

剂的硬度对药物的释放速度影响较小。

#### References:

- [1] Liu Q, Zhou L L, Li R. The research review of sinomenine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(4): 247-249.
- [2] Mosquera M J, Cuna M, Souto C, *et al.* Effects of hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) moisture content on hydrochlorothiazide release from HPMC-based tablets [J]. *Int J*

*Pharm*, 1996, 135(2): 147-149.

- [3] Panomsuk S P, Hatanaka T, Aiba T, *et al.* A study of the hydrophilic cellulose matrix: effect of indomethacin and a water-soluble additive on swelling properties [J]. *Int J Pharm*, 1995, 126(1-2): 147-153.
- [4] Campos A, Maria E, Villafuerte R, *et al.* Influence of the viscosity grade and the particle size of HPMC on metronidazole release from matrix tablets [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1997, 43(2): 173-178.

## 密花石斛的 HPLC/UV/MS 指纹图谱研究

张尊建<sup>1</sup>, 王源园<sup>1</sup>, 李 茜<sup>1</sup>, 王兴旺<sup>2</sup>, 徐向阳<sup>2</sup>, 张 蕙<sup>2\*</sup>

(1. 中国药科大学 分析测试中心, 江苏 南京, 210009;

2. 金陵药业股份有限公司 技术中心, 江苏 南京, 210009)

**摘要:** 目的 采用 HPLC/UV/MS 法对密花石斛进行指纹图谱研究。方法 采用 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱; 甲醇和水为流动相进行梯度洗脱; 流速为 1.0 mL/min。结果 得到分离度较好的密花石斛 HPLC/UV 指纹图谱, 标示了 9 个共有峰, 并用 HPLC/MS 对其部分色谱峰进行了初步定性。结论 该方法可用于密花石斛指纹图谱的测定, 并为其全面质量控制提供参考。

**关键词:** 密花石斛; 指纹图谱; HPLC/UV/MS

中图分类号: R286.6; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)04-0393-03

### Studies on fingerprints of *Dendrobium densiflorum* by HPLC/UV/MS

ZHANG Zun-jian<sup>1</sup>, WANG Yuan-yuan<sup>1</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, WANG Xing-wang<sup>2</sup>, XU Xiang-yang<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>

(1. The Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Technical Center, Jinling Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210009, China)

**Abstract:** **Object** To establish a method for studying the fingerprints of *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall. by HPLC/UV/MS. **Methods** Separation was performed on Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> column. Gradient elute was performed by the mobile phase consisting of methanol and water with the flow rate of 1.0 mL/min. **Results** Perfect fingerprints were obtained by HPLC/UV which can be used for the evaluation of *D. densiflorum*. Nine common peaks in the fingerprints were confirmed, and qualitative analysis of some other peaks were carried on by HPLC/MS. **Conclusion** The method can be applied to the quality control and studying on the chemical constituents of *D. densiflorum* crude drug.

**Key words:** *Dendrobium densiflorum* Lindl. ex Wall.; fingerprints; HPLC/UV/MS

石斛属植物全世界约 1 000 种, 广泛分布于亚洲热带、亚热带地区及大洋洲。我国有 74 个种和 2 个变种, 主产秦岭以南诸省区, 尤以云南南部为多<sup>[1]</sup>, 是一类常用中药材, 历代本草均有收载。《中华人民共和国药典》2000 年版收载了 5 种, 即环草石斛 *Dendrobium loddigesii* Rolfe、马鞭石斛 *D. fimbriatum* Hook. var. *oculatum* Hook.、黄草石斛 *D. chrysanthum* Wall.、铁皮石斛 *D. candidum* Wall. ex Lindl. 和金钗石斛 *D. nobile* Lindl.。长期以来, 由于过量采挖, 导致资源十分紧缺, 供不应求。密花

石斛 *D. densiflorum* Lindl. ex Wall. 为兰科石斛属植物, 在我国主要分布于广东、海南、广西等地, 具有滋阴清热、益胃生津的功效, 已成为石斛的主要代用品之一, 被《贵州省中药材标准》(1988 版) 和《江苏省中药材标准》(1998 版) 收载。近年来, 中药指纹图谱正逐步成为控制中药及其制剂质量的手段之一。目前有关密花石斛指纹图谱的研究尚未见报道, 本实验利用 HPLC/MS 技术对其部分成分进行了初步定性, 为其质量控制提供参考。

#### 1 仪器与试剂

\* 收稿日期: 2003-06-23

作者简介: 张尊建(1960—), 博士, 副教授, 中国药科大学分析测试中心主任, 主要从事药物(中药)现代仪器分析研究。

Tel: (025) 83271454 E-mail: zjzhang99@sina.com

Agilent 1100 LC/DAD 系统, 含在线真空脱气机, 低压四元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器 (DAD), HP Chemstation 色谱工作站; Agilent 1100 LC/DAD/MS 系统, 含在线真空脱气机, 高压二元梯度泵, 恒温自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器 (DAD)、电喷雾 (ES) 接口。

甲醇 (Merck, 色谱纯), 氯仿 (分析纯), 双蒸水, 滨蒿内酯对照品 (金陵药业股份有限公司提供, 批号 1511-200001, 纯度 > 99.0%), 密花石斛采自云南思茅云南金陵植物药业股份有限公司石斛 GAP 种植基地, 经中国药科大学中药学院徐璐珊教授鉴定为密花石斛 *D. densiflorum* Lindl. ex Wall.。

## 2 方法

2.1 供试品溶液的制备: 参照《中华人民共和国药典》2000 年版一部附录药材取样方法, 取密花石斛药材, 粉碎, 过 40 目筛。取粉末 2.0 g, 10% 氨水润湿, 置索氏提取器中, 加氯仿 60 mL, 水浴回流 4 h, 冷却。提取液水浴挥干, 冷却, 加 50% 甲醇 5 mL 溶解, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后作为供试品溶液。

2.2 参照物溶液的制备: 取滨蒿内酯对照品适量, 用 50% 甲醇溶解, 制成 100 μg/mL 滨蒿内酯溶液作为参照物溶液。

2.3 色谱条件: 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A)–水 (B), 梯度洗脱条件: 0~5 min A (35%), 55 min A (80%), 60 min A (80%); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 300 nm; 柱温: 25 °C; 柱后分流 0.4 mL/min 进质谱仪; 同时记录总离子流 (TIC) 色谱图。扫描范围: 100~1 000; 干燥气流速: 10 L/min; 干燥气温度: 250 °C; 雾化室压: 276 kPa; 毛细管电压: 4 000 V; 传输电压: 70 V; 进样量: 20 μL。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验: 取同一供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 12, 24 h 进样检测, 各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 均小于 0.88%, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.4.2 精密性试验: 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 均小于 0.21%, 表明精密性良好。

2.4.3 重现性试验: 取同一批药材, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液 6 份, 分别进样检测, 各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 均小于 2.23%, 表明方法的重现性良好。

2.5 指纹图谱: 密花石斛药材的 HPLC/UV 指纹

图谱见图 1, HPLC/MS 指纹图谱见图 2 和 3。

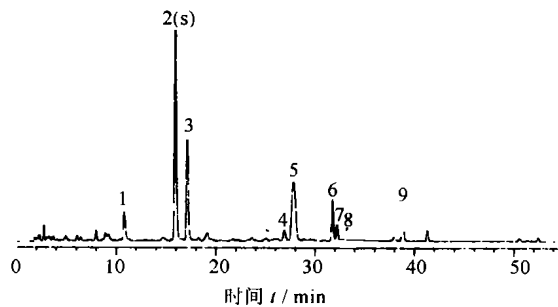


图 1 密花石斛药材色谱指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of *D. densiflorum*

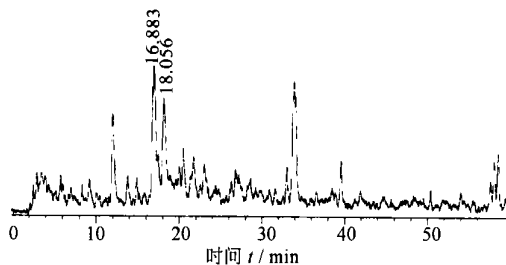


图 2 密花石斛药材的总离子流色谱图 ESI(+)

Fig. 2 TIC of *D. densiflorum* ESI(+)

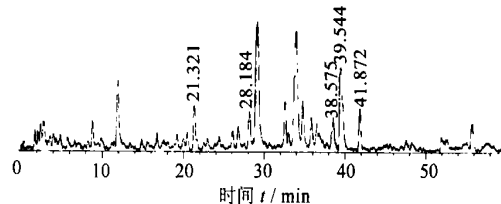


图 3 密花石斛药材的总离子流色谱图 ESI(-)

Fig. 3 TIC of *D. densiflorum* ESI(-)

## 3 结果与讨论

3.1 提取方法: 经对 95% 乙醇回流、氯仿超声和氯仿索氏提取进行考察, 发现 95% 乙醇提取杂峰过多; 氯仿超声提取效率低而氯仿索氏提取效率较高, 故采用氯仿为溶剂索氏提取制备供试品溶液。

3.2 HPLC/UV 指纹图谱: 参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》<sup>[2]</sup>, 测定了 10 批密花石斛药材的指纹图谱。以  $t_R = 16.0$  min 的滨蒿内酯色谱峰 (2 号峰) 为参照, 标示了 9 个共有峰, 并计算了 10 批密花石斛药材指纹图谱中各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值, 分别见表 1 及表 2。

3.3 HPLC/MS 指纹图谱: 实验条件下, 对密花石斛药材供试品分别进行了质谱的正、负离子检测, 并根据质荷比及相关文献<sup>[3-5]</sup>, 对色谱图中的部分色谱峰进行了归属。HPLC/UV 对照品试验表明  $t_R = 16.0$  min 的化合物为滨蒿内酯, 相对分子质量为 206, 相同位置处的质谱正离子检测图中出现滨蒿内

酯  $m/z$  207  $[M+H]^+$ 、 $m/z$  229  $[M+Na]^+$  峰;  $t_R=18.1$  min 的色谱峰表现为  $m/z$  191  $[M+H]^+$ 、 $m/z$  213  $[M+Na]^+$  及  $m/z$  229  $[M+K]^+$  峰, 推测为泽

兰内酯。LC/MS 负离子检测图中,  $t_R=21.3$  min 的色谱峰表现为  $m/z$  259  $[M-H]^-$  峰, 推测为 tristin;  $t_R=28.2$  min 的色谱峰表现为  $m/z$  331  $[M-H]^-$  峰, 推测为鼓槌联苜;  $t_R=38.6$  min 的色谱峰表现为  $m/z$  241  $[M-H]^-$  峰, 推测为 2,5-二羟基-4-甲氧基苜酮;  $t_R=39.5$  min 的色谱峰表现为  $m/z$  239  $[M-H]^-$  峰, 推测为 moscatin;  $t_R=41.9$  min 的色谱峰表现为  $m/z$  269  $[M-H]^-$  峰, 推测为大黄素或芦荟大黄素。

表 1 10 批密花石斛的相对保留时间  
Table 1 Relative retention time of 10 batches of *D. densiflorum* crude drugs

批号	峰号								
	1	2(s)	3	4	5	6	7	8	9
1	0.678	1.000	1.076	1.690	1.749	1.997	2.026	2.089	2.442
2	0.681	1.000	1.076	1.694	1.753	1.998	2.027	2.091	2.443
3	0.682	1.000	1.076	1.695	1.754	1.997	2.026	2.090	2.441
4	0.683	1.000	1.076	1.696	1.755	1.998	2.027	2.090	2.443
5	0.683	1.000	1.076	1.698	1.758	1.999	2.028	2.091	2.444
6	0.684	1.000	1.076	1.698	1.758	1.997	2.027	2.090	2.443
7	0.684	1.000	1.076	1.699	1.757	1.997	2.025	2.089	2.441
8	0.685	1.000	1.076	1.700	1.759	1.998	2.027	2.091	2.443
9	0.685	1.000	1.076	1.700	1.759	1.997	2.026	2.090	2.441
10	0.686	1.000	1.076	1.701	1.760	1.998	2.026	2.091	2.442
均值	0.683	1.000	1.076	1.697	1.756	1.998	2.026	2.090	2.442

s 为参照物

s is reference substance

表 2 10 批密花石斛的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of 10 batches of *D. densiflorum* crude drugs

批号	峰号								
	1	2(s)	3	4	5	6	7	8	9
1	0.165	1.00	0.469	0.058	0.567	0.179	0.079	0.083	0.155
2	0.150	1.000	0.468	0.046	0.563	0.189	0.045	0.091	0.154
3	0.159	1.000	0.552	0.067	0.669	0.152	0.091	0.089	0.162
4	0.163	1.000	0.458	0.059	0.597	0.173	0.075	0.094	0.146
5	0.135	1.000	0.474	0.059	0.653	0.180	0.084	0.091	0.158
6	0.152	1.000	0.467	0.061	0.569	0.198	0.095	0.091	0.153
7	0.155	1.000	0.537	0.075	0.568	0.186	0.075	0.097	0.160
8	0.159	1.000	0.395	0.038	0.463	0.193	0.058	0.068	0.126
9	0.163	1.000	0.467	0.061	0.569	0.179	0.075	0.089	0.149
10	0.158	1.000	0.473	0.049	0.634	0.156	0.049	0.090	0.179
均值	0.156	1.000	0.476	0.057	0.585	0.179	0.073	0.088	0.154

s 为参照物

s is reference substance

质谱检测器可以提供更多化合物的信息, 是对紫外检测器的一种补充。本实验根据密花石斛及已知的石斛化学成分的报道, 利用质谱技术对其部分成分进行了初步定性, 可为密花石斛化学成分的进一步研究及质量控制提供参考。研究结果也说明, 密花石斛与同为石斛属的其他种石斛在化学成分上存在着共性, 将其作为药典收载正品石斛的代用品不无道理。

致谢: 中国药科大学中药学院徐璐珊教授帮助完成了密花石斛药材的 DNA 鉴定。

References:

[1] Bao X S, Shun Q S, Chen L Z. *The Medicinal Plants of Dendrobium (Shi-Hu) in China* (中国药用石斛 [M]). Shanghai: Fudan University Press, 2001.

[2] *Technical Requirements of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard)* (中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)) [S]. 2000.

[3] Ma G X, Xu G J, Xu L S, et al. Studies on chemical constituents of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1994, 29(10): 763-766.

[4] Bi Z M, Wang Z T, Zhang M, et al. Studies on chemical constituents of *Dendrobium fimbriatum* Hook. ( ) [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(6): 421-422.

[5] Fan C Q, Wang W, Qin G W, et al. Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(8): 1255-1258.

## 液相色谱/蒸发光散射测定四物汤煎液中单糖和双糖的含量

梁乾德, 马百平, 王升启\*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: 目的 建立液相色谱/蒸发光散射(HPLC-ELSD)测定四物汤煎液中 D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖含量的方

\* 收稿日期: 2003-08-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271617, 30070913); 军队“十五”重点项目(01Z019); 北京市“二四八”重大创新工程项目(H010210220113)

作者简介: 梁乾德(1971—), 男, 吉林省农安县人, 军事医学科学院助理研究员, 博士, 1994年毕业于北京中医药大学中药系, 2000年、2003年获得军事医学科学院药物分析学硕士、博士学位, 主要从事中药现代化基础研究。

Tel: (010) 66931423 E-mail: lq@nic.bmi.ac.cn

\* 通讯作者 Tel: (010) 66932211 Fax: (010) 66932211 E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn