

- 24(4): 205-208.
- [6] Lei L, Song Z H, Tu P F. Advances in research of chemical constituents in plants of *Cistanche Hoffing.* et Link [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(5): 473-476.
- [7] Zhou Z J. Advances in research of *Cistanche Hoffing.* et Link [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 5: 28-30.
- [8] Xu W H, Qiu S X, Shen L Z. Comparing the chemical constituents and pharmacologic actions of *Cistanche desedicola* and *C. salsa* (C. A. Mey.) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(3): 143-146.
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 685-690.
- [10] Lan H Y, Li L H. Application of proteins gel electrophoresis in the identification of crop varieties [J]. *Agric Sci China* (中国农业科学), 2002, 35(8): 916-920.

天麻液相色谱指纹图谱研究

王 莉, 程孟春, 肖红斌*, 梁鑫森*

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116012)

摘 要:目的 建立天麻的液相色谱指纹图谱, 为科学评价及有效控制天麻质量提供新方法。方法 采用 HPLC 法分析不同产地的 18 个天麻样品, 确定指纹峰并进行对照药材相似度、共有模式相似度的计算, 用纯品随行对照结合 LC-MS 对主要指纹峰进行定性鉴定。结果 建立了由 27 个指纹峰和 17 个共有峰组成的天麻液相色谱指纹图谱, 指纹峰具有特征性, 鉴定了其中 12 个主要的指纹峰。用对照药材相似度, 可将天麻样品分为 3 类: 安徽河南产天麻、陕西四川产天麻和云南产天麻。两个相关系数分界点为 0.80 和 0.58, 夹角余弦分界点为 0.88 和 0.73。结论 所选指纹峰有特征性, 建立的指纹谱可用于区别 3 个产地的天麻药材, 并为进一步控制天麻质量提供依据。

关键词:天麻; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)09-1402-04

HPLC Fingerprint of *Gastrodia elata*

WANG Li, CHENG Meng-chun, XIAO Hong-bin, LIANG Xin-miao

(Dalian Institute of Chemicphysics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116012, China)

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint for evaluating and controlling the quality of *Gastrodia elata*. **Methods** HPLC Analysis and similarity calculation were used for establishing fingerprint chromatogram and classifying 18 different original samples; LC-MS and pure compound comparisons were employed for the fingerprint peaks identification. **Results** HPLC Fingerprint chromatogram was constructed with 27 fingerprint peaks, 17 of which were common fingerpring peaks and 12 main compounds were identified. According to the similarity to standardize herbal medicine, 18 samples could be classified three groups, Anhui-Henan, Shanxi-Sichuan, and Yunnan habitats. The two critical points were 0.80 and 0.58 for correlation coefficient and 0.88 and 0.73 for cosine values. **Conclusion** The selected fingerprint peaks are diagnostic for *G. elata* and the constituted HPLC fingerprint chromatogram could be used for identifying different habitats and served as a powerful tool for further quality control of *G. elata*.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; HPLC; fingerprint; similarity

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 主治头痛眩晕、肢体麻木、癫痫抽搐等症。其质量控制多用高效液相法测定天麻素的量或用毛细管电泳测定其他几个活性成分的量^[1~3]。指纹图谱是控制天然药物质量的有效方式之一, 已日益成为

国内外广泛接受的中药质量评价模式^[4,5]。本实验通过收集天麻主产地的 18 个样品进行指纹图谱研究, 最终建立了由 27 个指纹峰和 17 个共有峰组成的天麻液相色谱指纹图谱; 由对照药材相似度及共有模式相似度的计算, 可以较好地地区分不同产地的天麻

收稿日期: 2005-10-12

基金项目: 中科院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213); 国家自然科学基金重点项目“中药药效组分的指纹图谱分析的方法研究”(20235020)

作者简介: 王 莉(1975—), 女, 博士在读, 主要从事中药的分离分析工作。 E-mail: wlhws@dicp.ac.cn

* 通讯作者 肖红斌 梁鑫森

样品;同时通过制备纯化合物鉴定结构及结合液质联用的质谱规律,鉴定了天麻中 12 个主要指纹峰的结构。天麻的指纹图谱研究为进一步深入研究天麻的药理活性及科学评价其质量打下了良好基础。

1 仪器与试剂

美国 Waters 公司 2690 高效液相色谱仪(包括四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱恒温系统);Waters 996 二极管阵列检测器;Waters Millennium 32 色谱工作站;Millipore 超纯水;色谱纯甲醇,色谱纯醋酸。天麻对照药材(中国药品生物制品检定所,120944-200006),18 个天麻样品来源于不同产地,详见表 1,由河南中医陈随清教授鉴定为兰科植物天麻。表内半野生药材为人工放的菌种,但天麻的生长条件为自然环境。

表 1 天麻样品来源

Table 1 Sources of *G. elata* samples

样品号	药材产地	样品号	药材产地
1	安徽(同仁堂药房)	12	陕西(郑州本草园药馆)
4	四川(成都中医药大学)	13	陕西(安国药材市场)
5	安徽(威远生药房)	14	四川半野生
6	安徽(海王星辰西安路店)	15	四川半野生
7	安徽(海王星辰民政店)	16	河南伏牛山
8	云南昭通二级家种	17	河南大别山
9	云南昭通一级家种	18	秦岭山区
10	云南昭通一级野生	19	河南(禹州药材市场)
11	云南昭通特级野生	20	安徽(对照药材)

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备:天麻药材碎成小块,用粉碎机粉碎,过 60 目筛。精密称取天麻粉末 8 g,加入 80 mL 甲醇超声提取 30 min,放置过夜(约 14 h),再次超声提取 30 min。合并两次提取液,滤过,浓缩至干,用超纯水定容至 10 mL 即得(相当于原药材 0.8 g/mL)。

2.2 天麻指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件:Hypersil C₁₈ 色谱柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm, 大连依利特公司);流动相:0.5%醋酸甲醇(A)-0.5%醋酸水溶液(B),0~10 min 2% A 等度,10~60 min 2% A-40% A 线性梯度,60~75 min 40% A 等度;柱温 35 ℃;体积流量 1 mL/min。

2.2.2 测定方法:取供试品溶液过 0.45 μm 滤膜,取 10 μL 注入液相色谱仪,270 nm 检测,记录 75 min 内的色谱峰及其保留时间和峰面积,色谱图见图 1。

2.2.3 稳定性试验:取 4 号天麻样品的供试品溶液 10 μL,分别于 0、5、10、15、20 h 检测指纹图谱。结果

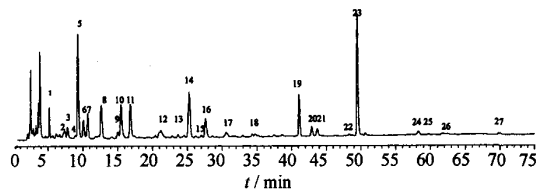


图 1 天麻对照药材的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of *Rhizoma Gastrodiae* reference substances

表明,各主要共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积无明显变化,RSD 分别为 0.0%~1.0%和 0.8%~8.7%。说明样品制备液在 20 h 内稳定。

2.2.4 精密度试验:取 4 号天麻样品的供试品溶液 10 μL,重复进样 5 次,记录指纹图谱。结果表明,各主要共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积无明显变化,RSD 分别为 0.0%~0.8%和 0.8%~7.1%。

2.2.5 重现性试验:取 4 号天麻样品粉末 5 份,分别按 2.1 项下方法制备供试品溶液,各取 10 μL 进样记录指纹图谱。结果表明,各主要共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积无明显变化,RSD 分别为 0.0%~0.8%和 1.1%~6.5%。

2.2.6 指纹峰及共有峰的选择:在当前色谱条件下,首先选择归一化峰面积大于 0.5%的色谱峰作为指纹峰;对于未分离的共有小峰(单个峰峰面积在 0.5%以下),若指纹性较特征,也将其保留为指纹峰。其方法是选择其中最易辨认峰的保留时间作为此峰群的保留时间,其总面积作为此峰群的峰面积。本指纹谱中的 12、17、18 号峰即为合并的指纹峰(有 2~4 个小峰组成)。最终共选择了 27 个指纹峰,其中 17 个为共有峰。

2.2.7 相对指纹图谱的建立:以 23 号峰巴利森苷为参照峰,其保留时间和峰面积均记为 1,计算其余指纹峰相对于巴利森苷的相对保留时间和相对峰面积。具有相同相对保留时间的指纹峰被认为是同一个指纹峰,并以每个峰的紫外光谱作为辅助验证。

2.3 数据处理

2.3.1 天麻药材相似度的计算:以选择的 27 个指纹峰的峰面积为变量用 Excel 2000 按照相关系数公式和夹角余弦公式^[6]计算 17 个天麻样品与对照药材样品(20 号)的相关系数和夹角余弦相似度,结果见表 2。从表 2 可知,安徽产天麻和河南产天麻的相似度范围为 0.97~0.80(相关系数)和 0.98~0.88(夹角余弦);四川和陕西产天麻的相似度范围为 0.79~0.59(相关系数)和 0.88~0.73(夹角余

弦);云南产天麻的相似度范围为 0.56~0.29(相关系数)和 0.72~0.44(夹角余弦)。其中秦岭山区产天麻和云南野生天麻的相似度较低,相关系数和夹角余弦范围分别为 0.20~0.31 和 0.44~0.47。因此对照药材相似度可清楚地把天麻的产地归为以上 3 类,两个分界点分别为 0.80、0.58(相关系数)和 0.88、0.73(夹角余弦),同时可初步判别野生药材。

2.3.2 共有模式相似度的计算:用中南大学指纹谱相似度评价软件拟合共有模式并以 5~72 min 的全谱图计算共有模式相似度。

模式 I 以安徽产天麻 5、6、7、20 号样品的均值作为共有模式,计算各个样品与此共有模式的相关系数相似度(夹角余弦相似度结果类似,为了描述方

便在此只讨论相关系数相似度)。从 I 的结果(表 3)可以看出所有安徽药材和共有模式的相关系数相似度在 0.92 以上;河南药材(19 号样品除外)和安徽药材不可分相似度在 0.93 以上;而其他产地药材相关系数相似度均在 0.85 以下容易区分。19 号样品相似度较低,和陕西四川产药材有交叉,为了把 19 号样品也融进母体,模式 II 以所有安徽产天麻和河南产天麻的均值作为共有模式(19 号也参与平均)。结果显示 19 号样品还是与主体河南、安徽药材不同。仔细观察其相对峰面积可知 19 号样品中的峰 7 质量分数比主体河南、安徽药材高 4~12 倍,因此判断,19 号样品的产地和其他安徽、河南样品应有较大差别。

表 2 天麻样品相似度计算结果

Table 2 Similarity for *Rhizoma Gastrodiae* substances

样品编号	相关系数	夹角余弦	产地	样品编号	相关系数	夹角余弦	产地
20	1	1	对照药材	14	0.606 3	0.737 9	四川
1	0.973 8	0.982 8	安徽	15	0.662 8	0.785 4	四川
5	0.912 2	0.947 9	安徽	12	0.795 9	0.880 5	陕西
6	0.839 4	0.906 3	安徽	13	0.597 8	0.743 2	陕西
7	0.890 1	0.934 2	安徽	8	0.566 3	0.720 6	云南
16	0.898 5	0.934 7	河南	9	0.488 6	0.623 0	云南
17	0.969 7	0.981 8	河南	10	0.295 6	0.446 9	云南野生
19	0.890 1	0.881 0	河南	11	0.318 8	0.445 1	云南野生
4	0.764 1	0.850 3	四川	18	0.209 1	0.479 8	秦岭山区

表 3 共有模式相关系数相似度计算结果

Table 3 Correlation coefficient similarity for common pattern

样品编号	安徽共有模式	安徽、河南共有模式	样品编号	安徽共有模式	安徽、河南共有模式
20	0.929 3	0.955 1	14	0.635 6	0.680 5
1	0.933 8	0.962 9	15	0.674 6	0.725 2
5	0.981 6	0.971 2	12	0.822 5	0.853 9
6	0.956 4	0.916 9	13	0.649 8	0.689 1
7	0.969 1	0.955 0	18	0.437 4	0.444 1
16	0.935 8	0.952 6	8	0.776 5	0.750 5
17	0.959 1	0.978 5	9	0.662 4	0.655 7
19	0.825 4	0.849 6	10	0.496 6	0.483 7
4	0.849 0	0.836 1	11	0.506 0	0.493 9

2.3.3 主要指纹峰的定性鉴别:以分离纯化的单一化合物为对照品及结合 LC-MS 鉴定结果,初步鉴定了 12 个指纹峰。1、5、6、7、8、10、14、17、19、20、23、25 号峰分别为尿苷(uridine)、天麻素(gastrodin)、鸟苷(guanosine)、棕榈酸(palmitic acid)、对羟基苯甲醇(*p*-hydroxy benzylalcohol)、腺苷(adenosine)、对羟基苯甲醛(*p*-hydroxy benzaldehyde)、硫-(对羟基苯基)谷胱甘肽 [*S*-(4-hydroxy-benzyl)-glutathione]、帕氏万带兰素 B(parishin B)、帕氏万带兰素 C(parishin C)、帕氏万带兰素(parishin)和 4,4'-二羟基苝醚(4,4'-dihydroxydibenzyl ether)。

3 讨论

3.1 提取方法及供试品溶液的制备:本实验参照《中国药典》方法采用超声提取并对其进行了适当改进,如天麻药材不宜久烘,本实验采用平行取少量样品 80 ℃烘干测定含水量,用含水量测定结果将实验用样品折算成净称样量以消除称样误差。本实验中所列峰面积即为折算后的数据,所有样品的最终质量浓度均相当于原药材 0.8 g/mL;采用水来定容,因为考虑到天麻中的多数成分为水溶成分。

3.2 色谱条件的选择:考虑到要用液质联用对指纹峰定性,实验中选用挥发性的醋酸作为改性剂并选

用了不同酸度的流动相,结果表明所选条件峰形较好、较稳定。对于检测波长的选择,天麻中多数成分的吸收在 220、270 nm,但 220 nm 醋酸有吸收,因此最终选择检测波长为 270 nm。

3.3 参照峰的选择:天麻素、对羟基苯甲醇和巴利森苷均为天麻中高质量分数的活性组分,但天麻素和对羟基苯甲醇的质量分数不稳定,有共轭互变关系且保留时间也不如巴利森苷稳定,因此选择巴利森苷作为参照峰。

3.4 指纹峰的选择:本实验没有考虑保留时间在 5 min 之前的峰,因为实验选择了尽可能低的有机相起始体积分数 2%,并在两相流动相中添加了酸抑制剂,所以 5 min 之前的峰为在反相柱上未分离的峰。

3.5 指纹峰的特征性:已鉴定的 12 个指纹峰中有 7 个为天麻活性成分,它们是天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷、巴利森苷 B、巴利森苷 C 和 4,4'-二羟基苄醚。3 个核苷类成分尿苷、鸟苷

和腺苷为天麻中首次鉴定,文献报道其有增强免疫作用,推测它们可能为天麻的潜在活性成分。这些成分均为天麻特征成分,因此本实验所选择的指纹峰具有较强的特征性可以用来控制天麻质量。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [J]. Vol 1. 2005.
- [2] Zhao Y K, Cao Q E, Xiang Y Q, et al. Identification and determination of active compound in *Gastrodia elata* Bl. by capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 849 (1): 277-283.
- [3] Li H X, Ding M Y, Yu J Y. Simultaneous determination of *p*-hydroxybenzaldehyde, *p*-hydroxybenzyl alcohol, 4-(*D*-glucopyranosyloxy)-benzyl alcohol, and sugars in *Gastrodia elata* Blume measured as their acetylated derivatives by GC-MS. [J]. *J Chromatogr Sci*, 2001, 39(6): 251-254.
- [4] Luo G A, Wang Y M, Cao J, et al. A study on establishing modern standard system to control the quality of traditional Chinese medicine in our nation. [J]. *World Sci Tech: Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术—中药现代化), 2002, 4 (4): 5-11.
- [5] Xiao R, Yuan Z F, Wang C Y, et al. Fingerprints of *Scutellaria baicalensis* from different habitats by HPLC. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 743-747.
- [6] Miao A D, Sun D J. Application of microsoft 2000 to calculate the similarity in fingerprints in Chinese herbs. [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2003, 27(1): 51-54.

施磷量和 AM 真菌对柴胡生长的交互效应

赵丽莉¹, 滕华容², 贺学礼^{1,2}

(1. 河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002; 2. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:目的 研究不同施磷水平下接种 AM 真菌摩西球囊霉 *Glomus mosseae*、苏格兰球囊霉 *G. caledonium* 和两者的混合菌剂对柴胡 *Bupleurum chinense* 生长的影响。方法 采用盆栽试验与室内分析相结合的方法。结果 接种 AM 真菌提高了柴胡根系菌根侵染率, 增加了植株磷的量和根干质量; 叶片叶绿素、类胡萝卜素和可溶性糖的量明显高于对照株, 而接种混合菌种的柴胡根可溶性糖的量低于对照株; AM 真菌接种效应因菌种和施磷量不同而变化, 施磷量为 0.1~0.3 g/kg 时接种效果最好。结论 接种 AM 真菌有利于柴胡生长, 提高磷肥利用率。

关键词: AM 真菌; 施磷量; 生长量; 柴胡

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)09-1405-05

Effects of AM fungi on growth of *Bupleurum chinense* under different phosphorus levels

ZHAO Li-li¹, TENG Hua-rong², HE Xue-li^{1,2}

(1. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Northwest

Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: **Objective** The effects of AM fungi on the growth of *Bupleurum chinense* were investigated by inoculation *Glomus mosseae*, *G. caledonium*, and the two fungal mixture under different phosphorus levels. **Methods** Pot culture and experimental analyses were carried out. **Results** Mycorrhizal infection rate could be promoted by inoculation and increased phosphorus content of plant and root dry weight; the content of chlorophyll, carotenoids, and soluble sugar of leaf was higher than that of controlled plant, and the soluble sugar content of plant root by inoculation the two fungal mixtures were lower than that of

收稿日期: 2005-10-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(40471637); 河北大学自然科学基金重点项目(Z200405)

作者简介: 赵丽莉(1964—), 女, 陕西省富平县人, 副教授, 主要从事植物生理生化和分子生物学方面的教学和研究工作, 在该领域已发表论文 15 篇。 Tel: (0312)4101908 E-mail: zhao3615@tom.com