

表 4 芍药种子胚乳、种皮乙醚萃取液纸色谱各区段对白菜种子萌发的影响

Table 4 Effect of residue in ether extract of *P. lactiflora* endosperm and testa in different sections of paper chromatography on seed germination and growth of young root of *B. pekinensis*

Rf 值	胚乳乙醚萃取液		种皮乙醚萃取液	
	发芽率为对照的百分率/%	幼根生长为对照的百分率/%	发芽率为对照的百分率/%	幼根生长为对照的百分率/%
0.1	85.71 c	60.26 d	68.75 d	43.18 e
0.2	71.43 e	79.27 a	75.00 c	45.45 d
0.3	114.29 a	77.27 b	50.00 f	50.30 c
0.4	71.43 e	46.28 f	87.50 b	59.09 a
0.5	78.57 d	35.24 g	56.25 e	53.51 b
0.6	85.71 c	59.86 d	93.75 a	59.80 a
0.7	78.57 d	32.73 h	37.50 g	34.75 h
0.8	78.57 d	58.64 e	56.25 e	40.61 f
0.9	64.29 f	30.77 i	87.50 b	35.91 g
1.0	107.14 b	73.18 c	87.50 b	34.07 h

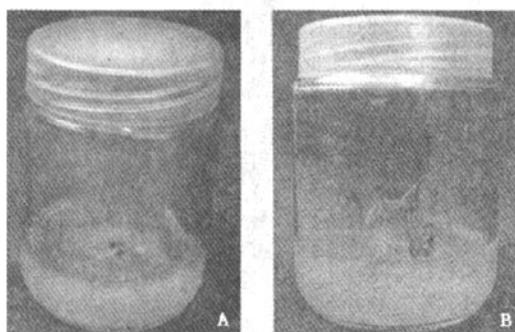


图 1 MS (A) 和 MS+GA<sub>3</sub>(B) 培养基中的胚

Fig. 1 Embryo grown on MS (A) and MS+GA<sub>3</sub> (B) culture medium

而附加 GA<sub>3</sub> 的培养基,可以打破胚芽的休眠。

### 3 讨论

在长期的系统演化过程中,芍药种子形成了较为特殊的休眠萌发特性,主要表现为秋季降温时下胚轴伸长,长出胚根,经过冬季低温后上胚轴休眠被破除,春季升温后胚芽出土萌发<sup>[5]</sup>。GA<sub>3</sub>可以代替低温打破芍药种子上胚轴休眠,说明芍药种子的激素休眠占主导地位。许多研究也指出,种子休眠的原因复杂,一般都是综合性的<sup>[6]</sup>。

本研究认为芍药种子胚乳乙醚萃取液在 Rf 值 0.5 区段对幼根生长抑制活性最强,对种子的萌发抑制作用较弱,与胚离体培养试验结果一致;去胚乳的胚在 10 d 左右就能长出胚根,而适当浓度的 GA<sub>3</sub> 在一定程度上能够代替低温打破上胚轴的休眠,说明在子叶或胚中存在抑制上胚轴生长的内源抑制物质。芍药种子胚乳中存在抑制胚根生长的物质,当胚根休眠打破后,子叶或胚中抑制胚芽萌动的激素占主导,各部位抑制作用大小为:胚乳>胚(子叶)>种皮。

### 参考文献:

- [1] 方前波. 中国芍药属芍药组的分类、分布与药用 [J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18(3): 28-30.
- [2] 陶新宇, 杨海兰, 李莉. 芍药种子萌发特性的研究 [J]. 赤峰学院学报, 2005, 21(6): 13-19.
- [3] 金鹰, 丁玲, 何小弟, 等. 芍药种子露地播种和低温贮藏过程中内源激素含量的变化 [J]. 南京林业大学学报, 2006, 29(6): 45-48.
- [4] 赵敏, 王炎, 张伟. 北五味子种子内源抑制物质特性的初步研究 [J]. 东北林业大学学报, 1999, 27(5): 62-64.
- [5] 李嘉珏. 中国牡丹与芍药 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
- [6] 唐安军, 龙春林, 刀志灵. 种子休眠机理研究进展 [J]. 云南植物研究, 2004, 26(3): 241-251.

## 关木通 HPLC-DAD-ESI/MS 指纹图谱研究

樊夏雷<sup>1,2</sup>, 丁一冰<sup>3</sup>, 冯有龙<sup>2</sup>, 尚 姝<sup>2</sup>, 刘文英<sup>1\*</sup>

(1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009; 2. 江苏省药品检验所, 江苏 南京 210008; 3. 南京大学医学院, 江苏 南京 210008)

**摘要:**目的 建立关木通 HPLC-DAD-ESI/MS 指纹图谱分析方法,可用于关木通质量的评价,为进一步开展关木通的肾毒性代谢研究提供药材质量依据。方法 用 75% 甲醇对不同产地的关木通样品进行提取,经 HPLC-DAD-ESI/MS 联用技术分析,建立指纹图谱,确定共有指纹峰,并选用两种相似度计算方法进行比较。结果 关木通中含有 30 个特征指标成分,初步建立了 30 个共有峰为特征指纹信息的 HPLC-DAD-ESI/MS 指纹图谱。24 批被测样品的指纹图谱整体相似度在 0.871~0.998,各产地关木通之间相似性良好。结论 方法准确可靠,重现性好,可应用于关木通的品质评价和质量控制。

收稿日期:2008-06-10

作者简介:樊夏雷(1965—),男,浙江绍兴人,在读博士,主要研究方向为色谱分析、质量标准与质量控制方法研究。

E-mail: fanxialei@sohu.com Tel: 13805165256 (025)83313672

\* 通讯作者 刘文英 Tel: (025)83271251 E-mail: lwcpu@126.com

关键词:关木通;指纹图谱;HPLC-DAD-ESI/MS

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)12-1883-05

### HPLC-DAD-ESI/MS Fingerprint of *Aristolochia manshuriensis*

FAN Xia-lei<sup>1,2</sup>, DING Yi-bing<sup>3</sup>, FENG You-long<sup>2</sup>, SHANG Shu<sup>2</sup>, LIU Wen-ying<sup>1</sup>

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008, China; 3. Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

**Abstract; Objective** To establish the analytical method for fingerprint of *Aristolochia manshuriensis* by HPLC-DAD-ESI/MS, which can be used as the basis for quality control of the drug and for the further studies on kidney toxicity metabolite. **Methods** Samples *A. manshuriensis* from different habitats were extracted by 75% methanol and analyzed by HPLC-DAD-ESI/MS, whose chromatographic fingerprints were established. Two ways to calculate the similarity were selected to compare the results by determining the common peaks. **Results** There were 30 main characteristic components in *A. manshuriensis*. The HPLC-DAD-ESI/MS fingerprint of the 30 common peaks was established preliminarily. The samples of *A. manshuriensis* from different habitats was found having a good similarity, and the range of similarities for 24 batches of *A. manshuriensis* were 0.871—0.998. **Conclusion** The method is reliable, accurate, and of good stability, and can be used for the quality control and variety identification of *A. manshuriensis*.

**Key words:** *Aristolochia manshuriensis* Kom.; fingerprint; HPLC-DAD-ESI/MS

近年来有关马兜铃属植物引起肾毒性<sup>[1]</sup>的临床报道日益增多,国外一些国家禁用了该属植物,美国FDA对于含有或可能混淆的品种予以禁止应用和进口。其中包括关木通、马兜铃、青木香、天仙藤和广防己药材品种及相关中成药。我国也采取了相应的措施,对有关品种进行了控制。

马兜铃事件对我国的中药现代化和国际化已经产生了深远影响,值得国内学者的关心、分析和研讨。由于大部分中药应用过程中缺少明确的体内过程及量效关系的理论依据,现有的研究结果尚难以判定关木通等含马兜铃酸中药的安全剂量和使用期限。研究中发现对于不同产地关木通,分析研究得也较少,其相应的质量研究更少。按照中医药学术特色的思路对药材质量标准进行研究是十分必要的,本实验以LC-DAD-ESI/MS为检测手段,建立了关木通的LC-UV和LC-ESI/MS指纹图谱,对24批不同产地关木通进行了相似度比较,同时比较了指纹图谱相似度的不同计算方法,为关木通的分析鉴定提供了新的方法和依据,为关木通肾毒性的代谢研究提供基础实验数据。

#### 1 仪器与试剂

1.1 仪器:HP1100 高效液相色谱仪,Agilent 1100 Series LC/MSD Trap。

1.2 试剂:乙腈为色谱纯;甲醇、甲酸、醋酸铵为分析纯;关木通主要产自东北,有专人到主产区收集,经江苏省药品检验所胡浩彬主任药师鉴定均为关木通 *Aristolochia manshuriensis* Kom. 的干燥藤茎(表1)。

表 1 关木通样品来源

Table 1 Origin of *A. manshuriensis* samples

药材编号	产地	药材编号	产地
1	延吉	13	东北(具体产地不明)
2	延吉	14	东北(具体产地不明)
3	图门	15	东北(具体产地不明)
4	图门	16	东北(具体产地不明)
5	图门	17	东北(具体产地不明)
6	集安	18	东北(具体产地不明)
7	集安	19	东北(具体产地不明)
8	集安	20	延吉
9	长白	21	延吉
10	长白	22	长白
11	长白	23	图门
12	长白	24	集安

#### 2 方法与结果

##### 2.1 分析条件

2.1.1 液相色谱条件:色谱柱为 Phenomenex Gemini C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm),流动相:水(0.1% 甲酸-5 mmol/L 醋酸铵)(A)-乙腈(0.1% 甲酸)(B),梯度洗脱条件:0 min(7% B)→20 min(15% B)→65 min(40% B)→80 min(100% B)→100 min(100% B),体积流量:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:40 ℃;柱后分流0.2 mL/min 进质谱仪。

2.1.2 质谱条件:扫描范围  $m/z$  100~1 000,干燥气体积流量:10 L/min,干燥气温度:350 ℃,雾化室压:2.758×10<sup>5</sup> Pa,毛细管电压:4 000 V,传输电压:70 V,进样量:20 μL。

2.2 供试品溶液制备:分别取 24 批关木通样品,粉碎,精密称定粉末(粗粉 0.25 g 与细粉 0.25 g),

置具塞锥形瓶中,加入 75% 甲醇约 50 mL,水浴上加热回流提取 2 h,取出,冷却至室温,滤至 50 mL 量瓶中,以少许甲醇洗涤残渣,洗涤液滤入同一量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过,续滤液作为供试品溶液。

2.3 内标溶液的制备:取萘普生对照品适量,用甲醇溶解,制成 10 μg/mL 萘普生的溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验:取同一供试品溶液 6 份,(关木通 13 号样品),分别于 0、4、8、12、24 h 进样检测,各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 3%,相对峰面积比值的 RSD 均小于 6%,表明供试品液在 24 h 内稳定。

2.4.2 精密密度试验:取供试品溶液(关木通 13 号样品)连续进样 5 次,各共有峰的相对保留时间

RSD 均小于 3%,相对峰面积比值的 RSD 均小于 6%,表明仪器状态稳定,色谱与质谱系统稳定。

2.4.3 重现性试验:取同一批次关木通 6 份(关木通 13 号样品),分别提取后,进样分析,各共有峰的相对保留时间 RSD 均小于 3%,相对峰面积比值的 RSD 均小于 6%,表明提取方法稳定,重现性良好。

2.5 HPLC-MS 指纹图谱的建立

2.5.1 指纹图谱的测定:按选定的 HPLC-MS 条件对关木通进行分析,测得所有供试品的 HPLC-MS 总离子流图;再对总离子流图中的各峰经质谱扫描后得质谱图。根据总离子流图所给出的峰数,经基峰图与提取峰图处理,得出各峰的保留时间与峰面积等相关参数,进行分析、比较,制定 HPLC-MS 指纹图谱,除内标峰(S)外共得 30 个共有峰(图 1)。

2.5.2 各地关木通药材相似度计算<sup>[2]</sup>:相似度是评

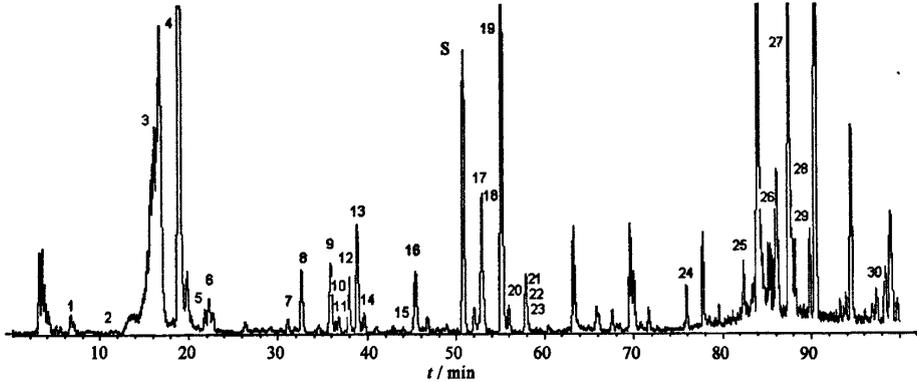


图 1 关木通的 HPLC-ESI/MS 指纹图谱

Fig. 1 HPLC-ESI/MS Fingerprint of *A. manshuriensis*

价中药指纹图谱的一个重要参数,是根据指纹图谱的整体相似程度来计算重要化学组成的整体波动程度,据此分析中药质量的稳定性。本实验采用夹角余弦和相关系数两个统计量为测试方法,其几何意义是在由  $n$  个特征值组成的  $n$  维向量空间中,表征两组变量定义的两个向量之间的夹角余弦值<sup>[3]</sup>。

$$\text{夹角余弦法计算公式: } \text{Sim}(d_j, q) = \frac{\vec{d}_j \cdot \vec{q}}{|\vec{d}_j| \times |\vec{q}|} =$$

$$\frac{\sum_{i=1}^n w_{i,j} \times w_{i,q}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n w_{i,j}^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^n w_{i,q}^2}}$$

$W_{i,j}$  为样本特征值,  $W_{i,q}$  为参照物特征值。

对 24 批不同产地的关木通样品进行了相似度计算,见表 2。各产地相似度除 16 号外均在 0.900 以上,表明各产地关木通之间的相似性良好。

2.6 HPLC-UV 指纹图谱的建立

2.6.1 HPLC-UV 指纹图谱的测定:按选定的液相

表 2 24 批关木通 LC-MS 指纹图谱相似度

Table 2 LC-MS Fingerprint similarity of 24 batches of *A. manshuriensis*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
1	0.988	9	0.995	17	0.978
2	0.982	10	0.997	18	0.987
3	0.985	11	0.997	19	0.996
4	0.998	12	0.996	20	0.987
5	0.996	13	0.995	21	0.987
6	0.998	14	0.974	22	0.987
7	0.987	15	0.918	23	0.998
8	0.990	16	0.871	24	0.998

条件,由 DAD 检测器采集 254 nm 处紫外吸光度,对关木通样品进行分析,记录 100 min 的色谱图。

2.6.2 相似度评价:采用“中药色谱指纹图谱相似度软件 2004A 版”评价系统,对 24 批不同来源的关木通 HPLC 指纹图谱检测结果进行数据处理,生成关木通共有模式的对照 HPLC 指纹图谱(图 2 中

R), 并通过“中药色谱指纹图谱相似度软件 2004A 版”评价系统, 分析对比了 24 个样品的 HPLC 指纹

图谱(图 2 中 S1~24) 与关木通共有模式的对照 HPLC 指纹图谱的相似度, 结果见表 3。

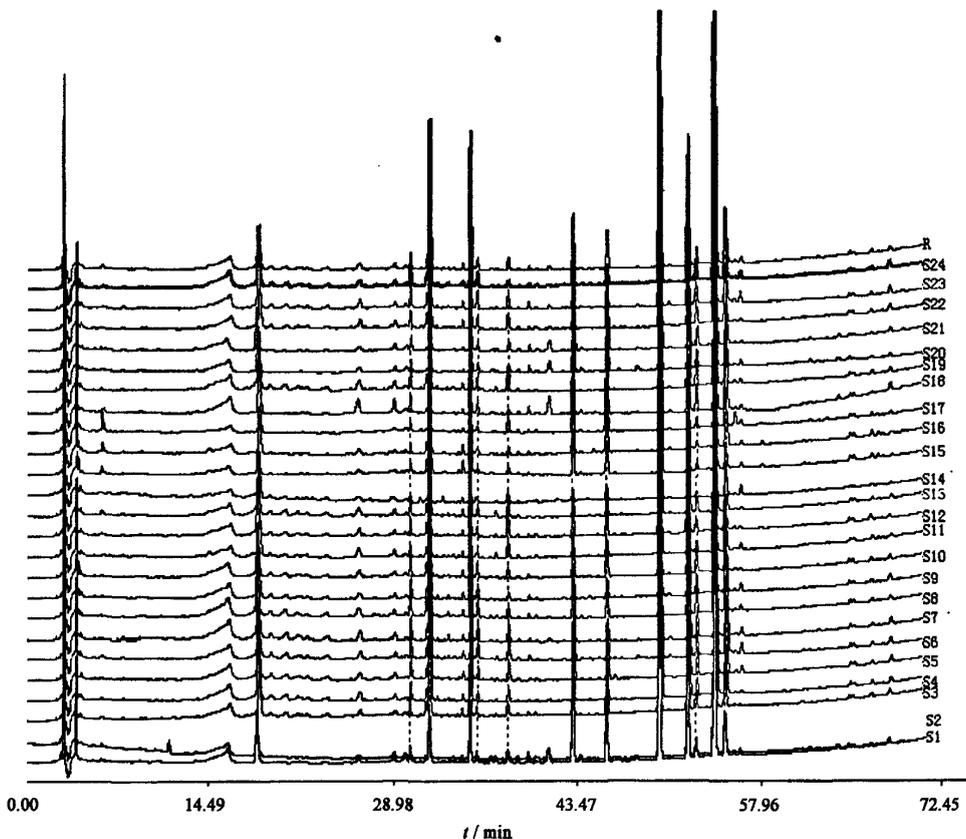


图 2 关木通对照指纹图谱和 24 批样品匹配色谱图

Fig. 2 Controlled fingerprint of *A. manshuriensis* and matched chromatograms of 24 batches of *A. manshuriensis*

表 3 24 批关木通 HPLC-UV 指纹图谱相似度

Table 3 HPLC-UV Fingerprint similarity of 24 batches of *A. manshuriensis*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
1	0.976	9	0.993	17	0.899
2	0.973	10	0.980	18	0.983
3	0.991	11	0.987	19	0.987
4	0.990	12	0.989	20	0.975
5	0.992	13	0.993	21	0.975
6	0.992	14	0.902	22	0.990
7	0.985	15	0.931	23	0.993
8	0.970	16	0.910	24	0.989

### 3 讨论

3.1 本试验分别考察了超声、水浴和加热回流的提取方法, 发现加热回流得到的峰数较多, 另外又比较了不同提取溶剂如水、三氯甲烷、乙醇、甲醇、醋酸乙酯、75% 甲醇和 75% 乙醇, 结果表明 75% 甲醇提取效果较好。综合考虑最终确定提取条件为 75% 甲醇, 水浴加热回流提取 2 h。

3.2 在色谱条件优化中试验了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液等多种流动相体系, 实验表明甲醇-水洗脱能力较差, 分离效果不好; 而乙腈-水体系的柱效高, 加入 0.1% 甲酸后, 采用梯度洗脱程序, 被测物质分离度、峰形都较为理想。

3.3 在色谱方法建立初期, 本试验选用并比较了不同品牌和型号的色谱柱, 如 Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm) 和 HP ODS Hypersil (100 mm × 2.1 mm) 等, 结果表明 Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm) 柱在关木通化学成分的梯度洗脱中, 具有柱效高、分离度好及稳定耐用的特点。

3.4 采用了 HPLC-DAD-MS 联用技术, 能够同时获得待测成分的紫外光谱特征和质谱特征, 增强了分析检测的选择性和专属性。在此基础上建立了关木通的紫外和质谱指纹图谱, 分别得出了相似度, 结果表明两者的相似度评价基本一致。研究结果同时

表明,虽然 LC-MS 等方法得到的测定结果不能用于“中药色谱指纹图谱相似度软件 2004A,B 版”(原始数据文件的输出格式必须为 .aia),但通过夹角余弦等计算方法可得到指纹图谱相似度,为中药材提供质量上的技术监督手段。

3.5 本试验中选用紫外检测器(DAD)进行色谱分析时,考察了 254 和 316 nm 波长的指纹图谱和相似度评价,结果显示,316 nm 波长处得到的结果与 254 nm 和 HPLC-MS 的结论差别较大,相似度在 0.777~0.980。分析原因在 316 nm 测定时色谱

峰多,且基线不稳,噪音较大,说明用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版软件对导入的图谱条件是比较苛刻的,否则会影响到后来相似的计算结果,建议选用 LC-MS 等专属性好的方法进行分析,克服紫外检测法的缺点。

参考文献:

[1] 梁爱华,丁晓霞,刘保研.含马兜铃酸中药的肾脏毒性研究概况[J].中国中药杂志,2004,29(1):10-13.  
 [2] 苗爱东,孙殿甲.Excel 2002 在中药指纹图谱相似度计算中的应用[J].药学进展,2003,27(1):51-54.  
 [3] 田润涛,谢培山.色谱指纹图谱相似度评价的规范化研究(一)[J].中药新药与临床药理,2006,17(1):40-42.

## 鲜品肉苁蓉渣和汁有效成分的比较

王丽楠<sup>1</sup>,陈君<sup>1</sup>,杨美华<sup>1\*</sup>,陈士林<sup>1</sup>,刘同宁<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京 100193;2. 宁夏永宁县肉苁蓉种植场,宁夏永宁 750100)

**摘要:**目的 鲜品肉苁蓉渣和汁有效成分比较及其药用研究初探。方法 采用硫酸-苯酚法测定肉苁蓉多糖的量;采用大孔树脂-紫外分光光度法测定了苯乙醇苷的量;采用《中国药典》肉苁蓉项下 HPLC 方法,测定了松果菊苷和毛蕊花糖苷的量。结果 以肉苁蓉多糖、苯乙醇总苷、松果菊苷和毛蕊花糖苷主要有效成分的量综合评价指标,鲜品肉苁蓉渣中除多糖的量与汁中相差不明显,其余有效成分的量均明显高于其汁,最大相差依次为 8、785、230 倍。鲜品肉苁蓉渣部分经冷冻后多糖的量显著升高,苯乙醇总苷的量明显下降。结论 鲜品肉苁蓉渣部分与其汁相比药用性更高,为鲜品肉苁蓉科学用药及其保健食品开发提供依据。同时,鲜品肉苁蓉渣部分经冷冻后有效成分的量明显改变,为鲜品肉苁蓉的储存提供了参考。

**关键词:**肉苁蓉;多糖;苯乙醇总苷;松果菊苷;毛蕊花糖苷

**中图分类号:**R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)12-1887-03

肉苁蓉 *Cistanche desertiola* Y. C. Ma 为列当科多年生寄生植物,为补肾壮阳、润肠通便之要药。始载于《神农本草经》,列为上品,主治阳痿、不孕、腰膝酸软、筋骨无力、肠燥便秘等,是临床常用中药之一。因其生长在沙漠环境中,又具有沙漠“人参”的美誉<sup>[1]</sup>。由于过度开发利用,野生资源濒临枯竭。肉苁蓉及其寄主固沙植物梭梭已被列为国家二级保护植物,并收入《国际野生植物保护名录》<sup>[2]</sup>。肉苁蓉中主要活性成分是苯乙醇苷类化合物、肉苁蓉多糖等,其苯乙醇苷的主要作用是调节内分泌,促进代谢和强壮作用以及清除自由基和抗衰老作用;肉苁蓉多糖可以增强机体的免疫功能<sup>[3,4]</sup>。

本实验首次以肉苁蓉多糖、苯乙醇总苷、松果菊苷和毛蕊花糖苷主要活性成分的量综合评价指标,比较鲜品肉苁蓉渣和汁部分的药用性。同时,考

察了鲜品肉苁蓉渣部分经冷冻后有效成分量的变化,预期为鲜品肉苁蓉的储存及鲜品药用提供参考。

### 1 仪器与试剂

UV-可视分光光度计(岛津 2550 型)。电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9143BS-Ⅲ,无锡市苏嘉实验设备厂),TP150 超声清洗机(功率 150 W,频率 40 kHz,北京天鹏新技术有限公司)。

D-101-I 型大孔树脂购于天津市海光化工有限公司,松果菊苷对照品(批号:111670-200502,供定量测定用)、毛蕊花糖苷对照品(批号:111530-200404,供量的测定用)均购于中国药品生物制品检定所。葡萄糖(分析纯)购于广州化学试剂厂。苯酚、硫酸均为分析纯(北京化学试剂二厂)。甲醇、乙腈均为色谱纯(Fisher Scientific 公司)。

苯酚试剂:取 AR 级苯酚 200 g 加铝片 0.2 g

收稿日期:2008-05-10

基金项目:宁夏自治区科技攻关计划项目(05GG-10807)

\* 通讯作者 杨美华,女,研究员,博士,研究方向为中药质量分析及新药研究开发。

Tel: (010) 62899730 (O) 13041071999 E-mail: yangmeihua15@hotmail.com