

### 3 讨论

RAPD 反应条件严格,由实验结果可知,引物、dNTP、模板 DNA、*Taq* DNA 聚合酶、 $Mg^{2+}$  等因素的变化都会对 RAPD 图谱产生一定的影响,从而影响 RAPD 分析的准确性。

RAPD 标记进行遗传多样性分析的前提条件就是首先要保证 RAPD 带谱的准确性和稳定性。为获得重复性和稳定性较高的 RAPD 带谱,在进行某一物种的 RAPD 分析前,筛选最适宜的 RAPD 条件是很必要的<sup>[14]</sup>。虽然 RAPD 反应涉及到诸多因素,但通过严格控制反应条件,尽量保证所有反应在同一反应体系下完成,如使用同一厂家相同批号的 *Taq* DNA 聚合酶,采用相同的扩增程序,就能获得重复性好、稳定性高的结果<sup>[15]</sup>。

通过扩增条件优化实验,建立了药用植物菝葜 RAPD-PCR 扩增体系最适宜的条件,即反应体积 30  $\mu$ L,内含 0.20  $\mu$ mol/L 引物、200  $\mu$ mol/L dNTP、40 ng 模板 DNA、2 U *Taq* DNA 聚合酶、2  $\mu$ mol/L  $Mg^{2+}$ ;而且筛选出条带清晰多态性好的 14 条随机引物,共扩增得到 144 条电泳带,其中有多态性带 62 条,检测到了 62 个多态性位点,多态率为 43%。为进一步进行菝葜种质资源的 RAPD 分析及其亲缘关系、遗传多样性研究提供了可靠的实验方法。

### 参考文献:

- [1] 中国中医药研究院中药所,全国中草药名鉴[M].北京:人民卫生出版社,1996
- [2] 曾晓霞,陈锡林.菝葜传统应用和现代研究概况[J].中草药,2008,39(6):952-953
- [3] 王慧中,卢江杰,施农农,等.利用 RAPD 分析 13 种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系[J].中草药,2006,37(4):588-592
- [4] 曹雅男,李庆章,孙岳,等.正品龙胆遗传多样性的 RAPD 及 ISSR 分析[J].中草药,2005,36(1):100-103
- [5] 丁平,刘瑾,仰铁锤,等.巴戟天遗传多样性的 RAPD 研究[J].中草药,2008,39(12):1869-1872
- [6] 白音,包英华,王文全,等.不同居群美花石斛种质资源的 RAPD 分析[J].中草药,2007,38(5):748-751
- [7] Brauner S, Crawford D J, Stuessy T F. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae [J]. *Amer J Bot*, 1992, 79: 1 436
- [8] Buren R V, Andersen W R, Harper K T, et al. Evaluation the relationship of autumn buttercup (*Ranunculus acris* form *isvar. aestivalis*) to some close congeners using random amplified polymorphic DNA [J]. *Amer J Bot*, 1994, 81: 514-519
- [9] 魏伟,王洪新,胡志昂,等.毛乌素沙地柠条群体分子生态学初步研究:RAPD 证据[J].生态学报,1999,19(1):16-22
- [10] 林菲,李进斌,李成云,等.利用 RAPD 分子标记定位 2 个水船舶瘟病菌非致病性基因[J].中国农业科学,2002,35(9):1079-1084
- [11] 孙丽娜,严一字,吴基日.桔梗 RAPD 反应体系的优化[J].广西植物,2007,27(5):410-413
- [12] 汪小全,邹喻苹,张大明.应用遗传多样性和系统学研究中的问题[J].植物学报,1996,38(12):954-962
- [13] Packer C, Gilbert D A, Pusey A E, et al. A molecular genetic analysis of kinship of cooperation in Africa Lions [J]. *Nature*, 1991, 351: 562-565
- [14] 李钧敏,金则新,柯世省,等.濒危植物七子花 RAPD 条件的优化[J].植物学通报,19(4):452-456
- [15] 邹喻苹,葛颂,王晓东.系统与进化植物学中的分子标记[M].北京:科学出版社,2001

## 基于淫羊藿苷测定及 HPLC 指纹图谱分析的淫羊藿药材质量差异评价

张萍<sup>1</sup>,孔维军<sup>1,2</sup>,鄢丹<sup>1</sup>,王晶彬<sup>1</sup>,任永申<sup>1,2</sup>,赵艳玲<sup>1</sup>,肖小河<sup>1\*</sup>,周旭<sup>1</sup>

(1. 解放军 302 医院全军中药研究所 北京 100039; 2. 成都中医药大学药学院,四川 成都 611137)

**摘要:**目的 建立客观评价淫羊藿药材质量差异的方法。方法 采用高效液相色谱法, Kromasil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu$ m),流动相为乙腈-水(23:77),体积流量 1 mL/min,检测波长 270 nm,进样量 10  $\mu$ L,建立不同产地、不同品种淫羊藿药材不同生长部位(茎与叶)的 HPLC 指纹图谱,并测定其不同生长部位中淫羊藿苷的量。结果 淫羊藿药材不同生长部位(茎与叶)的 HPLC 指纹图谱和淫羊藿苷的量存在差异,从其叶和茎的特征指纹图谱中分别提取出 19 和 10 个共有峰,且叶中淫羊藿苷的量是茎中的 4~8 倍;叶与叶、茎与茎之间的化学特征存在差异,叶与茎化学特征差异最显著。结论 建立的淫羊藿苷测定方法和指纹图谱的精密度、稳定性、重现性好,可表征淫羊藿药材质量的差异性,为淫羊藿药材的质量研究和建立淫羊藿药材的商品规格提供参考依据。

**关键词:**淫羊藿;淫羊藿苷;成分;指纹图谱;质量评价

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)11-1901-04

淫羊藿是多年生的草本植物,包括小檗科植物 箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et

①收稿日期:2010-02-21

基金项目:军队中医药研发推广重点项目(200623001);国家杰出青年科学基金项目(30625042);国家重大新药创制关键技术(2009zx09502-022)

作者简介:张萍(1978—),女,山东菏泽人,硕士,中药学专业。Tel: (010) 66933325 E-mail: zhp1231@126.com

\* 通讯作者 肖小河 Tel: (010) 66933322 E-mail: pharmacy302@126.com

Zucc.) Maxim. 朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 等多个品种, 主要用于阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛和更年期高血压等证, 具有广泛的药理作用和药用价值<sup>[1-2]</sup>。黄酮类是淫羊藿的主要有效成分, 包括淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、II 等<sup>[3-4]</sup>。《中国药典》(2005 年版)<sup>[5]</sup> 规定淫羊藿叶片中淫羊藿苷量的下限作为淫羊藿药材的质控方法, 且未区分其茎叶部位。临床使用及工业生产时, 常以淫羊藿药材的地上部分。作为其药用部位, 包括茎、叶两部分。而其叶片部位与茎部位在指纹图谱、主要组分、药效作用等方面有无差异性, 以及能否代替淫羊藿药材而进行相关的实验研究并体现相应的药效作用有待研究, 且叶中淫羊藿苷的量也难以代表药材整体质量。所以, 本研究建立了淫羊藿药材不同生长部位(茎与叶)的 HPLC 指纹图谱, 并测定其中淫羊藿苷的量, 以评价其化学特征及有效成分的差异性, 为淫羊藿药材品质评价和质量控制提供依据。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(惠普 HP—1110 四元泵; HP—1110DAD 检测器 HP Chemstation 化学工作站); 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。KQ3200 超声波清洗器(超声功率 120 W, 工作频率 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司); 淫羊藿苷对照品(质量分数 > 98%), 购于中国药品生物制品检定所, 批号 110737-200613。乙腈为色谱纯, 醋酸、乙醇及其他试剂均为分析醇。

3 批淫羊藿药材, 经解放军 302 医院全军中药研究所肖小河研究员鉴定, 分别为箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim. (湖南, 批号 20080910)、朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai (吉林, 批号 20080804; 辽宁, 批号 20081018, 20080918)。

## 2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备: 将 3 批药材的茎、叶分开并分别编号, 湖北产编为 H 茎、H 叶, 吉林产编号为 J 茎、J 叶, 东北产编为 D 茎、D 叶。将各药材干燥至恒定质量, 粉碎并过 3 号筛, 取相同量的样品粉末各约 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入稀乙醇 20 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 1 h 后放冷, 再称定质量, 用稀乙醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得样品溶液。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取淫羊藿苷对照品, 加甲醇溶解, 制成 0.088 mg/mL 的溶液即得。

### 2.3 淫羊藿苷的测定

2.3.1 色谱条件: Kromasil C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(23:77), 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 270 nm, 柱温为室温, 进样量为 10 μL。理论塔板数按淫羊藿苷计算不低于 1500。

2.3.2 线性关系考察: 精密吸取对照品溶液 2、4、6、8、10、20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标(Y), 淫羊藿苷的质量为横坐标(X), 绘制标准曲线。回归方程为  $Y = 2124.5X + 10.517$ ,  $r = 0.9998$ 。结果表明淫羊藿苷在 0.176~1.76 μg 呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验: 取 H 叶供试品溶液, 按上述色谱条件等量重复进样 5 次, 记录淫羊藿苷峰面积; 结果显示淫羊藿苷的 RSD 为 0.34%, 表明该方法精密度良好。

2.3.4 稳定性试验: 取 H 叶供试品溶液, 分别于配制后 0、4、8、12、16、24 h 进样, 记录淫羊藿苷峰面积; 结果显示淫羊藿苷的 RSD 为 0.62%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重现性试验: 称取 5 份适量 H 叶样品, 按“2.1”项下方法平行制备 5 份供试品溶液, 分别进样, 记录淫羊藿苷峰面积, 计算质量分数, 结果显示淫羊藿苷的 RSD 为 0.78%, 表明重现性试验符合要求。

2.3.6 回收率试验: 按“2.1”项下方法平行制备 5 份 H 叶供试品溶液, 分别精密加入淫羊藿苷对照品 0.1 mg, 按上述色谱条件分别进样, 记录淫羊藿苷峰面积; 结果显示淫羊藿苷平均回收率为 101.5%, RSD 为 0.47%。

2.3.7 定量测定: 精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行分析, 重复测定 3 次记录色谱图, 按外标法以峰面积计算各样品中淫羊藿苷的量, 结果 H 茎、H 叶、J 茎、J 叶、D 茎、D 叶中淫羊藿苷的质量分数分别为 0.0458%、0.3023%、0.0435%、0.3111%、0.0580%、0.2837%。

可见不同产地、不同品种淫羊藿药材的不同生长部位(叶与叶、茎与茎)中淫羊藿苷量存在差异, 叶中淫羊藿苷的量高, 茎中较低。同一品种及产地的淫羊藿药材叶与茎中淫羊藿苷的量亦存在较大差异, 叶中淫羊藿苷的量是茎中的 4~8 倍。表明不同产地、不同品种淫羊藿药材及其不同生长部位在主要化学组分的量上存在较大差异。

### 2.4 淫羊藿药材不同生长部位指纹图谱的建立

2 4 1 色谱条件: 同“2 3 1”项下, 流动相为乙腈(A)-1%醋酸水溶液(B), 且为梯度洗脱。梯度系统程序为: 0 min, 15% A; 20 min, 22% A; 40 min, 22% A; 60 min, 32% A; 85 min, 55% A。

2 4 2 精密度试验: 取 H 叶供试品溶液, 等量重复进样 5 次, 按上述色谱条件进行梯度洗脱, 以淫羊藿苷的出峰时间和峰面积为参照, 计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 5 批指纹图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 为 0.5% ~ 1.7%, 表明精密度试验符合要求。

2 4 3 稳定性试验: 取 H 叶供试品溶液, 分别于配制后 0、4、8、12、16、24 h 进样, 按上述色谱条件进行梯度洗脱, 以淫羊藿苷的出峰时间和峰面积为参照, 计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 5 批指纹图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 为 0.7% ~ 2.1%, 表明稳定性试验符合要求。

2 4 4 重现性试验: 称取 5 份适量湖北产淫羊藿药材, 按“2 1”项下方法制备供试品溶液, 分别进样, 按上述色谱条件进行梯度洗脱, 以淫羊藿苷的出峰时间和峰面积为参照, 计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 5 批指纹图谱共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 为 0.6% ~ 2.6%, 表明重现性试验符合要求。

2 4 5 同一产地淫羊藿不同生长部位的指纹图谱: 精密吸取对照品溶液及同一产地淫羊藿药材叶片与茎部位的供试品溶液各 10  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行梯度洗脱并记录色谱图, 见图 1。

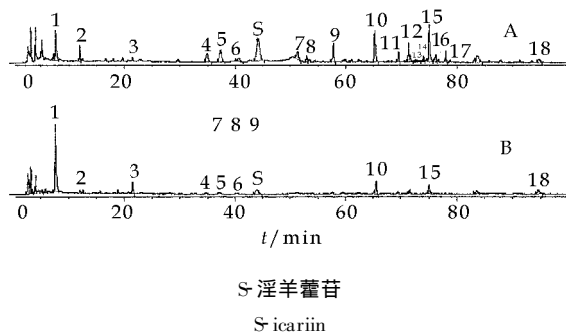


图 1 淫羊藿药材的叶(A)、茎(B)的 HPLC 指纹图谱

Fig 1 HPLC Fingerprints of *Epimedium Herba* leaves (A) and stems (B)

在此色谱条件下, 淫羊藿药材不同生长部位的指纹图谱中色谱峰均达到基线分离, 从叶的指纹图谱中共提取出 19 个共有峰, 而从茎的指纹图谱中共提取出 10 个共有峰, 茎的指纹峰少于叶指纹峰, 且皆可与叶指纹峰重叠。表明同一产地淫羊藿药材不

同生长部位的化学指纹图谱存在差异性。

2 4 6 不同产地淫羊藿药材叶片部位的指纹图谱: 精密吸取不同产地淫羊藿药材叶片部位的供试品溶液各 10  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行梯度洗脱并记录色谱图, 见图 2。

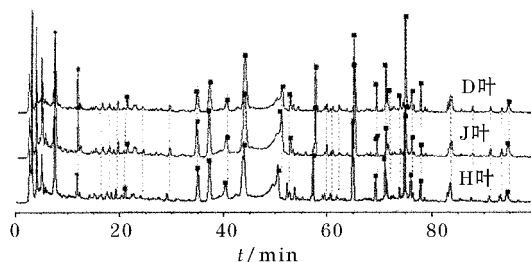


图 2 3 批淫羊藿药材叶片部位的指纹图谱

Fig 2 Fingerprints of leaves in three batches of *Epimedium Herba*

不同产地、不同品种淫羊藿药材叶片部位指纹图谱中共有峰基本相同, 表明其化学成分相似, 但各共有峰的相对峰面积存在差异。从图中可以看出, J 叶中 1、2、4、5、6、7、8、10、18 号峰的相对峰面积最大; H 叶中 3、9、12、13、16 号峰的相对峰面积最大; D 叶中 11、15、14、17 号峰的相对峰面积最大; 且 J 叶中淫羊藿苷相对峰面积最大。表明不同产地淫羊藿药材叶片部位的化学指纹图谱存在差异性。

2 4 7 不同产地淫羊藿药材茎部位的指纹图谱: 精密吸取不同产地淫羊藿药材茎部位的供试品溶液各 10  $\mu$ L, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件进行梯度洗脱并记录色谱图, 见图 3。

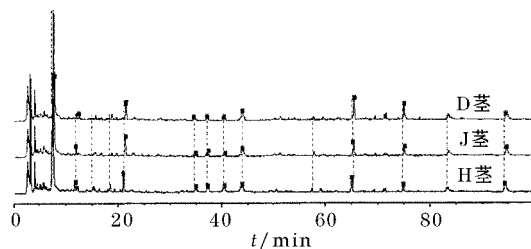


图 3 3 批淫羊藿药材茎部位的指纹图谱

Fig 3 Fingerprints of stems in three batches of *Epimedium Herba*

不同产地、不同品种淫羊藿药材茎部位指纹图谱中共有峰基本相同, 表明其化学成分相似, 但各共有峰的相对峰面积存在差异。J 茎中 3 号峰的相对峰面积最大; H 茎中 2、4、5、6、18 号峰的相对峰面积最大; D 茎中 1、10、15 号峰的相对峰面积最大; 且 D 茎中淫羊藿苷的相对峰面积最高。

### 3 讨论

由不同产地、品种淫羊藿药材的相同生长部位

(叶与叶、茎与茎)及同一产地、同一品种淫羊藿药材的不同生长部位(茎与叶)的淫羊藿苷量及指纹图谱的比较分析可知:①淫羊藿药材的不同生长部位(茎与叶)中淫羊藿苷的量存在较大差异,叶片中淫羊藿苷的量较高,茎中偏低,因此应综合淫羊藿药材叶与茎部位中淫羊藿苷的量及叶与茎的比例来评价不同产地、不同品种的淫羊藿药材的质量。②不同淫羊藿药材的茎与叶的比例存在较大差异,建议建立基于茎与叶不同比例要求及药材品种来源的新的淫羊藿药材商品规格划分标准。③由指纹图谱比较可知,叶片中淫羊藿苷的量较高,其余色谱峰代表的化学成分的量不一定高,当评价不同产地、不同品种淫羊藿药材化学品质时,应同时比较叶与茎的化学质量差异,综合各有效指标,进行整体评价。

基于本研究结果,建议应该建立基于综合茎与

叶比例、茎与叶中淫羊藿苷的量等因素的淫羊藿药材商品规格划分标准,以建立基于叶与茎中淫羊藿苷测定及指纹图谱的“一测多评”的不同产地、不同品种的淫羊藿药材的化学区分模式及质控方法,以期为淫羊藿药材的大质量观研究奠定基础<sup>[6]</sup>。

参考文献:

- [1] 王景祥,于静,吕文伟,等.淫羊藿提取物对急性心肌缺血模型犬血气的影响[J].中草药,2008,39(10):1537-1540
- [2] 滕菲,曾耀英,黄秀艳,等.淫羊藿提取物对小鼠T淋巴细胞体外活化和增殖的影响[J].中草药,2008,39(9):1355-1359
- [3] 雷光华,刘文和,李康华,等.淫羊藿黄酮对被动吸烟大鼠骨量与骨形态学的影响及其相关性研究[J].中国骨质疏松杂志,2008,14(1):8-12
- [4] 李波,安睿,王新宏.淫羊藿苷和补肾复方对肾阳虚大鼠下丘脑CRH基因和垂体POMC基因表达的影响[J].中成药,2008,30(1):132-134
- [5] 中国药典[S].一部.2005
- [6] 肖小河,金城,鄢丹,等.中药大质量观及实践[J].中草药,2010,41(4):505-508

## 白芍和赤芍 HPLC 指纹图谱比较研究

高明<sup>1</sup>,赵镭<sup>2</sup>,赵光树<sup>1\*</sup>

(1 浙江大学医学院附属第一医院,浙江 杭州 310003; 2 浙江大学医学院附属儿童医院,浙江 杭州 310003)

**摘要:**目的 通过建立白芍和赤芍药材的 HPLC 指纹图谱,进一步完善芍药野生品与栽培品药材的质量评价方法。方法 采用 HPLC 测定了 11 批白芍和 11 批赤芍样品,并建立标准对照指纹图谱,按国家药典委员会提供的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对样品的相似度进行评价。色谱条件:固定相为 Kromasil 100-5C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 梯度洗脱;检测波长为 220 nm,参比波长为 290 nm;柱温 35℃;体积流量 0.8 mL/min。结果 建立的 HPLC 指纹图谱能区别白芍和赤芍。结论 本法简单、快捷,为科学评价和控制芍药野生品与栽培品药材的质量提供了依据,为同来源于芍药的赤芍和白芍的临床应用提供依据。

**关键词:**赤芍;白芍;指纹图谱;RP-HPLC

中图分类号:R282.7 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2010)11-1904-03

白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根;赤芍为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 或川赤芍 *P. veitchii* Lynch 的干燥根<sup>[1]</sup>。一般认为,芍药野生品的根直接干燥就是赤芍,而栽培品的根去皮水煮后即白芍。白芍总苷<sup>[2]</sup>、赤芍总苷<sup>[3,4]</sup>均含有芍药苷(paeoniflorin)、芍药内酯苷(albiflorin)、羟基芍药苷(oxypaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷(benzoylpaeoniflorin)等单萜类化合物。本实验以白芍总苷胶囊(商品名:帕夫林, TGPC)为外参照,建立白芍、赤芍的标准对照指纹图谱以考察白、赤芍药材之间的成分差异,为完善赤

芍、白芍质量控制提供科学依据。

### 1 仪器与试剂

1.1 仪器:Agilent1200 高效液相色谱系统:G1322A 脱气机, G1311A 四元泵, G1329A 自动进样仪, G1316A 柱温箱, G1315D DAD 检测器, 安捷伦 Chemstation 色谱工作站; KQ300DB 型数控超声波清洗器(江苏昆山超声仪器公司); H2050R 高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机有限公司); METTLER AE163 分析天平(Mettler Toledo 仪器有限公司)。中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会)。

①收稿日期:2010-02-26

作者简介:高明,男,硕士,研究方向为中药成分分析。Tel:(0571)87236540 E-mail:48871550@QQ.com

\* 通讯作者 赵光树 Tel:(0571)87236539 E-mail:fishleczl@yahoo.com.cn