

表 2 野生与栽培品指纹图谱的比较结果

Table 2 Comparisons of fingerprints between wild and cultivated crude drugs

编号	产地	部位	相似度(以 a 样品的图谱为对照模板)
a-qc	浙江龙泉(野生)	全草	1.000
b-qc	浙江龙泉(栽培)	全草	0.929
c-qc	浙江龙泉(栽培)	全草	0.944
a-s	浙江龙泉(野生)	地上	1.000
b-s	浙江龙泉(栽培)	地上	0.956
c-s	浙江龙泉(栽培)	地上	0.961
a-x	浙江龙泉(野生)	地下	1.000
b-x	浙江龙泉(栽培)	地下	0.860
c-x	浙江龙泉(栽培)	地下	0.823

成基本一致,但在量上有较大差别。

由于地下部分在全草中所占的比例不是很大(<10%),所以,地上部分与全草的指纹图谱相相似

度较高,表明:两者被分析部分的化学成分及量的比值差别不大。

由于肿节风药材为多年生草本,如果使用全草的话,不利于该药材资源的可持续发展。由于地上部分与全草的化学成分差别不大,笔者认为现阶段可将肿节风药材的地上部分与全草等同使用。

测定结果显示,来源于同一产地的野生药材与栽培品的不同药用部位的指纹图谱中,其差别大小依次为:地下部分>全草>地上部分。虽然地下部分的差异较大,但由于地下部分在全草中所占的比例不是很大(<10%),因此对全草的相似度影响较大。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol. 2005.
 [2] Wang G L, Chen D F, Lin R C. Advances in chemical and quality control studies on *Herba Sarcandrae* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(8): a11-a12.

HPLC 法同时测定丹皮中丹皮酚和去甲丹皮酚

盛习锋^{1,2}, 谭健兵², 徐康平², 李福双², 黄伟², 谭桂山^{2*}

(1. 湖南师范大学医学院, 湖南长沙 410013; 2. 中南大学药学院 药物化学系, 湖南长沙 410013)

丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 是我国传统常用中药材, 具有清热凉血、活血化瘀的功效^[1]。丹皮酚是丹皮的主要有效成分之一, 具有抗炎、抗氧化、血小板凝聚抑制等药理活性^[2], 一直作为丹皮药材的质量控制指标。研究表明, 丹皮中还有多种丹皮酚的结构类似物, 这些苯乙酮类成分显示出强大的抗菌、抗炎、抗凝血活性及增加巨噬细胞吞噬细胞的活性^[3]。笔者在对湖南邵东产丹皮进行系统化学成分研究时得到几个苯乙酮类成分, 其中去甲丹皮酚的收率明显高于文献报道的 0.003%^[4], 达到 0.15%。笔者认为有必要对丹皮药材中的丹皮酚和去甲丹皮酚进行分析, 为丹皮的综合利用与开发提供依据。

丹皮中丹皮酚的测定方法, 文献中已有报道^[5,6], 但去甲丹皮酚的测定分析尚未见文献报道。本实验建立了同时测定丹皮中丹皮酚(paeonol)和雷锁苯乙酮[去甲丹皮酚(resacetophenone)]的高效液相色谱法, 并用建立的分析方法, 分析测定了不同

产地的丹皮药材中丹皮酚和去甲丹皮酚。

1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 型高效液相色谱仪(低压四元泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器, ChemStations 色谱工作站, 色谱柱: Kromasil ODS-1(200 mm×4.6 mm, 5 μm))。

乙腈和甲醇均为色谱纯; 95%乙醇和磷酸为分析纯, 水为双蒸水并经 0.45 μm 水系滤膜滤过。

丹皮酚和去甲丹皮酚为自制, 并经 UV、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR 等确证结构, 经 HPLC 检查质量分数均大于 99%。

丹皮药材经中南大学药学院生药教研室李劲平博士鉴定, 为毛茛科植物牡丹 *P. suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。

2 方法和结果

2.1 色谱条件与系统适应性试验: 乙腈-磷酸溶液 (pH=3.0), 梯度洗脱 (ACN%: 0 min 5%, 5 min 14%, 15 min 15%, 30 min 20%, 15 min 15%, 40

收稿日期: 2005-09-25

基金项目: 湖南省卫生厅中医药科研基金(204099)

作者简介: 盛习锋, 女, 中南大学药学院访问学者, 从事天然产物研究、开发和教学工作。

Tel: (0731)8912473 E-mail: shengxi63@yahoo.com.cn

* 通讯作者 谭桂山 Tel: (0731)2650395 Fax: (0731)2650442 E-mail: tgs395@yahoo.com.cn

min 35%), 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 275 nm, 柱温为 30 °C。采用外标峰面积法计算, 理论塔板数均大于 1×10^4 , 对称因子均在 0.95 ~ 1.05, 与相邻杂质峰的分度均大于 2.0, 且经 DAD 进行峰纯度检测, 表明均为单一成分峰。色谱图见图 1。

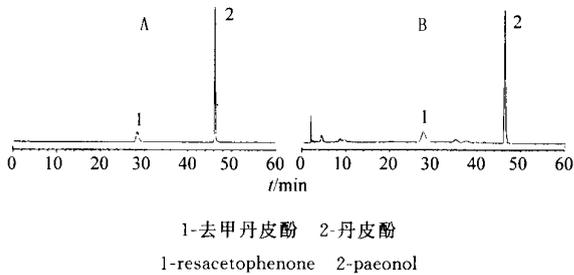


图 1 对照品(A)与丹皮样品(B)HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and Cortex Moutan (B)

2.2 标准曲线的制备: 精密称取丹皮酚 52.70 mg、去甲丹皮酚 10.08 mg 置 50 mL 量瓶中, 甲醇超声溶解并稀释至刻度, 摇匀制得混合对照品溶液。分别精密吸取混合对照品溶液 2、2.5、5、10、15、20 μ L 进样分析。按 HPLC 条件测定峰面积积分值, 以峰面积(Y)为纵坐标, 以进样量(X)为横坐标, 进行回归计算, 得回归方程丹皮酚: $Y = 2558.7540X + 2575.1512$, $r = 0.99992$, 线性范围为 2.108 ~ 21.08 μ g, 去甲丹皮酚: $Y = 4037.9552X$, $r = 0.99997$, 线性范围为 0.4032 ~ 4.032 μ g, 结果表明线性关系良好。

2.3 重现性试验: 精密称取同一批湖南邵东丹皮药材粗粉 5 份, 按照“2.7”项下操作, 测定丹皮酚和去甲丹皮酚, 计算质量分数的 RSD 分别为 1.45% 和 2.29%。

2.4 精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液 5 μ L, 重复进样 5 次, 记录峰面积, 测得丹皮酚和去甲丹皮酚质量分数的 RSD 分别为 0.25%、0.37%。

2.5 稳定性试验

2.5.1 对照品稳定性试验: 精密吸取混合对照品溶液 5 μ L 分别于配制后 0、2、4、6、8、12、24、36、48 h 测定峰面积, 计算 RSD 分别为 0.70%、0.91%, 表明对照品溶液在 48 h 内稳定。

2.5.2 供试品稳定性试验: 精密吸取供试品溶液(按 2.7 项下制备) 5 μ L 分别于配制后 0、2、4、8、12、24、36、48 h 测定峰面积, 计算 RSD 分别为 1.7%、1.9%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.6 加样回收率试验: 以湖南邵东产丹皮药材为研

究对象, 精密称定已测定质量分数的药材粗粉 5 份, 每份 2.5 g, 分别加丹皮酚 40 mg, 去甲丹皮酚 2.5 mg, 精密称定, 按 2.7 项方法测定, 计算各自的量, 得出丹皮酚和去甲丹皮酚的平均回收率分别为 99.3% 和 101.9%, RSD 分别为 1.05%、1.35% ($n=5$)。

2.7 样品的测定: 精密称取不同产地丹皮药材粉末 5.0 g, 加入 95% 乙醇 50 mL, 索氏提取 10 h, 溶液浓缩至干浸膏, 甲醇超声溶解, 转移至 100 mL 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀即得。取供试品溶液, 用微孔滤膜(0.45 μ m) 滤过, 取续滤液 20 μ L 进样, 按外标法计算丹皮酚和去甲丹皮酚, 结果见表 1。

表 1 不同产地丹皮中的丹皮酚和去甲丹皮酚 ($n=3$)

Table 1 Contents of paeonol and resacetophenone in Cortex Moutan from various habitats ($n=3$)		
产地	丹皮酚/%	去甲丹皮酚/%
湖南邵东	0.708	0.276
安徽亳州	1.499	0.153
四川垫江	1.305	0.178

3 讨论

3.1 检测波长的选择: 应用二极管阵列检测器在 190~400 nm 对丹皮酚和去甲丹皮酚进行扫描, 两个成分的 UV 吸收曲线相似, 在 275 nm 有最大吸收, 故检测波长选择为 275 nm。

3.2 流动相与色谱柱的选择: 本试验曾比较过多种流动相: MeOH-H₂O 系统、ACN-H₂O 系统、ACN-H₃PO₄ 溶液 (pH3.0) 系统和 ACN-NaH₂PO₄ (0.2 mol/L, pH3.0) 系统等。ACN-H₂O 系统比 MeOH-H₂O 系统分离度好, 柱效高; 在未调节 pH 值的 ACN-H₂O 系统情况下分离度不好, 峰形拖尾, 应用 H₃PO₄ 调节 pH=3.0 时峰形和分离度得到有效改善, 柱效显著提高, 峰形与分离度达到最佳; 采用等度洗脱时去甲丹皮酚出峰拖后且峰展宽, 故考虑应用梯度洗脱; 最终确定以 ACN-H₃PO₄ 溶液 (pH3.0) 为流动相进行梯度洗脱。笔者还对色谱柱进行了比较, 以 Kromasil ODS-1 C₁₈ (200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 柱峰形最佳, 分离度好, 柱效高。

3.3 提取条件的选择: 对丹皮干燥药材设计正交试验考察提取条件, 考察项目包括提取溶剂(水、丙酮、乙醇), 粉碎度(药材切片, 过 30 目筛的粗粉, 过 80 目筛的细粉), 提取方法(回流提取、索氏提取、超声提取), 结果表明以乙醇经索氏提取粗粉效果最好。又考察了乙醇体积分数及提取时间对提取效率的影响: 当乙醇为 95% 时, 两者均能得到较完全的提取; 提取时间分别进行了 8、10 和 12 h 的考察, 10 和 12 h 所测

得两种成分的量已无差别,说明已提取完全。故确定最佳提取条件为:95% EtOH 索氏提取 10 h。

3.4 试验结果表明,不同产地丹皮中丹皮酚和去甲丹皮酚的量存在较大差异。丹皮酚的量以安徽亳州丹皮最高,而去甲丹皮酚的量以湖南邵东的丹皮最高。去甲丹皮酚亦为苯乙酮类化合物,其药理活性研究尚未见文献详细报道,但从结构考虑,应与丹皮酚具有相似的药效作用,因此,同时对丹皮中丹皮酚和去甲丹皮酚进行定量测定,有益于完善丹皮药材的质量评价体系。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
 [2] Zhang L H, Xiao P G. Advance in studies of pharmacological effect and clinic on paeonol [J]. *Chinese J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1996, 16(3): 187-189.
 [3] Lin H C, Chen H M. Phytochemical and pharmacological study on *Paeonia suffruticosa* (1)-isolation of acetophenones [J]. *Chung-hua Yao Hsueh Tsa Chih* (中华药学期刊), 1991, 43(2): 175-177.
 [4] Masayuki Y, Toshio O, Atsuhiko K, et al. Bioactive constituents of Chinese natural medicines [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(9): 1327-1331.
 [5] Gao L X, Liang S Q, Wang L, et al. RP-TLC of paeonol and paeoniflorin in *Paeonia suffruticosa* [J]. *J Shandong Tradit Chin Med Coll* (山东中医学院学报), 1995, 19(4): 266-268.
 [6] Fang X C. Determination of paeonol in *Paeonia suffruticosa* by HPLC [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1989, 20(2): 109-110.

RP-HPLC 法测定薯蓣属植物中原薯蓣皂苷

刘中博¹, 王铁杰², 文琪璐³, 陈晓辉¹, 李 军², 毕开顺^{1*}

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 深圳市药品检验所, 深圳 518029;

3. 广东药学院, 广东 广州 510000)

薯蓣属 *Dioscorea* L. 是薯蓣科中最大的一属, 分布于全球的热带和温带, 我国和墨西哥为主产国。其中穿山龙 *D. nipponica* Mak., 黄山药 *D. panthaica* Prain et Burk. 和山药 *D. opposita* Thunb. 均收载于《中国药典》2005 年版一部, 均以根茎入药。穿山龙和黄山药有祛湿、清热解痉的功效。穿山龙用于治疗风湿性关节炎, 腰腿疼痛、麻木, 大骨节病, 跌打损伤, 闪腰岔气, 慢性支气管炎, 咳嗽气喘^[1]。黄山药可治胃病、风湿性心脏病、风湿性关节炎、跌打损伤、牛马炭疽等病^[2]。山药可补脾养胃, 生津益肺, 补肾涩精。用于脾虚食少, 久泻不止, 肺虚喘咳, 肾虚遗精, 带下, 尿频, 虚热消渴^[1]。

薯蓣属植物有效成分主要为甾体皂苷类。其中原薯蓣皂苷对人类白细胞 HL-60 的 DNA、RNA 和蛋白质的合成及细胞生长有抑制作用^[3]。同时, 胡柯等^[4]也发现白血病、结肠癌和前列腺癌细胞株对原薯蓣皂苷最敏感, 而卵巢癌细胞株最不敏感。经 COMPARE 程序分析发现, 在美国国家癌症研究所 (NCI) 抗癌药筛选数据库中, 没有化合物的细胞毒作用与该成分相似, 表明该化合物可能有新的抗癌机制。原薯蓣皂苷属于呋喃甾烷型皂苷, 这类皂苷含糖量高、极性大、结构复杂, 难以分离和纯化。目前为

止, 对其的研究多停留在药理活性方面, 没有对这一类皂苷的定量测定方法, 因此建立其测定方法是非常必要的。本实验首次对原薯蓣皂苷 (protodioscin) 进行定量测定, 该方法不仅灵敏度高、专属性强、操作简单易行, 而且将质量控制与活性成分相结合, 为该属植物的质量控制提供了新思路、新尝试。

1 仪器与试剂

美国 Waters 2695 型高效液相色谱仪, 2996 型二级管阵列检测器和 Empower 工作站。

原薯蓣皂苷对照品自制, 经 IR、MS、¹H-NMR、¹³C-NMR 确定结构为原薯蓣皂苷^[5]。质量分数为 99.5%。乙腈为色谱醇, 水为重蒸水 (自制), 乙醇为分析醇。

3 种药材分别购自沈阳天益堂药店、内蒙古万民药店、深圳市海王星辰连锁药店、辽宁省铁岭市药材有限公司、辽宁省清原县龙胆草研究所、吉林靖宁县综艺土特产产销中心及不同产地的药业公司, 经沈阳药科大学孙启时教授鉴定。产地见表 1。药材经 40 °C 干燥后, 粉碎过 24 目筛, 备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Xterra™ ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水 (27 : 73) 为流动相, 体积

收稿日期: 2005-10-05

基金项目: 深圳市无偿资助科技项目 (S04055)

作者简介: 刘中博 (1980-), 女, 辽宁铁岭人, 在读硕士研究生, 从事药物分析研究。

* 通讯作者 毕开顺 Tel: (024) 23928487 Fax: (024) 21896050 E-mail: bikaisun@yahoo.com