

用甲醇 - 水 = 8: 2 (V/V)洗脱 40 min,最后继用甲醇 - 醋酸乙酯 = 7: 3 (V/V)洗脱 120 min. 实验结果表明, 60 min后出峰数量并未增多. 改用 0.5 的  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  溶液洗脱 15 min,继用甲醇 - 水 = 8: 2 (V/V)洗脱 40 min,结果发现共有峰的数量反而减少了. 造成以上结果的原因,可能是本实验的分析对象是水溶性的极性成分,提取液中弱极性和非极性成分的含量很低,因此 60 min后峰数量并未增多. 用甲醇 - 水 = 8: 2 (V/V)洗脱出峰数量减少,说明分离度不好,改变甲醇和水的比例并未提高分离度. 因此本文确定用以 0.5 的  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  溶液为流动相进行等度洗脱.

4.3 在其它条件不变的情况下,分别考察了在检测波长为 254 nm, 214 nm, 210 nm 时的出峰情况,结果在 254 nm 时色谱峰较少,在 210 nm 和 214 nm 时色谱峰相同,但在 214 nm 时的灵敏度较高,故选择检测波长为 214 nm.

4.4 包括处方药在内的 8 个样品中,色谱仪检出的每个样品的出峰总数约 40 个左右,而相当一部分峰的面积很小,不足以作为评价指标. 其余的非共有峰虽然峰面积较大,但却不稳定,相对峰面积和相对保留时间波动性很大,说明这些成分在不同样品中的不确定性,进而也说明原药材的来源有一定的差异性.

致谢: 本文得到康丽莲老师的热心指导,化学与材料科学学院实验教学中心提供了高效液相色谱仪. 特此致谢!

#### 参考文献:

- [1] 江 俊. 中药质量评价新方法-中药指纹图谱 [J]. 湖北中医药大学学报, 2001, 3(4): 11.
- [2] 谢培山. 中药指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 653-655.
- [3] 洪筱坤, 王智华. 色谱指纹谱在中药质量标准研究中的应用 [J]. 中成药, 2001, 23(3): 157-159.
- [4] 屠鹏飞. 高效液相色谱法制定中药材和中药注射剂特征指纹图谱的探讨 [J]. 中成药, 2000, 22(7): 516.
- [5] 王嗣岑, 朱丽华, 贺浪冲. 川芎药材活性部位的高效液相色谱指纹图谱定性分析方法 [J]. 西安交通大学学报, 2003, 24(3): 221-223.
- [6] 汤树良, 杨 滨, 罗永明, 等. 山楂高效液相指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(4): 9-13.
- [7] 曾 志, 杨东晖, 宋立飞, 等. 高效液相色谱指纹图谱应用于板蓝根的鉴定 [J]. 分析化学, 2002, 30(7): 849-852.
- [8] 中国药典 2005年版一部 [S]. 2005: 537.

## 抱茎獐牙菜提取物的 HPLC 指纹图谱研究

周剑波<sup>1,2</sup>, 蒋福全<sup>1,2</sup>, 赵晓辉<sup>1,2</sup>, 文怀秀<sup>1,2</sup>, 邵 翥<sup>1</sup>, 陶燕铎<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

关键词: 抱茎獐牙菜; 提取物; HPLC; 指纹图谱

摘要: 目的: 用高效液相色谱法建立抱茎獐牙菜乙醇提取物的指纹图谱分析方法. 方法: 采用 Phenomenex Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 甲醇 - 0.1 磷酸为流动相, 线性梯度洗脱, 检测波长为 260 nm. 结果: 共有 20 个共有峰. 结论: 此方法准确、重复性好, 为有效地控制抱茎獐牙菜药材提取物的质量提供了科学的依据.

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2007)04-0473-03

## Fingerprint of *Swertia franchetiana* extracts by HPLC

ZHOU Jian-bo<sup>1,2</sup>, JIANG Fu-quan<sup>1,2</sup>, ZHAO Xiao-hui<sup>1,2</sup>, WEN Huai-xiu<sup>1,2</sup>, SHAO Yun<sup>1</sup>, TAO Yan-duo<sup>1\*</sup>

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

KEY WORDS: *Swertia franchetiana* extracts; fingerprint chromatogram; HPLC

ABSTRACT: AM: To establish the HPLC-FPC of *Swertia franchetiana* extracts METHODS: Based on

收稿日期: 2006-01-12

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目 (CXLY-2002-9).

作者简介: 周剑波 (1979 ~), 男, 硕士生, 电话: 0971-6117264, E-mail: zbjianbo@163.com.

\*通讯作者: 陶燕铎.

Phenomenex Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) column, methanol - 0.1 phosphate acid was used as the mobile phase, and gradient elution program was applied. The detection wavelength was at 260 nm. **RESULTS:** 20 peaks were gained on HPLC fingerprint. **CONCLUSION:** This method is simple and accurate with a good reproducibility and can be used as a quality control method for *Swertia franchetiana* extracts.

抱茎獐牙菜 (*Swertia franchetiana* h. smith), 为龙胆科 (*Gentianaceae*) 獐牙菜属 (*Swertia*) 植物, 是藏族民间习用的草药, 主治肝炎等肝胆系统疾病<sup>[1]</sup>, 主要分布于青藏高原, 是中医临床常用中药。近年来, 国内外有关抱茎獐牙菜的化学成分<sup>[2]</sup>、药理、药效、临床应用<sup>[3]</sup>等已有较多报道, 对其药材提取物的提取工艺研究<sup>[4]</sup>也有了相关报道, 但对抱茎獐牙菜提取物的质量控制研究较少。用 UV-VIS 法检测植物提取物中功效成分存在一些缺陷, 如准确度受杂质影响、不能够鉴定是否是该植物提取物、是否含有添加的化学合成成分以及重现性差等<sup>[5]</sup>。与传统检测几个指标成分的单一质量控制相比, 色谱指纹图谱是国际公认的控制中药或天然药物质量最有效的方法之一, 它可以较全面的反映多种成分在天然药物中的分布。本试验通过对抱茎獐牙菜提取物的 HPLC 分析, 建立了抱茎獐牙菜提取物的 HPLC 指纹图谱质量控制技术。

## 1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 液相色谱仪 (含在线真空脱气机, 低压四元梯度泵, 手动进样器, 柱温箱, DAD 检测器), Agilent 化学工作站, 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (国家药典委员会, 2004A 版, KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声波仪器有限公司), 电子分析天平 (梅特勒公司)。

1.2 试剂 甲醇为色谱纯 (山东禹王化工厂), 水为重蒸水, 其它试剂均为分析纯。獐芽菜苦苷对照品 (批号: 110770-200308)、齐墩果酸对照品 (批号: 110756-200110)、熊果酸对照品 (批号: 110796-200309), 以上对照品购自中国药品生物制品检定所。10 批抱茎獐牙菜提取物由本实验室根据优化工艺制得。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomenex Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 采用梯度洗脱, A 相为甲醇, B 相为 0.1 的 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 磷酸缓冲液; 流速: 1.0 mL/min, DAD 检测器, 柱温 30。线性梯度洗脱程序见表 1, 运行时间 55 min, 两次进样之间用流动相初始梯度条件平衡 15 min。采用二极管阵列检测器对检测波长进行了考察, 分别记录波长在

表 1 线性梯度洗脱程序

梯度 / t/min	流速 / mL/min	A / 甲醇	B / 0.1 H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 缓冲液
0	1.0	20	80
20	1.0	60	40
50	1.0	85	15
55	1.0	100	0

220, 240, 260, 280, 300 nm 的色谱图。结果在 260 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收, 色谱信息最为丰富, 并且分离度好, 可使主要色谱峰达到基线分离, 分离效果较好。

### 2.2 样品与对照品溶液的制备

2.2.1 提取物的制备 根据正交实验, 确定的最佳提取工艺为抱茎獐牙菜药材粗粉加 8 倍量 70 的乙醇, 回流提取两次, 每次 2 h, 合并提取液离心, 浓缩干燥后即得。

2.2.2 样品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的抱茎獐牙菜提取物粉末 10 mg, 加甲醇超声溶解, 定容至 25 mL, 过 0.45 μm 的微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取獐芽菜苦苷、齐墩果酸和熊果酸对照品 5 mg, 加甲醇超声溶解, 定容至 50 mL, 制成浓度各为 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液, 过 0.45 μm 的微孔滤膜后作为供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 分别精密吸取同一供试品溶液 10 μL, 按上述色谱条件连续进样 5 次, 记录指纹图谱。以獐芽菜苦苷色谱峰 (指纹图谱中为 2 号峰) 为参照峰, 计算各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和相对峰面积稳定, RSD < 3, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 按样品溶液制备方法处理同一样品 5 份, 各吸取 10 μL, 按上述色谱条件分别测定, 记录指纹图谱。以獐芽菜苦苷色谱峰 (指纹图谱中为 2 号峰) 为参照峰, 计算各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和相对峰面积稳定, RSD < 3, 表明实验方法的重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 10, 24 h 按上述色谱条件测定, 记录指纹图谱。以獐芽菜苦苷色谱峰 (指纹图谱中为 2 号峰) 为参照峰, 计算各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和相对峰面积稳定, RSD < 3, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 抱茎獐牙菜提取物指纹图谱的测定及参数 分别精密吸取对照品溶液及 10 批供试品溶液各 10 μL 按前述色谱条件进样, 记录指纹图谱 (见图 1、图 2、图 3), 通过指纹图谱相似性评价软件 (中药色谱指纹图谱相似度评价系统, 2004A 版) 分析, 确定了 20 个共有峰, 其中 2、19、20 号峰分别为獐芽菜苦苷、齐墩果酸、熊果酸, 选取分离度好, 峰形较为稳定的 2 号峰为参照峰。计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积值 (分别见表 2、表 3)。其中单峰面积与总峰面积的比值大于 10 的共有峰有 2、4、9、16 号峰, 其相对保留时间分别为 1.000、1.186、1.866、3.937。10 批样品中, 非共有峰

面积按峰面积归一化计算小于 10, 考虑到溶剂峰的影响, 共有峰均为在样品中含量较少不稳定的峰。出峰时间靠前的极性较大的色谱峰没有列为共有峰, 其余非

表 2 10批抱茎獐牙菜提取物指纹图谱共有峰的相对保留时间

峰号 Peak No	批号 (Batch No.)										平均	RSD /
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.858	0.857	0.858	0.859	0.856	0.857	0.858	0.856	0.858	0.856	0.857	0.124
2 (s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
3	1.125	1.126	1.127	1.126	1.126	1.128	1.126	1.127	1.126	1.128	1.127	0.086
4	1.185	1.187	1.185	1.188	1.185	1.186	1.185	1.187	1.185	1.186	1.186	0.093
5	1.484	1.486	1.485	1.484	1.485	1.484	1.486	1.487	1.485	1.486	1.485	0.070
6	1.575	1.577	1.576	1.578	1.575	1.576	1.575	1.577	1.578	1.575	1.576	0.078
7	1.716	1.715	1.716	1.717	1.715	1.716	1.715	1.717	1.716	1.715	1.716	0.046
8	1.762	1.760	1.761	1.761	1.760	1.760	1.762	1.760	1.761	1.760	1.761	0.047
9	1.866	1.865	1.864	1.867	1.868	1.867	1.865	1.867	1.866	1.868	1.866	0.072
10	2.151	2.149	2.152	2.151	2.152	2.151	2.152	2.150	2.149	2.152	2.151	0.056
11	2.374	2.375	2.374	2.376	2.374	2.373	2.374	2.375	2.374	2.376	2.375	0.041
12	2.677	2.678	2.677	2.678	2.675	2.676	2.677	2.675	2.676	2.678	2.677	0.043
13	3.022	3.024	3.022	3.024	3.022	3.025	3.024	3.026	3.023	3.025	3.024	0.044
14	3.150	3.151	3.150	3.153	3.150	3.152	3.150	3.153	3.152	3.153	3.151	0.043
15	3.215	3.217	3.216	3.217	3.218	3.217	3.216	3.218	3.215	3.216	3.217	0.034
16	3.937	3.938	3.937	3.939	3.938	3.937	3.935	3.937	3.938	3.937	3.937	0.027
17	4.061	4.060	4.062	4.060	4.061	4.060	4.062	4.061	4.060	4.061	4.061	0.019
18	4.392	4.390	4.393	4.392	4.391	4.390	4.392	4.390	4.391	4.390	4.391	0.025
19	4.935	4.937	4.938	4.937	4.936	4.938	4.937	4.936	4.935	4.937	4.937	0.022
20	5.016	5.015	5.017	5.015	5.018	5.16	5.014	5.016	5.018	5.017	5.016	0.026

表 3 10批抱茎獐牙菜提取物提取物指纹图谱共有峰相对峰面积

峰号 Peak No	批号 (Batch No.)										平均	RSD /
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.077	0.078	0.077	0.076	0.078	0.076	0.077	0.078	0.079	0.078	0.077	0.942
2 (s)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
3	0.103	0.104	0.105	0.106	0.104	0.104	0.105	0.105	0.104	0.104	0.104	0.661
4	0.336	0.336	0.338	0.337	0.337	0.336	0.336	0.338	0.337	0.337	0.337	0.232
5	0.139	0.140	0.140	0.141	0.138	0.139	0.140	0.138	0.139	0.139	0.139	0.586
6	0.050	0.050	0.051	0.052	0.051	0.052	0.051	0.052	0.051	0.052	0.051	0.129
7	0.070	0.071	0.070	0.069	0.071	0.070	0.069	0.068	0.069	0.068	0.070	0.067
8	0.077	0.078	0.077	0.078	0.079	0.078	0.078	0.077	0.079	0.077	0.078	0.982
9	0.270	0.271	0.270	0.270	0.269	0.269	0.270	0.269	0.271	0.269	0.270	0.240
10	0.152	0.153	0.154	0.152	0.153	0.153	0.152	0.153	0.155	0.153	0.153	0.456
11	0.130	0.129	0.130	0.129	0.131	0.129	0.129	0.131	0.129	0.128	0.130	0.571
12	0.054	0.054	0.055	0.054	0.053	0.053	0.054	0.055	0.054	0.053	0.054	0.850
13	0.101	0.101	0.102	0.100	0.101	0.100	0.102	0.100	0.101	0.102	0.101	0.660
14	0.122	0.122	0.121	0.122	0.123	0.122	0.123	0.124	0.123	0.123	0.123	0.691
15	0.143	0.144	0.143	0.143	0.145	0.144	0.142	0.143	0.143	0.143	0.143	0.573
16	0.446	0.446	0.447	0.445	0.446	0.446	0.445	0.446	0.447	0.446	0.446	0.325
17	0.199	0.198	0.200	0.198	0.200	0.198	0.199	0.198	0.198	0.199	0.199	0.384
18	0.041	0.040	0.041	0.041	0.041	0.041	0.042	0.040	0.039	0.042	0.041	0.870
19	0.138	0.139	0.139	0.140	0.138	0.139	0.140	0.139	0.138	0.140	0.139	0.459
20	0.032	0.033	0.033	0.033	0.032	0.032	0.033	0.032	0.033	0.032	0.033	0.084

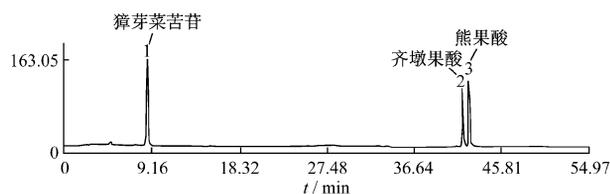


图 1 獐芽菜苦苷、齐墩果酸与熊果酸对照品色谱图  
1. 獐芽菜苦苷 2. 齐墩果酸 3. 熊果酸

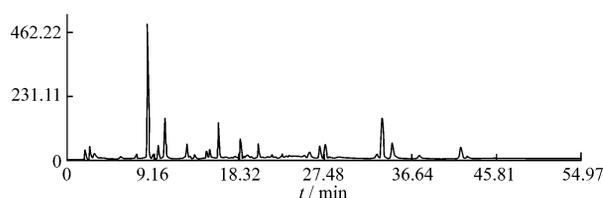


图 2 代表性样品色谱图(对照样品)

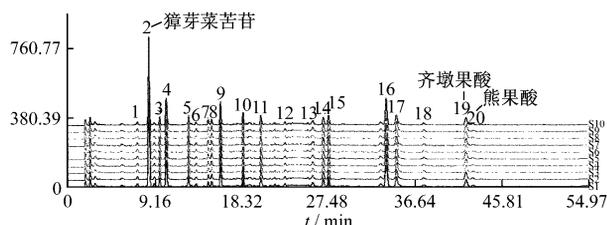


图 3 10批抱茎獐芽菜提取物的匹配色谱图

2.5 相似度计算 将实验数据导入指纹图谱相似度评价软件(中药色谱指纹图谱相似度评价系统,2004A版),经自动匹配,生成对照图谱(图2),各样品与对照色谱图相比较,采用夹角余弦法计算相似度,进行整体相似度评价。通过相似度分析发现,10批样品的相似度均在95以上(见表4),平均为97.88,表明样品相似性良好。

表 4 与对照图谱相比较 10批抱茎獐芽菜提取物的相似度

批号	相似度	批号	相似度
1	0.971	6	0.989
2	0.982	7	0.982
3	0.967	8	0.974
4	0.977	9	0.985
5	0.982	10	0.979

### 3 讨论

3.1 按照国家药典委员会关于“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)通知”,以HPLC梯度洗脱法对抱茎獐芽菜提取物进行了指纹图谱研究,实验证明,该方法可操作性强、重复性好,可作为抱茎獐芽菜提取物及其为主成分制剂的指纹图谱研究基础。

3.2 采用十八烷基硅烷键合硅胶为固定相的反相柱,对甲醇-水、甲醇-0.1磷酸水等体系进行考察,结果以甲醇-0.1磷酸水体系得到的色谱峰形以及分离度较好,比较了190~400nm波长下的色谱图,结果260nm波长时色谱峰信息较多,分离情况良好;考察了不同柱温、不同流速等条件对色谱分离的影响,结果以柱温30℃,流速1mL/min为佳,采用本方法可使主要色谱峰在50min内达到很好的分离,且同时分析了獐芽菜苦苷、齐墩果酸、熊果酸3个指标成分,这使提取物的指纹图谱分析效率大大提高。

3.3 在这10批样品中共有峰的重复性良好,考虑到溶剂峰的影响,除去前面极性大的色谱峰及含量较少不太稳定的峰没有列为共有峰外,按峰面积归一化计算,共有峰的峰面积占了总峰面积的85%以上。通过本方法分析10批抱茎獐芽菜提取物,经指纹图谱相似度软件分析,相似度均在95%以上,所建立的方法精密度、稳定性和重复性符合指纹图谱研究的技术要求,为抱茎獐芽菜提取物及其制剂的质量控制提供了科学依据。

### 参考文献:

- [1] 杨永昌.藏药志[M].青海:青海人民出版社,1992.111-112.
- [2] 杨慧玲,刘健全.9种“藏茵陈”原植物中的7种有效化学成分研究[J].中草药,2005,36(8):1233-1237.
- [3] 苏海疾,王慧芬,李捍卫,等.藏茵陈对肝脏慢性炎症治疗作用的观察[J].传染病信息,2003,16(3):132-133.
- [4] 张海满,董新燕,郭得忠.藏茵陈有效成分提取工艺的实验研究[J].青海科技,2003,10(3):31-32.
- [5] 邵云东,高文远,刘丹,等.植物提取物的质量控制[J].中国中药杂志,2003,28(10):899.

## GC法分析药用百合和食用百合的区别

胡敏敏, 蔡宝昌, 张志杰

(1. 南京中医药大学,江苏 南京 210029)

关键词:药用百合;食用百合;GC;豆甾醇

摘要:目的:比较药用百合和食用百合的区别。方法:以豆甾醇为指标性成分,通过GC法测定其在药用百合和食用百合中的含量,同时进行豆甾醇的药理活性研究。结果:因豆甾醇具有抗炎、止咳的作用,可代表百合的主要功效,选作为指标性成分。药用百合与食用百合中的豆甾醇含量差异显著,药用百合中的豆甾醇含量明显高于食用百合。结论:食用百合不可以作为药用百合应用于临床。

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-1528(2007)04-0476-04

## The difference between medicinal and edible *Lilium brownii* by GC analysis

HU Min-min, CAI Bao-chang, ZHANG Zhi-jie

收稿日期:2006-05-17

基金项目:国家科技部“十五”攻关科技专项(2001BA701A55-36)。

作者简介:胡敏敏(1981~),女,硕士生,从事中药质量控制,电话:025-86798281, E-mail: minmin1981cn@yahoo.com.cn.