

- depression: an overview and meta-analysis of randomised clinical trials [J]. *Bri Med J*, 1996, 313(7052): 253-258.
- [4] Evstifeeva V A, Shiryak S V. Immunotropic properties of biologically active products obtained from John's wort (*H. perforatum*) [J]. *Eksper Klin Form Log*, 1996, 59(1): 51-54.
- [5] Meruelo D, Lavie G, Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 5230-5234.
- [6] Hudson JB, Lopez-Bazzocchi I, Towers G. Antiviral activities of hypericin [J]. *Antiviral Res*, 1991, 5: 101-112.
- [7] Thomas C, Macgill R S, Miler G C, *et al.* Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase [J]. *Phytochem Phyto Biol*, 1992, 55(1): 47-53.
- [8] Takahashi I, Naknishi S, Kobayashi E, *et al.* Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1989, 165: 1207-1212.
- [9] Lü H F, Hu Z H. Comparative anatomy of secretory structures of leaves in *Hypericum* L. [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 2001, 39(5): 393-404.
- [10] Lü H F, Liu W Z, Hu Z H. Comparative anatomy of secretory structures in leaves of 7 species in *Hypericum* L. [J]. *Acta Bot Boreo-occident Sin* (西北植物学报), 1998, 18(6): 122-127.
- [11] Liu W Z, Hu Z H. The secretory structure of *Hypericum perforatum* and its relation to hypericin accumulation [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41: 369-372.
- [12] Curtis J D, Leisten N R. Internal secretory structures in *Hypericum* (Clusiaceae): *H. perforatum* L. and *H. balearicum* L. [J]. *New Phytol*, 1990, 114: 571-580.
- [13] Cellarova E, Daxenrova Z, Kimakova K, *et al.* The variability of the hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum* [J]. *Acta Biotechnol*, 1994, 14: 267-274.
- [14] Southwell I A, Campbell M H. Hypericin content variation in *Hypericum perforatum* in Australia [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(2), 475-478.
- [15] Cellarova E, Daxenrova Z, Kimakova K, *et al.* The variability of the hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum* [J]. *Acta Biotech*, 1994, 14: 267-274.
- [16] Lü H F, Hu Z H. Studies on the secretory structure of *Hypericum erectum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 32(10): 773-775.
- [17] Campbell M H, May C E, Southwell I A, *et al.* Variation and varietal determination in *H. perforatum* L. (St. John's wort) in New South Wales [J]. *P Prot Quart*, 1992, 7(2): 43-45.
- [18] Cellarova E, Kimakova K, Brutovaska R. Multiple shoot formation and phenotypic changes of R-O regenerants in *H. perforatum* L. [J]. *Acta Biotech*, 1992, 12(6): 445-452.

赤芍 HPLC指纹图谱的研究

张克荣, 毕开顺*

(沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立赤芍的 HPLC指纹图谱, 为科学评价与有效控制赤芍质量提供新方法。方法 采用 HPLC法, 测定了 18 个不同产地赤芍样品。色谱条件: Hypersil C₁₈柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-0.025 mol/L H₃PO₄-四氢呋喃 (9.5:90.5:1.25), 流速 0.8 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温为室温。结果 本研究建立的分析方法有较好的重复性, 不同产地赤芍药材色谱峰面积比值有一定的差异。结论 色谱指纹图谱分析法能简便快速地区分不同来源的赤芍药材, 为全面控制赤芍药材的质量提供了依据。

关键词: 赤芍; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-1048-04

Study on fingerprints of *Radix Paeoniae Rubra* by HPLC

ZHANG Ke-rong, BI Kai-shun

(Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract **Object** To study the HPLC fingerprints and establish a sensitive and specific method for controlling the quality of *Radix Paeoniae Rubra* (RPR). **Methods** The HPLC method was applied for quality assessment of RPR. All 18 samples collected from different places were determined. A Hypersil-C₁₈ column (200 mm×4.6 mm, 5 μ m) was used with the mobile phase being acetonitrile-0.025 mol/L H₃PO₄-THF (9.5:90.5:1.25), flow rate being 0.8 mL/min, detecting wavelength being 254 nm, the column temperature being at room temperature. **Results** This method had a good repeatability and reproducibility,

* 收稿日期: 2003-04-09

作者简介: 张克荣 (1975-), 女, 河北省保定市人, 硕士, 现在从事中药质量标准的研究。

E-mail: lkmn-09@163.com

* 通讯作者 Tel: (024)23843711-3363 E-mail: ksbj@mail.sy.ln.cn

and the ratio of peaks' area of different habitat samples were different. **Conclusion** The method is suitable to differentiate RPR form different sources conveniently, and can be used as a quality control method for this herb.

Key words *Radix Paeoniae Rubra* (RPR); HPLC; fingerprints

赤芍为毛茛科芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *P. veitchii* Lynch. 的干燥根。药材主产于内蒙古、辽宁、河北、黑龙江、吉林等地,此外,甘肃、山西、青海等地亦产^[1]。其味苦,微寒,归肝经。具有清热凉血,散瘀止痛之功能^[2]。赤芍根主要含有芍药苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷和苯甲酰羟基芍药苷等苷类成分^[3]。目前,多用芍药苷的含量控制赤芍的质量,但这样不能反映赤芍中其他成分的情况,难于真正控制其质量。鉴于中药具有复杂的化学成分,而其活性成分常常不甚明确的状况,国内外学者逐渐认识到色谱指纹图谱方法是评价植物药质量的有效方法之一^[4-7]。本实验采用 RP-HPLC 方法建立赤芍的指纹图谱,并考察了赤芍药材与产地之间的关系,为全面控制赤芍的质量提供了新方法。

1 仪器与试药

LC-10AD 液相色谱仪(日本岛津公司), SPD-10A 检测器(日本岛津公司), C-R6A 数据处理机。

芍药苷对照品购于中国药品生物制品检定所,批号为 0736-200116;赤芍批号:1093-200001。川赤芍批号:1092-200001。对照药材均购于中国药品生物制品检定所。赤芍药材样品见表 1(经沈阳药科大学孙启时教授鉴定)。

表 1 赤芍样品来源
Table 1 Origins of RPR samples

样品号	样品来源	样品号	样品来源
1	中国药品生物制品检定所	9	辽宁
2	中国药品生物制品检定所	10	宁夏
3	山东曹县	11	吉林长春
4	甘肃兰州	12	内蒙赤峰
5	安徽亳州	13	内蒙古 II
6	吉林市	14	内蒙古 III
7	河南	15	山西
8	内蒙古 I	16	内蒙古(购于河北)
		17	辽宁沈阳
		18	四川中江

2 方法和结果

2.1 对照品溶液的制备:精密称取芍药苷对照品适量,用甲醇配制成 0.25 mg/mL 的溶液。

2.2 供试品溶液的制备:精密称取赤芍粉末 1.0 g,加入 50% 乙醇溶液 10 mL,回流提取 3 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,旋转蒸发回收溶剂,残渣用甲醇

溶解并定容于 10 mL 量瓶中,再精密量取 0.5 mL 置 5 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,过 0.45 μm 微孔滤膜,续滤液作为供试品溶液,备用。

2.3 色谱条件: Hypersil C₈ 柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm)(大连依利特科学仪器有限公司生产);流动相: 乙腈-0.025 mol/L H₃PO₄ 四氢呋喃(9.5:90.5:1.25);流速: 0.8 mL/min;检测波长: 254 nm;柱温: 室温。

2.4 精密度试验:精密称取 14 号样品,按供试品溶液制备方法操作,连续进样 5 次,记录指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积比值基本一致(RSD 为 0.6%~2.3%),符合指纹图谱要求^[4]。

2.5 重现性试验:精密称取 14 号样品 5 份,按供试品溶液制备方法操作,记录指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积比值基本一致(RSD 为 1.0%~3.6%),符合指纹图谱要求。

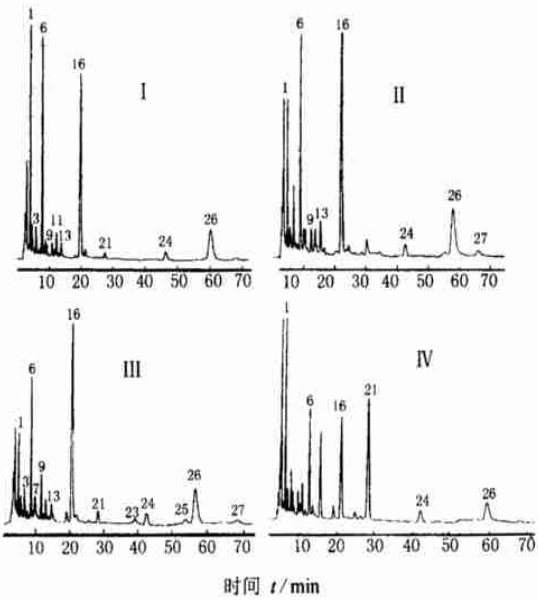
2.6 稳定性试验:精密称取赤芍对照药材,按供试品溶液制备方法操作,分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 测定,记录指纹图谱。结果表明,各色谱峰的相对保留时间和其相对峰面积比值基本一致(RSD 为 1.2%~4.3%),符合指纹图谱要求。

2.7 赤芍的指纹图谱:测定了 18 个不同产地赤芍样品,共获得 27 个色谱峰。典型色谱图见图 1。其中,16 号峰为赤芍主要指标成分芍药苷,将其作为内参比峰。以其色谱峰对内参比峰的相对保留时间定性,按下式计算各色谱峰相对于其内参比峰的峰面积比 X 。

$$X = A_{ij} / A_s W_i$$
 A_{ij} : 第 i 个样品第 j 个组份的峰面积, A_s : 第 i 个样品的参比峰面积, W_i : 样品质量(g)。

2.8 数据处理

2.8.1 系统聚类分析:系统聚类分析是一种无管理、无指导的模式识别方法。可依据所测样品的数据,对样品进行分类。本研究以经形态学鉴定的 18 个不同批次和产地的赤芍样品为研究对象,进行指纹图谱研究,获得包括芍药苷(16 号峰)在内的 27 个色谱峰。将各色谱峰相对于内参照物色谱峰的峰面积量化,得到 18×27 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 软件对其进行系统聚类分析,采用离差平方和法



I -山东曹县 II -内蒙古I III -沈阳 IV -四川中江
I -Shandong Caoxian II -Neimenggu I
III -Shenyang IV -Sichuan Zhongjiang
图 1 赤芍样品色谱指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of RPR samples

(Ward's Method), 利用欧氏距离 (Euclidean) 作为样品的测度。18 个样品基本可分为两大类, 第 1 类为赤芍, 第 2 类为川赤芍。聚类谱系图见图 2

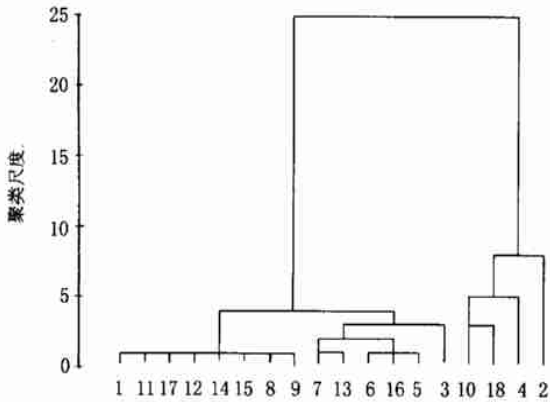


图 2 赤芍样品聚类谱系图

Fig. 2 Hierarchical clustering analysis figure of RPR

2.8.2 相似度分析: 指纹图谱反映的是样品整体的特征, 进行指纹图谱比较, 可以反映样品之间的亲疏程度, 但是单纯的直观比较指纹图谱的峰的多少和峰的大小, 只是定性比较, 而且又带有个人的主观性。相似度可以定量的描述指纹图谱, 本实验用相似度分析对样品进行了比较, 可以定量的、客观的对样品进行评价。用沈阳药科大学计算机中心编制的“指纹图谱相似度计算软件”, 以夹角余弦、相关系数和

欧氏距离作为测度, 分别计算各样本的相似度, 结果见表 2

表 2 相似度分析结果

Table 2 Results of similarity analysis

No	欧氏距离	夹角余弦	相关系数
1	0.99	0.99	1.00
2	0.44	0.66	0.57
3	0.86	0.86	0.84
4	0.51	0.51	0.38
5	0.90	0.90	0.90
6	0.96	0.97	0.97
7	0.95	0.95	0.95
8	1.00	1.00	0.99
9	0.93	0.94	0.95
10	0.73	0.68	0.59
11	0.99	1.00	0.99
12	0.90	0.90	0.92
13	0.95	0.97	0.96
14	0.93	0.93	0.96
15	0.86	0.84	0.80
16	1.00	1.00	1.00
17	0.96	0.97	0.97
18	0.66	0.54	0.54

由表 2 可知, 相似度在 0.80~1.00 可归为一类, 为赤芍样品, 相似度小于 0.79 归为川赤芍。本试验结果显示, 采用两种不同检验方法, 结果是一致的, 得到两种不同方法之间的相互认证。

3 讨论

3.1 本实验过程中, 选择了几种流动相系统: 甲醇-水 (H_2PO_4 调至不同 pH); 乙腈-水-四氢呋喃 (H_2PO_4 调至不同 pH); 甲醇-乙腈-水 (H_2PO_4 调至不同 pH); 乙腈-水 (H_2PO_4 调至不同 pH)。结果表明: 流动相以乙腈-0.025 mol/L H_2PO_4 -四氢呋喃 (9.5: 90.5: 1.25) 系统为最佳, 各色谱峰分离度较好, 保留时间适中。

3.2 本实验对甲醇、95% 乙醇索氏提取, 甲醇、95% 乙醇、丙酮-水 (7: 3) 回流提取, 对提取溶剂、提取方法进行了考察。结果表明, 乙醇回流提取后所得色谱峰的峰数为最多。后又对 50%、75%、95% 乙醇回流提取进行试验, 结果差异不明显。本实验采用 50% 乙醇作为提取溶剂进行回流提取。

3.3 本实验还对检测波长进行了选择, 分别在 210、230、254、282 nm 处检测。结果表明, 282 nm 处各色谱峰之间分离良好, 但峰数少; 在 210、230 nm 检测, 由于赤芍中芍药苷的含量最高, 达到 60% 左右, 必须具有相当的浓度, 才能检测到指纹图谱中峰

面积小的特征峰,本实验采用 254 nm 检测兼顾峰数、分离度。有时,有的品种某一种成分含量很高,在色谱图中占绝对优势,其他特征很弱,虽然这本身就是特征,但有时为了区别用药材作起始原料和单一成分直接投料,可使用不同的检测波长,突出其他特征,相互参照辨认。并且避免图谱中仅有一种成分偏高的现象^[8]。本研究为避免芍药苷成分偏高,并且为图谱中除突出芍药苷色谱峰特征外,也同时突出其他特征,故选 254 nm 检测。

3.4 色谱指纹图谱是通过对各样本色谱图进行比较,来反映产品化学成分的差异。在指纹图谱相似度计算中,一般将所选取的色谱峰同时作比较计算,反映了指纹图谱的整体相似性,可对中药产品质量作出较全面、准确地评价。

3.5 目前,中药材的鉴别和分类很大程度上还依赖于经验和表观分析,也缺乏从分析数据中获取评价依据的统一、使用的方法。相似度计算方法数学概念简单,数据处理过程简便、快速,在定量计算色谱指纹谱相似度方面有其优势。聚类分析在数据分类等方面有效。本实验将两者结合起来发挥各自优势,使

中药指纹图谱质量控制更全面。

References

- [1] Jingsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1977.
- [2] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol I.
- [3] Pharmacopoeia of People's Republic of China. *Commentary Selected Works of 1990 ed.* (1990年版一部注释选编) [M]. Vol I. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Publishing House, 1993.
- [4] TU P F. Approach characteristic fingerprints of Chinese medicinal materials and Chinese herbal injections by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(7): 516.
- [5] Ren D Q. Significance and effect of quality control technology of TCM fingerprints [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24(4): 235-239.
- [6] Bi K S, Li Y T. *Study on the Quality Control Method of Chinese Crude Drugs by Fingerprints* (中药材指纹图谱质量控制方法研究) [C]. Guangzhou, 2001.
- [7] Luo X, Bi K S, Wang X, et al. Quality assessment of traditional Chinese medicine by chemical pattern recognition [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1993, 28(12): 936-940.
- [8] *Technical Requirements of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard)* (中药注射剂色谱指纹图谱实验研究操作规程指南(试行)) [S]. 2001.

三七及其栽培土壤中几种重金属元素含量的测定

冯光泉,张文斌,陈中坚,王 勇,崔秀明*

(云南省文山州三七科学技术研究所,云南 文山 663000)

摘要:目的 通过对 3年生三七块根及其根际栽培土壤样品中 3种主要的重金属元素含量进行检测,了解三七和土壤中重金属元素残留量的存在情况,为三七 GAP栽培提供依据。方法 在三七的主产区选择了 48个点,每点分别采集3年生三七块根及其根际栽培土壤样品,进行砷、铅、汞 3种主要的重金属元素残留量的检测分析。结果

三七及其栽培土壤中 3种重金属元素残留量大多符合标准规定,只有少数高于规定标准。结论 三七主产区的土壤环境质量均符合 GAP对栽培土壤的要求。

关键词:三七;土壤;重金属元素

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-1051-04

Determination on residues of several heavy metal elements in *Panax notoginseng* and its cultivating soil

FENG Guang-quan, ZHANG Wen-bin, CHEN Zhong-jian, WANG Yong, CUI Xiu-ming
(Wenshan Prefecture Institute of Sanqi in Yunnan Province, Wenshan 663000, China)

Key words *Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen; soil; heavy metal elements; determination

收稿日期: 2003-02-21

基金项目: 云南省中药现代化资助项目(2000ZY001); 云南省自然科学基金资助项目(2001C0083M)

作者简介: 冯光泉,女,云南文山人,高级农艺师,1986年毕业于云南农业大学植保系,主要从事三七 GAP栽培研究工作,主持和承担多项云南省自然科学基金项目、国家中药现代化项目及云南省中药现代化项目,发表学术论文 10余篇。

* 通讯作者 Tel (0876) 2122577 E-mail: sanqiflx163@.com