 mL,分别置于 20 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得系列浓度的混合对照品溶液。精密吸取上述混合对照品贮备液及系列浓度的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积( $y$ )为纵坐标、对照品质量浓度( $x$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标绘制标准曲线,所得回归方程及线性范围如表 3 所示。

表 3 花椒毒素等 4 种成分的线性回归方程及线性范围

| 待测成分  | 回归方程                    | $r$     | 线性范围, $\mu\text{g/mL}$ |
|-------|-------------------------|---------|------------------------|
| 花椒毒素  | $y=30.256 0x-1.986 2$   | 0.999 9 | 0.365~36.505           |
| 佛手柑内酯 | $y=21.026 0x-5.437 9$   | 0.999 9 | 1.391~139.062          |
| 欧前胡素  | $y=47.784 6x-157.503 1$ | 0.999 8 | 3.870~386.996          |
| 蛇床子素  | $y=5.352 9x-8.842 6$    | 1.000 0 | 17.708~1 770.802       |

2.5.3 精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果显示,花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素峰面积的 RSD 分别为 0.83%、1.41%、0.12%、0.24% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取同批次蛇床子药材粉末(编号 S8)6 份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算含量。结果显示,花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素含量的 RSD 分别为 0.50%、0.71%、0.55%、0.74% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取蛇床子药材(编号 S8)供试品溶液适量,分别在室温下放置 0、2、4、6、8、12 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素峰面积的 RSD 分别为 0.38%、0.49%、0.69%、0.28% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置 12 h 内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 取已知含量的蛇床子药材粉末(编号 S8)约 0.15 g,精密称定,按样品中 4 种成分已知量的 0.5、1、1.5 倍加入花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的混合对照品溶液(配制方法同“2.5.2”项),每种质量浓度平行 3 份。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 4。结果显示,花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素的加样回收率分别为 100.26%~107.45%、101.47%~106.01%、98.42%~103.11%、98.44%~103.11%,RSD 均小于 3.0% ( $n=9$ ),表明该方法准确度良好。

2.5.7 相对校正因子的计算 以蛇床子素为内参物,按下式计算其他组分与内参物的相对校正因子( $f_{k,m}$ ): $f_{k,m}=f_k/f_m=(W_k \times A_m)/(W_m \times A_k)$ 。式中, $A_k$  为内参物的峰面积, $W_k$  为内参物的质量浓度, $A_m$  为  $m$  组分的峰面积, $W_m$  为  $m$  组分的质量浓度<sup>[9]</sup>。根据“2.5.2”项下线性关系考察结

表 4 花椒毒素等 4 种成分的加样回收率试验结果

| 待测成分    | 已知量/mg  | 加入量/mg  | 测得量/mg  | 加样回收率/% | 平均加样回收率/% | RSD/%  |
|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|--------|
| 花椒毒素    | 0.075 1 | 0.038 3 | 0.113 5 | 100.26  | 105.29    | 2.06   |
|         | 0.075 1 | 0.038 3 | 0.116 2 | 107.31  |           |        |
|         | 0.076 1 | 0.038 3 | 0.115 9 | 103.92  |           |        |
|         | 0.076 1 | 0.076 5 | 0.157 4 | 106.27  |           |        |
|         | 0.075 3 | 0.076 5 | 0.156 2 | 105.75  |           |        |
|         | 0.076 5 | 0.076 5 | 0.158 7 | 107.45  |           |        |
|         | 0.075 7 | 0.114 8 | 0.197 4 | 106.01  |           |        |
|         | 0.077 1 | 0.114 8 | 0.198 1 | 105.40  |           |        |
|         | 0.076 1 | 0.114 8 | 0.196 9 | 105.23  |           |        |
|         | 佛手柑内酯   | 0.173 4 | 0.088 2 | 0.266 9 |           |        |
| 0.173 4 |         | 0.088 2 | 0.264 8 | 103.63  |           |        |
| 0.175 6 |         | 0.088 2 | 0.265 5 | 101.93  |           |        |
| 0.175 6 |         | 0.176 5 | 0.362 1 | 105.67  |           |        |
| 0.173 8 |         | 0.176 5 | 0.354 0 | 102.10  |           |        |
| 0.176 6 |         | 0.176 5 | 0.362 5 | 105.33  |           |        |
| 0.174 8 |         | 0.264 7 | 0.447 9 | 103.17  |           |        |
| 0.178 0 |         | 0.264 7 | 0.446 6 | 101.47  |           |        |
| 0.175 6 |         | 0.264 7 | 0.447 9 | 102.87  |           |        |
| 欧前胡素    |         | 0.662 8 | 0.336 0 | 0.998 7 | 99.97     | 100.16 |
|         | 0.662 8 | 0.336 0 | 0.993 7 | 98.48   |           |        |
|         | 0.670 8 | 0.336 0 | 1.001 5 | 98.42   |           |        |
|         | 0.670 8 | 0.671 9 | 1.363 6 | 103.11  |           |        |
|         | 0.664 1 | 0.671 9 | 1.332 8 | 99.52   |           |        |
|         | 0.674 8 | 0.671 9 | 1.351 8 | 100.76  |           |        |
|         | 0.668 1 | 1.007 9 | 1.685 0 | 100.89  |           |        |
|         | 0.680 2 | 1.007 9 | 1.684 1 | 99.60   |           |        |
|         | 0.670 8 | 1.007 9 | 1.685 6 | 100.68  |           |        |
|         | 蛇床子素    | 2.701 1 | 1.366 4 | 4.067 6 | 100.01    |        |
| 2.701 1 |         | 1.366 4 | 4.047 1 | 98.51   |           |        |
| 2.733 8 |         | 1.366 4 | 4.078 9 | 98.44   |           |        |
| 2.733 8 |         | 2.732 8 | 5.551 6 | 103.11  |           |        |
| 2.706 5 |         | 2.732 8 | 5.426 2 | 99.52   |           |        |
| 2.750 2 |         | 2.732 8 | 5.503 7 | 100.76  |           |        |
| 2.722 9 |         | 4.099 2 | 6.858 9 | 100.90  |           |        |
| 2.772 0 |         | 4.099 2 | 6.855 2 | 99.61   |           |        |
| 2.733 8 |         | 4.099 2 | 6.861 2 | 100.69  |           |        |

果,以对照品的质量浓度及其对应色谱峰的峰面积分别计算花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素的相对校正因子,结果见表 5。结果显示,花椒毒素、佛手柑内酯和欧前胡素的平均相对校正因子分别为 0.181 4、0.258 6、0.731 6, RSD 分别为 1.14%、0.30%、2.51% ( $n=6$ )。

表 5 花椒毒素等 3 种成分的相对校正因子

| 蛇床子素质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$ | $f_{\text{花椒毒素/欧前胡素}}$ | $f_{\text{花椒毒素/佛手柑内酯}}$ | $f_{\text{花椒毒素/欧前胡素}}$ |
|------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 17.708                       | 0.178 7                | 0.258 0                 | 0.716 3                |
| 35.416                       | 0.178 7                | 0.257 4                 | 0.732 3                |
| 88.540                       | 0.183 1                | 0.258 7                 | 0.726 3                |
| 177.080                      | 0.182 7                | 0.258 7                 | 0.709 5                |
| 442.700                      | 0.182 4                | 0.259 1                 | 0.746 6                |
| 1 770.802                    | 0.182 5                | 0.259 6                 | 0.758 3                |
| 平均值                          | 0.181 4                | 0.258 6                 | 0.731 6                |
| RSD/%                        | 1.14                   | 0.30                    | 2.51                   |

2.5.8 耐用性考察 精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 1  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别考察 Waters H-Class、Agilent 1290、Thermo Vanquish 型超高效液相色谱仪, YMC Trait C<sub>18</sub>(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.9  $\mu\text{m}$ )、Waters BEH C<sub>18</sub>(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )、Agilent SB

C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱以及柱温±2 ℃、流速±0.02 mL/min对花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素相对校正因子的影响,结果见表6。结果显示,在上述条件下,花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素相对校正因子的RSD均小于3.0%(n=3),表明不同色谱仪、色谱柱以及较小变化的柱温、流速对上述3种成分相对校正因子无显著影响。

表6 不同色谱条件对花椒毒素等3种成分相对校正因子的影响

| 项目          | 条件                         | 花椒毒素                   |       | 佛手柑内酯                   |       | 欧前胡素                   |       |
|-------------|----------------------------|------------------------|-------|-------------------------|-------|------------------------|-------|
|             |                            | $f_{\text{校正因子:花椒毒素}}$ | RSD/% | $f_{\text{校正因子:佛手柑内酯}}$ | RSD/% | $f_{\text{校正因子:欧前胡素}}$ | RSD/% |
| 色谱仪         | Waters H-Class             | 0.178 7                | 1.85  | 0.257 7                 | 0.34  | 0.726 3                | 0.57  |
|             | Agilent 1290               | 0.172 2                |       | 0.257 9                 |       | 0.732 5                |       |
|             | Thermo Vanquish            | 0.175 6                |       | 0.256 3                 |       | 0.734 2                |       |
| 色谱柱         | YMC Trait C <sub>18</sub>  | 0.178 7                | 0.63  | 0.257 7                 | 0.48  | 0.726 3                | 1.11  |
|             | Waters BEH C <sub>18</sub> | 0.180 9                |       | 0.260 0                 |       | 0.732 3                |       |
|             | Agilent SB C <sub>18</sub> | 0.180 4                |       | 0.258 0                 |       | 0.716 3                |       |
| 柱温/℃        | 28                         | 0.182 9                | 1.26  | 0.258 7                 | 0.33  | 0.714 7                | 0.91  |
|             | 30                         | 0.178 7                |       | 0.257 7                 |       | 0.726 3                |       |
|             | 32                         | 0.182 4                |       | 0.259 4                 |       | 0.725 8                |       |
| 流速/(mL/min) | 0.18                       | 0.179 8                | 0.43  | 0.256 2                 | 1.37  | 0.715 9                | 1.36  |
|             | 0.20                       | 0.178 7                |       | 0.257 7                 |       | 0.726 3                |       |
|             | 0.22                       | 0.180 9                |       | 0.261 2                 |       | 0.735 7                |       |

2.5.9 色谱峰定位 根据“2.5.8”项下耐用性考察结果,以蛇床子素峰为参照峰,计算花椒毒素、佛手柑内酯和欧前胡素的相对保留时间,结果见表7。结果显示,在不同色谱仪、色谱柱以及较小变化的柱温、流速条件下,花椒毒素、佛手柑内酯和欧前胡素相对保留时间的RSD均小于5.0%(n=3),说明相对保留时间比较稳定,可以采用相对保留时间对花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素的色谱峰进行定位。本研究得不同色谱条件下花椒毒素、

佛手柑内酯和欧前胡素的平均相对保留时间分别为0.550、0.788、0.960。

表7 不同色谱条件对花椒毒素等3种成分相对保留时间的影响

| 项目          | 条件                         | 花椒毒素   |       | 佛手柑内酯  |       | 欧前胡素   |       |
|-------------|----------------------------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|
|             |                            | 相对保留时间 | RSD/% | 相对保留时间 | RSD/% | 相对保留时间 | RSD/% |
| 色谱仪         | Waters H-Class             | 0.555  | 2.41  | 0.788  | 0.46  | 0.959  | 0.49  |
|             | Agilent 1290               | 0.555  |       | 0.781  |       | 0.961  |       |
|             | Thermo Vanquish            | 0.560  |       | 0.786  |       | 0.968  |       |
| 色谱柱         | YMC Trait C <sub>18</sub>  | 0.555  | 2.08  | 0.788  | 0.61  | 0.959  | 0     |
|             | Waters BEH C <sub>18</sub> | 0.556  |       | 0.797  |       | 0.959  |       |
|             | Agilent SB C <sub>18</sub> | 0.538  |       | 0.789  |       | 0.959  |       |
| 柱温/℃        | 28                         | 0.559  | 2.21  | 0.776  | 1.46  | 0.959  | 0.06  |
|             | 30                         | 0.535  |       | 0.788  |       | 0.959  |       |
|             | 32                         | 0.545  |       | 0.799  |       | 0.958  |       |
| 流速/(mL/min) | 0.18                       | 0.570  | 1.36  | 0.806  | 2.35  | 0.958  | 0.06  |
|             | 0.20                       | 0.555  |       | 0.788  |       | 0.959  |       |
|             | 0.22                       | 0.560  |       | 0.769  |       | 0.958  |       |

2.5.10 含量测定 取21批蛇床子药材粉末,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。采用外标法计算其中蛇床子素、花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素的含量;以蛇床子素为内参物,采用一测多评法计算花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素的含量,并计算两种测定法的相对偏差,结果见表8。结果显示,两种方法测定的花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素含量的相对偏差[(A-B)/(A+B)×100%,式中A表示外标法结果,B表示一测多评法结果]分别在0.88%~1.07%、2.22%~2.29%、0.67%~2.93%范围内,均小于3.0%,表明一测多评法与外标法测得的含量结果无明显差异,一测多评法的结果可靠性高。

表8 21批蛇床子药材中蛇床子素等4种成分的含量测定结果

| 编号  | 蛇床子素含量/(mg/g) | 花椒毒素含量/(mg/g) |       |        | 佛手柑内酯含量/(mg/g) |       |        | 欧前胡素含量/(mg/g) |        |        | 总含量/(mg/g) |        |        |
|-----|---------------|---------------|-------|--------|----------------|-------|--------|---------------|--------|--------|------------|--------|--------|
|     |               | 外标法           | 一测多评法 | 相对偏差/% | 外标法            | 一测多评法 | 相对偏差/% | 外标法           | 一测多评法  | 相对偏差/% | 外标法        | 一测多评法  | 相对偏差/% |
| S1  | 35.039        | 2.507         | 2.456 | 1.03   | 1.530          | 1.462 | 2.27   | 11.801        | 11.374 | 1.84   | 50.877     | 50.331 | 0.54   |
| S2  | 33.091        | 2.317         | 2.271 | 1.00   | 1.418          | 1.355 | 2.27   | 11.069        | 10.667 | 1.85   | 47.895     | 47.384 | 0.54   |
| S3  | 32.793        | 2.309         | 2.263 | 1.01   | 1.422          | 1.359 | 2.27   | 10.922        | 10.538 | 1.79   | 47.446     | 46.953 | 0.52   |
| S4  | 26.325        | 1.298         | 1.272 | 1.01   | 1.770          | 1.692 | 2.25   | 9.663         | 9.362  | 1.58   | 39.056     | 38.651 | 0.52   |
| S5  | 22.014        | 1.109         | 1.087 | 1.00   | 1.097          | 1.049 | 2.24   | 9.047         | 8.806  | 1.35   | 33.267     | 32.956 | 0.47   |
| S6  | 22.570        | 1.068         | 1.047 | 0.99   | 1.319          | 1.260 | 2.29   | 7.588         | 7.360  | 1.53   | 32.545     | 32.237 | 0.48   |
| S7  | 31.089        | 1.496         | 1.466 | 1.01   | 1.520          | 1.453 | 2.25   | 7.694         | 7.408  | 1.89   | 41.799     | 41.416 | 0.46   |
| S8  | 18.189        | 0.506         | 0.496 | 1.00   | 1.168          | 1.117 | 2.23   | 4.463         | 4.281  | 2.08   | 24.326     | 24.083 | 0.50   |
| S9  | 24.872        | 1.644         | 1.611 | 1.01   | 1.065          | 1.018 | 2.26   | 9.024         | 8.657  | 2.08   | 36.605     | 36.158 | 0.61   |
| S10 | 17.256        | 0.495         | 0.486 | 0.92   | 1.103          | 1.054 | 2.27   | 9.047         | 8.806  | 1.35   | 27.901     | 27.602 | 0.54   |
| S11 | 21.271        | 0.830         | 0.814 | 0.97   | 1.383          | 1.322 | 2.26   | 11.135        | 10.766 | 1.68   | 34.619     | 34.173 | 0.65   |
| S12 | 30.795        | 1.490         | 1.460 | 1.02   | 1.864          | 1.782 | 2.25   | 9.258         | 9.087  | 0.93   | 43.407     | 43.124 | 0.33   |
| S13 | 14.158        | 0.297         | 0.291 | 1.02   | 1.061          | 1.014 | 2.27   | 9.776         | 9.417  | 1.87   | 25.292     | 24.880 | 0.82   |
| S14 | 16.545        | 0.228         | 0.224 | 0.88   | 1.149          | 1.099 | 2.22   | 4.790         | 4.687  | 1.09   | 22.712     | 22.555 | 0.35   |
| S15 | 26.964        | 1.490         | 1.460 | 1.02   | 1.162          | 1.110 | 2.29   | 13.217        | 12.786 | 1.66   | 42.833     | 42.320 | 0.60   |
| S16 | 41.388        | 3.813         | 3.737 | 1.01   | 1.758          | 1.680 | 2.27   | 5.847         | 5.514  | 2.93   | 52.806     | 52.319 | 0.46   |
| S17 | 28.191        | 2.205         | 2.161 | 1.01   | 1.447          | 1.383 | 2.26   | 5.987         | 5.907  | 0.67   | 37.830     | 37.642 | 0.25   |
| S18 | 25.820        | 1.131         | 1.108 | 1.03   | 0.928          | 0.887 | 2.26   | 12.426        | 11.984 | 1.81   | 40.305     | 39.799 | 0.63   |
| S19 | 18.706        | 0.895         | 0.877 | 1.02   | 2.765          | 2.645 | 2.22   | 5.821         | 6.115  | 2.46   | 28.187     | 28.343 | 0.28   |
| S20 | 19.078        | 0.897         | 0.878 | 1.07   | 2.803          | 2.681 | 2.22   | 5.942         | 6.203  | 2.15   | 28.720     | 28.840 | 0.21   |
| S21 | 19.189        | 0.920         | 0.902 | 0.99   | 2.842          | 2.715 | 2.29   | 6.028         | 5.820  | 1.76   | 28.979     | 28.626 | 0.61   |

### 3 讨论

#### 3.1 色谱条件选择

本研究采用超高效液相色谱法构建蛇床子药材指纹图谱,并对其中4种成分进行含量测定。与传统的高效液相色谱法相比,超高效液相色谱法分辨率更高、分析能力更强、分析时间更短,同时减少了溶剂用量,降低了分析成本<sup>[10]</sup>。本研究前期分别对色谱柱、流动相体系、检测波长、柱温等进行了考察,结果显示,在色谱柱为YMC Trait C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)、流动相为甲醇-水(梯度洗脱)、流速为0.20 mL/min、检测波长为248 nm(指纹图谱检测波长为310 nm)、柱温为30 ℃的色谱条件下,蛇床子药材色谱图的整体基线平稳,各色谱峰分离效果良好且方法重复性良好。

#### 3.2 供试品溶液制备方法考察

本课题组以花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素和蛇床子素的含量以及各色谱峰“峰面积/称样量”为评价指标,考察了不同体积分数甲醇、乙醇对蛇床子中花椒毒素、佛手柑内酯、欧前胡素、蛇床子素提取效率的影响。结果显示,当提取溶剂为80%甲醇时,各待测成分色谱峰响应值高、基线平稳,提取效果最好,且色谱信息丰富。另外,本课题组还对超声提取和加热回流的提取效率进行了考察,发现两者的提取效率没有明显差别,故为了操作更加简便,本研究选择超声提取。同时,本课题组进一步对样品提取时间、料液比进行了考察,结果显示,超声提取30 min已能够将样品提取完全;当料液比为0.3:20(g/mL)时,4种待测成分均已被完全提取。通过上述考察,本课题组最终确定最优供试品溶液制备方法如下:料液比为0.3:20(g/mL),80%甲醇超声提取30 min。

#### 3.3 指纹图谱分析

本研究基于21批蛇床子药材的超高效液相色谱叠加指纹图谱,采用平均数法建立了其对照指纹图谱,并确认了10个共有峰。相似度评价结果显示,产自山东省日照市(编号S7)和河南省南阳市(编号S14)蛇床子药材样品的图谱与对照指纹图谱的相似度小于0.999,其余批次蛇床子药材样品的相似度均不小于0.999。笔者发现,S7与其余20批样品的差异主要表现在峰1的峰高或峰面积较其他批次大;而S14主要表现在峰4的峰高或峰面积较其他批次小,这可能与药材生长的环境、采收时间及产地加工方式等的差异有关。总体而言,21批蛇床子药材的相似度均在0.99以上,说明21批蛇床子药材指纹图谱相似度较高,质量比较稳定;指纹图谱的相似度评价结果可以作为药材质量标准制定的依据。

#### 3.4 含量测定分析

香豆素类成分为蛇床子药材的主要活性成分<sup>[3]</sup>,为了进一步明确不同产地蛇床子中活性成分的差异,严格控制临床用蛇床子的质量,很有必要对蛇床子中所含香豆素类成分进行含量测定。而香豆素类成分容易受地

域温度、降雨量和日照时长的影响<sup>[4]</sup>。本研究对21批产自7个产地的蛇床子药材进行含量测定,结果显示,21批蛇床子药材均符合2020年版《中国药典》规定——蛇床子药材蛇床子素的含量不少于1.0%(即10 mg/g)<sup>[11]</sup>;4种香豆素类成分的总含量在22.712~52.806 mg/g(外标法)之间,总含量按产地排序由高至低依次为江苏省徐州市>湖北省宜昌市>山东省滨州市>江苏省盐城市>山东省日照市>河南省南阳市>黑龙江省哈尔滨市。这可能是由于南方地区的温度、降雨量和日照时间总体上更有利于蛇床子的生长和香豆素类成分的富集<sup>[4]</sup>。但是,对于某些特殊类型的香豆素,北方天气可能更利于其富集,如黑龙江省哈尔滨市蛇床子药材中佛手柑内酯的含量明显高于其他产地。

综上所述,本研究利用超高效液相色谱法建立了蛇床子药材的指纹图谱,并建立了测定4种香豆素类成分的一测多评法,实现了对蛇床子中蛇床子素、佛手柑内酯、花椒毒素、欧前胡素含量的控制,为蛇床子药材质量标准的提升提供了参考。

#### 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社2020:328-329.
- [2] 伍冠一,曾曼桐,吉玉芳,等.蛇床子本草考证[J].中国民族民间医药,2017,26(4):72-75.
- [3] 田斌,瞿孝兰,林义平,等.蛇床子化学成分及药理作用研究进展[J].中药与临床,2020,11(1):70-73,80.
- [4] 李义敏.蛇床果实香豆素类化学成分的生态地理分布及其形成机理[D].上海:第二军医大学,2016:44-57.
- [5] 宋宜蕾,侯雪芹,郝吉福.蛇床子现代药理学作用及临床应用的研究进展[J].神经药理学报,2019,9(6):58-63.
- [6] 李昱.关于蛇床子的化学成分与药理作用研究进展[J/OL].全科口腔医学电子杂志,2019,6(26):22-23[2021-06-17]. [https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST2019&filename=QKKQ2019-26013&uniplatform=NZKPT&v=okDA05iAQCTvwh\\_VmDQBdsNU8AJuCWKy187cTs8DvFoPJMSGTfQRgI7bya-5p0w15](https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&dbname=CJFDLAST2019&filename=QKKQ2019-26013&uniplatform=NZKPT&v=okDA05iAQCTvwh_VmDQBdsNU8AJuCWKy187cTs8DvFoPJMSGTfQRgI7bya-5p0w15).
- [7] 沃小敏,伍冠一,王海霞.蛇床子防治骨质疏松的研究概况[J].中国民族民间医药,2018,27(20):34-38.
- [8] 王倩,郑海雅,周颖,等.蛇床子素对TRAIL抗乳腺癌活性的影响及其作用机制[J].中国现代应用药学,2016,33(9):1141-1147.
- [9] 魏良兵,单莉,高家荣,等.一测多评结合指纹图谱法在中药质量控制中的研究进展[J].中国基层医药,2018,25(9):1220-1224.
- [10] 鲁珍娥,聂娟,鲁彩彩,等.高效液相色谱法在药品检验中的应用和效果[J].生物化工,2020,6(6):170-172.

(收稿日期:2021-06-27 修回日期:2021-12-16)

(编辑:邹丽娟)