

# 藤黄药材的指纹图谱研究

侯文洁<sup>1,3</sup>, 陈保来<sup>2,3,4</sup>, 萧伟<sup>2,3,4\*</sup>

- (1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046;  
2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;  
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001;  
4. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001)

**[摘要]** 目的: 建立藤黄药材的高效液相指纹图谱方法。方法: 采用 Luna C<sub>8</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 柱温 25 °C, 以乙腈-0.1% 冰乙酸水溶液为流动相梯度洗脱, 检测波长 362 nm, 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>。采用国家药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价》(2004 年 A 版) 软件, 对 11 批不同批次的藤黄药材指纹图谱进行相似度计算。结果: 各批藤黄药材中有 13 个共有峰, 各峰分离度良好, 各批次藤黄药材间共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 1.0%, 药材间相似度均 > 90%。结论: 本方法具有良好的精密性、重复性、稳定性, 各共有峰间分离度高, 可用于藤黄药材的真伪鉴别和质量综合评价。

**[关键词]** 藤黄; HPLC; 指纹图谱

藤黄(gamboge)为藤黄科植物藤黄树(*Garcinia hanbaryi* Hook. f.)分泌的干燥树脂,又名玉黄、月黄,主产柬埔寨、印度、泰国和越南,我国广东和海南地区均有栽培。藤黄酸涩,有毒,具消肿、止血,杀虫之功效。治痈疽肿毒,顽癣恶疮,损伤出血,牙疳蛀齿,烫火伤<sup>[1]</sup>。由藤黄中提取的有效部位总藤黄酸显示出对多种肿瘤细胞有抑制作用,而藤黄含有多种藤黄酸类成分,如 10α-羟基表藤黄酸,藤黄酸,异藤黄酸, gambogin, gambogic acid B, gambogenic acid, gambogellic acid 等<sup>[2]</sup>。为有效控制药材质量,根据所含化学成分的特性和指纹图谱研究方法,对不同产地的藤黄药材进行高效液相指纹图谱研究。

以往建立的藤黄药材指纹图谱<sup>[3-4]</sup>, 色谱峰采集不完全, 虽对藤黄酸、异藤黄酸等进行了定性定量分析, 但对药材中主要成分藤黄酸(C<sub>2</sub>-S)未作相关分析, 并且各色谱峰分离度不佳, 为了进一步丰富藤黄指纹图谱的内容, 提高药材的质

量控制标准, 本实验对不同产地的 11 批藤黄药材进行了研究, 建立藤黄药材指纹图谱标准, 为藤黄药材的质量控制提供依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(G1315B 检测器、G1312A 输液泵、G1313A 自动进样器、G1379A 脱气机、G1316A 柱温箱, 美国 Agilent 公司); BP211D Sartorius 电子天平; KQ-250DB 型数控超声波清洗仪(昆山市超声波仪器有限公司); 甲醇、乙腈、甲酸、乙酸(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 磷酸、乙酸铵(分析纯, 南京化学试剂有限公司); 水为 Milli-Q 超纯水。

### 1.2 试剂

藤黄药材, 见表 1; 新藤黄酸、藤黄酸(C<sub>2</sub>-R)、藤黄酸(C<sub>2</sub>-S) 对照品(江苏康缘药业股份有限公司, 纯度均大于 99%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Phenomenex luna C<sub>8(2)</sub> 100A (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相乙腈(A) - 0.1% 冰乙酸水溶液(B); 梯度洗脱: 0 ~ 20 min, 70% A; 20 ~ 50 min, 70% A ~ 80% A; 50 ~ 70 min, 80% A。检测波长 362 nm; 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温 25 °C; 进样量 5 μL。

**[稿件编号]** 20101125008

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2008ZX09101-Z-024)

**[通信作者]** \* 萧伟, 研究员, 高级工程师, 博士。研究方向为中药新剂型的研究与开发, E-mail: wzzh-nj@tom.com

**[作者简介]** 侯文洁, 在读硕士研究生, 研究方向为中药制剂的研发, Tel: 15150997850, E-mail: nickyn529@hotmail.com

表1 藤黄样品的来源

| No. | 性状     | 来源产地 | 批号       | No. | 性状     | 来源产地 | 批号       |
|-----|--------|------|----------|-----|--------|------|----------|
| 1   | 红黄色块状物 | 广东   | 20090710 | 7   | 橙黄色块状物 | 越南   | 20090806 |
| 2   | 红黄色块状物 | 广东   | 20090908 | 8   | 橙黄色块状物 | 越南   | 20090923 |
| 3   | 红黄色块状物 | 广东   | 20090923 | 9   | 橙黄色块状物 | 越南   | 20091011 |
| 4   | 橙黄色块状物 | 泰国   | 20100407 | 10  | 红黄色块状物 | 海南   | 20100705 |
| 5   | 橙黄色块状物 | 泰国   | 20100608 | 11  | 红黄色块状物 | 海南   | 20100823 |
| 6   | 橙黄色块状物 | 泰国   | 20100625 |     |        |      |          |

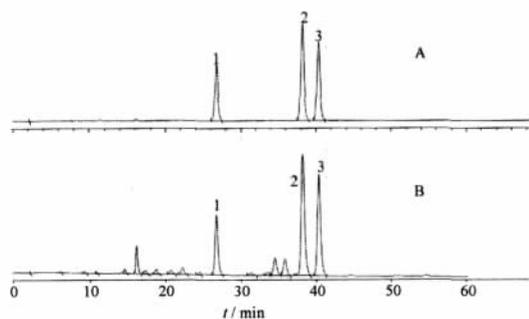
## 2.2 溶液制备

对照品溶液的制备:精密称取新藤黄酸、藤黄酸(C<sub>2</sub>-R)、藤黄酸(C<sub>2</sub>-S)对照品0.012 96,0.019 33,0.013 08 g,加甲醇制成质量浓度为1.296,1.933,1.308 g·L<sup>-1</sup>的混标贮备液,备用。

供试品溶液的制备:取藤黄药材粉末0.2 g,精密称定,置50 mL量瓶中,加入甲醇约40 mL,超声处理20 min,取出,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

## 2.3 测定

分别精密量取对照品溶液及供试品溶液各5 μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,见图1。



A. 对照品;B. 药材;1. 新藤黄酸;2. 藤黄酸(C<sub>2</sub>-R);  
3. 藤黄酸(C<sub>2</sub>-S)。

图1 藤黄药材 HPLC 图

## 2.4 方法学考察<sup>[5]</sup>

**2.4.1 线性关系的考察** 分别精密吸取混标储备液1.0 mL,分别置于10,20,25,50,100,200 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。按2.1项下色谱条件进行分析,分别以色谱峰面积(Y)对质量浓度(X)绘制标准曲线。结果表明新藤黄酸、藤黄酸(C<sub>2</sub>-R)、藤黄酸(C<sub>2</sub>-S)分别在6.48~129.60,9.66~193.30,6.54~130.80 mg·L<sup>-1</sup>,其峰面积与

质量浓度呈良好的线性关系,回归方程分别为 $Y = 5\ 752.9X - 1.24$ , $Y = 7\ 890.3X + 6.436\ 4$ , $Y = 7\ 891.3X + 5.481\ 8$ ,相关系数r均为0.999 9。

**2.4.2 精密度试验** 取藤黄(批号20100407)适量,按2.2项下制备供试品溶液,在2.1项下的色谱条件下重复进样6次,记录色谱图,结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积无显著差异,其RSD分别为0.08%,0.20%,表明仪器精密度良好,符合指纹图谱要求。

**2.4.3 重复性试验** 取藤黄(批号20100407)适量,按2.2项下平行制备6份供试品溶液,进样分析,记录色谱图,结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积无显著差异,其RSD分别为0.12%,0.21%,表明该方法重复性良好,符合指纹图谱要求。

**2.4.4 稳定性试验** 取藤黄(批号20100407)适量,按2.2项下制备供试品溶液,室温放置,分别于0,2,4,6,8,12,24 h进样分析,结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积无显著差异,其RSD分别为0.14%,0.17%,表明该供试品在24 h内稳定。

**2.4.5 加样回收率试验** 取藤黄(批号20100407)药材粉末约0.2 g,精密称定,置100 mL量瓶中,加入新藤黄酸对照品约13 mg,藤黄酸(C<sub>2</sub>-R)对照品约40 mg,藤黄酸(C<sub>2</sub>-S)对照品约30 mg,分别精密称定,再加入甲醇约80 mL,超声处理20 min,取出,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。平行制备6份供试品溶液,按2.1项下色谱条件进行分析,按外标法计算新藤黄酸及藤黄酸的含量及回收率,回收率平均值分别为99.0%,99.5%,99.4%,RSD分别为0.3%,0.2%,0.1%。

**2.4.6 样品含量测定** 取藤黄药材粉末约0.2 g,

精密称定,置50 mL量瓶中,再加入甲醇约40 mL,超声处理20 min,取出,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。按2.1项下色谱条件进行分析,按外标法计算新藤黄酸及藤黄酸的含量,见表2。

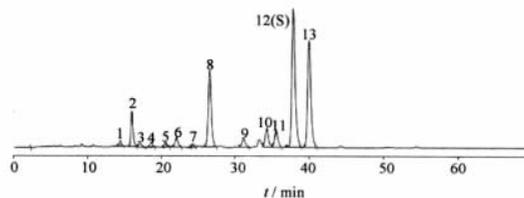


表2 11批藤黄药材中新藤黄酸和藤黄酸质量分数 %

| No.   | 新藤黄酸 | 藤黄酸 (C <sub>2</sub> -R) | 藤黄酸 (C <sub>2</sub> -S) |
|-------|------|-------------------------|-------------------------|
| 21.71 | 2.79 | 10.73                   | 8.19                    |
| 2     | 6.15 | 18.65                   | 14.46                   |
| 3     | 6.73 | 20.10                   | 15.37                   |
| 4     | 6.49 | 15.48                   | 12.12                   |
| 5     | 6.72 | 19.40                   | 14.99                   |
| 6     | 6.53 | 19.60                   | 15.11                   |
| 7     | 6.53 | 20.86                   | 15.94                   |
| 8     | 5.20 | 17.92                   | 13.69                   |
| 9     | 6.93 | 18.38                   | 14.22                   |
| 10    | 5.24 | 15.09                   | 11.69                   |
| 11    | 6.28 | 21.33                   | 16.29                   |
| 平均值   | 5.96 | 17.96                   | 13.82                   |

图2 藤黄药材的色谱指纹特征图谱

## 2.6 指纹图谱的建立<sup>[6]</sup>

**2.6.1 共有指纹峰的标定** 采用相对保留时间法定共有指纹峰,以图谱中藤黄酸色谱峰为参照峰(S),将各色谱峰保留时间与同一图谱中参照峰的保留时间比较,其比值为各色谱峰的相对保留时间,计算11批药材指纹图谱中各色谱峰的相对保留时间,见表3。其中13个色谱峰为各样品所共有,故标定它们为共有指纹峰,见图2。

**2.6.2 共有峰的相对峰面积** 以图谱中藤黄酸峰为参照峰,将各色谱峰峰面积与同一图谱参照峰的峰面积比较,其比值为各色谱峰的相对峰面积,结果符合“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求<sup>[7]</sup>”的相关规定,各共有指纹峰的面积比值必须相对固定,见表4。

**2.6.3 非共有峰面积** 通过对11批藤黄药材供试品的测定,统计各批非共有峰面积百分比,结果非共有峰面积百分比符合指纹图谱研究的规定。

**2.6.4 相似度计算** 采用中国药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价》软件(2004年A版)进行相似度计算。设置批号为20100407的样品图谱为参照图谱,对照图谱生成方法采用中位数法,时间窗宽度为0.10,多点校正后自动匹配,生成对照指纹图谱,见图3。结果11批藤黄药材相似度均在0.96以上,表明所建立的指纹图谱的技术指标稳定、重复性较好。

## 3 讨论

**3.1 提取方法的选择** 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、乙腈、乙

表3 11批藤黄药材各峰相对保留时间

| 峰号    | 各批样品相对保留时间 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 平均值   | RSD % |
|-------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|       | 1          | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    |       |       |
| 1     | 0.381      | 0.381 | 0.382 | 0.380 | 0.381 | 0.383 | 0.380 | 0.381 | 0.380 | 0.379 | 0.381 | 0.381 | 0.28  |
| 2     | 0.422      | 0.421 | 0.422 | 0.420 | 0.423 | 0.421 | 0.422 | 0.420 | 0.421 | 0.422 | 0.421 | 0.421 | 0.22  |
| 3     | 0.452      | 0.453 | 0.453 | 0.451 | 0.450 | 0.452 | 0.453 | 0.451 | 0.452 | 0.451 | 0.452 | 0.452 | 0.22  |
| 4     | 0.492      | 0.490 | 0.493 | 0.490 | 0.494 | 0.490 | 0.491 | 0.489 | 0.489 | 0.488 | 0.490 | 0.491 | 0.37  |
| 5     | 0.542      | 0.540 | 0.541 | 0.543 | 0.540 | 0.544 | 0.540 | 0.539 | 0.539 | 0.538 | 0.539 | 0.540 | 0.37  |
| 6     | 0.582      | 0.580 | 0.582 | 0.583 | 0.581 | 0.580 | 0.581 | 0.583 | 0.580 | 0.576 | 0.580 | 0.581 | 0.35  |
| 7     | 0.636      | 0.639 | 0.641 | 0.639 | 0.639 | 0.638 | 0.639 | 0.640 | 0.638 | 0.637 | 0.637 | 0.638 | 0.24  |
| 8     | 0.700      | 0.701 | 0.700 | 0.699 | 0.699 | 0.705 | 0.698 | 0.698 | 0.698 | 0.696 | 0.702 | 0.700 | 0.33  |
| 9     | 0.820      | 0.821 | 0.822 | 0.816 | 0.824 | 0.821 | 0.818 | 0.820 | 0.821 | 0.817 | 0.824 | 0.820 | 0.35  |
| 10    | 0.904      | 0.903 | 0.905 | 0.903 | 0.903 | 0.901 | 0.903 | 0.903 | 0.904 | 0.903 | 0.903 | 0.903 | 0.12  |
| 11    | 0.938      | 0.940 | 0.938 | 0.939 | 0.938 | 0.937 | 0.938 | 0.941 | 0.938 | 0.937 | 0.938 | 0.938 | 0.13  |
| 12(S) | 1.000      | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.000 |
| 13    | 1.056      | 1.059 | 1.057 | 1.056 | 1.056 | 1.056 | 1.057 | 1.056 | 1.058 | 1.057 | 1.057 | 1.057 | 0.093 |

表4 11批藤黄药材各峰相对峰面积

| 峰号    | 各批样品相对峰面积 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       | 平均值   |
|-------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|       | 1         | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | 11    |       |
| 1     | 0.021     | 0.023 | 0.020 | 0.014 | 0.035 | 0.028 | 0.017 | 0.019 | 0.025 | 0.022 | 0.027 | 0.023 |
| 2     | 0.150     | 0.020 | 0.124 | 0.062 | 0.199 | 0.172 | 0.099 | 0.115 | 0.165 | 0.125 | 0.165 | 0.127 |
| 3     | 0.015     | 0.029 | 0.016 | 0.010 | 0.017 | 0.016 | 0.014 | 0.013 | 0.018 | 0.013 | 0.019 | 0.016 |
| 4     | 0.037     | 0.018 | 0.032 | 0.034 | 0.038 | 0.037 | 0.033 | 0.035 | 0.032 | 0.036 | 0.029 | 0.033 |
| 5     | 0.033     | 0.022 | 0.030 | 0.029 | 0.037 | 0.034 | 0.030 | 0.029 | 0.027 | 0.033 | 0.030 | 0.030 |
| 6     | 0.048     | 0.043 | 0.057 | 0.055 | 0.075 | 0.060 | 0.057 | 0.051 | 0.048 | 0.065 | 0.060 | 0.056 |
| 7     | 0.016     | 0.027 | 0.015 | 0.010 | 0.020 | 0.017 | 0.012 | 0.013 | 0.017 | 0.014 | 0.019 | 0.016 |
| 8     | 0.425     | 0.387 | 0.472 | 0.479 | 0.616 | 0.507 | 0.491 | 0.448 | 0.425 | 0.539 | 0.496 | 0.480 |
| 9     | 0.021     | 0.064 | 0.024 | 0.012 | 0.119 | 0.061 | 0.016 | 0.017 | 0.028 | 0.062 | 0.065 | 0.044 |
| 10    | 0.108     | 0.100 | 0.116 | 0.110 | 0.125 | 0.117 | 0.112 | 0.116 | 0.113 | 0.137 | 0.114 | 0.115 |
| 11    | 0.100     | 0.105 | 0.112 | 0.105 | 0.108 | 0.103 | 0.110 | 0.109 | 0.108 | 0.120 | 0.105 | 0.108 |
| 12(S) | 1.000     | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 13    | 0.765     | 0.791 | 0.763 | 0.758 | 0.797 | 0.784 | 0.788 | 0.759 | 0.776 | 0.767 | 0.768 | 0.774 |

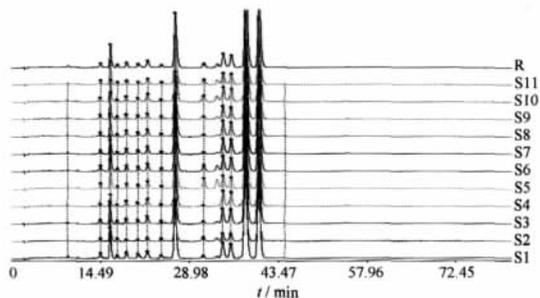


图3 11批藤黄药材的指纹图谱

醚、乙酸乙酯)、提取方式(超声、加热回流)及提取时间进行了考察,最终选择用甲醇超声20 min,方法简便,得到的色谱峰信息丰富。

**3.2 流动相的选择** 考察了乙腈-0.1%醋酸铵梯度洗脱,甲醇-0.1%磷酸水溶液(9:1),乙腈-0.1%甲酸水溶液(75:25),甲醇-0.1%冰乙酸水溶液(93:7),乙腈-0.1%冰乙酸水溶液(75:25)以及乙腈-0.1%冰乙酸水溶液梯度洗脱,根据主要成分的性质,采取乙腈-0.1%冰乙酸水溶液梯度洗脱,分离效果较好,保留时间适中。

**3.3 色谱柱的选择** 考察了相同条件下,十八烷基键合硅胶、八烷基键合硅胶以及苯基、氨基键合硅胶的固定相对藤黄药材中各成分分离度的影响,结果显示,使用八烷基键合硅胶柱,藤黄中各成分分离度高,色谱峰尖锐,分离时间短。

**3.4 测定波长的选择** 采用采用 Agilent DAD 二

级管阵列检测器,在分析时进行全波长紫外扫描,同时得到不同波长下全数据。结果显示,各主要色谱峰在360,290,230,220 nm 波长处有最大吸收,经比较后表明在362 nm 波长的色谱图峰形最好,出峰数目适中,各色谱峰相互之间分离度较好,故检测波长定在362 nm。

**3.5 指纹图谱评价** 对采自广东、海南、泰国、越南的11批藤黄药材进行了指纹图谱分析,不同产地、批次藤黄中主要成分的量略有差异,但指纹图谱中主要色谱峰的整体图貌基本一致,经相似度计算,11批样品指纹图谱相似度均在0.96以上,不同产地、批次的藤黄药材指纹图谱无显著性差异。

**【参考文献】**

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社, 1977:2695.
- [2] 贾明美,寿清耀,谭青,等. 藤黄化学成分的研究[J]. 化学学报,2008,66(22):2513.
- [3] 韩全斌,宋景政,乔春峰,等. 藤黄中 xanthone 类化合物的定性定量分析[J]. 中国天然药物,2006,4:210.
- [4] 张旭,柳文媛,冯锋,等. 藤黄 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国医药工业杂志,2003,34:605.
- [5] 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:485.
- [6] 屠鹏飞. 中药指纹图谱指定的方法学探讨[C]. 现代化中药产业关键技术系列研讨会——国际色谱指纹评价中药质量研讨会. 广州:广州药学会,2001.
- [7] 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(暂行)[J]. 中成药,2000,22(10):671.

## Fingerprint analysis of gamboge by HPLC

HOU Wenjie<sup>1,3</sup>, CHEN Baolai<sup>2,3</sup>, XIAO Wei<sup>2,3\*</sup>

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Jiangsu Kanion pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China;

3. State Key Laboratory of Pharmaceutical New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China;

4. Enterprises Academician Workstations, Lianyungang 222001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the chromatographic fingerprint for the quality control of gamboge. **Method:** Analysis on a Luna C<sub>8</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column eluted with mobile phases containing acetonitrile and 0.1% glacial acetic acid in water in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was at 362 nm. The temperature of column was 25 °C. And data of 11 batches of gamboge samples from different sources were analysed by "similarity evaluation for chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine" software. **Result:** Thirteen common peaks were selected in chromatograms, and all the common peaks were separated effectively. **Conclusion:** The precision, repeatability, and stability of this method were satisfying. The method developed can be used to identify and evaluate the quality of gamboge.

**[Key words]** gamboge; HPLC; fingerprint

doi: 10.4268/cjcm20110627

[责任编辑 丁广治]

### 欢迎订购《当代药用植物典》丛书

《当代药用植物典》由香港浸会大学中医药学院赵中振教授及中国工程院肖培根院士主编。全书分为3篇共4册,分别为东方篇(第一及第二册)、西方篇(第三册)与岭南篇(第四册),涵盖800多种国际上常用药用植物,系统地收录了植物基原主要成分及其化学结构、药理、毒理、原植物及药材图片和临床资料。收集的资料信息量极大,不仅仅涉及到了生长于中国的草本植物,同时也涉及到许多生长在日本、韩国乃至欧美国家的草本植物,堪称国际天然药用草本植物之大成,融汇中西,与时俱进。

全书图文并茂,深入浅出,内容独到。书中药用草本植物的照片(实物照片)质量优良,不少是深入其原产地拍摄获得,十分珍贵,便于与药用草本植物实物进行鉴别比较。特别附有的中国、日本、韩国药典中的同名异物情况中英文对照表对在国际上规范药用草本植物名称及功用说明更是具有开创性的意义。书中药用植物名采用中英文对照的形式,加上药用草本植物的化学结构分析,用国际化的语言阐述草本植物的各个特性,可谓中西合璧,便于草本植物和中医药精神的进一步国际化。全书版式简洁,分类清楚,除为从事教育、医药、科研等方面的人士提供最新的参考资料外,亦可培养民众对中医药的兴趣及认识,普及中医知识和应用,是一套值得收藏的参考工具书。

丛书作者在行业内具有权威性,经验丰富,出版过多部中医药学等方面的中英文著作,在国际上具有广泛的影响力,其实力得到专业人士的认同。

《当代药用植物典》(简体版)荣获中国第七届(2007年度)输出版、引进版优秀图书奖。

定价:368.00元/册,全套定价1472元,订阅方式:邮局汇款。

汇款地址:北京市东城区东直门内南小街16号中国中药杂志社收,请注明书名(册)及订购数量,电话:010-64048925,联系人:程志铭。