河北道地药材连翘的高效液相色谱指纹图谱研究

崔 洋,王 巧,张兰桐*,孔德志,段坤峰
(河北医科大学药学院 药物分析教研室,河北 石家庄 050017)

摘 要:**目的** 建立河北道地药材连翘的 HPLC-PDA 指纹图谱,得到对照图谱,与不同产地、不同采收部位连翘药材指纹图谱相比较,并测定了各批药材中连翘苷和芦丁的量,为科学评价与有效控制连翘药材质量提供方法。**方法** 色谱柱为 Diamonsil™ C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液进行梯度洗脱,柱温 30 ℃,检测波长为 235 nm,体积流量 0.8 mL/min,定量测定中连翘苷与芦丁的检测波长分别为 210 和 254 nm。**结果** 建立了河北省连翘药材 HPLC-PDA 指纹图谱共有模式,对不同产地、不同采收部位药材进行了相似度比较,并结合定量测定结果对各批药材进行评价。**结论** 本方法操作简便、快速、准确,为连翘药材的鉴别和全面质量控制提供了依据。另外,连翘叶和花中连翘苷和芦丁量非常高,对于叶和花能否替代果实或与果实合并用药有待于进一步研究。

关键词:连翘;指纹图谱;连翘苷;芦丁;高效液相色谱
中图分类号:R282.7 **文献标识码**:A **文章编号**:0253-2670(2010)02-0297-05

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实,具有清热解毒、消肿散结的功效,用于痈疽、瘰疬、乳痈、丹毒、风热感冒、温病初起、温热入营、高热烦渴、神昏、发斑、热淋尿闭[1]。化学成分包括苯乙醇苷类、木脂素及其苷类、五环三萜类、挥发油类等[2],其中连翘苷是连翘抗菌和抗病毒作用的活性成分[3]。河北为连翘药材的主要产区。通过 HPLC 方法建立药材的指纹图谱已有很多报道[4~6],本实验对来自不同产区和不同采收部位的 29 批连翘药材(其中包括老翘、青翘的茎、叶、花)进行了 HPLC-PDA 指纹图谱分析,以 12 批河北道地药材生成对照指纹图谱,并测定了各批药材中连翘苷和芦丁。方法重现性与精密度良好,有助于连翘药材的标准化种植与道地药材的质量控制,同时为连翘药材的鉴别提供依据。

1 仪器与试药

美国 Agilent 1200 高效液相色谱仪(在线脱气机,四元泵,自动进样器,PDA 检测器);Agilent Chem Office 色谱工作站;SCQ-200 超声波清洗器(100 W,25 kHz)(上海声谱超声波设备厂),Heal Force-PWVF 超纯水制备仪(香港力康发展有限公司)。甲醇、乙腈为色谱纯(美国迪马公司),水为二次重蒸水,其他溶剂均为分析纯。连翘苷对照品(批号 0821-200104)、芦丁对照品(批号 100080-200306)、连翘对照药材(批号 120908-200613)均由中国药品生物制品检定所提供。不同产地连翘样品来源见表 1,均经河北医科大学药学院生药学教研室聂凤禔教授鉴定。

本研究收集了 29 批不同产地、不同采收部位的连翘药材,晾干。将样品置于烘箱内,40 ℃烘干 8 h,取出,用粉碎机粉碎,过 3 号筛,置干燥器中,备用。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备:取连翘苷、芦丁对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释制成质量浓度分别为 0.535、0.521 mg/mL 的溶液,即得。

2.2 供试品溶液的制备:取药材粉末(过 3 号筛)0.5 g,精密称定,置 25 mL 量瓶中,加 75%甲醇至刻度,摇匀,称定质量,超声提取 45 min,取出,放冷,用 75%甲醇补足质量,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验:色谱柱为 Diamonsil™ C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)(迪马公司);乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相梯度洗脱,0~20 min,5%~18%乙腈;20~48 min,18%~27%乙腈;48~60 min,27%~36%乙腈;60~90 min,36%~70%乙腈;检测波长 235 nm;体积流量 0.8 mL/min;柱温 30 ℃;进样量 10 μL。除未达到基线分离的两峰合并外,其余各峰的分离度均大于 1.0。所有组分均在 100 min 内检测完成,色谱图见图 1。

2.3.2 精密度试验:取 10 号连翘药材粉末制备供

* 收稿日期:2009-04-15
基金项目:河北省科技支撑计划项目(092764231D)
作者简介:崔 洋(1985-),女,河北保定人,河北医科大学药学院 2007 级硕士研究生,从事中药质量控制与药代动力学研究。E-mail:yangyang1985hanzhe@163.com
*通讯作者 张兰桐 Tel:(0311)86266419 Fax:(0311)86266419 E-mail:zhanglantong@263.net

表 1 连翘药材样品来源

Table 1 Sources of Fructus Forsythiae samples

样品号	样品来源	采收部位	样品号	样品来源	采收部位
1	河北安国	果实	16	四川	果实
2	河北承德	果实	17	云南	果实
3	河北邯郸	果实	18	湖南	果实
4	河北邯郸	果实	19	山西	果实
5	河北邯郸	果实	20	河南老翘	果实
6	河北邯郸	果实	21	河北井陉	花
7	中国药品生物制品检定所	果实	22	河北井陉	叶(蒸过)
8	河北井陉青翘	果实	23	河北井陉	叶
9	河北井陉	果实	24	河北井陉	叶
10	河北涉县太行山	果实	25	河北井陉	叶
11	河北石家庄	果实	26	河北井陉	叶
12	河北辽城	果实	27	河北井陉	叶
13	河南新乡青翘	果实	28	河北井陉	叶
14	山西老翘	果实	29	河北井陉	茎
15	陕西西安	果实			

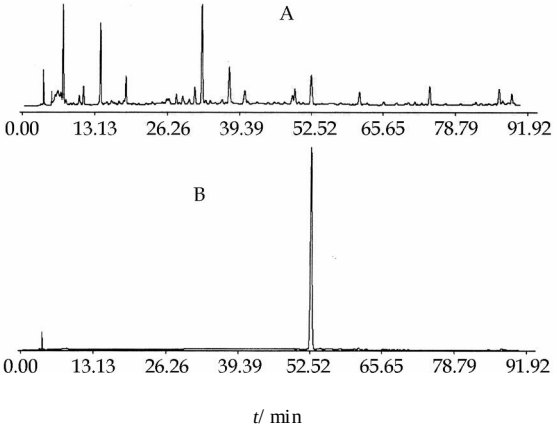


图 1 连翘药材(A)和连翘苷对照品(B)图谱对比

Fig. 1 Comparison of fingerprint between Fructus Forsythiae (A) and forsythin reference substance (B)

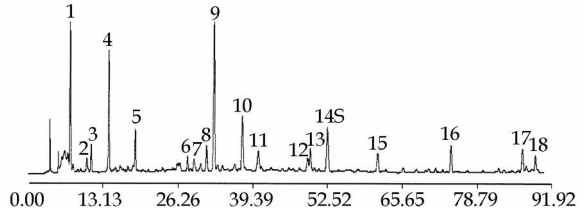
试品溶液 1 份,重复进样 6 次,记录指纹图谱,利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版软件计算相似度,结果均大于 0.9;各主要色谱峰相对保留时间 RSD 均小于 0.17%,相对峰面积比值的 RSD 均小于 1.6%。

2.3.3 重现性试验:取 10 号连翘药材粉末制备供试品溶液 6 份,分别进样,记录指纹图谱,相似度计算结果均大于 0.9;各主要色谱峰相对保留时间 RSD 均小于 0.25%,相对峰面积比值的 RSD 均小于 1.27%。

2.3.4 稳定性试验:取 10 号连翘药材粉末,精密称定,制备供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 检测指纹图谱。相似度计算结果均大于 0.9;各主要色谱峰相对保留时间 RSD 均小于 1.5%,相对峰面积比值 RSD 均小于 2.0%,说明样品在 24 h 内稳定。

2.3.5 河北道地连翘药材指纹图谱的建立:取对照药材及河北产连翘药材(1～12 号样品),制备供试品溶液,分别进样,进行 HPLC 分析,得道地连翘药材指纹图谱及其 18 个共有峰(图 2),并生成对照图谱(R),见图 3;计算其相似度,结果见表 2。

2.3.6 不同产地连翘药材指纹图谱的建立:取不同

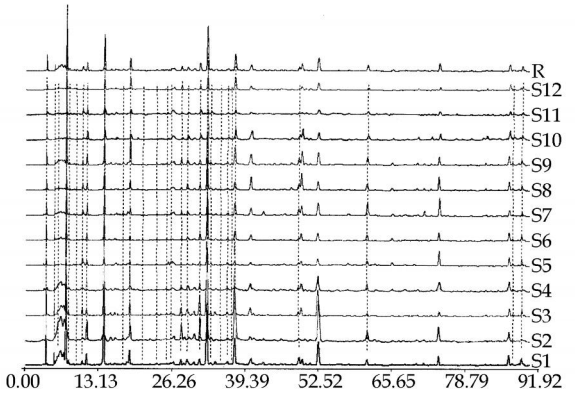


S-连翘苷

S-forsythin

图 2 连翘药材指纹图及共有峰标识

Fig. 2 Fingerprints of Fructus Forsythiae and marking of common peaks



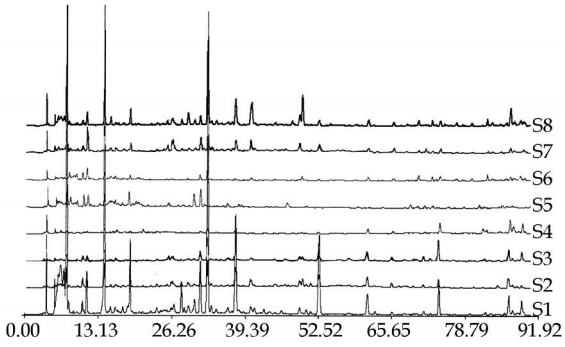
S1～S12-样品 1～12 R-对照指纹图谱

S1—S12-samples 1 - 12 R-reference fingerprint

图 3 12 批道地连翘药材指纹图谱及生成的共有模式

Fig. 3 Fingerprints of 12 batches of Fructus Forsythiae and their plots of mutual modes

来源的连翘药材(13～20 号样品),制备供试品溶液,分别进样,进行 HPLC 分析,得到 8 批不同来源连翘药材的指纹图谱,见图 4;并计算其与对照指纹图谱比较的相似度,结果见表 2。



S1～S8-样品 12～19

S1 - S8-samples 12 - 19

图 4 不同产地连翘药材指纹图谱

Fig. 4 Fingerprints of Fructus Forsythiae **from different sources**

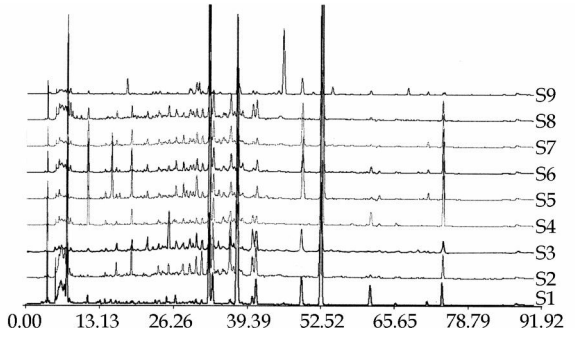
表 2 不同批次连翘药材与共有模式比较的相似度

Table 2 Similarities among 29 batches of Fructus Forsythiae **samples compared with reference fingerprints**

批号	相似度	批号	相似度
1	0.954	16	0.465
2	0.968	17	0.293
3	0.974	18	0.669
4	0.959	19	0.764
5	0.891	20	0.825
6	0.902	21	0.589
7	0.853	22	0.672
8	0.865	23	0.580
9	0.938	24	0.309
10	0.874	25	0.330
11	0.886	26	0.373
12	0.850	27	0.316
13	0.752	28	0.337
14	0.768	29	0.432
15	0.541		

2.3.7 不同采收部位连翘药材指纹图谱的建立:取不同采收部位的连翘药材(21～29 号样品),制备供试品溶液,分别进样,进行 HPLC 分析,得到 9 批不同采收部位连翘药材的指纹图谱,见图 5;并计算其与对照指纹图谱比较的相似度,结果见表 2。

2.3.8 相似度比较:在 29 批药材中,12 批河北道地药材相似度均在 0.85 以上,批间差异较小。据文献报道山西、河南也是连翘药材主产地[7],由表 2 可看出,山西、河南产连翘药材相似度差异不大。但其他产地药材与河北道地药材生成的对照指纹图谱相比,相似度差异较大,说明不同产地的连翘药材之间存在较大差异。不同采收部位连翘药材(茎、叶、花)相似度差异也较大,说明连翘不同采收部位化学成分或各成分量不尽相同。



S1-花 S2～S8-叶 S9-茎

S1-flower S2 - S8-leaf S9-stem

图 5 不同采收部位连翘药材指纹图谱

Fig. 5 Fingerprints of Fructus Forsythiae **from different parts of plant**

2.4 连翘药材中连翘苷和芦丁的测定

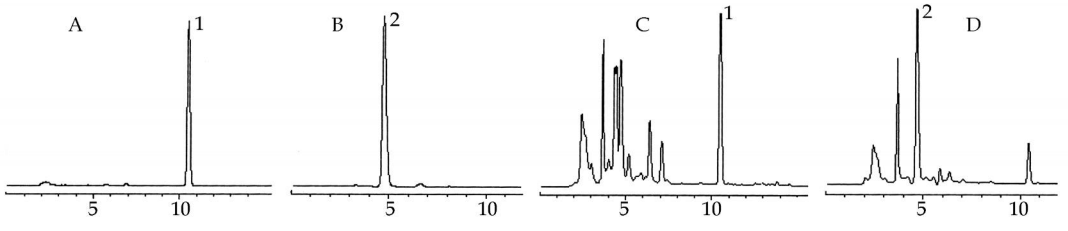
2.4.1 色谱条件:采用 Diamonsil™ C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)(迪马公司);乙腈-0.1%磷酸为流动相梯度洗脱,0～5 min,25%～30%乙腈;5～8 min,30%～35%乙腈;8～12 min,35%～55%乙腈;体积流量 1.0 mL/min;检测波长为:连翘苷 210 nm,芦丁 254 nm;柱温 30 ℃。

2.4.2 系统适用性实验:在上述确定的色谱条件下,吸取供试品溶液 10 μL,注入 HPLC 色谱仪,记录 12 min 内的色谱图,理论板数按连翘苷和芦丁计算分别为 25 000 和 4 800,与其他色谱峰的分离度大于 1.5,色谱图见图 6。

2.4.3 标准曲线制备:稀释连翘苷和芦丁对照品储备液,使配制成连翘苷为 6.7～535 μg/mL、芦丁为 6.5～521 μg/mL 的对照品溶液。吸取上述溶液 10 μL,注入 HPLC 色谱仪,记录峰面积。以质量浓度(Y)为横坐标,峰面积(X)为纵坐标,绘制标准曲线,经回归处理得回归方程为,连翘苷:$Y = 0.024\ 5X - 18.667$,$r = 0.999\ 2$($n = 7$);芦丁:$Y = 0.108\ 5X - 3.586\ 3$,$r = 0.999\ 9$($n = 7$)。

2.4.4 精密度试验:取连翘药材 10 号样品适量,精密称定,制备供试品溶液,吸取 10 μL,注入液相色谱仪,重复进样 6 次,按确定的色谱条件记录峰面积,连翘苷、芦丁质量分数的 RSD 分别为 1.4%和 0.9%。

2.4.5 稳定性试验:取连翘药材 10 号样品适量,精



t/ min

1-连翘苷 2-芦丁

1-forsythin 2-rutin

图 6 对照品连翘苷(A)、芦丁(B)和 25 号样品连翘苷(C)、芦丁(D)色谱图

Fig. 6 Chromatograms of forsythin reference substance (A) and rutin reference substance (B), forsythin of sample (C), and rutin of sample (D)

密称定,制备供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h,吸取 10 μL 进样,记录峰面积,连翘苷、芦丁质量分数的 RSD 分别为 1.0 %和 0.66 %,说明供试液在 24 h 内稳定。

2.4.6 重现性试验:取连翘药材 10 号样品适量,精密称取 6 份,制备供试品溶液,分别吸取 10 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积,连翘苷、芦丁质量分数的 RSD 分别为 2.0 %和 1.7 %。

2.4.7 回收率试验:取连翘药材 10 号样品约 0.25 g,共 6 份,精密称定,分别精密量取连翘苷、芦丁对照品溶液 1.0 和 2.0 mL(约相当于连翘药材含连翘苷、芦丁的 50 %),依次加入上述 6 份药材中,制备供试品溶液,分别吸取 10 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积,连翘苷、芦丁的平均回收率分别为 99.20 %和 96.97 %,RSD 分别为 1.4 %和 0.9 %。

2.4.8 最低检测限:精密称取连翘苷、芦丁对照品,加甲醇溶解并逐步稀释至所得色谱图中峰高为噪音的 3 倍,连翘苷、芦丁的最低检测限分别为 5 和 2.5 ng。

2.4.9 样品测定:取河北道地(1～12 号)与不同产地和不同采收部位连翘药材(13～29 号),制备供试品溶液,分别吸取 10 μL,注入液相色谱仪,记录峰面积并计算质量分数,结果见表 3。

《中国药典》2005 年版规定连翘中连翘苷不得低于 0.15 %[1],在测定的 29 批药材中,有 19 批药材中连翘苷的量高于 0.15 %,其中有道地的,也有非道地的。四川采收的连翘药材相似度较低,实验中基本检测不到连翘苷和芦丁所对应的色谱峰。不同来源连翘药材中连翘苷和芦丁的量有很大差别。连翘叶和花中连翘苷和芦丁的量都非常高,对于连翘叶和花能否替代连翘果实入药值得进一步研究。

3 讨论

本实验采用 HPLC-PDA 法,对来自不同产地和不同采收部位的 29 批连翘药材进行了指纹图谱分析,利用相似度软件以 12 批道地连翘指纹图谱生成对照指纹图谱,并对不同产间药材的差异进行了研究,同时对 29 批连翘样品中的连翘苷和芦丁进行了测定,有助于连翘药材的标准化种植与质量控制。

表 3 连翘药材中连翘苷和芦丁的测定结果

Table 3 Contents of forsythin and rutin in Fructus Forsythiae

批号	连翘苷/ %	芦丁/ %	批号	连翘苷/ %	芦丁/ %
1	0.569 7	0.447 1	16	0	0
2	0.061 7	0.170 0	17	0.032 6	0.183 1
3	0.628 3	0.488 3	18	0.029 5	0.394 0
4	0.509 9	0.623 6	19	0.030 9	0.527 0
5	0.113 6	0.214 9	20	0.072 7	0.355 7
6	0.183 5	0.299 4	21	1.077 3	1.679 8
7	0.246 4	0.284 3	22	2.036 5	2.698 5
8	0.414 9	0.818 2	23	1.799 4	1.252 1
9	0.329 5	0.349 5	24	1.783 9	1.469 2
10	0.188 3	0.335 1	25	2.234 9	1.259 8
11	0.836 6	0.554 4	26	1.873 4	1.224 0
12	0.186 5	0.116 4	27	1.753 2	1.270 1
13	0.857 3	0.577 1	28	1.934 8	1.384 3
14	0.129 7	0.225 7	29	0.067 2	0.088 6
15	0.070 3	0.109 9			

研究结果表明,连翘苷和芦丁量的高低与其相似度并非成对应关系。河北道地连翘药材中,除 2 号和 5 号样品连翘苷和芦丁的量较低外,其余各批量均较高,相似度差异不大,质量相对稳定。河南、山西产连翘药材相似度虽相差不大,但连翘苷的量较低。陕西、四川、云南和湖南产连翘药材连翘苷和芦丁量低同时相似度差异也很大,疑为非道地药材。青翘中连翘苷和芦丁的量均高于老翘,与文献报道一致[8]。就不同采收部位的药材而言,连翘叶、花、茎的相似度均较低,可能与化学成分以及成分量的差异有关。连翘茎中连翘苷和芦丁量比果实低,但花和叶中两种物质量均非常高,约为果实的 10 倍,其中蒸过的叶(22 号)与其他批次叶相比,量无显著差别。因此,对于连翘叶、花的化学成分与果实有何

差异值得深入研究,连翘叶和花的药用价值也需要进一步验证。

本实验采用 PDA 检测器对最佳检测波长进行选择,经 HPLC-PDA 在 200～400 nm 下进行全波长扫描,在 235 nm 处出峰最多且整体信号明显,故选择 235 nm 为检测波长。

本实验比较了不同提取溶剂(甲醇、75 %甲醇、50 %甲醇、30 %甲醇)的水浴回流和超声提取的提取效果,同时还考察了不同提取时间的提取效果。结果表明,以 75 %甲醇为提取溶剂,当超声提取 45 min 时,各色谱峰响应值不再增加,且方法稳定,重现性好。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
[2] 张海燕. 连翘化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中药材, 2000, 23(10): 657-658.
[3] 肖培根. 新编中药志[M]. 第 2 卷. 北京: 化学工业出版社, 2002.
[4] 兰泽伦, 李 敏, 李校堃, 等. 温莪术 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2008, 39(6): 920-922.
[5] 马致法, 董江江, 李振宁, 等. 不同款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量分析及 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1305-1308.
[6] 黎 阳, 刘素香, 张铁军, 等. 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1469-1474.
[7] 李英霞, 孟庆梅. 连翘的本草考证[J]. 中药材, 2002, 25(6): 435-437.
[8] 李书渊, 施玉旋, 罗 婷. 青翘与青翘种子及老翘中连翘苷的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(9): 1720.

高产绿原酸杜仲细胞悬浮培养体系优化研究

颜日明[1,2], 张志斌[1], 邱晓芳[1], 曾庆桂[1], 游 海[1], 朱 笃[1,2]*

(1. 江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022;
2. 江西省天然药物活性成分研究重点实验室, 江西 宜春 336000)

摘 要: **目的** 优化杜仲细胞悬浮培养及其产绿原酸的条件。**方法** 研究基本培养基种类、激素质量浓度、碳源种类及质量浓度、pH 值、接种量和摇床转速等因素对杜仲细胞生长和绿原酸产量的影响,建立了高产绿原酸的悬浮细胞培养体系。**结果** B5 培养基 + 0.5 mg/L NAA + 0.6 mg/L 6-BA、蔗糖 30 g/L、初始 pH 5.0～5.5、接种量 20 g·FW/L 以及摇床转速 110 r/min 为杜仲细胞悬浮培养的适合条件。**结论** 优化后的培养条件为杜仲细胞大规模悬浮培养生产天然活性成分奠定了基础。

关键词: 杜仲; 细胞悬浮培养; 绿原酸
中图分类号: R282.1 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2670(2010)02-0301-04

杜仲 *Eucommia ulmoides* Olive 为杜仲科杜仲属多年生落叶乔木,其干燥树皮为我国特有名贵中药,具有补肾健腰、强筋壮骨、提高机体缺氧耐力、改善提高机体免疫功能、降低血脂、平衡调节血压等功效。其药用成分包括木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类和黄酮类等。其中属于苯丙素类物质的绿原酸具有广泛的抗菌、抗病毒、抗诱变、抗肿瘤作用[1]。绿原酸具有较强药理活性,对消化系统、血循环系统和生殖系统均有作用[2],还可能作为抗 HIV 的先导化合物,具有抗逆转录酶的活性[3]。但是杜仲作为第三纪孑遗的古老树种,其野生资源正在日益稀竭,同时杜仲栽培周期长,商品药材的有效药用成分量极低,产量质量都不稳定。运用细胞工程生产有用次生代谢物质是目前全世界生物技术研究的三大潮流之一,因此采用生物技术提高其活性成分的量势在必行。目前,有关杜仲的组织培养、快繁及培养条件对愈伤组织次生代谢产物合成影响的研究国内外已有较多研究,但有关杜仲细胞悬浮培养研究仅有少量报道[4,5]。本实验通过对杜仲细胞悬浮培养及其产绿原酸条件优化,为通过杜仲细胞大规模生产次级代谢产物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料:杜仲种子 2005 年 11 月采于庐山,由南昌大学生命科学学院黄兆祥教授鉴定。

1.2 愈伤组织的诱导:杜仲愈伤组织系由杜仲种子萌发的无菌苗真叶诱导,诱导的培养基为含 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L NAA(萘乙酸) + 1.0 mg/L 6-BA(6-苄氨基嘌呤)的 MS 培养基[6]。置于

* 收稿日期: 2009-04-08
基金项目: 教育部重点科技项目资助(地方 204078)
作者简介: 颜日明(1979—),男,在读博士研究生,研究方向为发酵工程。E-mail: yanriming@yahoo.com.cn
*通讯作者 朱 笃 Tel: (0795)3200616 E-mail: zhudu12@163.com