

- [12] 饶贵珍. 不同浓度 GA<sub>3</sub>、6-BA 对萝卜芽苗菜生长及产量的影响 [J]. 种子科技, 2002(4): 220-222.
- [13] 姜润田, 吴慧杰. 赤霉素对芹菜作用效果的试验研究 [J]. 吉林蔬菜, 1995(4): 5-6.
- [14] 蔡葛平, 郭燕红, 姚辉, 等. 矮壮素和赤霉素对黄芩生物量及根中黄酮类成分产量的影响 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(7): 213-217.
- [15] Yamamoto H, Sano T, Takeuchi S, et al. Flavonoid production by two-stage cultures and differentiated roots of *Scutellaria baicalensis* callus in liquid medium [J]. *J Pharmacol*, 1989, 43: 188-191.
- [16] 陈蕾, 朱霁虹. 丹参中 4 种脂溶性成分的含量测定 [J]. 中国药事, 2004, 18(12): 749-751.
- [17] 黄新杰, 李章海, 黄义德. 植物生长物质在烤烟烟碱调控中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(19): 4959-4960.
- [18] 王津慧, 赵明, 魏全嘉, 等. 不同浓度赤霉素对人工种植红花岩黄芩的影响及黄芩苷含量测定 [J]. 中国现代中药, 2006, 8(12): 14-15.
- [19] 苑博华, 廖祥儒, 郑小洁, 等. 吲哚乙酸在植物细胞中的代谢及其作用 [J]. 生物学通报, 2005, 40(4): 21-23.
- [20] 盛束军, 俞旭平, 胡雪波, 等. 不同生长调节物质对益母草的生长调控及其表现效应 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(5): 360-362.
- [21] 袁媛, 黄璐琦, 崔光红, 等. 赤霉素及其合成抑制剂对丹参酮类活性物质含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(6): 1-3.
- [22] 汪斌, 刘德辉, 谈献和, 等. 铜、锌对栽培丹参的丹参酮类物质影响机制的研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(17): 2082-2087.
- [23] 王金祥, 严正龙, 潘瑞炽. 不定根形成与植物激素的关系 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(2): 133-142.
- [24] 单守明, 刘国杰, 李绍华, 等. 秋季叶面喷施 IAA、6-BA 或 GA<sub>3</sub> 对草莓植株的影响 [J]. 果树学报, 2007, 24(4): 545-548.

## 芫花高效液相色谱指纹图谱研究

逢楠楠, 毕开顺, 闫宝庆, 陈晓辉\*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要:**目的 研究芫花药材的高效液相色谱指纹图谱。方法 采用 RP-HPLC 法。色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-0.05% 磷酸水, 梯度洗脱, 体积流量: 1.0 mL/min, 柱温: 35℃, 检测波长: 238 nm。结果 在色谱指纹图谱中, 确立了其中 21 个共有峰, 建立了芫花药材的共有模式, 在 19 批芫花药材中有 17 批样品的指纹图谱相似度在 0.90 以上。结论 该方法简便、准确、重现性好, 为评价芫花药材的质量提供了依据。

**关键词:** 芫花; 指纹图谱; RP-HPLC

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)05-0818-04

### Fingerprint analysis of *Flos Genkwa* by HPLC

PANG Nan-nan, BI Kai-shun, YAN Bao-qing, CHEN Xiao-hui

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** **Objective** To establish the chromatographic fingerprint analysis for the quality control of *Flos Genkwa*. **Methods** RP-HPLC Method was applied to establish the chromatographic fingerprint. The separation was performed on a Kromasil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a gradient elution composed of methanol and 0.05% phosphate acid. The column temperature was set at 35℃ and the flow rate was 1.0 mL/min. The detective wavelength was at 238 nm. **Results** Twenty-one characteristic peaks were established in the fingerprint. The mutual model of *Flos Genkwa* was established and the similarities were calculated. The similarity of 17 samples in all the 19 samples was more than 0.90. **Conclusion** The method is simple and accurate with good reproducibility. It can be used for the quality control of *Flos Genkwa*.

**Key words:** *Flos Genkwa*; fingerprint; RP-HPLC

芫花始载于《神农本草经》<sup>[1]</sup>, 为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc 的干燥花蕾, 收载于《中国药典》2005 年版(一部), 味苦、辛, 性温, 有毒, 归肺、脾、肾经<sup>[2]</sup>, 其为传统的泻下逐水药。内服

用于治疗水肿胀满、胸腹积水、痰饮积聚、气逆咳喘、二便不利, 外用治疗疥癣秃疮、冻疮。现代研究表明芫花还具有镇痛、镇静、抗惊厥、抗炎、抗肿瘤、免疫调节、抗生育等作用<sup>[3,4]</sup>。

收稿日期: 2009-09-10

作者简介: 逢楠楠(1984—), 女, 山东龙口人, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制研究。

Tel: (024) 23986292 E-mail: nange132@163.com

\*通讯作者 陈晓辉 Tel: (024) 23986259 E-mail: cxh\_syphu@yahoo.com

《中国药典》2005 年版(一部)芫花项下仅有性状、鉴别和炮制等项目,目前指标成分定量已有报道<sup>[5]</sup>。为更全面控制芫花药材的质量,本实验采用 RP-HPLC 法建立了芫花药材的色谱指纹图谱。指纹图谱是顺应中药多组分、多靶点的整体综合作用的特点,从“全成分”的角度出发的一种现代中药质量控制方法,现广泛用于中药质量控制<sup>[6,7]</sup>,该方法准确,重现性好,操作简便可行,为评价芫花药材的质量提供了依据。

### 1 仪器与试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪,四元泵,自动进样器,在线脱气机,柱温箱,自动进样器,DAD 检测器(美国 Agilent 公司);BP210S 电子分析天平(德国赛多丽斯公司)。

芫花素-5-O-D-茜黄樱草糖苷、芫花素-5-O-D-葡萄糖苷、木犀草素、槲苷、芹菜素、羟基芫花素和芫花素为自制(经核磁和质谱确证结构,采用 HPLC 峰面积归一化法计算质量分数,质量分数均大于 98.5%);甲醇(色谱纯),磷酸(色谱纯),水为二次重蒸水。

芫花药材经沈阳药科大学中药学院孙启时教授鉴定为芫花正品药材。其来源见表 1。

表 1 芫花样品的来源

Table 1 Origins of Flos Genkwa samples

| 样品编号 | 来源     | 样品编号 | 来源   |
|------|--------|------|------|
| 1    | 安徽 1   | 11   | 山东 2 |
| 2    | 安徽 2   | 12   | 山东 1 |
| 3    | 福建     | 13   | 陕西   |
| 4    | 广东广州   | 14   | 山西 1 |
| 5    | 河北     | 15   | 山西 2 |
| 6    | 河南     | 16   | 辽宁沈阳 |
| 7    | 江西     | 17   | 四川   |
| 8    | 山东临沂 1 | 18   | 广东珠海 |
| 9    | 山东临沂 2 | 19   | 江苏   |
| 10   | 江苏南京   |      |      |

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 大连中汇达公司);流动相:甲醇(A)-0.05%磷酸水溶液(B);梯度洗脱程序:0 min, A-B(15 85);10 min, A-B(45 55);22 min, A-B(45 55);38 min, A-B(60 40);52 min, A-B(95 5);65 min, A-B(95 5)。体积流量:1.0 mL/min;检测波长:238 nm;柱温:35 °C;进样量:20 μL。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取芫花素-5-O-D-茜黄樱草糖苷、芫花素-5-O-D-葡萄糖苷、木犀草素、槲苷、芹菜素、羟基芫花素和芫花素对照品适量,置 5 mL 量瓶中,用色谱甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得含芫花素-5-O-D-茜黄樱草糖苷 0.21

mg/mL、芫花素-5-O-D-葡萄糖苷 0.20 mg/mL,木犀草素 0.22 mg/mL、槲苷 0.25 mg/mL、芹菜素 0.40 mg/mL、羟基芫花素 0.38 mg/mL、芫花素 0.36 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取芫花药材粉末 0.5 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇 20 mL,密塞,称定质量,超声处理 20 min,取出,放冷,再称定质量,用 70%甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 指纹图谱方法学的考察

2.4.1 精密度试验:取芫花供试品溶液,在上述色谱条件下重复进样 6 次,记录色谱图,结果表明,各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

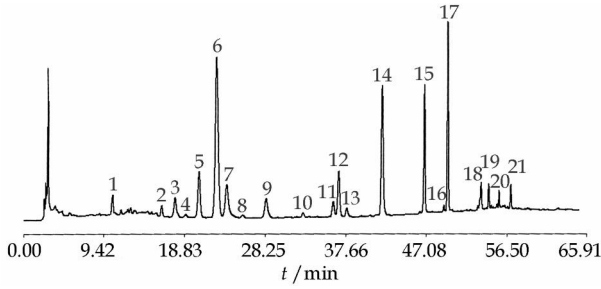
2.4.2 重现性试验:取芫花药材(No. 1)6 份,按“2.3”项下制备供试品溶液,进样分析,记录色谱图,计算各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明该方法重现性良好,符合指纹图谱要求。

2.4.3 稳定性试验:取芫花供试品溶液,在室温下放置,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析,计算各共有峰与内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明该供试品在 24 h 内稳定。

2.5 芫花样品 HPLC 指纹图谱:取所收集的芫花药材粉末 0.5 g,精密称定,按“2.3”项下方法制备 19 批供试品溶液,分别取各供试品溶液 20 μL 进行测定,记录色谱图。以芹菜素为内参比峰,确定了 21 个共有峰,指认了其中 7 个色谱峰,分别为芫花素-5-O-D-茜黄樱草糖苷(7 号)、芫花素-5-O-D-葡萄糖苷(9 号)、木犀草素(11 号)、槲苷(12 号)、芹菜素(14 号)、羟基芫花素(15 号)和芫花素(17 号),色谱图见图 1(2 号样品)。

2.6 芫花样品聚类分析:将各色谱峰面积相对于称样量化,应用“SPSS”软件对其进行系统聚类分析,采用组间均联法(between-group linkage),以夹角余弦(cosin)作为样品相似度的测度。聚类分析将 19 批芫花样品分为 3 类,聚类分析结果见图 2。

2.7 芫花样品共有模式建立:结合聚类分析结果,从 19 批芫花药材中选取第 1 类的 9 个样品(1、2、5、7、8、14、16、17、19 号样品),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,通过色谱峰多点校正的方法对色谱峰进行自动匹配生成药材的色谱指纹图谱共有模式,色谱图见图 3。



7-芫花素-5-O-D-茜黄樱草糖苷 9-芫花素-5-O-D-葡萄糖苷  
 11-木犀草素 12-槲苷 14-芹菜素 15-羟基芫花素 17-芫花素  
 7-genkwanin-5-O-D-primeveroside 9-genkwanin-5-O-D-  
 glucoside 11-luteolin 12-tiliroside 14-apigenin  
 15-hydroxygenkwanin 17-genkwanin

图 1 芫花样品色谱指纹图谱

Fig. 1 Chromatographic fingerprint of Flos Genkwa

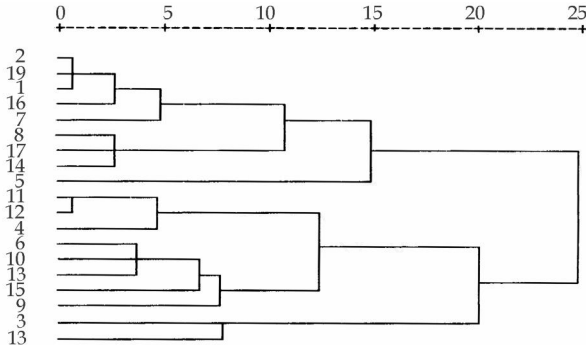
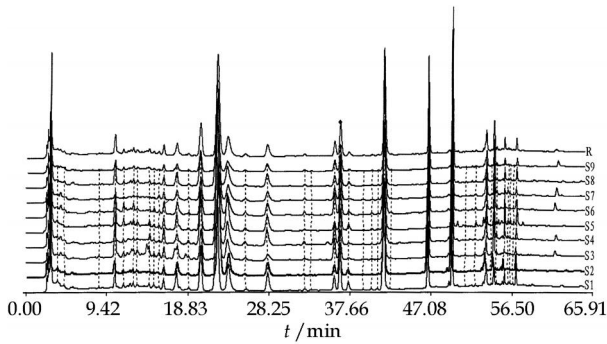


图 2 聚类分析结果

Fig. 2 Results of hierarchical cluster analysis



R-共有模式 S1~S9-1,2,5,7,8,14,16,17,19 号样品

R-mutual model S1-S9-nine batches of Flos Genkwa samples number 1, 2, 5, 7, 8, 14, 16, 17, and 19

图 3 9 批药材色谱图

Fig. 3 Comparability of nine batches of Flos Genkwa samples

2.8 各产地药材指纹图谱相似度评价: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 B 版对上述 19 批药材的指纹图谱进行相似度的分析,相似度结果见表 2。分析结果表明,相似度分析结果与系统聚类结果一致,2 种方法得到了相互验证。由相似度计算结果结合聚类分析和形态鉴定

结果,相似度在 0.90 以上的可以认为该药材为推荐品,0.90 以下(3,18 号)的为该药材的非推荐品。

表 2 相似度计算结果

Table 2 Results of similarity analysis

| 样品编号 | 来源     | 相似度   | 样品编号 | 来源   | 相似度   |
|------|--------|-------|------|------|-------|
| 1    | 安徽 1   | 0.989 | 11   | 山东 2 | 0.944 |
| 2    | 安徽 2   | 0.974 | 12   | 山东 1 | 0.934 |
| 3    | 福建     | 0.873 | 13   | 陕西   | 0.944 |
| 4    | 广东广州   | 0.957 | 14   | 山西 1 | 0.991 |
| 5    | 河北     | 0.977 | 15   | 山西 2 | 0.940 |
| 6    | 河南     | 0.965 | 16   | 辽宁沈阳 | 0.992 |
| 7    | 江西     | 0.983 | 17   | 四川   | 0.996 |
| 8    | 山东临沂 1 | 0.991 | 18   | 广东珠海 | 0.896 |
| 9    | 山东临沂 2 | 0.944 | 19   | 江苏   | 0.991 |
| 10   | 江苏南京   | 0.934 |      |      |       |

### 3 讨论

3.1 检测波长的选择:采用 DAD 检测器考察了 190~400 nm 不同检测波长处的色谱图,结果表明 238 nm 处的色谱图特征性强,信息量大,各成分的响应值较为均匀,具有良好的代表性,因此选择 238 nm 作为检测波长。

3.2 流动相系统的选择:实验中考察了甲醇-水、甲醇-0.1%醋酸水、甲醇-0.05%磷酸水、乙腈-水等多种流动相系统,结果表明采用甲醇-0.05%磷酸水溶液作为流动相系统进行梯度洗脱时,各色谱峰分离度较好,且基线平稳。同时 2 倍保留时间的色谱图显示,65 min 后无其他色谱峰出现。

3.3 色谱柱的选择:实验中考察了美国奥泰公司 Apollo C<sub>18</sub>、美国 Dikma 公司 Diamonsil C<sub>18</sub>、大连中汇达公司 Kromasil C<sub>18</sub> 3 根不同厂家的色谱柱,结果表明,采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱时基线平稳,色谱峰数目较多,分离度和峰形较好,因此选择中汇达公司的 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱进行指纹图谱研究。

3.4 提取方法的优化:对多种提取方法进行了考察和优化,分别对提取溶剂(甲醇、乙醇、水以及不同比例的甲醇-水溶液)、提取方式(超声、加热回流)及提取时间进行了考察,最终选择用 70% 甲醇超声 20 min,方法简便,得到的色谱峰信息丰富。

芫花中含有多种化学成分,简单的测定一个或几个有效成分的量为主的传统的质量分析方法不能全面地反映药材的质量,因此建立全面、系统而又特征地反映其化学成分的指纹图谱,可以为质量评价和控制提供一个有效的参考方法。

通过建立芫花高效液相色谱指纹图谱,确立了 21 个共有峰,并指认了其中 7 个色谱峰。这 7 个成分在芫花对照指纹图谱中占共有峰总峰面积的 54.1%,具有较强的特征性和代表性。结合聚类分

析和相似度评价,发现不同产地的芫花药材指纹图谱有一定的差别,21 个共有峰的相对保留时间符合程度较好,但相对峰面积差别较大。由此说明不同产地芫花药材质量差别较大,应用本实验所建立的方法控制芫花药材的质量更为可靠。

参考文献:

[1] 孙星衍,孙冯翼. 神农本草经:卷三 [M]. 台湾:五洲出版社,1981.

[2] 中国药典 [S]. 一部. 2005.  
 [3] 李玲芝,宋少江,高品一. 芫花的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(9):587-592.  
 [4] 雷沛霖,李姚姚,原思通. 不同产地芫花药材质量标准分析 [J]. 药物分析杂志,2008;28(5):834-837.  
 [5] 李姚姚,刘延泽. RP-HPLC 法测定芫花叶中 3 种黄酮苷的含量 [J]. 中草药,2004,35(7):822-823.  
 [6] 苏建,袁志芳,吴一兵,等. 何首乌和夜交藤药材指纹图谱研究与评价 [J]. 中草药,2008,39(5):766-796.  
 [7] 王文燕,赵强,张铁军,等. 决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中草药,2009,40(10):1638-1641.

## GAP 生产基地龙胆的质量控制及评价

曹悦<sup>1,2</sup>,左代英<sup>2</sup>,刘敬武<sup>3</sup>,孙启时<sup>2\*</sup>

(1. 辽宁省食品药品检验所,辽宁 沈阳 110023;2. 沈阳药科大学,辽宁 沈阳 110016;

3. 辽宁天瑞绿色产业科技开发有限公司,辽宁 清原 113300)

**摘要:**目的 建立龙胆药材的指纹图谱研究方法并进行聚类分析。方法 色谱柱为 Shimadzu C<sub>18</sub> (3.0 mm ×75 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸(5.5-94.5),体积流量:0.8 mL/min;检测波长:240 nm;柱温为 40。结果 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷分别在 0.154 8~1.858 mg/mL,0.322~5.152 mg/mL 呈良好的线性关系,平均回收率分别为 102.09%,RSD=1.68%(n=6);103.80%,RSD=1.11%(n=6)。指纹图谱的精密度与重现性试验中的各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积的 RSD 小于 2.1%,指纹图谱相似度结果与聚类分析谱系图一致。结论 建立的指纹图谱适用于龙胆药材的标准化种植及质量控制。

**关键词:**龙胆;指纹图谱;聚类分析;超高效液相色谱法

中图分类号:R284.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)05-0821-05

## Quality control and evaluation of Radix et Rhizoma Gentianae from GAP production base

CAO Yue<sup>1,2</sup>, ZUO Dai-ying<sup>2</sup>, LIU Jing-wu<sup>3</sup>, SUN Qi-shi<sup>2</sup>

(1. Liaoning Provincial Institute of Food and Drug Control, Shenyang 110023, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Liaoning Tianrui Science and Technology Development Co., Ltd., Qingyuan 113300, China)

**Abstract:** **Objective** To establish method for the fingerprint of *Radix et Rhizoma Gentianae* using UFLC with the hierarchical cluster analysis. **Methods** Column: Shimadzu C<sub>18</sub> (3.0 mm ×75 mm, 1.7 μm); mobile phase: Acetonitrile-0.4% phosphorylation (5.5-94.5); flow rate: 0.8 mL/min; detection wavelength: 240 nm; temperature: 40. **Results** This method had a good linearity in the range of 0.154 8—1.858 mg/mL, and the average recovery was 102.09% with RSD of 1.68% for swertiamarin. It had a good linearity in the range of 0.322—5.152 mg/mL, and the average recovery was 103.80% with RSD of 1.11% for gentiopicroside. The RSD of precision and reproducibility were lower than 2.1%. The result of fingerprint studying was the same with the hierarchical cluster analysis. **Conclusion** This method can be used as standardized implantation and quality control of *Radix et Rhizoma Gentianae*.

**Key words:** *Radix et Rhizoma Gentianae*; fingerprint; hierarchical cluster analysis; UFLC

龙胆为龙胆科植物条叶龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag.、龙胆 *G. scabra* Bunge、三花龙胆 *G. triflora* Pall. 或坚龙胆 *G. rigescens* Franch. 的干燥根及根茎<sup>[1]</sup>。前三者习称“龙胆”,后一种习称“坚

收稿日期:2009-09-22

基金项目:国家科技支持计划(2006DAI06A05-08)

作者简介:曹悦(1978—),男,辽宁沈阳人,硕士研究生,主管药师,主要从事药品分析检验。

Tel:(024)25425645 E-mail:cyy\_0319@163.com

\*通讯作者 孙启时 Tel:(024)23986468 E-mail:sunqishi@sina.com