

3.2 检测波长选择: 本实验在200~700 nm 进行波长扫描, 经筛选后比较了样品在256、286、320、342、370 nm 的色谱图, 发现342 nm 处色谱峰信息丰富, 各峰分离情况良好, 各组分均有较大吸收, 最后确定色谱分析波长为342 nm。

3.3 样品指纹图谱分析: 从各样品色谱图可以看出, 15个样品的色谱峰都有以11号峰为分界线, 呈左侧峰密集右侧峰稀疏的分布特征。“宁杞I号”样品中, 河北样品有12个共有峰(缺少10、13、14、15号峰); “大麻叶”品种有13个共有峰(缺少4、8、13号峰); “宁杞II号”品种有14个共有峰(缺少3、4号峰)。值得一提的是河北样品2号色谱峰为所有样品中最高, 并且40 min 处出现了一个在其他样品中极低或无的色谱峰, 可认为该色谱峰是河北样品特有的特征峰。从芦丁和绿原酸色谱峰面积来看: “宁杞I号”样品中宁夏固原黑城乡、宁夏中宁恩和乡、宁夏银川南梁农场以及新疆样品中芦丁和绿原酸峰面积均较高, 内蒙和河北与宁夏其他地区“宁杞I号”枸杞样品中芦丁和绿原酸峰面积相差不大; “大麻叶”和“宁杞II号”枸杞品种中芦丁和绿原酸峰面积较低; 说明不同产地、不同品种枸杞黄酮类化合物指纹图谱共有峰的相对保留时间基本一致, 相对峰面积存在显著的差异。

3.4 枸杞样品相似度比较分析: 对相似度计算结果(表2)分析可知, 样品余弦夹角和相关系数计算结果基本一致。以10个宁夏不同产地的“宁杞I号”样品

建立的共有模式为对照指纹图谱, 与15个样品进行比较, “宁杞I号”样品中, 宁夏不同产地的枸杞样品间有较好的相关性, 但也存在差别, 宁夏中卫样品与共有模式的相关性略低; 新疆样品与共有模式的相关性较好; 内蒙样品和河北样品与共有模式相关性较低。此外, “大麻叶”和“宁杞II号”与“宁杞I号”品种间的相关性低。说明不同产地、不同品种间枸杞黄酮类化合物的组成存在差异, 也表明不同的气候条件和生长条件导致了相同品种在不同产地产生了化学成分上的差异。

枸杞子具有多种药理作用, 所含有效成分很多, 仅从某一类成分来评价不同产地、不同品种枸杞的质量不够全面。但所建立的宁夏枸杞黄酮类化合物HPLC 指纹图谱能为不同产地、不同品种枸杞的鉴定提供一定的参考, 也为进一步研究宁夏枸杞的道地性奠定了基础。

参考文献:

- [1] 白寿宁. 宁夏枸杞研究 [M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1998.
- [2] 谢培山. 中药制剂色谱指纹图谱鉴别 [J]. 中成药, 2000, 22(6): 391-394.
- [3] 周玉新. 中药指纹图谱研究技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [4] 卢红梅, 梁逸曾. 枸杞的高效液相色谱指纹图谱 [J]. 中南大学学报: 自然科学版, 2005, 36(2): 248-252.
- [5] 黄元庆, 鲁建华, 沈泳, 等. 枸杞总黄酮类化合物抗脂质过氧化研究 [J]. 卫生研究, 1999, 28(2): 115-116.
- [6] 张颖, 张立睦, 周红英, 等. 不同产地枸杞子中黄酮含量的测定 [J]. 中国中医药科技, 2004, 11(2): 102-103.

天山雪莲HPLC 指纹图谱研究

欧元^{1,2}, 袁晓凡^{1*}, 徐春明^{1,2}, 赵兵¹, 王晓东¹, 王玉春^{1*}

(1. 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 目的 建立天山雪莲药材的HPLC 指纹图谱, 为雪莲药材的快速质量控制提供依据。方法 以绿原酸、芦丁茴香、芦丁、木犀草素、芹菜素5种对照品为对照, 采用HPLC 法, 测定了10批次不同产地天山雪莲的色谱图, 确立参照指纹图谱。色谱条件: 色谱柱Diamondsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 甲醇-水(0.8% 醋酸, 0.2% 三乙胺, pH 3.5~4.0) 线性梯度洗脱, 柱温30℃, 检测波长270 nm, 记录时间30 min, 体积流量1.0 mL/min。结果 标示出天山雪莲的13个特征指纹峰。结论 该方法准确、重现性好, 为天山雪莲的指纹图谱质量控制提供了参考。

关键词: 天山雪莲; 指纹图谱; HPLC; 相似度

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0105-04

* 收稿日期: 2007-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(20506027); 中国科学院西部行动高新技术项目(KGCX2-SW-506)

作者简介: 欧元(1982—), 女, 河北石家庄市人, 硕士研究生, 主要研究方向为中药指纹图谱。

* 通讯作者 袁晓凡 Tel: (010)62574372 E-mail: yuanxf99@yahoo.com

HPLC Fingerprint of *Saussurea involucrata*

OU Yuan^{1,2}, YUAN Xiao-fan¹, XU Chun-ming^{1,2}, ZHAO Bing¹, WANG Xiao-dong¹, WANG Yu-chun¹

(1. State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Objective To establish HPLC fingerprints of *Saussurea involucrata* for the quick quality control. **Methods** Chlorogenic acid, syringin, rutin, luteolin, and apigenin were used as reference substances. Diamonsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used and the methanol-water (0.8% acetic acid, 0.2% triethylamine, pH 3.5—4.0) was chosen as a mobile phase. The column temperature was 30 °C and the fingerprint was detected at 270 nm. The detection time was 30 min, and the flow rate was 1.0 mL/min. Ten batches of *S. involucrata* samples from various habitats were analyzed to establish a reference fingerprint. **Results** Thirteen characteristic peaks were indicated on HPLC fingerprints. **Conclusion** This method is simple and accurate with a good reproducibility and provides a reference standard for the quality control of *S. involucrata*.

Key words: *Saussurea involucrata* Kar. et Kir; fingerprints; HPLC; similarity

菊科植物天山雪莲 *Saussurea involucrata* Kar. et Kir, 又名新疆雪莲, 具有通经活血、暖宫散瘀、散寒除湿和强筋助阳等多种功效, 主治雪盲、牙痛、风湿及类风湿性关节炎、肾虚阳痿、麻疹不透、肺寒咳嗽及某些妇科疾病。近年来作为民族药和民间药, 在抗炎镇痛、抗早孕、抗衰老及抑制癌细胞增殖方面的作用备受关注^[1]。天山雪莲主要含有黄酮、生物碱、内酯甾醇、多糖及挥发油等多种化学成分, 其中主要的次生代谢物是黄酮及黄酮苷类^[2]。目前国内关于天山雪莲质量控制的研究还不够完善, 《中国药典》2005年版中天山雪莲的质量控制仅限于绿原酸、芦丁的薄层鉴别^[3]; 薛秀峰^[4]、苗爱东^[5]等人分别用紫丁香苷、芦丁为对照品, 对其指纹图谱进行了研究; 黄毅^[6]用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对天山雪莲不同部位的HPLC色谱图进行相似度计算。本实验采用RP-HPLC法对天山雪莲指纹图谱进行了研究, 同时标示出了绿原酸、紫丁香苷、芦丁、木犀草素、芹菜素5种主要有效成分的特征峰, 并利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对10批次不同产地的药材进行相似度计算。通过方法学考察, 可以在30 min内得出天山雪莲的特征性色谱指纹图谱, 为雪莲建立快速、稳定、全面的质量控制方法提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器: 高效液相色谱仪(Waters 2695)配自动进样器、四元泵、柱温箱、PDA二极管阵列检测器(Waters 2996)、Empower色谱工作站; TDL—5—A型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 超纯水器(美国Millipore); KQ 5200DB型数控超声清洗器

(中国玉环曙峰)。

1.2 材料: 甲醇、乙腈(色谱纯, J&K Chemical); 无水甲醇、醋酸(分析纯, 北京化工厂); 三乙胺(分析纯, 北京化学试剂公司); 水为超纯水; 芦丁、绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号0080-200105、11075-200312); 紫丁香苷(安徽DELTA公司, 质量分数>98%); 木犀草素、芹菜素(Sigma); 天山雪莲对照药材(中国药品生物制品检定所, 批号121205-0101); 不同产地野生天山雪莲样品购于新疆, 来源地见表1, 均由中国科学院过程工程研究所植物分类学博士王晓东副研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Diamonsil™(TM) 钻石 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(北京迪马公司); C₁₈保护柱BBM-600220。流动相组成: A 甲醇-B 水(添加0.8%醋酸, 0.2%三乙胺, pH 3.5~4.0); 梯度条件: 0~10~15~25~30 min; V_A V_B=20 80~30 70~60 40~80 20~80 20, 二元梯度洗脱。检测波长: 270 nm, 柱温: 30 °C, 体积流量: 1.0 mL/min, 进样量: 20 μL, 记录时间: 30 min。在此色谱条件下, 绿原酸、紫丁香苷、芦丁、木犀草素、芹菜素5种对照品的保留时间分别为10.28、11.66、18.73、22.91、24.78 min。

2.2 雪莲药材提取方法的选择: 实验研究了天山雪莲药材的最佳提取条件, 分别比较了室温浸提、加热回流、索氏提取、超声提取4种方法, 以及不同提取剂浓度、不同提取时间的提取效果, 最终确定以下最优方法: 植物材料经烘箱50 °C干燥后, 粉碎机粉碎, 过40目筛精确称取粉末0.1 g, 密闭容器中经10 mL

70% 甲醇超声提取 40 min 后, 4 000 r/min 离心 10 min, 过 0.20 μm 有机相针式滤器, 取续滤液进行色谱分析。

2.3 色谱指纹峰的标定: 以参照物芦丁对应的色谱峰的保留时间和峰面积为 1, 计算 10 批次样品其他各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验: 精密称取同一棵野生天山雪莲粉末 0.1 g, 按 2.2 项方法制备成供试品溶液, 连续进样 6 次, 进样量均为 20 μL, 测定峰面积, 以芦丁峰为对照, 计算出各共有峰的相对保留时间和峰面积比值的 RSD < 3%。结果表明本方法精密度好。

2.4.2 稳定性试验: 精密称取野生天山雪莲粉末 0.1 g, 按 2.2 项方法制备成供试品溶液, 在室温下分别放置 0、1、4、8、12、24 h 后分析, 进样量均为 20 μL, 测定峰面积, 以芦丁峰为对照, 计算出各共有峰的相对保留时间和峰面积比值的 RSD < 3%。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重现性试验: 取同一批野生天山雪莲粉末 6 份, 按 2.2 项方法制备成供试品溶液, 分别进样分析, 进样量均为 20 μL, 测定峰面积, 以芦丁峰为对照, 计算出各共有峰的相对保留时间和峰面积比值的 RSD < 3%。结果表明本方法重现性好。

2.5 不同批次天山雪莲指纹图谱相似度评价: 测定了 10 批次的天山雪莲样品, 色谱图见图 1。应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版中国药典委员会), 将所得谱图进行色谱峰匹配。以 10 批次拟合图谱为对照图谱, 见图 2, 生成原理为中位矢量法。以夹角余弦法计算图谱之间的相似度, 结果见表 1。计算结果在 0.9~ 1.0, 符合“中药注射剂指纹图谱试验研究的技术要求(暂行)的通知(2000)”。说明不同产地雪莲药材的化学组成一致性较好, 质量较稳定。

表 1 10 批次天山雪莲样品相似度结果(n= 3)

Table 1 Similarity of ten batches of *S. involucrata* samples (n= 3)

编号	来源	相似度	编号	来源	相似度
S1	阜康	0.949	S6	药检所	0.908
S2	巩留	0.930	S7	巴里坤	0.962
S3	哈密	0.998	S8	奇台	0.956
S4	乌鲁木齐	0.950	S9	和静	0.902
S5	焉耆	0.901	S10	新源	0.922

3 讨论

3.1 检测波长的选择: 采用 PDA 二级管阵列检测

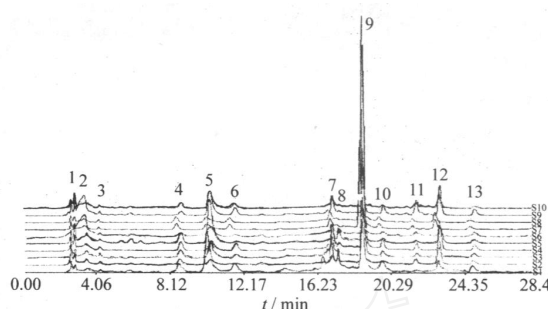
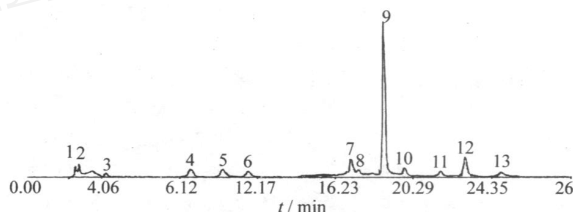


图 1 10 批次天山雪莲 HPLC 指纹图谱(编号见表 1)

Fig 1 HPLC Fingerprints of ten batches of *S. involucrata* (No. seen in Table 1)



5-绿原酸 6-紫丁香苷 9-芦丁 12-木犀草素 13-芹菜素
5-chlorogenic acid 6-syringin 9-rutin 12-luteolin
13-apigenin

图 2 天山雪莲对照指纹图谱

Fig 2 Reference fingerprint of *S. involucrata*

器对检测波长进行了考察, 分别比较波长 220~ 400 nm 的色谱图, 结果在 270 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收, 色谱信息最为丰富, 并且 5 种对照品在此波长下都有最大吸收峰, 因此选择 270 nm 作为检测波长。

3.2 流动相的选择: 天山雪莲含有多种化学成分, 如黄酮、生物碱、内酯、甾醇、多糖等活性物质, 成分较为复杂, 很难找到较理想的等度洗脱条件, 故采用梯度洗脱。黄酮类成分含有多个酚羟基, 呈弱酸性, 故使用酸性缓冲系统^[7]。实验中分别采用了乙腈-醋酸、甲醇-醋酸等不同浓度、不同比例的流动相进行梯度洗脱对比, 结果发现甲醇-0.8% 醋酸, 添加 0.2% 三乙胺防拖尾剂, 在线性梯度下各组分得到较好分离。另考虑到甲醇较乙腈毒性小且更经济, 故选用甲醇作为流动相。

3.3 参照峰的选择: 芦丁为天山雪莲的主要有效成分, 峰面积大, 出峰位置适中且稳定, 故选作参照峰。

3.4 从色谱图上比较, 虽各批次样品成分的量有差异, 相对峰面积 RSD 值差异较大, 但色谱图概貌一致, 说明药材的成分种类和相对质量分数较一致。本实验采用 RP-HPLC 法对天山雪莲指纹图谱进行了研究, 同时标示出了 13 个共有峰中 5 种主要有效成分的色谱峰, 方法稳定、可靠、重现性好, 弥补了《中

国药典》的不足,可以对天山雪莲药材进行快速、全面的质量评价。

参考文献:

[1] 陈发菊, 杨映根, 赵德修, 等. 我国雪莲植物的种类、生境分布及化学成分的研究进展 [J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 561-566.

[2] 李君山, 蔡少青. 雪莲花类药材的化学和药理研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 1998, 33(8): 449-452.

[3] 中国药典 [S]. Vol. 1. 2005.

[4] 薛秀峰, 张海茹, 潘丽娜, 等. 雪莲及其注射液的指纹图谱研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2005, 39(1): 72-74.

[5] 苗爱东, 孙殿甲, 彭燕, 等. HPLC 法建立新疆雪莲指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2003, 25(9): 691-693.

[6] 黄毅, 周茜, 阎明, 等. 天山雪莲不同部位总黄酮含量及高效液相指纹图谱分析 [J]. 中药材, 2005, 28(11): 980-982.

[7] 赵明波, 邓秀兰, 王亚玲, 等. 红花RP-HPLC 指纹图谱的建立及其质量研究 [J]. 药学学报, 2004, 39(3): 212-216.

黄檗种子及果肉中抑制物质活性的研究

张秋菊¹, 杨文娣², 刘雪莲¹, 杨晓翠^{1*}

(1. 通化师范学院 生物系, 吉林 通化 134002; 2. 通化师范学院 制药系, 吉林 通化 134002)

摘要:目的 探讨黄檗野生种群更新困难的原因,为其种子的萌发机制研究提供参考依据。方法 采用甲醇、乙醚、蒸馏水分别浸提黄檗果肉和种子,以白菜、小麦和黄檗作为受试植物,检测种子发芽及幼苗生长情况。结果 黄檗果肉和种子的浸提液分别降低了白菜、小麦和黄檗种子的发芽率,对幼苗生长也有不同程度的抑制作用。抑制作用随浓度的增高而增强,以乙醚提取液抑制作用最强,水提液抑制作用不明显。将黄檗种子分离为胚、胚乳和子叶3部分用蒸馏水提取,生物测定发现子叶水提液的抑制活性最强。结论 黄檗果肉和种子中均存在着活性较强的抑制物质,能够明显抑制自身及其他植物的生长,抑制物质主要存在于子叶中。

关键词: 黄檗; 种子; 果肉; 抑制活性

中图分类号: R 282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0108-04

Inhibitory activity of substance in seed and sarcocarp of *Phellodendron amurense*

ZHANG Qiu-ju¹, YANG Wen-di², LIU Xue-lian¹, YANG Xiaocui¹

(1. Department of Biology, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China; 2. Department of Pharmacy, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China)

Abstract: Objective Looking into the causes of self-regeneration obstacle of the wild *Phellodendron amurense* population in order to provide the reference for the study of the germination mechanism. **Methods** The germination and seedling growth were observed by taking cabbage, wheat, and *P. amurense* as the tested objects and the sarcocarp and seed of *P. amurense* were extracted by alcohol and ethyl ether. **Results** The extract in sarcocarp and seed of *P. amurense* could decrease the germination rate of cabbage, wheat, and *P. amurense* seed, also inhibit the seedling growth in different levels. The inhibitory effect was getting stronger and stronger following the concentration increased. The ethyl ether extract showed the best inhibitory effect, while the water extract had no significant effect. The embryo, endosperm, and cotyledon of *P. amurense* were extracted by distilled water, and among them the cotyledon had the strongest inhibition. **Conclusion** There are some substances with the better inhibitory effect in the sarcocarp and seed of *P. amurense*, which can inhibit the growth of itself and other plants significantly. The substance with the inhibitory effect exists mainly in cotyledon.

Key words: *Phellodendron amurense* Rupr.; seed; sarcocarp; inhibitory activity

黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 系芸香科落叶阔叶乔木,别名黄波罗,以去栓皮的树皮供药用,即为著名中药“黄柏”。黄檗含有多种生物碱,是

提取黄连素的主要原料。黄檗主要分布于东北三省、河北等地,因其市场用量大,价格上涨,造成疯狂采伐,以致野生资源急剧枯竭,目前已被列为国家三级

* 收稿日期: 2007-04-10

基金项目: 吉林省教育厅项目资助([2007]-399)

作者简介: 张秋菊(1968—),女,吉林省通化市人,副教授,硕士,主要从事植物生理及长白山药用植物驯化研究,已发表科研论文15篇,出版教材1部。 Tel: 013944595515 E-mail: zhangqiuju5515@163.com