

度是影响 P_n 的主要环境因子。黄芩植株出现光合“午休”现象时,光照强度变化不是很大,光强可能不是导致光合速率中午降低的直接原因,但它是引起日气温和湿度等变化的主要因素,从而间接地影响光合作用。

3.4 黄芩 G_s 与 P_n 的关系:植物的光合作用受气孔调节与非气孔调节的共同影响,但在不同的植物中其作用不等^[5]。本研究表明,黄芩叶片气孔阻力在一天中呈现规律性变化,并且同步同向对应着 P_n 的日变化,两者之间呈极显著正相关,表明黄芩植株 P_n 与气孔调节是密切相关的。

3.5 黄芩植株 P_n 与生态因子的灰色关联分析:本研究表明,PPFD、空气湿度是影响黄芩植株 P_n 的主要生态因子。由于 PPFD 依赖于自然条件的变

化,不易控制,而空气湿度则可以通过技术措施加以改变。因此生产上在 7~8 月高温干旱季节应加强黄芩田间水分管理,合理灌溉,增加土壤水分,提高空气相对湿度,以提高叶片光合能力,增加光合作用日同化量。同时在有条件地区推广喷灌技术,创造人工小气候,从而减少或避免“午休”现象的出现,为药材产量的提高奠定基础。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 山东农业大学. 植物生理实验技术[M]. 泰安: 山东农业大学出版社, 2000.
- [3] 阎秀峰, 孙国荣, 李敬兰, 等. 羊草和星星草光合蒸腾日变化的比较研究[J]. 植物研究, 1994, 14(3): 287-291.
- [4] Farquhar S. Stomatal conductance and photosynthesis[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1982, 33: 317-345.
- [5] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1998.

广东土牛膝 HPLC 指纹图谱的研究

张 军¹, 张晓琦², 汤 毅^{3*}, 林雪颖¹, 邓鲲鹏¹

(1. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广东 广州 510405; 2. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632;
3. 广州中大创新公司, 广东 广州 510070)

摘要:目的 采用 HPLC 法对广东土牛膝进行指纹图谱研究, 为广东土牛膝药材质量控制提供依据。方法 实验采用 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水为流动相梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25℃, 检测波长 230 nm。结果 建立广东土牛膝药材 HPLC 指纹图谱, 确定 13 个共有峰, 确定其相对保留时间和相对峰面积。结论 在选定的条件下所建立的指纹图谱为广东土牛膝药材质量控制提供依据。

关键词: 广东土牛膝; HPLC 指纹图谱; 泽兰素

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0964-04

Fingerprint of *Eupatorium chinense* by HPLC

ZHANG Jun¹, ZHANG Xiao-qi², TANG Yi³, LIN Xue-ying¹, DENG Kun-peng¹

(1. New Drug R&D Center, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
3. Guangzhou Zhongda Innovation Company, Guangzhou 510070, China)

Abstract : Objective To establish the HPLC fingerprint of *Eupatorium chinense*. **Methods** The analysis was performed on a Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-water as mobile phase in a gradient mode. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 25℃ and the detection wavelength was 230 nm. **Results** The fingerprint of *E. chinense* with common 13 peaks was established. The relative retention time and the ranges of relative area of the common peaks were determined. **Conclusion** The established fingerprint could be used for the quality control of *E. chinense*.

Key words : *Eupatorium chinense* L. ; HPLC fingerprint ; euparin

* 收稿日期: 2008-09-18

作者简介: 张 军(1971—), 男, 山东淄博人, 副研究员、硕士, 研究方向为中药新药药学研究。

Tel.: (020) 39358519 E-mail: zhjxsh@yahoo.com.cn

*通讯作者 汤 毅 Tel: 13352816718 E-mail: tigertang@21cn.com

广东土牛膝为菊科植物华泽兰 *Eupatorium chinense* L. 的干燥根,具有清热解毒、凉血利咽的功效,收载于《广东省中药材标准》^[1],是广东地区常用的喉科要药。广东土牛膝含黄酮苷、氨基酸、有机酸、酚类、生物碱、挥发油^[2]。现代药理研究表明,广东土牛膝具有抗菌^[3,4]、中和毒素和抗炎镇痛作用^[5]。本品的质量标准研究仅见性状鉴别、显微鉴别及 TLC 鉴别,本实验以泽兰素为对照品,建立广东土牛膝 HPLC 指纹图谱,为广东土牛膝的质量控制提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器:Dionex Summit 高效液相色谱仪;电子分析天平(Shimadzu Libror AEG-220; Sartorius CP225D);KQ2200 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 试药:甲醇、乙腈均为色谱纯,液相用水为高纯水。其余试剂为分析纯。泽兰素对照品(质量分数>98%,由暨南大学中药及天然药物研究所提供)。广东土牛膝(产地:广东、广西),来源见表1,经广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室黄海波教授鉴定,均为菊科植物华泽兰 *E. chinense* L. 的干燥根及根茎。

表1 广东土牛膝药材样品产地

Table 1 Habitats of *E. chinense* samples

批 次	产 地	批 次	产 地
1	广东从化	6	广东清远
2	广东清远	7	广东清远
3	广西来宾	8	广东清远
4	广东清远	9	广东清远
5	广东韶关	10	广东从化

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验:色谱柱为 Kromasil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);乙腈-水为流动相梯度洗脱:0~15 min,乙腈 10%递升至 36%,15~20 min,乙腈 36%递升至 38%,20~25 min,乙腈 38%等度,25~70 min,乙腈 38%递升至 100%;体积流量 1.0 mL/min;柱温:25℃;检测波长:230 nm,理论板数按泽兰素计算应不低于3 000。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取泽兰素对照品适量,加甲醇制成质量浓度为 0.2 mg/mL 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备:取本品粉末(过 20 目筛)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 100 mL,称定质量,回流提取 1 h,冷却至室温,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密吸取续滤液 50 mL,回收甲醇,残渣加甲醇使溶解并转

移至 5 mL 量瓶中,定容至刻度,摇匀,再以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.4 测定方法:精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定记录广东土牛膝色谱图,以供试品溶液中泽兰素为参照峰(12 号峰)分别计算各峰的相对保留时间和相对峰面积的比值,采用国家药典委员会相似度对比软件 2004A 版进行相似度计算。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样 5 次,以上述色谱条件测定其 HPLC 图谱。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算相似度均在 0.99 以上。各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 小于 2%,相对峰面积的 RSD 小于 2%,符合指纹图谱研究技术的要求^[6]。

2.5.2 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别在 0、4、8、12、24 h 进样测定,各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 小于 2%,相对峰面积的 RSD 小于 4%,符合指纹图谱研究技术的要求^[6],表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.3 重现性试验:分别精密称取同一批药材粉末(过 20 目筛)共 5 份,按照 2.3 项制备供试品溶液,以上述色谱条件测定其 HPLC 图谱。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算相似度均在 0.99 以上。各主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 小于 2%;相对峰面积的 RSD 小于 3%,符合指纹图谱研究技术的要求^[6]。

2.6 指纹图谱各项技术参数:按上述方法测定 10 批广东土牛膝药材的指纹图谱与对照品的 HPLC 图谱,结果见图 1、2。共有峰相对保留时间和相对峰面积见表 2、3。

2.7 指纹图谱相似度计算:将 10 批广东土牛膝样品指纹图谱的 AIA 数据文件导入 2004 年国家药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)》,计算各样品指纹图谱与生成的对照图谱 R 的相似度,结果见表 4。经鉴定,第 1 批药材为菊科植物华泽兰的干燥根及根茎。与其他批次药材相比较,在相同的色谱条件下,指纹共有峰的相对保留时间一致。因第 1 批药材 1[#]、5[#]、11[#] 相对峰面积较大,导致了相似度偏低。这种成分之间量的比例差异可能是因药材的生长环境,采收加工,储存等各种因素的影响,但现有的研究基础无法确定其具体因素。

2.8 广东土牛膝根与茎的指纹图谱比较:依据所设

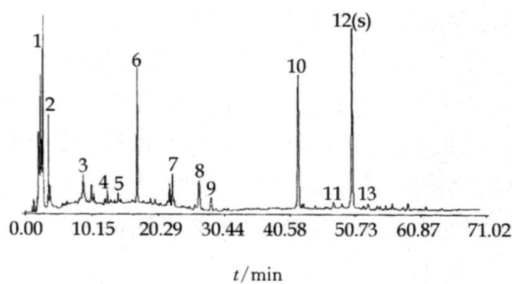


图 1 土牛膝的对照图谱

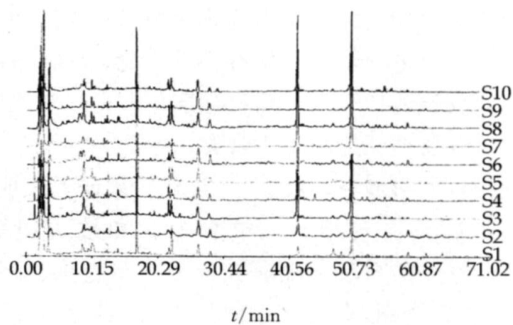
Fig 1 Reference fingerprint of *E. chinense*

图 2 10 批广东土牛膝指纹图谱

Fig 2 HPLC Fingerprint for ten batches of *E. chinense*

表 2 广东土牛膝指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 2 Relative retention time of HPLC fingerprint common peaks

峰号	相对保留时间										RSD/ %
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]	9 [#]	10 [#]	
1	0.047	0.047	0.046	0.047	0.046	0.046	0.047	0.046	0.046	0.048	1.201
2	0.081	0.076	0.076	0.076	0.077	0.076	0.076	0.076	0.076	0.074	2.082
3	0.174	0.178	0.177	0.177	0.179	0.177	0.177	0.177	0.178	0.173	0.938
4	0.249	0.248	0.249	0.249	0.252	0.250	0.249	0.249	0.249	0.250	0.363
5	0.340	0.339	0.339	0.339	0.342	0.340	0.339	0.340	0.340	0.340	0.205
6	0.380	0.379	0.380	0.380	0.381	0.380	0.380	0.380	0.380	0.380	0.144
7	0.438	0.437	0.437	0.437	0.439	0.438	0.438	0.438	0.438	0.438	0.135
8	0.529	0.529	0.527	0.528	0.529	0.528	0.528	0.528	0.527	0.528	0.118
9	0.565	0.565	0.563	0.564	0.565	0.564	0.564	0.564	0.563	0.564	0.138
10	0.834	0.834	0.834	0.834	0.834	0.834	0.834	0.834	0.833	0.834	0.027
11	0.943	0.943	0.943	0.943	0.944	0.944	0.942	0.943	0.944	0.943	0.046
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
13	1.050	1.049	1.050	1.048	1.050	1.049	1.048	1.049	1.050	1.048	0.074

表 3 广东土牛膝指纹图谱共有峰相对峰面积

Table 3 Relative peak area of HPLC fingerprint common peaks

峰号	相对峰面积										
	1 [#]	2 [#]	3 [#]	4 [#]	5 [#]	6 [#]	7 [#]	8 [#]	9 [#]	10 [#]	
1	2.722	0.945	0.745	0.244	1.429	0.252	0.591	0.449	0.524	0.433	
2	0.075	0.101	0.026	0.027	0.067	0.047	0.080	0.042	0.020	0.126	
3	0.444	0.318	0.498	0.121	0.819	0.166	0.068	0.147	0.428	0.126	
4	0.124	0.132	0.066	0.026	0.136	0.060	0.026	0.030	0.068	0.035	
5	2.302	1.661	0.776	0.155	1.861	0.458	0.056	0.228	0.616	0.471	
6	0.092	0.068	0.050	0.016	0.096	0.029	0.012	0.019	0.041	0.032	
7	0.232	0.143	0.216	0.044	0.495	0.095	0.023	0.119	0.030	0.094	
8	0.663	0.720	0.314	0.093	0.822	0.256	0.032	0.149	0.413	0.188	
9	0.276	0.373	0.116	0.047	0.277	0.129	0.016	0.058	0.158	0.073	
10	0.552	0.858	0.879	0.785	0.622	0.889	0.825	0.706	0.309	0.792	
11	0.600	0.104	0.077	0.017	0.218	0.046	0.014	0.027	0.043	0.043	
12	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	
13	0.139	0.166	0.051	0.022	0.142	0.071	0.012	0.029	0.049	0.041	

表 4 相似度分析结果

Table 4 Analytic result of similarity

编号	相似度	编号	相似度
1	0.534	6	0.971
2	0.873	7	0.919
3	0.973	8	0.968
4	0.933	9	0.862
5	0.840	10	0.956

色谱条件,对 2 批广东土牛膝的茎进行 HPLC 测定,与广东土牛膝对照图谱比较,相似度分别为

0.327 和 0.390。见图 3。

3 讨论

3.1 检测波长的确定:在对供试品溶液进行指纹图谱条件摸索时,考察了 203、230、240、260 nm 检测波长下的色谱图。其中 230 nm 波长下检测色谱峰较多,因此确定测定波长为 230 nm。

3.2 色谱条件的选择:实验过程中选择了多种流动相系统甲醇-水、甲醇-0.4%磷酸水溶液、乙腈-水、乙

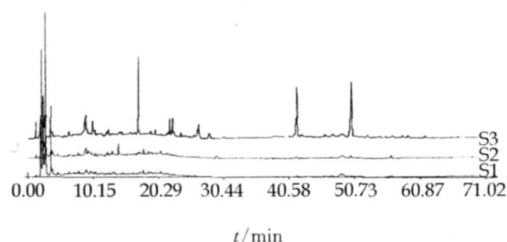


图 3 土牛膝根及茎 HPLC 图谱(S1,S2 为茎,S3 为根)

Fig 3 HPLC Chromatogram for root and stem

of *E. chinense* (S1 and S2-stem; S3-root)

腈-0.3%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液等度和梯度洗脱方式,并对梯度洗脱程序进行优化,结果表明以乙腈-水系统为最佳。各色谱峰分离度较好,峰型尖锐,保留时间适中。

3.3 供试品溶液制备条件的选择:考察了回流、超声提取方式及甲醇、95%乙醇、70%乙醇提取溶剂。结果表明,回流提取方式得到的色谱峰峰面积大,峰数多,优于超声提取。甲醇提取的色谱峰最多,提取完全。故供试品溶液制备采用甲醇回流提取 1 h。

3.4 指纹图谱的建立:通过指纹图谱整体图形、共有特征峰、相对保留时间等参数可对药材进行鉴定,

通过各共有峰相对峰面积可对药材的质量进行评价。10 批广东土牛膝药材指纹图谱中,13 个共有峰相对保留时间符合程度较好,说明不同来源的广东土牛膝药材中组分有其一致性。但是 10 批药材共有峰相对峰面积有一定的差异,说明 10 批药材的质量是有差异的。

3.5 广东土牛膝根茎指纹图谱比较:在收集样品的过程中,发现市售部分药材含有茎,个别甚至以茎为主,因此本实验对广东土牛膝的茎进行 HPLC 测定。结果表明,与广东土牛膝对照图谱差异显著,说明广东土牛膝根和茎成分差异较大。

参考文献:

- [1] 广东省中药材标准[S]. 2004.
- [2] 张丹雁,王宏,赖秀珍. 广东土牛膝化学成分的研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1999, 39(4): 232.
- [3] 曾品会. 土牛膝根对白喉杆菌的抑制和对动物实验的观察[J]. 广东中医, 1959(9): 345-347.
- [4] 陈国清,邱小梅,郑鸣金,等. 14 种草药对白喉菌的抗生力中及其对白喉毒素作用的观察[J]. 福建中医药, 1964(9): 137-147.
- [5] 刘晓燕,曾晓春,江剑东,等. 广东土牛膝抗炎镇痛的研究[J]. 中医药学刊, 2004, 22(9): 635-636.
- [6] 中药注射剂色谱指纹图谱研究技术要求[S]. 2000.

(上接第 914 页)

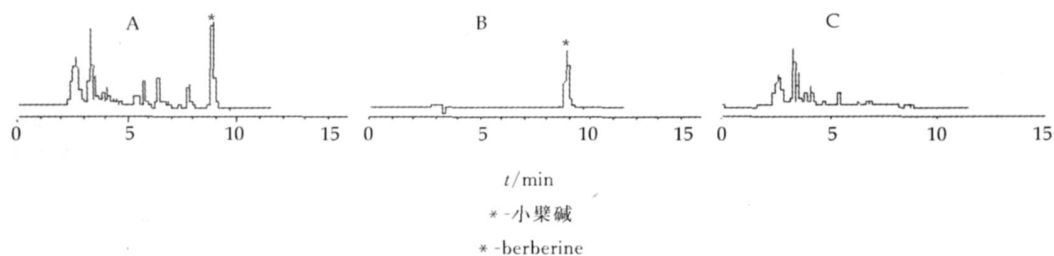


图 1 黄连明目丸(A)、盐酸小檗碱对照品(B)和缺黄连的阴性样品(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of Huanglian Mingmu Pills (A), berberine hydrochloride reference substance (B), and negative sample (C)

6 份,分别精密称定,制备供试品溶液,进样测定盐酸小檗碱峰面积,计算得盐酸小檗碱的质量分数为 1.313 mg/g,其 RSD 为 1.12%。

2.9 回收率试验:取批号 080801 黄连明目丸样品 5 份,每份 0.25 g,精密称定,加入 0.277 4 mg 盐酸小檗碱对照品,制备供试品溶液,进样测定,计算,结果平均回收率为 100.1%,RSD 为 0.8%。

2.10 样品测定:取 3 批黄连明目丸样品,制备供试品溶液。分别精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液与供试品溶液各 5 μ L 注入液相色谱仪,测定,计算,结果见表 1。

3 讨论

采用加盐酸-甲醇(1:100)直接超声处理 15、

表 1 黄连明目丸中盐酸小檗碱的测定结果 (n=3)

Table 1 Determination of berberine hydrochloride in Huanglian Mingmu Pills (n=3)

批号	盐酸小檗碱/(mg·g ⁻¹)
080801	1.31
080802	1.38
080803	1.39

30 min、预浸 30 min 后超声 30 min、预浸 60 min 后超声 60 min,2 倍溶剂预浸 60 min 后超声 30 min 方法提取对盐酸小檗碱的影响,结果显示上述方法测定结果无明显差异,为保证提取完全,选择超声提取 30 min。

参考文献:

- [1] 丘文珍. HPLC 法测定障眼片中盐酸小檗碱[J]. 中草药, 2007, 38(7): 1030-1031.