

## 当药 HPLC 特征图谱的探索

段吉平<sup>1</sup>, 姚宝林<sup>2</sup>, 杨建玲<sup>3</sup>, 段琼<sup>1</sup>

(1. 河北省药品检验研究院, 石家庄 050011; 2. 承德市食品药品检验检测中心, 河北承德 067000; 3. 保定儿童医院, 河北保定 071000)

**[摘要]** **目的:**建立当药高效液相色谱(HPLC)特征图谱的质量评价方法。**方法:**采用 Waters 2695-2996 型高效液相色谱仪, Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, Agilent-1260 型高效液相色谱仪; 资生堂 CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG II 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 波士顿 Green ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 菲罗门 Gemini 5 μ C<sub>18</sub> 110A 色谱柱(4.6 mm × 250 mm), 以甲醇-乙腈-0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠溶液(0.1% 磷酸溶液调节 pH 至 3.9)(15:5:80)为流动相, 检测波长 268 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。采用主成分相对保留时间比较分析法, 对 10 批不同产地的当药 HPLC 特征图谱进行评价。**结果:**建立了当药的 HPLC 特征图谱, 共标定了 5 个共有峰, 10 批当药共有峰的相对保留时间的 RSD < 2.0%。**结论:**该研究建立的当药特征图谱特征性和专属性强, 且方法快速、简便、可靠, 可用于控制当药的质量。

**[关键词]** 当药; 特征图谱; 高效液相色谱法; 相对保留时间

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0075-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210075

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1126.058.html>

**[网络出版时间]** 2017-08-09 11:26

### Characteristic Fingerprint of Swertiae Herba by HPLC

DUAN Ji-ping<sup>1</sup>, YAO Bao-lin<sup>2</sup>, YANG Jian-ling<sup>3</sup>, DUAN Qiong<sup>1</sup>

(1. Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China;  
2. Chengde City Center for Food and Drug Control, Chengde 067000, China;  
3. Children's Hospital of Baoding, Baoding 071000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a method of HPLC fingerprinting analysis for the quality evaluation of Swertiae Herba. **Method:** The Waters 2695-2996, Dionex Ultimate 3000 and Agilent-1260 high performance liquid chromatograph instrument equipped with Shiseido CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG II (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Boston Green ODS (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) and Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> 110A column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used. Methanol-acetonitrile-0.05 mol·L<sup>-1</sup> sodium dihydrogen phosphate solution (adjusted pH value to 3.9 with 0.1% phosphoric acid solution) (15:5:80) were used as mobile phase; the wavelength was set at 268 nm, and the flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The principal component relative retention time comparison method was used to evaluate the characteristic fingerprints of 10 batches of Swertiae Herba produced in different regions. **Result:** The chromatographic fingerprint was completed with five common peaks, and the RSD of relative retention time for the common peaks from 10 batches of Swertiae Herba was less than 2.0%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and sensitive, which can be used for the quality control of Swertiae Herba.

**[Key words]** Swertiae Herba; characteristic fingerprint; HPLC; relative retention time

**[收稿日期]** 20170702(010)

**[基金项目]** 河北省中医药管理局科学技术研究计划课题项目(2009044)

**[第一作者]** 段吉平, 主任药师, 从事中药材质量标准研究, Tel:0311-85212007-8042, E-mail:jiping819@sohu.com

当药,又名紫花当药,为龙胆科植物瘤毛獐牙菜的干燥全草,具有清湿热、健胃功能,用于湿热黄疸、胁痛、痢疾腹痛、食欲不振。当药是 20 世纪后半叶中草药群众运动中发展起来的中药材,主要用于治疗肝病,是中成药“当药片”和“当飞利肝宁胶囊”的主要药味,在古代本草中尚未见记载。《中国药典》1977 年版,2010 年版,2015 年版均收录本品,其药用情况在《内蒙古中草药》<sup>[1]</sup>,《中华本草》<sup>[2]</sup>,《全国中草药汇编》<sup>[3]</sup>,《河北植物志》(第二卷)<sup>[4]</sup>中均有论述。各版《中国药典》当药项下未规定当药的特征图谱。本文采用高效液相色谱法,对其 HPLC 特征图谱进行了研究,为更好地控制当药的质量提供了可靠的方法依据。

## 1 材料

Waters 2695-2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),Agilent-1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),资生堂 CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG II 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),波士顿 Green ODS 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),菲罗门 Gemini C<sub>18</sub> 110A 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); AE240 型电子分析天平(瑞士 Mettler 公司);乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。龙胆苦苷(批号 770-200105),当药苷(批号 111742-200501),獐牙菜苦苷(批号 0785-200203,纯度 77.86%),均购自中国食品药品检定研究院。当药药材和饮片采集或购买自河北承德、唐山和内蒙古等地,经河北医科大学中医学院郑玉光教授鉴定为龙胆科植物瘤毛獐牙菜 *Swertia pseudochinensis* 的干燥全草,药材来源见表 1。

表 1 当药样品的来源

Table 1 Source of medicinal materials of *Swertia pseudochinensis*

批号	产地	收集地
S1	河北	四川成都荷花池
S2	河北	河北唐山
S3	河北	河北承德
S4	内蒙古	河北安国
S5	内蒙古	安徽亳州
S6	内蒙古	河北保定安国
S7	河北	四川成都荷花池
S8	河北	安徽亳州
S9	内蒙古	安徽亳州
S10	内蒙古	四川成都荷花池

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,流动相甲醇-乙腈-0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠溶液(0.1% 磷酸溶液调节 pH 至 3.9)(15:5:80),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 268 nm,柱温 25 ℃,进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称定当药苷对照品 10.12 mg,龙胆苦苷对照品 10.18 mg 和獐牙菜苦苷对照品 10.03 mg,分别置 100,50,10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品储备溶液,从中分别精密吸取 10 mL,分别置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得各单个对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 取当药适量,粉碎,过 3 号筛,混匀,取 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 400 W,频率 40 kHz)15 min,放冷,再称定质量,用 70% 乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,置中性氧化铝柱(中性氧化铝 5 g;120~150 目,内径 1.5 cm,干法上柱),收集流出液至 25 mL 量瓶中,待液面下降至柱顶近干时,用适量水洗脱至同一 25 mL 量瓶中,并收集洗脱液并定容至刻度,摇匀,即得。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密度试验** 取同一份供试品溶液(S1),按 2.1 项下方法连续进样 6 次,记录色谱图,选取獐牙菜苦苷色谱峰作为参照峰,计算其他特征峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰相对保留时间的 RSD 在 0.2%~0.6%,相对峰面积的 RSD 在 0.5%~1.2%,说明仪器精密度良好。

**2.4.2 重复性试验** 取同一样品(S1)共 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下方法进样,记录色谱图,选取獐牙菜苦苷色谱峰作为参照峰,计算其他特征峰的相对保留时间和相对峰面积。各色谱峰相对保留时间的 RSD 在 0.4%~0.8%,相对峰面积的 RSD 在 0.6%~1.8%,说明方法重复性良好。

**2.4.3 样品稳定性试验** 将样品(S1)供试品溶液按 2.1 项下方法分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样分析,记录不同时间的色谱图,计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 在 0.3%~0.5%,相对峰面积的 RSD 在 0.8%~2.0%,说明样品溶液在 24 h 内稳定。

**2.4.4 耐用性考察** 将样品(S1)供试品溶液按 2.1 项下方法分别用同一高效液相色谱仪和不同品

牌色谱柱以及用同一品牌色谱柱和不同型号高效液相色谱仪进样分析,记录色谱图,计算各色谱峰相对保留时间和相对峰面积,结果各特征峰相对保留时间的 RSD 在 0.5% ~ 2.0%,各特征峰相对峰面积的 RSD 为 0.7% ~ 3.3%,见表 2,3,说明方法适应性良好。

表 2 不同品牌色谱柱和不同型号高效液相色谱仪相对保留时间测定

Table 2 Relative retention time of different chromatographic column and different HPLC

高效液相色谱仪型号	色谱柱品牌	P <sub>2</sub> /S	P <sub>3</sub> /S	P <sub>4</sub> /S	P <sub>5</sub> /S
Waters	Phenomenex	1.07	1.35	1.53	1.70
Waters	Boston	1.07	1.35	1.55	1.73
Waters	Shiseido	1.07	1.35	1.55	1.73
Waters	Shiseido	1.06	1.33	1.53	1.70
Dionex	Shiseido	1.07	1.35	1.61	1.77
Agilent	Shiseido	1.06	1.33	1.53	1.70

注:S代表獐牙菜苦苷,P<sub>1</sub>~P<sub>5</sub>分别代表5个特征峰。S(P<sub>1</sub>)/S均为1.00。表3同。

表 3 不同品牌色谱柱和不同型号高效液相色谱仪相对峰面积测定

Table 3 Relative peak area of different chromatographic column and different HPLC

高效液相色谱仪型号	色谱柱品牌	P <sub>2</sub> /S	P <sub>3</sub> /S	P <sub>4</sub> /S	P <sub>5</sub> /S
Waters	Phenomenex	0.115	0.279	0.164	0.033
Waters	Boston	0.117	0.277	0.167	0.032
Waters	Shiseido	0.115	0.281	0.160	0.030
Waters	Shiseido	0.116	0.280	0.169	0.031
Dionex	Shiseido	0.118	0.283	0.161	0.032
Agilent	Shiseido	0.115	0.280	0.162	0.032

## 2.5 特征图谱及技术参数

**2.5.1 不同批次当药特征图谱的建立** 按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下方法进样,记录色谱图,分析 10 批次当药药材,所得 10 批当药 HPLC 特征图谱见图 1。10 批当药药材共有 5 个特征峰。

**2.5.2 特征峰的标定** 用相对保留时间标定特征峰,对 10 批当药测定结果进行比较分析,发现 10 批当药共有 5 个分离较好的特征峰。通过与对照品色谱对照,确定 1 号峰为獐牙菜苦苷,3 号峰为龙胆苦苷,4 号峰为当药苷,见图 2。以 1 号峰(獐牙菜苦苷)为参照峰,计算其他特征峰相对保留时间,10 批样品 1~5 号峰均为 1.00,1.07,1.35,1.53,1.70。相对峰面积结果见表 4。

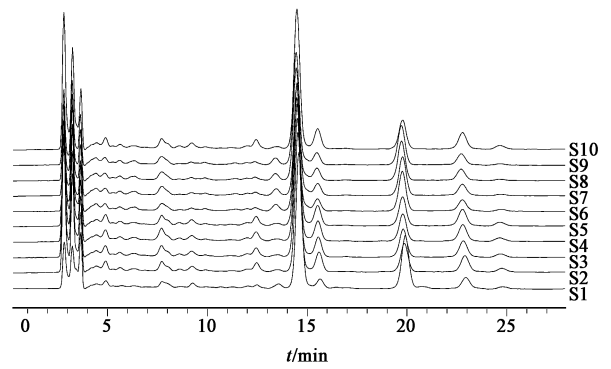
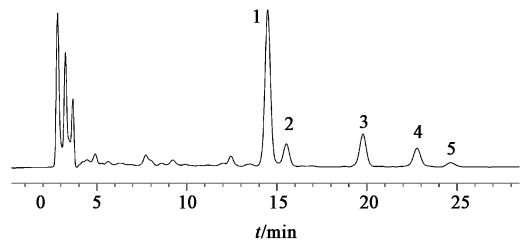


图 1 10 批当药 HPLC 特征谱

Fig. 1 HPLC characteristic spectrum of 10 batches of *Swertia pseudochinensis*



1. 獐牙菜苦苷;3. 龙胆苦苷;4. 当药苷

图 2 当药 HPLC 特征对照谱

Fig. 2 HPLC characteristic spectrum of *Swertia pseudochinensis*

表 4 10 批当药特征图谱中共有特征峰相对峰面积

Table 4 Characteristic peak relative peak area of 10 batches of *Swertia pseudochinensis*

批号	2 号峰	3 号峰	4 号峰	5 号峰
S1	0.115	0.279	0.164	0.033
S2	0.181	0.232	0.186	0.052
S3	0.172	0.244	0.197	0.059
S4	0.164	0.250	0.169	0.061
S5	0.167	0.262	0.178	0.050
S6	0.135	0.287	0.150	0.030
S7	0.126	0.278	0.155	0.015
S8	0.135	0.277	0.148	0.032
S9	0.139	0.279	0.142	0.010
S10	0.173	0.251	0.164	0.063

注:1 号峰均为 1.000。

**2.6 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”(2004 A 版),对 10 批当药药材进行相似度评价分析。结果 10 批当药药材(S1~S10)的指纹图谱的相似度分别为 0.981,0.992,0.996,0.995,0.960,0.976,0.979,0.972,0.961,0.998,相似度较好。

## 2.7 当药质量评价方法的确立

**2.7.1 参比峰的选择** 在各批次样品图谱中獐牙

菜苦苷的色谱峰(1号峰)较高,分离良好,所以确定为参照峰,计算其他共有峰的相对保留时间。

**2.7.2 测定指标的选择**<sup>[5-9]</sup> 由于相对保留时间比相对峰面积重复性好,以相对保留时间作为特征图谱的评价指标已被新版《香港中药材标准》和2015年版《中国药典》所采用,所以选择相对保留时间作为评价当药特征图谱的指标,并规定波动范围。

**2.7.3 质量评价标准** 供试品特征图谱中应呈现5个特征峰,其中1个峰应与参照物獐芽菜苦苷峰保留时间相同,以獐芽菜苦苷参照物峰相应的峰为S峰,计算特征峰1~5的相对保留时间,其相对保留时间应在规定值的 $\pm 5\%$ 之内,规定值为1.00(1号峰),1.07(2号峰),1.34(3号峰),1.55(4号峰),1.72(5号峰)。

### 3 讨论

用流动相甲醇-乙腈-0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠溶液(0.1%磷酸溶液调节pH至3.9)(15:5:80)为溶剂配制獐牙菜苦苷、当药苷、龙胆苦苷对照品溶液,以流动相为空白,紫外-可见分光光度法测定对照品溶液的紫外光谱图,獐牙菜苦苷最大吸收波长为236.5 nm,龙胆苦苷最大吸收波长为273.0 nm和242.5 nm,当药苷最大吸收波长为246.0 nm。由于样品中獐牙菜苦苷含量最多,当药苷含量最少,为平衡3个成分的峰高,同时获得较多的,且分离效果好的共有峰,选择268 nm为测定波长。

目前通过HPLC图谱进行药材质量评价的常用方法主要有2种,即指纹图谱相似度评价法<sup>[10-11]</sup>,通过与标准图谱比较来衡量指纹图谱特征变量上变化模式的相似度,提供样品鉴别真伪相似性的信息;相对保留时间比较法<sup>[12]</sup>,确定1个参照峰,将其他峰的保留时间与参照峰相比较,计算相对保留时间,并规定波动范围,来提供样品鉴别真伪相似性的信息。由于生物的多样性,造成不同产地的样品相同

成分的含量差异较大。因此,相对保留时间比较法与指纹图谱相似度评价法相比较,前者重复性高,在鉴别中药材真伪方面具有更好的可操作性。

#### [参考文献]

- [1] 内蒙古自治区革命委员会卫生局. 内蒙古中草药[M]. 呼和浩特: 内蒙古自治区人民出版社, 1972: 206-207.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 264-265.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编. 上册[M]. 上海: 人民卫生出版社, 1992: 909.
- [4] 河北植物志编辑委员会. 河北植物志. 第二卷[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 1988: 353-354.
- [5] 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求[J]. 中成药, 2000, 22(10): 671-675.
- [6] 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.
- [7] 彭亮, 李诒光, 陈杰, 等. 绞股蓝黄酮类成分HPLC指纹图谱快速分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 53-56.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1498.
- [9] 中华人民共和国香港特别行政区卫生署. 香港中药材标准. 第八册[M]. 2017: 317-329.
- [10] 王玺, 王文宇, 张克荣, 等. 中药HPLC指纹图谱相似性研究的探讨[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(5): 360-362.
- [11] 孟庆华, 刘永锁, 蒋淑敏, 等. 色谱指纹图谱综合信息指数在中药质量控制中的应用研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(6): 359-364.
- [12] 张敏, 董慧. 五味子药材特征图谱质量标准研究[J]. 中国药业, 2004, 23(1): 25-26.

[责任编辑 顾雪竹]