

质量的最佳培养基是 1/2MS (20% 香蕉提取物) + LaCl_3 20 mg/L + SmCl_3 10 mg/L + YbCl_3 0 mg/L。3 种稀土元素对叶绿素 a 的量的影响都不显著。但 La^{3+} 对叶绿素 b 的影响却极其显著,能显著提高它的量; Yb^{3+} 对叶绿素 b 的影响显著,也能显著提高它的量,这与杨永刚等^[14]报道的 Yb^{3+} 能提高西蒙洛托中叶绿素 b 的量相一致。因此笔者推测:稀土元素镧 (La^{3+}) 之所以能促进铁皮石斛试管苗增质量与镧 (La^{3+}) 从一定的角度影响了铁皮石斛的光合作用的效率是分不开的。试验中发现,高质量浓度的 SmCl_3 和 YbCl_3 的配比试验号,如 3、4、7、8、10、12 号植株长得相对较矮小,叶片也窄小,可见高质量浓度的 SmCl_3 和 YbCl_3 的组合会抑制石斛的增高。胡勤海等^[6]报道稀土对植株叶绿素的量和光合速率有明显的促进作用,并以单一稀土元素及喷施方法增效作用较好。稀土元素对光合作用影响的机制尚无明确的报道。

试验表明:提高铁皮石斛试管苗多糖量的最优培养基是 1/2MS (20% 香蕉提取物) + LaCl_3 10 mg/L + SmCl_3 20 mg/L + YbCl_3 20 mg/L。稀土元素镧 (La^{3+}) 对石斛多糖的量有显著的影响。据报道,Hoagland 等用含有 LaCl_3 的营养液栽培黄瓜植物,黄瓜植物根系中稀土量逐渐增加,同时引起根系伤流液的溢泌量也随之增加。镧有促进 NO_3^{-1} 还原、氮素同化和氨基酸的合成与代谢的作用^[15]。因此,笔者推测稀土能够提高石斛多糖的量可能与稀土增加了石斛根系的伤流量从而提高了对有机碳源的吸收和转化有关。稀土元素对石斛的生理效应的分子机制还有待于进一步研究。

References:

- [1] Xu H, Wang Z T, Ding J Y, et al. General research aspect of biotechnology about medicl *Dendrobium* [J]. *Chin Wild Plant Res* (中国野生植物资源), 2001, 20(1): 1-4.
- [2] Zhang X Y. To determine the content of amylose in three kinds of artificial propagation of *Dendrobium* in Sichuan province [J]. *J Leshan Normal Coll* (乐山师范学院学报), 2004, 19(5): 89-90.
- [3] Wei X Y, Zhang M. Protoplast fusion in *Dendrobium candidum* and *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(7): 811-814.
- [4] Wu M G, Kang C F, Lu R L, et al. Tissue culture of the stems of *Dendrobium huoshanense* under effects of IBA/NAA [J]. *J Chin Univ Sci Tech* (中国科学技术大学学报), 2001, 31(5): 624-628.
- [5] Shao H, Zhang L Q, Li J M, et al. Advances in research of *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(1): 109-112.
- [6] Hu Q H, Ye Z J. The physiological effects of rare earth element on plant [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1996, 32(4): 296-300.
- [7] Zhang Z G, Liu H, Wang L, et al. To research the culture condition of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(8): 431-433.
- [8] Yu W J. *Biological Statistical Algorithm and Design of Experiment* (生物统计附试验统计) [M]. China Agriculture Press, 2001.
- [9] Zhang Z L, Zhai W Q. *The Experimental Guide for Plant Physiology* (植物生理学实验指导) [M]. Beijing: High Education Press, 2003.
- [10] Wang X Z. *The Principle and Methods of Experimental Technique on Biochemistry* (生物化学实验技术原理和方法) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002.
- [11] Zhou Z Z. The plant ecophysiological effect of the rare earth element [J]. *Acta Agric Boreali-occiden Sin* (西北农业学报), 2004, 13(2): 119-123.
- [12] Liao T J. The physiological effects of rare earth elements on crops [J]. *Rare Earth Element* (稀土), 1994, 15(5): 26-29.
- [13] Liu H, Zhang Z G. To research the medium of growth of plants of *Dendrobium candidum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23(11): 654-656.
- [14] Yang Y G, Cheng L, Zhou G Y, et al. Effects of rare earth elements on muskmelon *in vitro* [J]. *J Capital Norm Univ: Nat Sci* (首都师范大学学报: 自然科学版), 2001, 23(2): 62-67.
- [15] Ni J Z. *Bioinorganic Chemistry of Rare Earth Elements* (稀土生物无机化学) [M]. Beijing: Science Press, 1995.
- [1] Xu H, Wang Z T, Ding J Y, et al. General research aspect of biotechnology about medicl *Dendrobium* [J]. *Chin Wild Plant*

蓬子菜药材 HPLC 指纹图谱研究

马美丽, 卢卫红, 崔明宇, 杨帆, 史国玉, 于晓敏

(黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 建立蓬子菜药材的 HPLC 指纹图谱。方法 以香叶木甘为内标物, 采用高效液相色谱法分析不同产地 10 个蓬子菜样品, 并进行相似度计算。色谱条件: Hypersil ODS₂ 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-

收稿日期: 2006-01-12

基金项目: 黑龙江省科技攻关计划项目 (20031101)

作者简介: 马美丽, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药活性成分及质量标准化研究。

Tel: (0451) 82196178 E-mail: mylt666@sina.com

0.4% 醋酸溶液梯度洗脱;体积流量为 1.0 mL/min;检测波长 340 nm;柱温:26 ℃。结果 本研究建立了具有 19 个共有峰的蓬子菜药材指纹图谱,各色谱峰分离较好,达到指纹图谱要求。结论 本方法重现性好,可用于不同产地蓬子菜药材的指纹图谱的测定和质量评价。

关键词:蓬子菜药材;高效液相色谱;指纹图谱

中图分类号:R282.7 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2006)11-1723-04

HPLC Fingerprint of *Herba Galii Veri*

MA Ying-li, LU Wei-hong, CUI Ming-yu, YANG Fan, SHI Guo-yu, YU Xiao-min

(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective To establish the HPLC-FPC of *Herba Galii Veri*. **Methods** To analyze ten samples from various habitats by HPLC method. The similarity degree was calculated, taking diosmin as the internal standard. Conditions: Column, Hypersil ODS₂ (200 mm×4.6 mm, 5 μm); mobile phase: mixture liquid of CH₃OH-0.4% CH₃COOH in a gradient mode; flowing rate, 1.0 mL/min; wavelength: 340 nm; column temperature, 26 ℃. **Results** The HPLC-FPC of *Herba Galii Veri* was set up by establishing 19 common peaks. The peaks in the spectrum were all separated perfectly, which met the regulation of HPLC-FPC. **Conclusion** The method has good reproducibility, and can be used in setting up HPLC-FPC and quality control of *Herba Galii Veri* from various habitats.

Key words: *Herba Galii Veri*; HPLC; fingerprint

蓬子菜系茜草科猪殃殃属植物蓬子菜 *Galium verum* L. 的干燥全草,别名黄花米、疗毒蒿、鸡肠草。国内外分布广泛,民间用药历史悠久。近年来,经临床实践发现,蓬子菜及其复方制剂对治疗血栓闭塞性脉管炎具有独特的疗效^[1~3]。以往文献报道仅以绿原酸的量作为蓬子菜的质量控制指标,经本课题的药效学研究结果表明,蓬子菜治疗血栓有效部位为黄酮类成分,因此仅以绿原酸作为指标不能全面评价蓬子菜的药材质量。同时,由于受产地、气候和生态环境的影响,不同来源蓬子菜所含成分有一定的差异。目前,指纹图谱已经成为国际公认的控制中药与天然药物质量的有效手段,能从整体上控制质量,因此本实验采用 HPLC 指纹图谱技术对蓬子菜药材进行了研究,以期对蓬子菜药材的质量控制提供有效的方法。

1 仪器与试剂

Waters 600E-2487 高效液相色谱仪;甲醇(色谱纯,DIMA 公司);醋酸(分析纯,天津市化学试剂六厂);自制重蒸水。

蓬子菜 10 个样品采自黑龙江省不同地区及其他省区(见表 1),经黑龙江中医药大学于加宾教授鉴定为蓬子菜 *Galium verum* L.

对照品:香叶木苷(自制经 HPLC 分析,质量分数为 98.85%)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:精密称取香叶木苷对照品适量,加甲醇溶解,配成 0.2 mg/mL 溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备:取蓬子菜药材粉末(20 目)20 g,70% 乙醇回流提取 2 次,减压浓缩,浸膏加水溶解,过大孔树脂柱纯化,洗脱液减压浓缩,加适量甲醇溶解,稀释至 100 mL 量瓶中,精密吸取 5 mL,稀释于 25 mL 量瓶中,作为供试品溶液备用(相当于原药材 40 g/L),临用前过 0.45 μm 的微孔滤膜。

2.3 色谱条件:色谱柱:Hypersil ODS₂(200 mm×4.6 mm,5 μm);检测波长 340 nm,柱温为 26 ℃,体积流量 1.0 mL/min 时,用甲醇-0.4% 醋酸系统梯度洗脱,各色谱峰分离度好,保留时间适中。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:同一供试品溶液连续进样 5 次,其相对保留时间 RSD 小于 3%,主要共有峰面积的 RSD 不超过 5%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 重现性试验:同一产地蓬子菜样品 5 份,分别按供试品溶液制备项下操作并测定,其相对保留时间 RSD 小于 3%,主要共有峰面积的 RSD 不超过 5%,表明重现性良好。

2.4.3 稳定性试验:供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12 h 检测,其相对保留时间 RSD 小于 3%,主要共有峰面积的 RSD 不超过 5%,说明供试品溶液至少在 12 h 内稳定。

2.5 蓬子菜样品测定

2.5.1 标准峰位的标定:分别取对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,通过与对照品色谱比较,对样品图中色谱峰进行标定。见图 1。

2.5.2 共有峰确定:将 10 批蓬子菜样品的供试品溶液按以上色谱条件进样分析,记录色谱图得到具有 19 个共有峰的指纹图谱。见图 2。

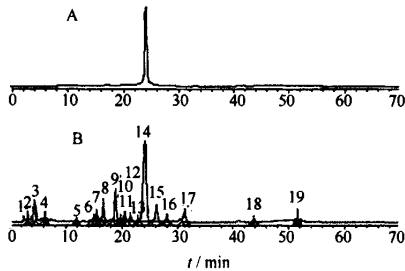


图 1 香叶木苷 (A) 和样品 (B) HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC Fingerprint of diosmin (A) and sample (B)

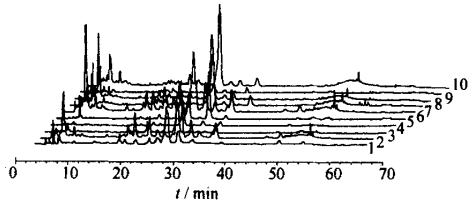


图 2 10 个不同产地样品 HPLC 指纹图谱
Fig. 2 HPLC Fingerprint of ten samples
from various habitats

2.5.3 共有峰的峰号(相对保留时间)见表 2。

2.5.4 相对峰面积值:1、2、3、4 号峰未达完全基线分离,用四者峰面积之和计算相对峰面积,同样 6 与 7 号,9 与 10 号,18 与 19 号峰未达完全基线分离,也用峰面积之和计算相对峰面积。

(1+2+3+4)、5、(6+7)、8、(9+10)、11、12、13、s、15、16、17、(18+19) 峰相对峰面积为 (4.29~26.79)、(0.12~0.43)、(1.13~4.20)、(1.44~3.90)、(6.67~11.60)、(0.63~4.44)、(0.97~1.92)、(0.45~1.88)、(41.77~56.07)、(1.09~5.10)、(0.93~8.36)、(1.86~7.73)、(0.77~2.79)。

2.5.5 指纹图谱相似度的计算:应用大连物化所王龙星的中药指纹图谱相似度计算软件(夹角余弦法),选用样品 5 为标准(产地:哈尔滨郊区,本课题前期药效学、化学研究中选用该产地的蓬子菜)。对蓬子菜的指纹图谱进行相似度评价,结果见表 1、2。

表 1 不同产地 10 个样品的指纹图谱相似度
Table 1 Similarity degrees of ten samples
from various habitats

样品号	产 地	相似度/%	样品号	产 地	相似度/%
1	大兴安岭	88.8	6	千山	85.7
2	本校药圃	95.6	7	赤峰	85.7
3	宾县	80.2	8	泰安	81.3
4	镜泊湖	91.4	9	长春	75.4
5	哈尔滨	100.0	10	二龙山	92.7

表 2 10 批蓬子菜药材共有指纹峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks for fingerprint of ten batches of *Herba Galii Veri*

共有峰 峰号	相对保留时间										平均值	RSD/ %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	0.096 8	0.097 7	0.096 7	0.086 6	0.091 4	0.097 4	0.094 9	0.093 7	0.093 4	0.094 2	0.094 3	3.58
2	0.129 7	0.133 0	0.129 6	0.125 4	0.129 7	0.131 1	0.128 8	0.126 4	0.126 8	0.127 0	0.128 7	1.83
3	0.177 2	0.188 0	0.177 0	0.173 0	0.177 1	0.180 2	0.176 6	0.173 6	0.174 5	0.174 3	0.177 2	2.47
4	0.254 3	0.274 6	0.254 1	0.249 6	0.256 1	0.261 6	0.255 7	0.249 1	0.254 9	0.252 4	0.256 2	2.87
5	0.491 2	0.499 0	0.490 5	0.465 9	0.491 0	0.503 8	0.483 1	0.476 8	0.469 1	0.486 9	0.485 7	2.51
6	0.619 1	0.621 7	0.618 2	0.589 4	0.618 2	0.621 5	0.641 3	0.613 3	0.569 5	0.614 4	0.609 9	2.79
7	0.641 3	0.653 9	0.640 3	0.612 5	0.639 9	0.636 4	0.641 3	0.634 1	0.634 3	0.635 9	0.637 4	1.66
8	0.689 1	0.700 2	0.695 6	0.632 8	0.688 8	0.682 5	0.690 6	0.678 3	0.685 2	0.684 0	0.682 7	2.73
9	0.777 7	0.754 1	0.780 7	0.714 2	0.777 8	0.767 1	0.767 2	0.746 8	0.740 9	0.742 0	0.756 9	2.81
10	0.818 4	0.837 5	0.817 2	0.773 3	0.818 4	0.802 6	0.807 4	0.776 7	0.775 6	0.776 1	0.800 3	2.90
11	0.846 9	0.856 8	0.845 7	0.817 4	0.847 3	0.845 8	0.836 4	0.814 5	0.833 7	0.811 3	0.835 6	1.91
12	0.890 1	0.899 0	0.888 8	0.841 1	0.890 8	0.870 0	0.902 9	0.846 0	0.844 0	0.843 7	0.871 0	2.80
13	0.948 6	0.942 5	0.947 1	0.891 4	0.948 6	0.940 0	0.933 3	0.913 0	0.892 4	0.892 6	0.925 0	2.69
14	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	
15	1.084 6	1.097 0	1.083 1	1.057 5	1.084 9	1.117 2	1.095 9	1.089 4	1.075 8	1.072 1	1.085 8	1.48
16	1.163 6	1.162 3	1.163 1	1.115 0	1.162 5	1.195 5	1.161 1	1.139 9	1.157 6	1.159 3	1.158 0	1.75
17	1.319 0	1.307 4	1.318 8	1.270 0	1.295 5	1.338 7	1.307 2	1.286 8	1.288 7	1.289 7	1.302 2	1.54
18	1.939 6	1.927 7	1.940 3	1.832 4	1.942 6	1.950 1	1.897 9	1.871 2	1.866 2	1.878 0	1.904 6	2.15
19	2.117 4	2.028 3	2.114 3	2.042 7	2.146 2	2.132 0	2.078 8	2.046 0	2.069 8	2.071 9	2.084 7	1.95

3 讨论

3.1 经紫外光谱扫描,该样品甲醇溶液在 253、269、340 nm 处有较高吸收,通过指纹图谱对照,在 340 nm 处所包含的吸收峰最多,且各色谱峰分离较好。

3.2 色谱指纹图的建立,比较所有测定和记录的指纹图谱,确定 19 个共有峰组成指纹图谱(见图 1、2)。整个指纹图谱按保留时间可分为 3 个区段,即 I 区(1~4 号峰),保留时间在 2.198~6.658 min; II 区(5~17 号峰),保留时间在 11.742~31.697 min; III 区(18~19 号峰),保留时间在 46.701~51.806 min。3 个区段中“表观丰度”最强的是第 II 区,其次是第 I 区、第 III 区。其中 14 号峰是峰强度最强的色谱峰,也是整个指纹图谱中峰高最高、积分面积最大、相对峰面积值比较稳定的色谱峰,其色谱峰面积占总峰面积的比例为 41.77%~56.07%,且经对照品标定 14 号峰为香叶木苷,这与前期的药效学研究结果相符。

3.3 通过 10 个样品的测定,统计共有峰面积、非共有峰总面积与总峰面积的百分比,其结果,共有峰面积占总峰面积百分比为 93.02%~98.96%,非共有峰总面积只占 1%~7%。符合指纹图谱研究的非共有峰总面积百分比<10%的技术要求。

参阅文献报道^[4,5],相似度在 90%~100% 可归为一类,为优质品(I),相似度在 70%~90% 可归为一般品(II),见表 3。

表 3 不同产地蓬子菜药材评价

Table 3 Evaluation of *Herba Galii Veri* from varous habitats

类 别	产 地
I	2、4、5、10
II	1、3、6、7、8、9

通过计算可以看出,不同来源样品的相似度有所不同,虽然共有峰较多,但各共有峰的丰度不尽相同,表现出各样品的差异性,通过指纹图谱的建立,获取了对蓬子菜样品统一的评价依据,正确反映了其他样品与标准样品之间的相似程度与偏离程度,使药材质量评价更为客观。

References:

- [1] Kahn S R. The clinical diagnosis of deep venous thrombosis; integrating in cadence, risk factors and symptoms and signs [J]. *Arch Intern Med*, 1998, 39(8): 513-516.
- [2] Guo W G, Yang S Q, Han X Y. Curing thrombophlebitis with Xueshuantong injection-clinical observation for 120 case [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 1997, 14(1): 27.
- [3] Guo W G, Yu H Y, Li F N, et al. Curing thrombophlebitis with ion electrolyzed from *Galium verum* L. extract-clinical observation for 100 case [J]. *Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 1997, 4(2): 115-116.
- [4] Tu P F. Discussion on FPC of Chinese medicine and Chinese medicine injection established by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(7): 516.
- [5] Zhang K R, Bi K S. Analysis of HPLC fingerprint chromatography of *Paoniae Alba* [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(4): 380.

空 心 胶 囊 商 讯

绍兴中亚胶囊有限公司是与马来西亚合资的专业生产销售药用空心胶囊的生产企业,地处唐诗之路天姥山麓,104 国道,风景秀丽、环境幽雅、气候宜人,对药品(胶囊)生产有着得天独厚的自然条件。

公司严格按照 GMP 标准规范生产,产品指标完全达到并超过《中国药典》2005 年版标准。是国家食品药品监督管理局空心胶囊定点生产企业。公司年产空心胶囊 50 亿粒,严格选用优质药用明胶为原料生产 00#、0#、1#、2#、3#、4# 和安全胶囊 A、B 型等不同规格、颜色的机制硬胶囊;并且已成功开发了植物胶囊并出口世界各地。

在满足各制药企业的同时,公司又为方便医院诊所和科研机构等,开设小客户服务中心,零售空心胶囊及与之配套的胶囊套合板、胶囊填充机等胶囊制剂设备,热忱欢迎各胶囊制剂单位来电咨询。公司先进的全自动胶囊生产线与高素质的企业员工向您承诺,携手中亚是您明智的选择。

地址:浙江省新昌县儒岙镇 邮编:312560 联系人:张小姐

电话:0575-6060562 E-mail: feima666@126.com