

林蛙油的指纹图谱

李津明¹, 许 婷², 贾绍华²

(1. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 建立一种稳定、可靠的鉴别和控制林蛙油质量的方法。方法 利用高效液相色谱法, 测定 10 批林蛙油药材建立指纹图谱。色谱条件: Dimonsil C₁₈ 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温: 25 °C, 流动相: 乙腈-水 (50 : 50), 分析时间 60 min。结果 测 10 份不同林蛙油商品完整药材的丙酮提取物的 HPLC 图谱。结论 在本色谱条件下, 可以检出 17 个相应位置稳定的共有峰, 可作为确定鉴定林蛙油的指标峰。

关键词: 指纹图谱; 高效液相色谱法; 林蛙油

中图分类号: R282.710

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)04-0591-05

Fingerprint of *Oviductas Ranae*

LI Jin-ming¹, XU Ting², JIA Shao-hua²

(1. Northeast Forest University, Harbin 150076, China; 2. School of Pharmaceutical Science,

Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Objective To set up a stable and reliable method used to identify and control the quality of *Oviductas Ranae*. **Methods** Using HPLC method to measure ten batches of *Oviductas Ranae* samples in order to establish the fingerprint. Chromatographic condition: Dimonsil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the temperature of column is 25 °C, mobile phase: acetonitrile-H₂O (50 : 50), analytical time 60 min. **Results** The HPLC fingerprints of acetone extracts were detected from ten different *Oviductas Ranae* medicinal materials. **Conclusion** Under the chromatographic condition, 17 common peaks of correlated position could be detected and used to definite the index peak of *Oviductas Ranae*.

Key words: fingerprint; HPLC; *Oviductas Ranae*

林蛙油是两栖纲无尾目蛙科蛙属动物中国林蛙 *Rana temporaria chensinensis* David 雌蛙的干燥输卵管^[1], 是传统的名贵中药, 具有健脾胃、滋阴补肾、润肺生津之功效^[2,3], 对体虚气弱、气血亏损、精力耗损、记忆力不佳、神经性头痛、神经衰弱均有疗效。林蛙油的活性成分分为两部分^[4,5]: 水溶性成分(蛋白质和氨基酸)和脂溶性成分(脂肪、维生素 A、胆固醇、甾体激素类等)。其能够增加机体的免疫能力, 且有镇咳祛痰作用^[6,7]。目前, 林蛙属于国家保护动物, 严禁滥捕乱杀, 而林蛙油市场需求量不断增加, 市场上林蛙油的价格居高不下, 因此出现许多伪品, 如中华大蟾蜍的输卵管、青蛙油等, 为此建立一个完整的质量标准体系是十分必要的。本实验选用不同产地及不同药店的 10 种林蛙油完整商品药材, 通过 HPLC 指纹图谱建立起评价林蛙油质量的方法。

1 仪器与试剂

Water-515 高效液相色谱仪(包括 515-HPLC

泵、Wates 双波长紫外检测器、Millog 工作站)。甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂为分析纯、去离子水。参照物: 酪氨酸(中国药品生物制品鉴定所, 872-200205); 10 批林蛙油, 来源于不同产地, 分别为: 黑龙江省伊春金山林蛙养殖场(1号)、黑龙江省宾县林蛙养殖场(2号)、黑龙江省中药联营公司(3号)、黑龙江省药材联营公司(4号)、黑龙江省绥滨林蛙养殖场(5号)、哈尔滨市世一堂药店(6号)、吉林省桦甸林蛙养殖场(7号)、吉林省江石林蛙养殖场(8号)、吉林省二道白河林蛙养殖场(9号)、吉林省百姓大药房(10号)。经哈尔滨商业大学药学院中药鉴定教研室鉴定均为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱 Dimonsil C₁₈ 分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (50 : 50); 体积流量: 0.5 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 室温 25 °C。

2.2 供试品溶液:取林蛙油粉末 1 g,用索氏提取器丙酮提取 6 h 后,减压蒸干丙酮,残留物用色谱甲醇定容到 10 mL 量瓶中,密封,置冰箱中备用。

2.3 精密度试验:取 2 号林蛙油药材粉末按 2.1 项下方法制备供试品,精密取 20 μL 重复连续进样 5 次,检测 1 h 的指纹图谱。结果表明:各峰的相对保留时间一致,RSD<1%,而各峰的相对面积比值大体一致,RSD<5%,符合指纹图谱的要求。

2.4 稳定性试验:取 3 号林蛙油粉末按 2.1 项下方法制备,取 20 μL 在 1 d 内进样 5 次,检测 1 h 指纹图谱。结果表明:各色谱峰相对保留时间一致,RSD<1%,各峰相对积分面积大体一致,RSD<3%。由此可知常温下 1 d 保持较好的稳定性。

2.5 重现性试验:取 3 号林蛙油粉末 5 份,按 2.1 项下方法平行制备供试品。取 20 μL 进样,检测 1 h 的指纹图谱,结果表明:各色谱峰的相对保留时间和主要峰面积比值大体一致,其 RSD<3%。

2.6 林蛙油原药材的 HPLC 指纹图谱及技术参数^[8,9]。

2.6.1 分析方法:精密吸取 1~10 号林蛙油供试品各 20 μL,在上述色谱条件下进样,记录 HPLC 色谱图,计算样品中各色谱峰相对保留时间(RT)及相对峰面积比值 RA,结果见表 1、2。

2.6.2 共有峰确定:在 1~10 号林蛙油供试品的 HPLC 指纹图谱中由相对保留时间比较稳定的色谱峰(RSD≤3%)可以确定的主要共有峰有 17 个,其平均保留时间在 0.654 4~6.256,RSD<2.9%。分别为峰 3、4、S、6、7、12、14、15、18、20、21、23、26、27、28、30、31,林蛙油的 HPLC 指纹图谱见图 1(所标示出的为共有峰)。共有峰面积比值见表 3。

2.7 对照指纹图谱的制定^[10]:本实验不存在超长样本,因此选用共有模式生成法即平均矢量法。

通过一系列色谱指纹图谱的研究,模拟出对照指纹图谱或生成对照指纹图谱的数据,即共有模式生成法,该方法综合了所有样品的指纹图谱信息。

$$\text{平均矢量法} = \frac{(X_{1j}, X_{2j}, \dots, X_{ij}, \dots, X_{nj})}{n}$$

式中, X_{ij} 保留时间 t_R = i 时的数据。

表 1 各样品峰的相对保留时间比值

Table 1 Ratio of relative retention time for each chromatographic peaks

峰号	各样品的 RT										RSD/%
	1号	2号	3号	4号	5号	6号	7号	8号	9号	10号	
1	0.51	0.515	0.515	0.509	0.484	0.512	0.497	0.513	0.504	0.511	1.923
2	0.542	0	0	0.54	0	0	0	0	0.541	0.539	129.1
3	0.617	0.622	0.609	0.622	0.635	0.636	0.642	0.627	0.630	0.62	1.59
4	0	0.767	0.787	0.772	0	0	0	0	0.782	0.774	105.4
5	0.807	0	0	0	0	0	0	0.81	0	0	210.8
6	0	0.852	0.859	0	0	0	0	0	0.877	0	161
7	0.935	0.938	0.938	0.935	0.951	0.941	0.939	0.936	0.938	0.936	0.502
S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
8	1.12	1.16	1.156	1.16	1.183	1.111	1.112	1.109	1.102	1.158	2.551
9	0	0	0	0	0	0	0	1.171	0	0	316.2
10	1.242	1.23	1.233	1.22	1.241	1.19	1.208	1.242	1.231	1.235	1.371
11	0	0	0	1.274	0	0	1.277	0	0	1.299	161
12	1.338	1.334	1.336	1.338	1.353	1.324	1.356	1.337	1.331	1.337	0.711
13	1.501	1.506	1.504	1.5	1.485	1.513	1.413	1.479	1.502	1.499	1.937
14	1.735	0	0	0	1.723	0	0	0	0	0	210.8
15	1.783	1.794	1.791	1.783	0	1.787	1.827	0	1.788	1.783	52.71
16	1.91	1.912	1.917	1.911	1.958	1.846	1.907	1.897	1.914	1.914	1.424
17	2.003	1.996	2.002	2	2.04	1.985	1.957	1.996	2	2	1.015
18	2.091	0	0	0	0	0	0	2.085	0	0	210.8
19	2.169	2.175	2.176	2.163	0	0	2.165	0	2.173	2.169	69
20	2.386	2.412	2.408	2.383	2.399	2.407	2.388	2.322	2.397	2.387	52.72
21	0	0	0	0	0	2.699	0	0	2.579	0	210.9
22	0	2.852	2.735	0	2.717	2.757	2.887	0	0	0	105.5
23	0	0	0	0	0	0	3.051	0	0	0	320.5
24	0	3.331	3.342	0	3.558	3.283	3.399	0	0	0	105.5
25	4.039	4.052	4.057	4.053	0	0	3.881	0	4.051	0	86.09
26	4.509	4.504	4.521	4.493	0	4.556	0	0	4.506	4.536	69
27	0	4.812	0	0	0	0	0	0	0	0	316.2
28	6.212	6.088	6.102	6.057	6.098	6.062	6.599	5.978	6.066	6.049	2.846

表 2 各样品峰的相对峰面积比值

Table 1 Ratio of relative peak area for each chromatographic peaks

峰号	各样品的 RA									
	1 号	2 号	3 号	4 号	5 号	6 号	7 号	8 号	9 号	10 号
1	0.07	0.08	0.1	0.07	0.04	0.09	0.07	0.09	0.08	0.07
2	0.016	0	0	0.01	0	0	0	0	0.01	0.01
3	0.076	0.032	0.07	0.07	0.06	0.131	0.08	0.022	0.08	0.07
4	0	0.001	0	0.01	0	0	0	0	0.01	0.01
5	0.01	0	0	0	0	0	0	0.02	0	0
6	0	0.033	0.03	0	0	0	0	0	0.02	0
7	0.095	0.122	0.114	0.113	0.049	0.098	0.111	0.078	0.117	0.119
S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	0.001	0.007	0.002	0.005	0.004	0.005	0.008	10.005	0.009	0.003
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0.003	0.02	0.021	0.019	0.046	0.022	0.034	0.028	0.038	0.033
11	0	0	0	0.03	0	0	0	0	0	0.03
12	0.021	0.04	0.05	0.02	0.01	0	0.04	0.02	0.05	0.02
13	0	0.01	0.01	0	0	0	0	0	0.01	0
14	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0
15	0.005	0.039	0.03	0.01	0	0	0	0	0.03	0.01
16	0.001	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0
17	0.001	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0
18	0.001	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0.004	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0
20	0.003	0	0	0	0	0	0.001	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0
22	0	0.02	0.01	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0.14	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0.003	0	0.01	0.02	0	0	0	0	0	0
26	0.002	0	0	0	0	0.02	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01

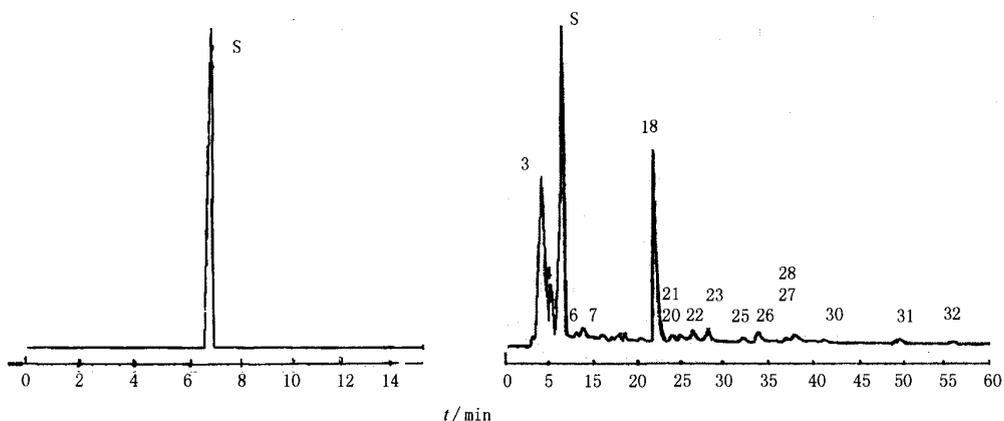


图 1 参照物(A)和样品(B)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

对照指纹图谱的特征峰保留时间和面积比值见表 4、5。

2.8 指纹图谱中色谱峰的重叠率^[11]:峰重叠率是在两个相互比较样品的各自峰数及两者共有峰数(指 α 值相同的峰)的基础上,从质的角度上考虑其相关性。

$$\text{重叠率} = \frac{\text{待测样品与对照品共有峰} \times 2}{\text{待测样品的峰数} + \text{对照品的峰数}} \times 100\%$$

由此,重叠率的计算是以建立的对照指纹图谱为基准,将其出峰数目和欲对比样品的出峰数之和作分母,两者具有相同的 α 值之和作分子,以此分别求出 10 个样品的重叠率,见表 6。从表中可以知道 10 批林蛙油的指纹图谱与对照指纹图谱十分接近。

表 3 主要色谱峰的相对峰面积比值
Table 3 Ratio of relative peak area for main chromatographic peaks

峰号	各样品的 RA										RSD/%
	1号	2号	3号	4号	5号	6号	7号	8号	9号	10号	
3	0.416	0.428	0.585	0.441	0.334	0.397	0.782	0.759	0.667	0.523	29.66
4	0.085	0.115	0.096	0.094	0.022	0.045	0.119	0.087	0.106	0.103	35.34
S	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
6	0.015	0.015	0.028	0.009	0.021	0.028	0.013	0.009	0.012	0.022	41.53
7	0.023	0.021	0.062	0.027	0.026	0.027	0.043	0.014	0.027	0.046	45.4
12	0.005	0.008	0.009	0.01	0.002	0.007	0.01	0.011	0.012	0.008	36.27
14	0.019	0.019	0.021	0.017	0.01	0.013	0.021	0.012	0.023	0.024	26.79
15	0.017	0.01	0.013	0.011	0.01	0.004	0.009	0.006	0.016	0.012	37.24
18	0.24	0.111	0.565	0.303	0.222	0.403	0.554	0.176	0.53	0.328	47.7
20	0.016	0.011	0.03	0.023	0.014	0.007	0.008	0.02	0.023	0.015	43.74
21	0.015	0.009	0.014	0.017	0.019	0.014	0.033	0.014	0.036	0.017	46.36
23	0.013	0.026	0.053	0.025	0.043	0.021	0.033	0.033	0.029	0.025	37.6
26	0.019	0.012	0.038	0.01	0.025	0.013	0.019	0.012	0.019	0.015	45.66
27	0.038	0.039	0.017	0.038	0.015	0.041	0.017	0.026	0.069	0.033	48.32
28	0.005	0.011	0.011	0.008	0.01	0.002	0.018	0.007	0.007	0.01	48.09
30	0.015	0.015	0.01	0.008	0.009	0.011	0.014	0.012	0.015	0.008	24.85
31	0.024	0.017	0.03	0.025	0.019	0.026	0.045	0.023	0.043	0.028	33.12

表 4 对照指纹图谱的特征保留时间比值

Table 4 Ratio of retention time for characters of contrast fingerprint

峰号	RT	峰号	RT
1	0.654 4	9	2.804 7
2	0.842 2	10	2.954 1
S	1	11	3.177 3
3	1.180 6	12	3.984 7
4	1.279 4	13	4.318 6
5	1.806 4	14	4.731 6
6	1.937 9	15	5.327 8
7	2.042 1	16	6.483 7
8	2.508 6		

表 5 对照指纹图谱的特征峰面积比值

Table 5 Ratio of peak area for characters of contrast fingerprint

峰号	RA	RSD/%	峰号	RA	RSD/%
1	0.667	29.66	9	0.023	43.74
2	0.106	35.34	10	0.036	46.36
S	1	0	11	0.029	37.60
3	0.012	41.53	12	0.019	45.66
4	0.027	45.40	13	0.069	48.32
5	0.012	36.27	14	0.007	48.09
6	0.023	26.79	15	0.015	24.85
7	0.016	37.24	16	0.043	33.12
8	0.53	47.70			

表 6 10 种样品的重叠率

Table 6 Repeatability of ten samples

样品	重叠率/%	样品	重叠率/%
1	79.07	6	94.44
2	91.89	7	85.00
3	87.18	8	95.14
4	80.95	9	89.47
5	80.95	10	87.18

3 讨论

对中药复杂体系的质量控制是中药现代化研究的关键问题,本实验以林蛙油为例应用反相高效液相色谱技术,建立了林蛙油指纹图谱控制林蛙油的质量。

3.1 流动相的选择:选用了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水(含二乙胺)等体系进行洗脱,结果以乙腈-水体系得到的色谱峰形较好,且较稳定。为了更好的分离度,选用乙腈-水(25:75)、乙腈-水(50:50)、乙腈-水(75:25)3种流动相的组合。结果在280 nm处,乙腈-水(50:50)的系统为最佳,分离度较好,保留时间适中,因此选用此作为林蛙油 HPLC 指纹图谱检测的流动相。

3.2 检测波长的选择:本试验选用 208、254、280 nm 3种波长,在 208 nm 有多个峰出现,但是其属于末端吸收,溶剂对其有影响;在 254 nm 的峰较少;在 280 nm 有多个峰出现而且峰形也较好,同时结合所含主要成分(参照对照品)在 280 nm 处有最大吸收,因此选用 280 nm 作为林蛙油的 HPLC 的指纹图谱检测波长。

3.3 参照峰的选择;在指纹图谱中一般选择比较大的且稳定的峰作为参照峰,其中林蛙油的指纹图谱中酪氨酸的吸收峰最大而且稳定,因此选择此峰为林蛙油指纹图谱的参照峰。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. 2000.
 [2] Jiangsu New Medical College. Dictionary of Chinese Materia Medica (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai People's Publishing House, 1997.
 [3] Editorial Office of National Chinese Herbal Medicine Collec-

- tion. *Collection of National Chinese Herbal Medicine* (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1978.
- [4] Jiu BTQG. About oviductas ranae, research on oviductas ranae oral [J]. *Japanese Med Anal* (日本药理学杂志), 1934 (18): 39.
- [5] Wang L L. Analysis of *Oviductas Ranae* Oral [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1982, 13(9): 5-8.
- [6] Wang C L. Analysis of *Oviductas Ranae* Oral [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1985, 10(2): 44.
- [7] Liu Y L. *Oviductas Ranae* Oral and its acetone abstract [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1997, 14 (1): 48-50.
- [8] State Pharmacopoeia Committee. *Experiment Technique of Fingerprints of Chinese Traditional Medicine Injection* (中药注射剂指纹图谱实验技术指南) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1999.
- [9] Jamal Faghihi, et al. Reproducibility of the high-performance liquid chromatographic fingerprint obtained from two soybean cultivars and a selected progeny [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 915: 61-74.
- [10] Zhou Y X. *Research on Fingerprint of Traditional Medicine* (中药指纹图谱研究) [M]. Beijing: Beijing Chemical Industry Press, 1999.
- [11] Zhang C. Research on red ginseng and Gaoli ginseng (HPLC-FPS) [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(3): 160-162.

独活种子发芽特性研究

王康才, 陈 暄, 唐晓清, 兰才武

(南京农业大学园艺学院 中药材科学系, 江苏 南京 210095)

摘要:目的 探讨独活种子的发芽率低的原因, 以及适宜发芽条件, 为大田生产奠定基础。方法 采用去果皮、清水以及 GA 浸种等方法处理种子, 在不同的温度和光照条件下, 检测种子的发芽情况。结果 清水浸种 24 h 可提高发芽率 13.7%, 去果皮可提高种子发芽率 10.6%; 在浸种 24 h 条件下, 与暗培养相比, 光照可提高发芽率 16.6%; 适宜发芽温度为 20 ℃, 高温对独活种子萌发具有抑制作用。结论 独活种子中存在发芽抑制物质, 光照可促进种子发芽。

关键词:独活; 种子; 休眠; 发芽抑制物质

中图分类号:R282.21

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)04-0595-03

Seed germination character of *Radix Angelica Pubescentis*

WANG Kang-cai, CHEN Xuan, TANG Xiao-qing, LAN Cai-wu

(Department of Chinese Materia Medica, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Key words: *Radix Angelica Pubescentis* (RAP); seed; dormancy; germination inhibitory substance

独活的原植物为伞形科多年生草本重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan, 以根入药, 具有祛风除湿、通痹止痛的功效。重齿毛当归为商品独活的主流品种, 以川独活著称, 品质优, 产量大, 应用广泛并有出口, 市售川独活多出自四川、湖北两省^[1]。目前, 生产上主要采用种子进行有性繁殖, 10~11 月份采种后, 冬播或春播。但在调查中发现, 重齿毛当归出苗率低, 影响了独活的规范化种植。为此, 对重齿毛当归种子发芽特性进行了初步研究, 以期建立其种子质量检测方法奠定基础, 并为生产提供技术支持。

1 材料与与方法

1.1 材料: 独活种子由湖北省中药研究所陈平教授提供。小白菜种子购于江苏省农业科学院。

1.2 方法

1.2.1 常规质量检查: 依《实用种子检验技术》^[2]检测种子净度、千粒质量。

1.2.2 吸水曲线的测定: 参考文献的方法^[3], 挑选饱满均匀的独活分生果 100 粒, 置培养皿中, 3 次重复, 25 ℃加水浸泡, 按一定时间 1、2、4、8、12、16、20、24 h 间隔取出, 快速用滤纸把分生果表面的水分吸干, 称质量, 种子吸水百分率 = [(吸水后种子质量 - 风干种子质量) / 风干种子质量] × 100%。

1.2.3 不同种子处理发芽试验: 将生产上应用的种

收稿日期: 2004-07-17

作者简介: 王康才(1962—), 男, 江苏赣榆人, 副教授, 1985年毕业于吉林农业大学药用植物栽培专业, 从事药用植物栽培与生理研究。

Tel: (025)84396125 Fax: (025)84396125 E-mail: njwkc2002@126.com