

# 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 键合硅胶固定相的制备、表征及应用(二)

谷晓娟, 韩亚琼, 李心怡, 沈报春\*

昆明医科大学药学院 云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500

**摘要:** 采用“一锅法”, 以 1,6-己二异氰酸酯作为间隔臂, 制备了一种新型天然中草药药用成分键合固定相——人参皂苷 R<sub>g1</sub> 键合硅胶固定相(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以元素分析、热重分析和电镜扫描对自制的人参皂苷 R<sub>g1</sub> 键合硅胶固定相进行表征。采用该固定相, 建立三七总皂苷原料药的 HPLC 指纹图谱方法, 乙腈-水为流动相梯度洗脱, 检测波长 203 nm, 柱温 25 °C, 流速 0.8 mL/min, 进样量 10 μL。以人参皂苷 Re 色谱峰为参照峰, 确定 20 个共有峰。10 批三七总皂苷原料药指纹图谱相似度为 0.882 ~ 0.999。以人参皂苷 R<sub>g1</sub> 键合硅胶固定相分离三七总皂苷中的皂苷成分, 为天然产物的分离分析提供新的思路。

**关键词:** 高效液相色谱; 指纹图谱; 人参皂苷 R<sub>g1</sub> 键合硅胶固定相; 固定相表征; 三七总皂苷原料药  
中图分类号: R282; R917; O658 文献标识码: A

## Preparation, Characterization and Application of Ginsenoside R<sub>g1</sub>-bonded Silica Gel Stationary Phase( II )

GU Xiao-juan, HAN Ya-qiong, LI Xin-yi, SHEN Bao-chun\*

*School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Yunnan Kunming 650500, China*

**Abstract:** A new ginsenoside R<sub>g1</sub>-bonded silica gel stationary phase (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was prepared by one-pot reaction method using 1,6-diisocyanate as spacer arm. The characterization of the new self-made ginsenoside R<sub>g1</sub>-bonded silica gel stationary was done by elemental analysis, thermal analysis and scanning electron microscope (SEM). The HPLC fingerprint of Active Pharmaceutical Ingredient (API) of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on the ginsenoside R<sub>g1</sub>-bonded silica gel stationary phase was established. The chromatographic fingerprints of 10 batches PNS API were determined on the self-made ginsenoside R<sub>g1</sub>-bonded silica gel column. The mobile phase consisted of acetonitrile and water with gradient elution mode. The detection wavelength was 203 nm, the column oven temperature was maintained at 25 °C, the flow rate was 0.8 mL/min and the injection volume was 10 μL. Based on the peak of ginsenoside Re, 20 common peaks were selected, the similarity between 10 batches of samples were within 0.882-0.999. This study provided a new idea for natural products analysis using ginsenoside R<sub>g1</sub>-bonded silica gel stationary phase.

**Key words:** HPLC; fingerprint; ginsenoside R<sub>g1</sub>-bonded silica gel stationary phase; characterization of stationary phase; active pharmaceutical ingredient of *Panax notoginseng* saponins

色谱分析在环境、生化、药物等领域的应用日益普遍。高效液相色谱(HPLC)具有分离效能高、分离模式灵活和对药物及生化样品兼容性好等特点, 已发展成为无机、有机、生化、环境、食品和药物分析等领域的重要分离分析方法中最活跃的方法之一<sup>[1,2]</sup>。近年来, 新型液相色谱分离模式和固定相

的研究非常活跃, 键合硅胶固定相已成为近代液相色谱发展的主流。新型键合固定相分子设计、合成、性能、应用及分离机理研究是当今 HPLC 的重要课题。然而, 以天然产物为配体的色谱固定相报道不多。Armstrong 等制备了具有抗菌活性的万古霉素等 3 种大环抗生素键合硅胶固定相<sup>[3]</sup>。House 等将萝芙木生物碱育亨宾及其同系物的羟基通过氨基甲酸乙酯键合到硅胶表面<sup>[4]</sup>。李来生等以药用植物中的大蒜素、黄芩苷、姜黄素和靛红为配体, 制备和评价了其色谱分离功能<sup>[5,6]</sup>。研究表明, 与常用的 ODS 相比较, 这类固定相具有多种作用位点, 对性

收稿日期: 2013-12-09 接受日期: 2014-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81102408); 云南省天然药物药理重点实验室开放研究基金项目(2013G010); 昆明医科大学 2014 年度校级大学生创新性实验计划项目(CX201435)

\* 通讯作者 E-mail: shen\_baochun@126.com

质相似的水溶性和极性化合物有较高的分离选择性,具有快速分离等特点<sup>[7]</sup>。

人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> ( ginsenoside R<sub>g<sub>1</sub></sub> ) 是人参皂苷中含量最多、活性较强的人参皂苷三醇型的单体皂苷成分,同时也是 PNS 中含量最高、活性较强的有效单体成分。选择人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 作为配体,是因为人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 中含有的羟基和双键,与溶质间能发生氢键作用、 $\pi$ - $\pi$  或  $n$ - $\pi$  作用,电荷转移以及偶极-偶极等多重作用。人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 化学结构中苷元具有不同程度的亲脂性,糖链具有较强的亲水性,以其作为液相色谱的固定相,可以同时产生疏水和亲水作用,具有更强的分离能力和更为广泛的应用范围。

三七[ *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen ] 为五加科( Araliaceae ) 人参属植物,现代药理学研究表明三七有维持凝血与抗纤溶动态平衡,有利于止血而不留瘀双向药理作用<sup>[8]</sup>,还具有明显的补血作用,在血液系统心脑血管系统免疫系统等有较好的活性,是外伤和心脑血管类疾病的常选药材。因此,三七成为目前最为常用的贵重中药材,而皂苷类成分为其主要的生理活性成分,其中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub>、Re、Rb<sub>1</sub>、Rd 为主要皂苷,以三七总皂苷为原料药的制剂也不断涌现。因而,为了有效打击假劣药品,保证药品质量,同时为了实现中药标准标准化,推动中药材 GAP 的实施,建立三七总皂苷原料药指纹图谱分析方法势在必行。目前,对三七药材及其制剂的指纹图谱研究已有报道,其方法大多为 HPLC-UV,少数为 HPLC-ELSD、HPLC-CAD,所用色谱柱均为不同品牌的 ODS。

本实验采用“一锅法”,制备得到人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 键合硅胶固定相。对该固定相进行表征,确定人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 已键合至硅胶上。用人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 键合硅胶固定相对三七总皂苷原料药进行 HPLC 指纹图谱分析。该研究不仅扩大了人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 的应用范围,对天然产物中活性成分的分离分析也提出了新的思路。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

安捷伦 1260 高效液相色谱仪,包括 G1322A 真空脱气机, G1312C 二元泵, G1329B 标准型自动进样器, G1316A 柱温箱, G1315D 检测器, Agilent 1200LC 色谱工作站;电子天平( BS224S ):北京赛多利斯仪器系统有限公司;超声清洗仪( SK3200H ):

上海科导超声仪器有限公司;装柱机: Haskel 气动高压装柱机( Haskeline. , Burbank, CA. , USA );氮气:昆明梅塞尔气体产品公司;元素分析仪为( VarioEL, 德国 );予华公司的循环水式真空泵[ SHZ-D ( III ) ] 和集热式恒温加热磁力搅拌器( DF-101S );电热鼓风干燥箱( DHG-9053A ):上海一恒科学仪器有限公司;空柱管( 250 mm × 4.6 mm ):大连日普利科技仪器有限公司。

### 1.2 试剂

1,6-己二异氰酸酯( 1,6-diisocyanatehexane, 99%, AcrosOrganics );  $\gamma$ -氨丙基三乙氧基硅烷( 3-Aminopropyltriethoxysilane, 99%, Aerosorganics );吡啶( 国药集团化学试剂有限公司 );甲苯( 广东汕头市西陇化工厂,分析纯 );甲醇( 天津市光复精细化工研究所,色谱纯 );乙腈( 天津市光复精细化工研究所,色谱纯 );氯仿( 天津市风船化学试剂科技有限公司,分析纯 );丙酮( 广东光华化学厂有限公司,分析纯 );冰乙酸( 北京五二九五二化工厂,分析纯 );盐酸( 成都市科龙化工试剂厂,分析纯 );硅胶( Akzo Nobel, 平均粒径 5  $\mu$ m, 平均孔径 9 nm, 比表面积为 320 m<sup>2</sup>/g, 荷兰 );乙腈( 色谱纯, 天津永大化学试剂有限公司 ),水( 娃哈哈饮用纯净水 ),其余试剂均为分析纯。

人参皂苷 Re 对照品( 贵州迪大生物技术有限公司 ),三七总皂苷原料药( 批号: 120801、120805、120807、120901、120909、120911、120916、121003、121007、121008 )由云南云科药业提供。

## 2 实验方法

### 2.1 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 键合硅胶固定相的制备

#### 2.1.1 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 键合硅胶固定相的合成

人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 键合硅胶固定相的制备反应式见图 1。具体实验步骤为:冰浴中,氮气保护,向 50 mL 3.0 g(3-氨丙基)硅胶的干燥甲苯中加入 1,6-己二异氰酸酯( 2.5 mL, 15 mmol ),搅拌 15 min。移去冰浴,混合物加热至 70  $^{\circ}$ C 反应 2h,冷却至室温后,氮气保护下除去多余溶剂。分 3 次以 10 mL 干燥甲苯洗涤,除掉过量的 1,6-己二异氰酸酯。然后加入 100 mL 含 0.5 g 人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 的干燥吡啶溶液,将反应化合物加热至 70  $^{\circ}$ C,搅拌 12 h 至人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 反应完全。冷却至室温后过滤,分别用 50 mL 的吡啶、水、甲醇、乙腈和二氯甲烷洗涤,减压干燥( 70  $^{\circ}$ C, 0.1 mbar, 2 h ),得到人参皂苷 R<sub>g<sub>1</sub></sub> 键合硅胶固定相。

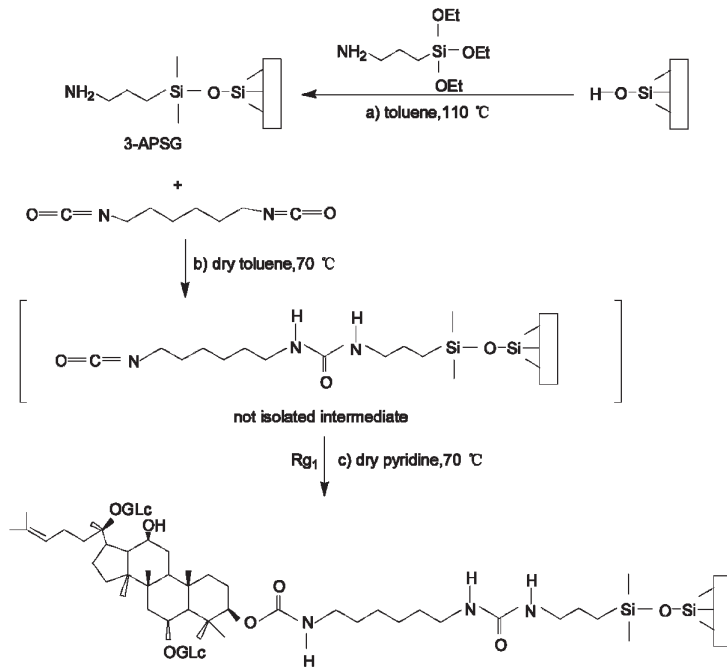


图1 人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相合成路线

Fig. 1 Synthetic routes of ginsenoside  $R_{g_1}$ -bonded silica gel stationary phase

### 2.1.2 人参皂苷 $R_{g_1}$ 键合硅胶色谱柱的制备

将 3.30 g 的人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相分散到 60 mL 含 15% 冰醋酸的氯仿-丙酮 (1:1, v/v) 溶液中, 超声 5 min。用 50 mL 针筒注入匀浆罐内, 匀浆罐接至装柱机上, 甲醇做顶替液, 用 6000 psi (约  $4.15 \times 10^7$  Pa) 压力下装入不锈钢空柱中, 顶替液成线形流出, 维持高压 30 min, 然后撤去压力。待压力表指针读数降为零时, 取下装填好的色谱柱, 用小刀削平填料, 两端密封, 贴好标记及流动相方向待用。

### 2.2 三七总皂苷原料药的 HPLC 指纹图谱分析

中药材的质量控制是中医药现代化的重要内容, 也是中药走向世界必须解决的问题<sup>[9]</sup>。指纹图谱分析是对中药及其制剂进行宏观分析的可行手段<sup>[10]</sup>, 在环境保护、食品评价等领域都得到广泛应用, 其作为中药材及中成药的一种新的质量控制技术, 正得到普遍关注。本研究首次建立起三七总皂苷原料药在人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相上的指纹图谱分析方法, 以人参皂苷 Re 为参照峰, 确定 20 个共有峰, 对 10 批三七总皂苷原料药进行指纹图谱分析。

#### 2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取人参皂苷 Re 对照品 10 mg, 置于 10

mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得人参皂苷 Re 对照品溶液, 浓度为 1 mg/mL。进样前取适量溶液用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。

#### 2.2.2 供试品溶液的制备

分别取不同批号的三七总皂苷原料药约 100 mg, 精密称定, 置于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。进样前取适量溶液用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤。

#### 2.2.3 色谱条件

色谱柱: 自制人参皂苷  $R_{g_1}$  高效液相色谱柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱程序: 0 ~ 20 min, 20% A; 20 ~ 50 min, 20% ~ 35% A; 50 ~ 53 min, 35% ~ 35% A; 53 ~ 54 min, 35% ~ 90% A; 54 ~ 64 min, 90% A, 流速: 0.8 mL/min, 柱温: 25  $^{\circ}$ C, 检测波长: 203 nm, 进样量 10  $\mu$ L。

## 3 实验结果

### 3.1 人参皂苷 $R_{g_1}$ 键合硅胶固定相的结构表征

本实验采用元素分析、热重分析、电镜扫描对人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相进行结构表征。元素分析可测出相关元素的百分含量, 计算出键合量; 热重分析则能用于估算固定相有机物总浓度, 其扫描曲

线与配体稳定性有关;电镜扫描可由键合前后硅胶颗粒表层的改变,判断键合成功与否。

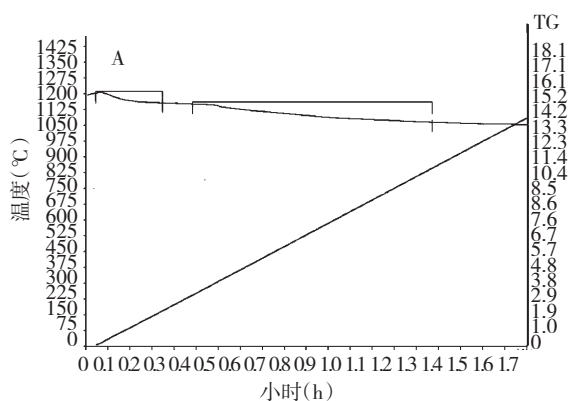
### 3.1.1 固定相的元素分析

人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相的元素分析结果

表1 元素分析结果

Table 1 Element analysis results

固定相 Stationary phase	C (%)	N (%)	H (%)
硅烷化后的硅胶 Silanized silica gel	4.176	2.044	1.520
人参皂苷 $R_{g_1}$ 硅胶键合固定相 Ginsenoside $R_{g_1}$ -bonded silica gel stationary phase	13.42	4.109	2.434



见表1。由元素分析结果可知,键合后,C、N、H的含量均有增加,说明人参皂苷  $R_{g_1}$  被成功键合到硅胶上。根据元素分析结果,人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相表面配体浓度为  $183 \mu\text{mol/g}$ 。

### 3.1.2 固定相的热重分析

硅烷化硅胶和人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相的热重分析结果见图2。对比键合前后固定相热重分析图谱,可以看出,在  $176^\circ\text{C}$  时,人参皂苷  $R_{g_1}$  硅胶键合固定相有明显的失重,表明硅胶表面的有机物随着温度的逐渐升高,有机物分解,产生失重,出现失重时温度较高 ( $176^\circ\text{C}$ ),说明人参皂苷  $R_{g_1}$  配体在键合反应后有较好的热稳定性和化学稳定性,这为稳定的色谱性能奠定了基础。

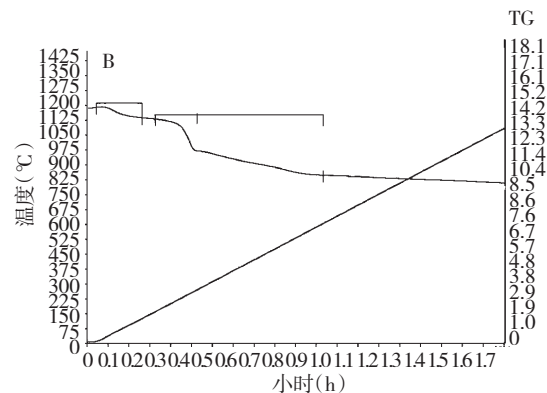


图2 硅烷化硅胶(A)及人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相(B)的热重分析图谱

Fig. 2 TGA diagram of silanized silica gel (A) and ginsenoside  $R_{g_1}$ -bonded silica gel stationary phase (B)

### 3.1.3 固定相的电镜扫描分析

人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相的电子显微镜扫描结果见图3。由图3可明显观察到键合前后硅胶颗粒表层的改变。键合后硅胶比键合前硅胶颗粒的表层多出一层覆盖物。结合固定相的元素分析和热重分析可知,人参皂苷  $R_{g_1}$  配体已成功键合到硅胶上。

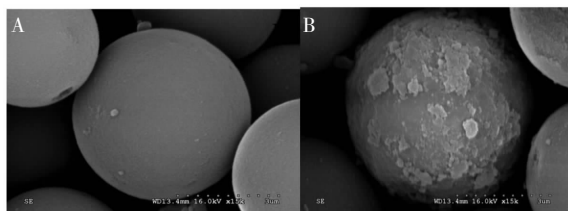


图3 正相硅胶(A)及人参皂苷  $R_{g_1}$  键合硅胶固定相(B)的电镜扫描图

Fig. 3 SEM photographs of normal phase silica gel (A) and ginsenoside  $R_{g_1}$ -bonded silica gel stationary phase (B)

## 3.2 指纹图谱方法学考察

### 3.2.1 色谱系统适用性试验

三七总皂苷原料药供试品溶液色谱图见图4。从图4可以看出达到分离度要求的色谱峰数为13个,以人参皂苷  $R_e$  为参照S峰,确定20个共有峰,共有指纹峰峰面积之和占总峰面积比值大于90%,组分在80 min内完全出峰。取同一供试品溶液,连续进样6次,分别对共有峰的保留时间和峰面积比

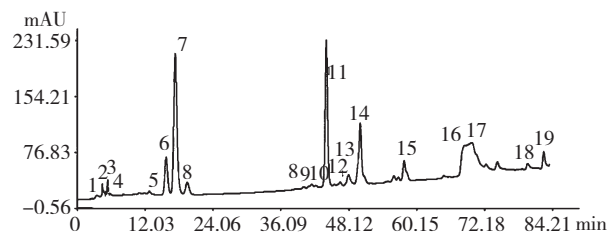


图4 三七总皂苷原料药的高效液相色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram of PNS API

值进行考察。结果表明,各共有峰的保留时间 RSD < 0.79%, 峰面积 RSD < 2.33%。以人参皂苷 Re 峰计算,理论板数为 5776 块/m。

### 3.2.2 重复性试验

取同一批样品 6 份,精密称定,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,分别进样测定各共有峰保留时间 RSD < 0.79%, 峰面积 RSD < 2.95%, 结果表明方法重现性良好。

### 3.2.3 稳定性试验

取同一供试品溶液,室温放置,分别于 0、4、8、

12、16、24 h 进样,测定各共有峰保留时间 RSD < 1.02%, 峰面积 RSD < 2.86%, 结果表明供试品在 24 h 内稳定性良好。

## 3.3 指纹图谱分析及各项技术参数

### 3.3.1 指纹图谱的建立

测定了 10 个不同批次的三七总皂苷原料药,建立指纹图谱。以人参皂苷 Re 为参照 S 峰,计算各共有指纹峰的相对保留时间的 RSD (%) 为 0.06% ~ 0.75% ( $n = 10$ ), 结果见表 2。

表 2 10 批次三七总皂苷原料药共有指纹峰的相对保留时间(分)

Table 2 Relative retention times of the common peaks of 10 batches PNS API (min)

峰号 No.	批次 Batches										平均值 Average	RSD%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.209	0.211	0.211	0.211	0.210	0.210	0.209	0.208	0.209	0.209	0.210	0.51
2	0.238	0.243	0.242	0.242	0.239	0.240	0.239	0.238	0.239	0.239	0.240	0.75
3	0.257	0.261	0.260	0.260	0.258	0.258	0.258	0.258	0.258	0.258	0.259	0.49
4	0.283	0.284	0.287	0.287	0.287	0.284	0.284	0.283	0.283	0.283	0.284	0.56
5	0.645	0.647	0.646	0.646	0.646	0.646	0.646	0.646	0.645	0.646	0.646	0.09
6	0.802	0.803	0.803	0.803	0.802	0.803	0.803	0.802	0.802	0.803	0.803	0.06
7	0.887	0.889	0.889	0.888	0.888	0.888	0.888	0.888	0.887	0.888	0.888	0.08
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
9	2.095	2.097	2.099	2.102	2.094	2.098	2.093	2.086	2.089	2.087	2.094	0.25
10	2.167	2.165	2.168	2.172	2.167	2.171	2.166	2.158	2.161	2.161	2.166	0.21
11	2.205	2.205	2.208	2.211	2.205	2.209	2.205	2.195	2.198	2.199	2.204	0.23
12	2.303	2.302	2.305	2.309	2.302	2.308	2.303	2.293	2.296	2.296	2.302	0.23
13	2.432	2.431	2.434	2.439	2.431	2.436	2.432	2.421	2.424	2.425	2.430	0.23
14	2.525	2.523	2.525	2.528	2.514	2.519	2.514	2.500	2.506	2.504	2.516	0.39
15	2.619	2.621	2.623	2.628	2.619	2.625	2.620	2.607	2.612	2.612	2.619	0.25
16	3.031	3.041	3.043	3.048	3.032	3.038	3.032	3.014	3.023	3.021	3.032	0.35
17	3.796	3.804	3.809	3.817	3.799	3.805	3.798	3.778	3.787	3.785	3.798	0.31
18	3.904	3.912	3.916	3.924	3.907	3.912	3.904	3.882	3.892	3.890	3.904	0.33
19	4.186	4.196	4.199	4.207	4.190	4.196	4.187	4.163	4.175	4.174	4.187	0.32
20	4.335	4.344	4.348	4.356	4.338	4.344	4.335	4.311	4.322	4.323	4.336	0.31

### 3.3.2 相似度比较

相似度是评价中药指纹图谱一个最常用的参数,通常利用指纹图谱的相似度数据来研究中药质量是否可控、稳定。本研究采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 A,对 10 批三七总皂苷原料药样品图谱进行相似度比较。以中位数法生成对照

指纹图谱为模板,10 批样品与对照指纹图谱之间相似度为 0.882 ~ 0.999 (见表 3)。同时,对 10 批三七总皂苷原料药的色谱分离图导入,采用药典委员会推荐的中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行叠加比较(见图 5)。

表 3 相似度计算结果

Table 3 Results of similarity calculation

编号 Number	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
相似度 Similarity	0.911	0.882	0.942	0.913	0.999	0.976	0.941	0.979	0.917	0.996

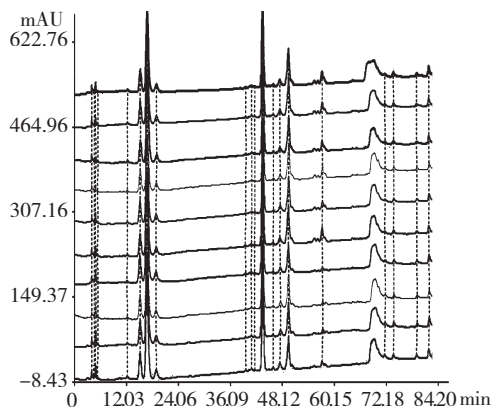


图 5 10 批次三七总皂苷原料药样品的高效液相色谱叠加图

Fig. 5 The overlaid HPLC chromatograms of 10 batches PNS API

## 4 讨论与结论

以 ODS 为固定相的反相色谱存在一定的局限性,如对强极性、离子型、高分子、生物活性等物质直接分离还不够理想。由于其分离机理仅为单一的疏水作用,对于脂溶性成分保留太强,不利于快速分析。而人参皂苷 R<sub>g1</sub> 键合硅胶固定相作为类似 ODS 直链结构的色谱分离材料,不仅有良好的疏水性,而且能为溶质提供多种作用位点,是 ODS 良好的补充,同时作为药用基质材料,在中药材含量测定和质量控制方面也有应用前景。

人参皂苷 R<sub>g1</sub> 具有一定的药理活性,抗污染能力强,从而有利于保持柱良好的渗透性,延长柱使用寿命,提高色谱重现性,在生化样品的分离分析方面有应用优势。

本研究成功建立了人参皂苷 R<sub>g1</sub> 键合硅胶固定相对三七总皂苷原料药的 HPLC 指纹图谱分析。以天然产物活性成分人参皂苷 R<sub>g1</sub> 为固定相,对相似组分进行分离研究,为天然产物中活性成分的分离分析提供了新的思路。而且这对充分利用我国丰富的药用植物资源,开发植物活性成分的新用途具有重要意义。

本研究建立的人参皂苷 R<sub>g1</sub> 键合硅胶固定相对三七总皂苷原料药指纹图谱分析方法,方法可靠,精密度、重现性、稳定性良好,指纹图谱具有一定的特征性,能反应三七总皂苷原料药的特征,可用于三七总皂苷原料药的质量控制及真伪品鉴别。

## 参考文献

- 1 Snyder LR, Kirkland J, Glajch JL. Practical HPLC method development. *John Wiley Sons Inc*, 1997, 30(5): 67-70.
- 2 Zou HF (邹汉法), Zhang YK (张玉奎), Lu PZ (卢佩章). High Performance Liquid Chromatography (高效液相色谱法). Beijing: Science Press, 1998. 79-125.
- 3 Armstrong DW, Tang Y, Chen S, et al. Macrocyclic Antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal Chem*, 1994, 66: 1473-1484.
- 4 House DW. Chiral stationary phase based on yohimbine. US6132606, 2000-10-17.
- 5 Li LS (李来生), Chen XQ (陈雄泉), Yang HR (杨汉荣), et al. Preparation and characterization of a Baicalin-bonded stationary phase for high performance liquid chromatography. *Anal Chem* (分析化学), 2007, 35: 1279-1284.
- 6 Xu LL (许丽丽), Li LS (李来生), Yang HR (杨汉荣). Preparation, characterization and chromatographic performance of curcumin bonded silica stationary phase. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2007, 25: 374-379.
- 7 Chen HM (陈会明), Li LS (李来生), Ma HP (马海萍), et al. Study on the preparation of emodin-bonded silica stationary phase and its application in separation of nucleoside bases by HPLC. *Chin J Anal Lab* (分析实验室), 2010, 29(3): 14-18.
- 8 Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. Biology of Plants, 6th ed. New York: W. H. Freeman, 1999. 48: 2431-2440.
- 9 Yu XM (禹晓梅), Xu HY (徐红颖), Liang YZ (梁逸曾), et al. Study on HPLC fingerprint of glyrrhiza. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 1009-1012.
- 10 Zheng Y (郑颖), Wu FE (吴凤镔). Advanced studies on fingerprint chromatogram of TCM. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15: 55-60.