

ASE-HPLC 测定仙茅中仙茅苷的含量及其指纹图谱研究

王丽丽¹, 韦日伟², 廖强^{2*}, 梁美艳² (1. 桂林市食品药品检验所, 广西 桂林 541012; 2. 梧州市食品药品检验所, 广西 梧州 543002)

摘要: 目的 获得仙茅药材的 HPLC 指纹图谱, 同时研究快速萃取仙茅中仙茅苷及其含量测定的方法, 为其质量控制提供依据。方法 采用正交试验优选 ASE 350 快速溶剂萃取系统的最佳提取方法, 采用 HPLC 测定仙茅苷的量, 色谱柱为 Thermo Synchronis C₁₈(100 mm×3 mm, 3 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长为 285 nm, 柱温为 40 ℃。指纹图谱共有模式采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0 版)进行处理分析。结果 采用萃取温度 100 ℃、静态萃取时间 5 min、循环提取 2 次的快速提取方法最优。在指纹图谱研究中, 标定了 15 个共有峰, 建立了对照指纹图谱, 20 批药材与共有模式之间相似性良好, 相似度均>0.9。结论 本方法快速、准确, 可用于仙茅药材的综合质量评价。

关键词: 仙茅; 指纹图谱; 快速溶剂萃取; 仙茅苷; 正交试验

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)06-0869-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.06.018

引用本文: 王丽丽, 韦日伟, 廖强, 等. ASE-HPLC 测定仙茅中仙茅苷的含量及其指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 869-874.

Contents Determination of Curculigoside and Fingerprint Chromatograms of Curculiginis Rhizoma by ASE-HPLC

WANG Lili¹, WEI Riwei², LIAO Qiang^{2*}, LIANG Meiyan² (1. Guilin Food and Drug Control Institute, Guilin 541012, China; 2. Wuzhou Food and Drug Control Institute, Wuzhou 543002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the HPLC fingerprint and study on rapid extraction and content determination of curculigoside in Curculiginis Rhizoma, provide evidence for quality control. **METHODS** The orthogonal design was used for ASE 350 condition optimization, and the content of curculigoside was determined by HPLC, using Thermo Synchronis C₁₈ (100 mm×3 mm, 3 μm) column, acetonitrile-0.1% phosphoric acid as mobile phase by gradient elution, the flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, the column temperature was 40 ℃, detection wavelength was 285 nm. The data analysis was performed with Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2.0). **RESULTS** The optimal extraction conditions were extracting two times at 100 ℃ and static extraction time was 5 min. There were fifteen common peaks in the fingerprint. The similarity of fingerprints of 20 batches of Curculiginis Rhizoma were all >0.9. **CONCLUSION** The method is rapid, accurate, and can be used to control quality evaluation for Curculiginis Rhizoma. **KEY WORDS:** Curculiginis Rhizoma; fingerprint; accelerated solvent extraction; curculigoside; orthogonal design

仙茅为石蒜科植物仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn. 的干燥根茎, 具有补肾阳、强筋骨、祛寒湿之功效。用于阳痿精冷、筋骨痿软、腰膝冷痛、阳虚冷泻^[1]。药理学研究显示仙茅具有清除氧自由基、增强免疫、延缓生殖系统老化、抗骨质疏松、补肾壮阳、保肝、保护心血管系统等作用^[2]。其化学成分主要包括木脂素类、酚及酚苷类、皂苷类、黄酮类、甜味蛋白及多糖类等^[3]。目前, 多用仙茅苷和仙茅苷乙作为仙茅的质控指标^[4-5], 然而一两个成分不能表征中药复杂的体系, 很难全面控制仙茅的内在质量, 不能对其真伪优劣作出评价^[6]。

中药指纹图谱作为现代中药质量控制和鉴别的新技术, 为整体评价中药质量提供了新思路。马鹏、潘馨等^[7-8]曾对仙茅正丁醇提取部位的指纹图谱进行研究, 而本研究采用甲醇提取不同极性成分, 能更全面地反映仙茅的指纹特征信息。快速溶剂萃取(accelerated solvent extraction, ASE)法是在高温和高压条件下进行萃取的一种新型前处理方法, 其操作简单、快速, 大大缩短了萃取时间。本实验研究了 ASE 的样品前处理方法, 建立仙茅中仙茅苷定量测定方法, 并利用不同产地的 20 批仙茅药材建立了 HPLC 指纹图谱, 为全面控

作者简介: 王丽丽, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 15277433629
15878055153 E-mail: 19972802@qq.com

E-mail: 583313176@qq.com *通信作者: 廖强, 男, 主管药师 Tel:

制仙茅质量提供参考依据。

1 仪器与试药

Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 高效液相色谱仪、Thermo Synchronis C₁₈ 色谱柱(100 mm×3 mm, 3 μm)、ASE 350 快速溶剂萃取仪(Thermo 公司); XA205DU 电子分析天平(梅特勒-托利多)。

对照品仙茅苷(中国食品药品检定研究院, 批号: 110771-200904; 含量: 99.6%); 乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

仙茅药材均为市售品, 经广西梧州食品药品检验所黄衢副主任中药师鉴定为石蒜科植物仙茅 *Curculigo orchoides* Gaertn. 的干燥根茎, 来源及批号见表 1。

表 1 样品来源及批号

Tab. 1 Sample source and batch number

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	四川	1508090	S11	湖南	1511024
S2	四川	1511118	S12	湖南	150523
S3	广西	20150701	S13	湖南	20151001
S4	广西	150721	S14	广东	150507
S5	广西	151201	S15	广东	150331
S6	广西	160302	S16	广东	1509076
S7	浙江	1509003	S17	广东	1508166
S8	浙江	1511012	S18	湖北	151102
S9	浙江	1507103	S19	湖北	151008
S10	浙江	1505082	S20	湖北	150630

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Thermo Synchronis C₁₈(100 mm×3 mm, 3 μm)。流动相: 乙腈(A)-0.1%磷酸(B)。梯度洗脱(0~5 min, 5%A; 5~15 min, 5%→10%A; 15~20 min, 10%→15%A; 20~30 min, 15%→25%A; 30~35 min, 25%→35%A; 35~35.1 min, 35%→5%A; 35.1~40 min, 5%A); 体积流量为 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长为 285 nm, 柱温为 40 ℃, 进样量为 5 μL。在上述色谱条件下, 仙茅苷对照品和供试品中其他色谱峰分离良好, 理论板数按仙茅苷峰计≥5 000。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取仙茅苷对照品 10.24 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 制成浓度为 0.408 0 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取仙茅药材粉末(过三号筛)约 1 g, 精密称定, 与 1 g 硅藻土混合均匀, 移入到装有滤膜的 10 mL 萃取池中, 再加入适量硅藻土, 轻轻振摇使之与

池口在同一水平线上, 拧紧萃取池上盖, 按快速溶剂萃取仪优化好的参数(萃取溶剂甲醇、萃取温度 100 ℃、静态萃取时间 5 min、冲洗体积 100%、循环 2 次)萃取, 萃取结束后, 把萃取液转移于 25 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

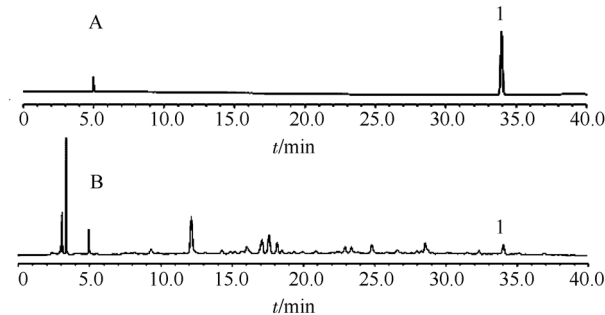


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-仙茅样品; 1-仙茅苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference substance; B-Curculigins Rhizoma; 1-curculigoside.

2.4 ASE 正交试验的设计

参考中国药典 2015 年版以及仙茅中成分测定的相关文献^[4-5,9-10], 本研究采用甲醇为萃取溶剂, 以仙茅苷的量为测定指标, 采用 L₉(3³) 正交试验设计对快速溶剂萃取效率影响较大的因素(萃取温度、静态萃取时间、循环次数)进行优化, 因素水平见表 2。正交优化结果显示, 影响仙茅中仙茅苷提取效率的各因素主次顺序为萃取温度>静态萃取时间>循环次数, 静态萃取时间和循环次数对实验结果影响不显著, 结果见表 3。综合考虑时间和提取效率等因素, 优化的最佳提取工艺组合: 萃取温度 100 ℃; 静态萃取时间 5 min; 循环萃取 2 次。

表 2 因素水平表

Tab. 2 Table of factors and levels

水平	因素		
	A 萃取温度/℃	B 静态萃取时间/min	C 循环次数
-1	80	1	1
0	100	3	2
1	120	5	3

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下对照品储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。分别精密吸取上述对照品溶液各 5 μL, 注入高效液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积。以浓度

表 3 $L_9(3^3)$ 正交试验设计表及结果($n=3$)

Tab. 3 Designs table and results of $L_9(3^3)$ orthogonal test ($n=3$)

序号	萃取 温度/℃	静态萃取 时间/min	循环 次数	仙茅苷含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	80	1	1	0.545
2	80	3	2	0.592
3	80	5	3	0.602
4	100	1	2	0.622
5	100	3	3	0.627
6	100	5	1	0.648
7	120	1	3	0.618
8	120	3	1	0.620
9	120	5	2	0.639
K_1	0.580	0.595	0.604	
K_2	0.632	0.613	0.618	
K_3	0.626	0.630	0.616	
R	0.052	0.035	0.014	

($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 仙茅苷的回归方程为 $Y=3\ 980.445\ 6X-2.285\ 6(r=0.999\ 8)$, 线性范围为 20.4~612.0 ng。

2.5.2 仪器精密度试验 取同一样品(S9), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件洗脱, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD。结果相对保留时间 $\text{RSD}<0.6\%$, 相对峰面积 $\text{RSD}<0.9\%$, 说明仪器精密度好。

2.5.3 重复性试验 取同一样品(S9), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件洗脱, 分别进样, 记录色谱图, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示相对保留时间 $\text{RSD}<0.4\%$, 相对峰面积 $\text{RSD}<2.2\%$, 说明重复性好。

2.5.4 稳定性试验 取同一样品(S9), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件洗脱, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 记录色谱图, 考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD。结果显示相对保留时间 $\text{RSD}<0.9\%$, 相对峰面积 $\text{RSD}<1.5\%$, 表明样品在 24 h 内稳定。

2.5.5 加样回收率试验 取已测定的仙茅样品(S9) 9 份, 每份 0.5 g, 精密称定, 编号 1~3、4~6、7~9 号分别精密加入 $0.408\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 仙茅苷 0.8, 1.0, 1.2 mL, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 计算平均回收率, 平均回收率为 99.12%, RSD 为 1.98%。

2.6 指纹图谱共有模式的建立及相似度评价

2.6.1 指纹图谱共有模式的建立 取 20 批不同批次仙茅样品按“2.3”项下方法制备, 各取 5 μL , 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 得到 HPLC 指纹图谱, 运用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0 版)软件, 对保留时间 0~38 min 内的峰进行分析, 选择分离度高、重复性好的色谱峰作为共有指纹峰, 共标定 15 个共有峰, 20 批样品的色谱叠加图见图 2。仙茅的 HPLC 指纹图谱共有模式样品指纹图谱见图 3, 其共有峰面积占总峰面积的 80%以上, 符合共有峰的要求。以仙茅苷(14 号峰)为参照峰(S), 计算各色谱峰保留时间和保留峰面积与同一图谱中 S 峰的保留时间和保留峰面积比值, 得到的相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 4~5。

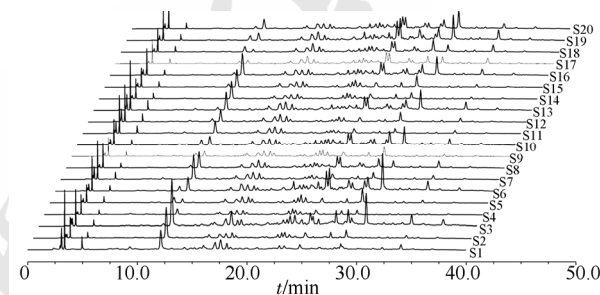


图 2 20 批仙茅 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC of fingerprint of 20 batches of Curculigin Rhizoma

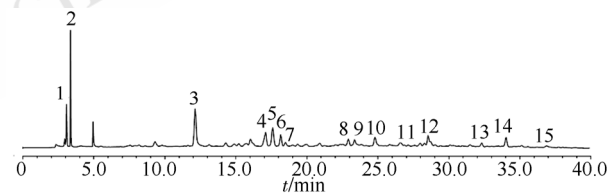


图 3 仙茅的 HPLC 指纹图谱共有模式

14 号峰仙茅苷为参比峰。

Fig. 3 The common HPLC fingerprint of Curculigin Rhizoma

Curculigoside as reference is represented by peak 14.

2.6.2 相似度评价及分析 采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0 版)软件, 以样品(批号: 1507103)作为参照图谱, 利用中位数法进行多点校正生成对照指纹图谱, 各批样品与对照指纹图谱进行比较, 计算各批仙茅药材的指纹图谱相似度, 结果见表 6。由相似度评价结果可以看出, 各批仙茅药材与对照指纹图谱间的相似度均 >0.9 , 表明药材质量相对稳定。

表 4 20 批仙茅指纹图谱共有峰相对保留时间

Tab. 4 Relative retention time of common peaks in 20 batches of Curculigins Rhizoma

序号	相对保留时间														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14(S)	15
S1	0.090	0.099	0.356	0.502	0.517	0.533	0.543	0.674	0.687	0.729	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S2	0.090	0.099	0.356	0.499	0.517	0.533	0.543	0.674	0.686	0.729	0.797	0.839	0.950	1.000	1.084
S3	0.090	0.099	0.357	0.502	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.797	0.830	0.950	1.000	1.085
S4	0.090	0.099	0.357	0.502	0.517	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.797	0.839	0.950	1.000	1.084
S5	0.090	0.099	0.356	0.502	0.516	0.533	0.543	0.674	0.686	0.731	0.797	0.839	0.950	1.000	1.084
S6	0.090	0.099	0.356	0.499	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.798	0.839	0.950	1.000	1.085
S7	0.090	0.099	0.357	0.502	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.729	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S8	0.090	0.099	0.357	0.499	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.797	0.839	0.950	1.000	1.084
S9	0.090	0.099	0.357	0.502	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.729	0.797	0.839	0.950	1.000	1.084
S10	0.090	0.099	0.356	0.499	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S11	0.089	0.099	0.356	0.502	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.729	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S12	0.089	0.099	0.356	0.502	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.729	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S13	0.089	0.099	0.356	0.502	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S14	0.089	0.099	0.356	0.498	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S15	0.089	0.099	0.356	0.499	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.729	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S16	0.089	0.099	0.356	0.498	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.798	0.839	0.950	1.000	1.085
S17	0.089	0.099	0.355	0.498	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S18	0.089	0.099	0.355	0.498	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S19	0.089	0.099	0.355	0.498	0.515	0.533	0.542	0.674	0.687	0.728	0.798	0.839	0.950	1.000	1.084
S20	0.089	0.099	0.355	0.498	0.515	0.533	0.542	0.674	0.687	0.728	0.797	0.839	0.950	1.000	1.084
平均值	0.090	0.099	0.356	0.500	0.516	0.533	0.543	0.674	0.687	0.728	0.798	0.838	0.950	1.000	1.084
RSD/%	0.430	0.057	0.155	0.360	0.092	0.043	0.050	0.019	0.032	0.114	0.019	0.237	0.011	0	0.028

表 5 20 批仙茅指纹图谱共有峰相对峰面积

Tab. 5 Relative peak area of common peaks in 20 batches of Curculigins Rhizoma

序号	相对峰面积														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14(S)	15
S1	1.554	2.157	4.817	1.984	2.324	1.070	0.859	0.679	0.710	1.077	0.9200	1.270	0.411	1.000	0.258
S2	0.521	1.413	8.580	2.514	1.878	1.807	0.909	2.082	1.526	2.832	1.470	2.997	0.394	1.000	0.397
S3	1.300	0.712	5.513	1.103	1.812	0.494	0.644	0.790	1.146	1.202	0.982	1.138	0.345	1.000	0.757
S4	0.849	4.068	5.045	3.257	4.122	3.072	1.742	1.528	2.334	5.207	2.703	3.088	0.665	1.000	0.668
S5	0.545	1.195	1.415	2.656	2.576	1.936	1.396	2.413	1.927	2.139	1.236	4.118	0.529	1.000	0.289
S6	1.320	0.750	3.705	1.332	0.790	0.501	0.837	2.265	1.071	2.058	0.802	1.520	0.367	1.000	0.410
S7	1.067	1.634	6.164	1.982	1.953	1.214	0.420	0.776	0.722	1.686	0.586	1.716	0.351	1.000	0.216
S8	0.175	0.701	2.617	1.206	1.339	0.666	0.806	1.420	0.522	1.686	1.187	1.057	0.425	1.000	0.186
S9	0.643	1.807	2.649	3.617	3.260	2.512	1.769	3.078	2.936	3.108	1.726	4.490	0.598	1.000	0.417
S10	0.366	0.837	4.658	1.691	1.243	0.851	0.551	0.961	1.031	2.002	0.873	1.908	0.469	1.000	0.313
S11	1.075	2.270	4.390	2.635	2.661	1.449	0.518	0.916	0.867	2.052	0.607	1.837	0.460	1.000	0.203
S12	1.076	1.739	3.216	2.241	2.389	1.359	0.639	1.087	1.062	1.580	0.524	2.222	0.446	1.000	0.175
S13	0.855	1.080	2.388	1.429	1.203	0.631	0.886	1.188	0.534	1.038	0.914	0.942	0.425	1.000	0.280
S14	0.628	1.902	9.935	3.299	2.592	2.211	1.136	2.366	1.785	3.534	1.964	3.273	0.502	1.000	0.540
S15	0.489	1.259	6.747	2.573	2.259	1.855	1.132	2.272	1.578	2.446	1.439	3.745	0.467	1.000	0.343
S16	1.283	0.874	4.323	1.631	1.056	0.828	0.421	0.757	1.193	2.358	0.958	1.823	0.235	1.000	0.450
S17	0.922	0.717	4.636	1.204	1.382	0.599	0.281	0.470	0.468	1.140	0.423	0.877	0.216	1.000	0.173
S18	1.138	1.586	4.427	1.130	1.354	0.618	0.365	0.502	0.601	0.821	0.855	1.318	0.228	1.000	0.134
S19	1.148	1.552	4.813	1.008	0.946	1.397	0.188	0.140	0.373	1.193	0.856	1.097	0.357	1.000	0.212
S20	0.308	0.999	2.250	1.827	1.194	0.812	0.436	0.630	1.082	1.578	1.078	1.772	0.245	1.000	0.418
平均值	0.583	1.363	3.965	2.116	1.917	1.244	0.687	1.216	1.173	2.037	0.950	2.110	0.347	1.000	0.342
RSD/%	40.56	53.84	45.47	39.76	44.79	56.78	56.68	62.23	57.16	51.17	49.31	52.80	29.55	0	49.23

表 6 20 批仙茅药材相似度评价结果

Tab. 6 Similarities of 20 batches of Curculigins Rhizoma

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	对照谱
S1	1.000	0.903	0.912	0.943	0.928	0.967	0.992	0.924	0.977	0.946	0.973	0.931	0.906	0.913	0.943	0.911	0.994	0.986	0.947	0.937	0.943
S2	0.903	1.000	0.986	0.965	0.932	0.906	0.912	0.922	0.986	0.964	0.921	0.908	0.991	0.942	0.947	0.951	0.940	0.967	0.981	0.993	0.904
S3	0.912	0.986	1.000	0.903	0.918	0.943	0.928	0.953	0.942	0.961	0.921	0.943	0.957	0.988	0.979	0.961	0.923	0.945	0.900	0.912	0.940
S4	0.943	0.965	0.903	1.000	0.956	0.984	0.912	0.908	0.978	0.946	0.951	0.922	0.945	0.938	0.910	0.956	0.904	0.971	0.984	0.986	0.913
S5	0.928	0.932	0.918	0.956	1.000	0.900	0.912	0.934	0.972	0.921	0.917	0.928	0.946	0.917	0.924	0.923	0.942	0.907	0.924	0.923	0.958
S6	0.967	0.906	0.943	0.984	0.900	1.000	0.952	0.975	0.951	0.943	0.983	0.973	0.945	0.976	0.918	0.953	0.928	0.945	0.915	0.942	0.947
S7	0.992	0.912	0.928	0.912	0.912	0.952	1.000	0.901	0.922	0.913	0.907	0.923	0.942	0.934	0.948	0.909	0.943	0.972	0.924	0.934	0.977
S8	0.924	0.922	0.953	0.908	0.934	0.975	0.901	1.000	0.917	0.928	0.934	0.924	0.935	0.972	0.924	0.907	0.903	0.918	0.944	0.942	0.973
S9	0.977	0.986	0.942	0.978	0.972	0.951	0.922	0.917	1.000	0.912	0.903	0.918	0.976	0.971	0.924	0.934	0.927	0.908	0.934	0.957	0.941
S10	0.946	0.964	0.961	0.946	0.921	0.943	0.913	0.928	0.912	1.000	0.934	0.906	0.913	0.908	0.982	0.936	0.938	0.986	0.908	0.935	0.958
S11	0.973	0.921	0.921	0.951	0.917	0.983	0.907	0.934	0.903	0.934	1.000	0.977	0.946	0.918	0.923	0.943	0.941	0.906	0.973	0.921	0.966
S12	0.931	0.908	0.943	0.922	0.928	0.973	0.923	0.924	0.918	0.906	0.977	1.000	0.910	0.973	0.914	0.900	0.941	0.934	0.912	0.975	0.907
S13	0.906	0.991	0.957	0.945	0.946	0.945	0.942	0.935	0.976	0.913	0.946	0.910	1.000	0.917	0.972	0.906	0.982	0.913	0.945	0.956	0.911
S14	0.913	0.942	0.988	0.938	0.917	0.976	0.934	0.972	0.971	0.908	0.918	0.973	0.917	1.000	0.921	0.934	0.907	0.911	0.943	0.954	0.938
S15	0.943	0.947	0.979	0.910	0.924	0.918	0.948	0.924	0.924	0.982	0.923	0.914	0.972	0.921	1.000	0.919	0.911	0.943	0.907	0.925	0.907
S16	0.911	0.951	0.961	0.956	0.923	0.953	0.909	0.907	0.934	0.936	0.943	0.900	0.906	0.934	0.919	1.000	0.953	0.907	0.924	0.966	0.973
S17	0.994	0.940	0.923	0.904	0.942	0.928	0.943	0.903	0.927	0.938	0.941	0.941	0.982	0.907	0.911	0.953	1.000	0.917	0.911	0.907	0.945
S18	0.986	0.967	0.945	0.971	0.907	0.945	0.972	0.918	0.908	0.986	0.906	0.934	0.913	0.911	0.943	0.907	0.917	1.000	0.904	0.928	0.934
S19	0.947	0.981	0.900	0.984	0.924	0.915	0.924	0.944	0.934	0.908	0.973	0.912	0.945	0.943	0.907	0.924	0.911	0.904	1.000	0.944	0.987
S20	0.937	0.993	0.912	0.986	0.923	0.942	0.934	0.942	0.957	0.935	0.921	0.975	0.956	0.954	0.925	0.966	0.907	0.928	0.944	1.000	0.947
对照谱	0.943	0.904	0.940	0.913	0.958	0.947	0.977	0.973	0.941	0.958	0.966	0.907	0.911	0.938	0.907	0.973	0.945	0.934	0.987	0.947	1.000

2.7 仙茅苷量的测定

取上述 20 批仙茅样品, 每批 3 份, 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, 计算仙茅苷的量, 结果见表 7。

表 7 20 批仙茅中仙茅苷测定结果($n=3$)

Tab. 7 Determination results of 20 batches of Curculigins Rhizoma($n=3$)

样品编号	仙茅苷	样品编号	仙茅苷
S1	0.479	S11	0.565
S2	0.276	S12	0.852
S3	1.057	S13	0.304
S4	0.968	S14	1.038
S5	0.118	S15	0.818
S6	0.285	S16	0.195
S7	0.862	S17	0.282
S8	0.424	S18	0.565
S9	0.656	S19	0.639
S10	0.201	S20	0.764

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

比较了 3 个不同厂家 C_{18} 色谱柱 Thermo Synchronis C_{18} (100 mm×3 mm, 3 μ m)、Agilent Zorbax Rapid Resolution HT SB- C_{18} (100 mm×3 mm, 1.8 μ m)、phenomenex Kinetex XB- C_{18} (100 mm×4.6 mm, 2.6 μ m)对样品的分离效果, 在同等的梯度洗脱条件下, Thermo Synchronis C_{18} 的分离效果较好。上述 Agilent 色谱柱的开发理念在于缩短 UPLC 分析时间, phenomenex 色谱柱的含碳量为 10%, 而 Thermo 这款色谱柱的含碳量高达 16%, 金属杂质质量较低。反相色谱柱含碳量越高, 说明硅胶上键合有机相越多, 溶质的 K 值越大, 保留越强, 分离度越高。保留强可能造成拖尾等峰畸变, 但通过有效控制金属杂质质量来保证硅胶纯度起到了防止拖尾的作用。本研究采用了 Thermo Synchronis C_{18} 色谱柱, 色谱分离和峰形都达到了较好的效果。

3.2 检测波长的选择

供试品溶液在 200~400 nm 进行全波长扫描, 并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明, 在 285 nm 下各特征峰数量较多, 峰形较好, 各峰分离良好, 因此选择 285 nm 为指纹图谱测定波长。20 批药材指纹图谱中, 共标定了 15 个共有峰, 共有峰面积占总峰面积的 80% 以上, 非共有峰中发现仅 10 批样品存在保留时间为 24.75 和 29.86 min 的峰, 且峰面积相差较大, 说明不同产地的仙茅药材在成分上稍有差异。

本研究利用 ASE 350 快速溶剂萃取系统萃取样品, 并优化了 ASE 的萃取条件, 中国药典 2015 年版仙茅中仙茅苷含量测定的提取需回流 2 h, 在本实验中仅用了 15 min, 大大缩短了提取时间, 提取效率高, 仪器操作简单方便, 安全性好, 自动化程度高且环保, 提取液无需过滤浓缩, 可用于仙茅药材的综合质量评价。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 102.
- [2] 杨光义, 叶方, 潘红, 等. 仙茅药理作用和临床应用研究概述[J]. 中国药师, 2011, 14(7): 1039-1041.
- [3] CHENG Z Q, LIU X X, YI X H, et al. Research progress on chemical constituents of *Genus curculigo* [J]. J Guilin Coll Edu(桂林师范高等专科学校学报), 2012, 23(3): 163-169.
- [4] ZENG Q, JI H. Simultaneous determination of curculigoside and curculigoside B in the rhizome of *Curculigo orchioides* from different regions by HPLC-DAD [J]. J Pharm Pract(药学实践杂志), 2010, 28(3): 196-198.
- [5] WANG Y, LIU L, XUN J L, et al. Simultaneous determination of phenolic glycosides in Curuligins Rhizoma by HPLC [J]. China Pharm J(中国药学杂志), 2012, 47(5): 375-379.
- [6] ZHU M, CHEN B L, SHI S M. Application of fingerprint technology on traditional Chinese medicine in Chinese pharmacopoeia (2015 edition) volume I [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(5): 611-614.
- [7] MA P, LI L Y, YU Q, et al. Studies on HPLC fingerprints of curculigo orchioides from different regions [J]. China Pharmacy(中国药房), 2011, 22(39): 3692-3694.
- [8] PAN X. Studies on the fingerprint of Rhizoma Curculiginis [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2003, 15(4): 36-37.
- [9] LI L Y, MA P, YU Q, et al. Quality standards of *Curculigo orchioides* [J]. China Pharmacy(中国药房), 2011, 22(43): 4068-4071.
- [10] 唐正平, 李秀兰, 周晓非, 等. 高效液相色谱法测定仙茅超微饮片中仙茅苷的含量[J]. 湖南中医药杂志, 2002, 18(4): 52.

收稿日期: 2017-07-17

(本文责编: 李艳芳)