

# 红花龙胆高效液相指纹图谱

罗君<sup>1</sup>, 卿娟<sup>2</sup>, 赵琳璐<sup>3</sup>, 张丽艳<sup>2\*</sup>, 毕纱燕<sup>2</sup>

(1. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550001; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002;  
3. 贵阳新天卫生服务中心, 贵阳 550008)

[摘要] 目的:建立红花龙胆药材的 HPLC 指纹图谱的测定方法。方法:采用以 Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 245 nm, 柱温 25 °C。结果:建立了红花龙胆药材 HPLC 指纹图谱, 标定了 40 个共有峰, 以芒果苷为参照峰, 12 批红花龙胆药材的相似度均 >0.97。结论:该法重复性好, 专属性强, 可为红花龙胆药材质量控制提供科学依据。

[关键词] 红花龙胆; 指纹图谱; 芒果苷

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)14-0069-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140069

## HPLC Fingerprint Chromatograms of *Gentiana rhodantha*

LUO Jun<sup>1</sup>, QING Juan<sup>2</sup>, ZHAO Lin-jun<sup>3</sup>, ZHANG Li-yan<sup>2\*</sup>, BI Sha-yan<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (TCM),  
Guiyang 550001, China; 2. Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China;  
3. The Community Health Service of Xintian in Guiyang, Guiyang 550008, China)

[Abstract] **Objective:** To established the HPLC fingerprint chromatograms of *Gentiana rhodantha*.

**Method:** The HPLC analysis was performed on a Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column with isocratic elution of acetonitrile-0.05% phosphoric acid at a flow rate of 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The detection wavelength was set at 245 nm, and the column temperature was 30 °C. **Result:** The HPLC fingerprint chromatograms of *G. rhodantha* has been established, there were 40 common peaks, the similarities of the fingerprint chromatograms were calculated over 0.97 between 12 batches of *G. rhodantha* samples with mangiferin as reference substance.

**Conclusion:** The method is repeatable, exclusive and can be used quality control of *G. rhodantha*.

[Key words] *Gentiana rhodantha*; HPLC; fingerprint

红花龙胆 *Gentiana rhodantha* Franch. 为龙胆科红花龙胆的全草, 收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003 年版<sup>[1]</sup>, 为贵州苗族习用药材(苗药名“锐定谋”)。具有清热燥湿、解毒泻火、止咳的功效, 用于湿热黄疸、肺热咳嗽、小便不利等证<sup>[2]</sup>。红花龙胆中含有酚类成分、三萜类成分和环烯醚萜苷类成分等<sup>[3,4]</sup>。目前以红花龙胆药材为主要原料的

制剂有“肺力咳胶囊”“康妇灵胶囊”等, 其药材质量标准中仅有“性状鉴别”和“显微鉴别”, 难以有效地评价和控制红花龙胆药材及其制剂的质量。鉴于此, 笔者采集了贵州省 12 批不同产地的红花龙胆药材, 建立了能够反映该中药特征的 HPLC 指纹图谱, 以期能为提升及控制红花龙胆药材及其制剂的质量提供科学依据。

[收稿日期] 20131129(005)

[基金项目] 贵州省科技厅贵阳中医学院联合基金项目(黔科合中药字[2012]LKZ7059); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究项目(QZYY2012-04); 贵阳中医学院研究生教育创新项目(ZYYCX12027); 贵州省高等学校大学生创新创业训练计划项目(201310662004)

[第一作者] 罗君, 硕士, 主管中药师, 从事中药、民族药质量控制与新药研究, E-mail: 53011402@qq.com

[通讯作者] \*张丽艳, 教授, 硕士生导师, 从事中药、民族药质量控制与新药研究, E-mail: zly1964@163.com

### 1 材料

1260 系列高效液相色谱仪 (Agilent DAD 检测器), AY120 型电子天平 (梅特勒-托利多公司), CH-250 型超声波清洗机 (天津泰斯特仪器有限公司, 功率 250 W, 频率 33 kHz), DK-98-II A 型数显恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司)。芒果苷对照品 (批号 111607-200402) 由中国食品药品检定研究院提供, 供含量测定用。乙腈为色谱醇, 甲醇、乙醇、磷酸均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。红花龙胆药材自采集, 经贵阳中医学院魏升华副教授鉴定为红花龙胆 *Gentiana rhodantha* Franch. 的全草, 洗净后 60 °C 烘干, 密封保存, 临用前粉碎过 60 目筛, 红花龙胆样品信息见表 1。

表 1 12 批不同产地红花龙胆药材 HPLC 指纹图谱共有峰的相似度

No.	产地	采收时间	相似度
1	贵州贵阳花溪高坡	2012-12	0.976
2	贵州黔南龙里	2012-11	0.985
3	贵州黔东南凯里	2012-10	0.994
4	贵州黔东南雷山	2012-12	0.993
5	贵州遵义南北	2013-02	0.991
6	贵州黔南罗甸	2012-11	0.996
7	贵州黔西南安龙	2012-10	0.990
8	贵州黔西南晴隆县	2012-10	0.997
9	贵州黔西南贞丰县	2013-01	0.996
10	贵州黔西南兴义	2012-12	0.979
11	贵州安顺关岭	2013-02	0.979
12	贵州六盘水六枝	2012-11	0.997

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-0.05% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 92% ~ 90.5% B; 5 ~ 20 min, 90.5% ~ 89.5% B, 20 ~ 45 min, 89.5% ~ 80% B; 45 ~ 80 min, 80% ~ 70% B; 80 ~ 90 min, 70% ~ 68% B; 90 ~ 100 min, 68% ~ 64% B; 100 ~ 105 min, 64% ~ 64% B), 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 245 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 取干燥至恒重的芒果苷对照品适量, 加甲醇制成 0.113 5 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液。

**2.3 供试品的制备** 取红花龙胆药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 25 mL, 摇匀, 密塞, 称定质量。超声提

取 10 min, 放冷, 称定质量, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 滤液过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

#### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取同批红花龙胆药材 (No. 1) 1 份, 按 2.3 和 2.1 项下方法操作, 连续进样 6 次, 以 15 号峰为参照, 测得共有峰相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.2 稳定性试验** 精密吸取红花龙胆 (No. 1) 供试品溶液, 按 2.1 项下方法分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h 进样检测。其各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明样品在 48 h 内稳定。

**2.4.3 重复性试验** 取同批红花龙胆药材 (No. 1) 6 份, 分别按 2.3 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, 测得其各共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 3%, 表明该方法重复性良好

#### 2.4.4 红花龙胆药材 HPLC 指纹图谱中的特征峰

取不同产地的红花龙胆药材, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 在 2.1 项下色谱条件测定图谱, 分别得到 12 批样品的指纹图谱。根据中国药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2004 版 A) 处理图谱, 生成红花龙胆药材共有模式的对照指纹图谱, 见图 1, 其中共有色谱峰 40 个。通过对照保留时间, 指认了 40 个峰中的 15 号峰为芒果苷。

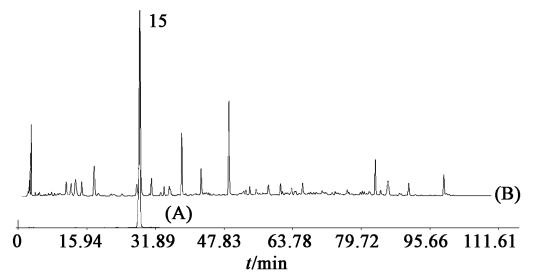


图 1 芒果苷对照品 (A) 及红花龙胆药材对照 (B) 指纹谱

#### 2.5 红花龙胆药材指纹图谱

**2.5.1 参比峰的选择** 在各批次红花龙胆药材图谱中以 15 号色谱峰 (芒果苷) 的分离效果良好, 峰面积最大且为所有样品共有, 所以确定 15 号色谱峰 (芒果苷) 为参照峰。

**2.5.2 指纹图谱的建立及相似度评价** 取不同来源的 12 批红花龙胆药材 HPLC 图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2004 版 A) 软件, 以第 S1 批药材图谱作为参照谱进行指纹匹配, 确定

了40个共有峰,建立了红花龙胆药材特征指纹图谱的共有模式,并进行了相似度计算,12批药材的叠加指纹图谱,见图2,通过对12批样品进行相似度评价和数据匹配,其相似度均 $>0.9$ ,见表1。40个共有色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD分别为 $0.18\% \sim 0.48\%$ 和 $14.68\% \sim 73.07\%$ 。说明所建立的红花龙胆药材指纹图谱的技术指标稳定,可反映其指纹特征。

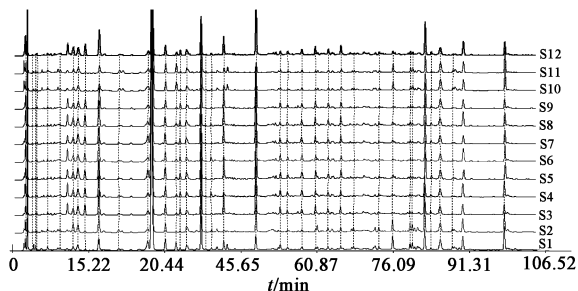


图2 12批红花龙胆药材指纹谱叠加

**2.5.3 主成分分析** 采用SPSS 21.0软件对12批红花龙胆药材的40个共有峰峰面积做标准化处理后,进行主成分分析。以主成分的特征根 $>1$ 及累计贡献率 $>85\%$ 作为选择主成分的依据。取前四个特征值的方差累计贡献可以达 $86.41\%$ ,包含了大部分信息。其中第1主成分特征值为21.28,方差贡献率为 $53.20\%$ ;第2主成分特征值为5.75,方差贡献率为 $14.37\%$ ;第3主成分特征值为4.66,方差贡献率为 $11.64\%$ ;第4主成分特征值为2.88,方差贡献率为 $7.20\%$ 。由旋转后的公共因子载荷矩阵表可以看出,第1主成分(因子1)主要反映了来自原始指标色谱峰1,3,5~7,9~13,15,18,19,23~31,33~35,37~40的信息,包含了15号峰芒果苷;第2主成分(因子2)主要反映了来自原始指标色谱峰2,4,8,14,16,21,22的信息;第3主成分(因子3)主要反映了来自原始指标色谱峰17,20,32,36。用前3个主成分就可表示原HPLC数据的主要信息。

**2.5.4 聚类分析** 将12批红花龙胆药材HPLC指纹图谱中的40个共有峰的峰面积数据进行量化,运用SPSS 21.0软件对其进行系统聚类,采用组间平均数联结法,以欧式距离法作为样品距离度,得到样品的聚类分析树状图。根据聚类分析结果,当分类距离在 $5 \sim 10$ 时,12个不同产地红花龙胆样品被分为2大类。即S1,S2,S10,S11为一类,剩下的为一类。见图3。

### 3 讨论

**3.1 提取溶剂选择** 根据红花龙胆中的化学成分

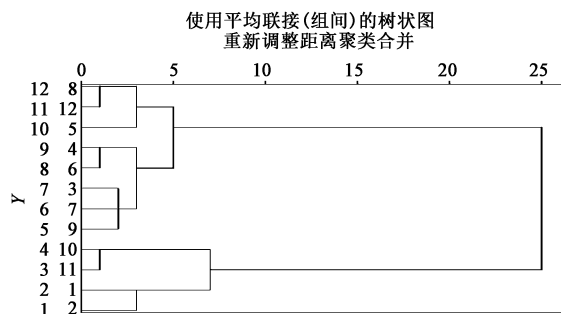


图3 12批红花龙胆药材指纹谱聚类分析

性质,在试验中对水、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇等9种提取溶剂进行了提取效果考察。对比各色谱图得出,以50%乙醇溶液做提取溶剂,色谱峰较多,能更好的反应红花龙胆药材的化学成分信息。

**3.2 提取方法考察** 分别考察了回流提取法和超声提取法进行供试液的制备,对HPLC色谱图进行比较,二者色谱图基本一致,通过比较峰面积,从节约能源及操作简单便捷考虑,选择超声提取法作为提取手段。

**3.3 提取时间考察** 分别对提取10,20,30,40,50,60 min不同提取时间进行了比较。结果不同提取时间对其峰面积几乎无影响,故选择10 min作为提取时间。

**3.4 流动系统选择的选择** 对甲醇-水,乙腈-水,乙腈-0.05%磷酸水,乙腈-0.1%磷酸水,乙腈-0.2%磷酸水5种流动相系统进行筛选,结果显示乙腈-0.05%磷酸水系统能达到较好的洗脱效果,各色谱峰的峰型和分离度较好,且基线平稳,选择其作为检测流动系统。

**3.5 色谱柱的选择** 考察了不同厂家生产的色谱柱:Hypersil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), Diamonsil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), Spherisorb C<sub>18</sub>(4.6 mm × 200 mm, 5 μm)。在相同色谱条件下对同一供试液进行检测,Diamonsil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 200 mm, 5 μm)的分离度好,且基线平稳,用其作红花龙胆药材指纹图谱的检测。

**3.6 柱温、流速及检测波长考察** 在相同条件下,使供试液分别在25℃和30℃条件下检测,结果显示30℃条件下部分色谱峰间发生了重叠,影响分离效果,故选择25℃作为检测温度。

考察了 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 及 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速下,色谱峰的分离情况,结果发现在 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速下的色谱图分离效果较 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速下好,综合分析时间和分离效果,选择 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行

# 气相色谱法测定丝瓜子中4种脂肪酸的含量

刘海霞,裴香萍\*,李慧峰,严婧,孟霜,王丽  
(山西中医学院,太原 030024)

**[摘要]** 目的:建立气相色谱法测定不同产地丝瓜子脂肪油中4种脂肪酸含量的方法,为丝瓜子质量评价和标准制定提供实验依据。方法:采用HP-FFAP毛细管色谱柱(0.2 mm×50 m,0.3 μm),载气高纯度氮气,流速0.5 mL·min<sup>-1</sup>,分流比23:1,柱温235℃,进样口温度250℃,初始温80℃,FID检测器,温度250℃,空气流量450 mL·min<sup>-1</sup>,氢气流量45 mL·min<sup>-1</sup>。结果:丝瓜子中棕榈酸质量分数为2.325%~2.985%;硬脂酸质量分数为1.198%~1.771%,油酸质量分数为2.212%~5.159%,亚油酸质量分数为7.383%~13.578%。结论:该方法准确、可靠、重复性好,可用于丝瓜子脂肪油中亚油酸、油酸、棕榈酸、硬脂酸的质量控制。

**[关键词]** 丝瓜子;气相色谱法;油酸;亚油酸;棕榈酸;硬脂酸

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0072-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140072

## Determination of Content of Four Kinds of Fatty Acids in *Luffa cylindrica* Seed by GC

LIU Hai-xia, PEI Xiang-ping\*, LI Hui-feng, YAN Jing, MENG Shuang, WANG Li

**[收稿日期]** 20131202(019)

**[基金项目]** 山西省食品药品监督管理局项目(2012014A)

**[第一作者]** 刘海霞,在读硕士,Tel:0351-2272284,E-mail:liuhaixin.169@163.com

**[通讯作者]** \*裴香萍,硕士,副教授,从事中药鉴定及质量标准研究工作,Tel:0351-2272284,E-mail:peixp69@163.com

检测。

为了全面反应色谱峰信息,利用DAD检测器对供试液在190~400 nm波长范围信息进行采集,分析其全波长扫描的三维和等高图谱,结果显示在245 nm条件下色谱峰信息较多,基线平稳,因此选择该波长为检测波长。

### 4 结论

本研究建立了红花龙胆药材的HPLC指纹图谱,共标定了40个共有峰,计算了12批贵州不同产地红花龙胆药材的相似度。均>0.9,反应了药材在化学成分组成上差异不大。对建立的HPLC指纹图谱进行方法学考察,显示该方法具有较好的精密度、稳定性和重复性。将HPLC指纹图谱运用于红花龙胆药材的鉴定及质量评价中,能够较直观和全面地反映红花龙胆药材所含化学成分的种类与数量。有研究报道红花龙胆中尚含马钱苷酸、獐牙菜苦苷、槲皮素、熊果酸、没食子酸乙酯等成分<sup>[3-4]</sup>,采用对照品进行对比鉴定发现,仅有马钱苷酸在部分批次药

材中出现,其余均未检测到,可能是上述成分在红花龙胆药材中含量较少或检测条件等限制,有待进一步研究。红花龙胆指纹图谱的建立可为其药材及其为原料的中药制剂的质量控制提供准确、有效的方法。

### [参考文献]

- [1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药质量标准[M].贵阳:贵州科技出版社,2003:184.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草.第三十五卷-苗药卷[M].贵阳:贵州科技出版社:2005,12:328.
- [3] 陈云,王国凯,武臻,等.红花龙胆化学成分研究[J].中国中药杂志,2013,38(3):362.
- [4] Xu M, Wang D, Zhang Y J, et al. Iridoidal glucosides from *Gentiana rhodantha* [J]. J Nat Prod Res, 2008, 10(6):491.

[责任编辑 顾雪竹]