

γ , γ -二甲基烯丙焦磷酸酯(DMAPP)的生物合成; 2) 三萜环碳环系统的生物合成; 3) 环上复杂的官能化反应过程, 最终形成完整的三萜皂苷分子^[17]。黄芪甲苷、黄芪皂苷I 和黄芪皂苷II 的化学结构母核都是环阿屯烷型的三萜皂苷, 只是后两者在糖上进行了乙酰基取代, 在碱性条件下可以转化为黄芪甲苷。从表 2 中可以看出, 年平均气温可能是影响环阿屯烷型皂苷母核生物合成的关键酶的因素, 而年平均无霜期则是影响母核乙酰化酶的关键因素。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 凌洪锋, 苏丹, 曹洋. 黄芪多糖抗氧化作用研究[J]. 医学理论与实践, 2005, 18(8): 872-874
- [3] Wei X, Zhang J. Astragalus mongholicus and polygonum multiflorum protective function against cyclophosphamide inhibitory effect on thymus[J]. *Am J Chin Med*, 2004, 32(5): 669-680
- [4] 杨沁, 陈敏珠. 黄芪总苷的抗炎与镇痛作用及其作用机制[J]. 安徽医科大学学报, 2000, 35(5): 376
- [5] 赵文, 任永凤, 樊建航. 新疆黄芪抗病毒作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(1): 23-25
- [6] 崔伊梅, 高卫真, 刘艳霞. 黄芪及其有效成分黄芪苷IV在心血管药理作用的研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2005(4): 656-659
- [7] 关凤英, 杨世杰. 黄芪甲苷预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤

后细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1146-1150

- [8] Wang W T, Zhao Z Y, Han Y M, *et al*. Effects of Astragaloside IV derivative on heart failure in rats[J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 48-53
- [9] 张琦, 彭洋, 宋春秋, 等. 黄芪苷IV通过PI3/Akt信号通路抗H₂O₂诱导的H9c2细胞氧化损伤[J]. 中草药, 2010, 41(6): 955-959
- [10] 吴庆生, 朱仁斌, 宛志沔, 等. 西洋参有效成分与气候生态因子的关系[J]. 生态学报, 2002, 22(5): 779-782
- [11] 褚必海, 毛善国, 丁小余, 等. 泽泻有效成分与生态因子的关系[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2007, 30(2): 98-103
- [12] 王振月, 王宗权, 左月明, 等. 毛脉酸模次生代谢产物动态特征及其与环境因子的相关性分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(9): 773-776
- [13] 曹海禄, 曹国番, 魏建和, 等. 遗传和环境因子对药用植物品质的影响[J]. 中草药, 2007, 38(5): 785-788
- [14] 徐莉, 王丽, 赵桂仿, 等. 新疆阜康荒漠红砂种群构件结构与环境因子的灰色关联度分析[J]. 植物生态学报, 2003, 27(6): 742-748
- [15] 王建林, 常天军, 成海宏, 等. 西藏野生芥菜型油菜种群构件结构与环境因素的灰色关联度分析[J]. 生态科学, 2006, 25(6): 507-511
- [16] 成海宏, 王建林, 常天军, 等. 西藏栽培白菜型油菜种群构件与环境因子的灰色关联度分析[J]. 生态科学, 2007, 26(6): 495-500
- [17] 陈莉, 吴耀生. 三萜皂苷生物合成途径及相关酶[J]. 国外医药: 植物药分册, 2004, 19(4): 156-161

泽泻的双波长 HPLC 指纹图谱研究

谢 普, 毕开顺, 俞 悦, 苏 丹, 张天虹, 陈晓辉*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 采用双波长 HPLC 法建立泽泻指纹图谱, 为科学评价和控制泽泻的质量提供依据。方法 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水; 检测波长: 254 nm (0~13.00 min), 210 nm (13.01~60.00 min); 体积流量: 1.0 mL/min。结果 采用双波长对福建和四川两个产地 20 批泽泻进行指纹图谱研究, 分别确定了 18 和 23 个共有峰, 并指认其中 3 个色谱峰。结论 建立的双波长 HPLC 法色谱指纹图谱可以为泽泻药材的鉴别和质量评价提供依据。

关键词: 泽泻; 双波长; 指纹图谱

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1712-04

HPLC Dual-wavelength fingerprint of *Alisma orientalis*

XIE Pu, BI Kai-shun, YU Yue, SU Dan, ZHANG Tian-hong, CHEN Xiao-hui

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective The HPLC dual-wavelength chromatographic fingerprint was established for evaluating and controlling the quality of *Alisma orientalis*. **Methods** Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) was used with acetonitrile-water gradient elution, at flow rate of 1.0 mL/min. The detection wave-

①收稿日期: 2010-03-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20875064)

作者简介: 谢 普(1985-), 男, 湖南省常德市人, 硕士研究生。Tel: (024)23986296 E-mail: xiepu@yahoo.cn

* 通讯作者 陈晓辉 Tel: (024)23986259 E-mail: cxh_syphu@yahoo.com.cn

length was 254 nm (0– 13.00 min) and 210 nm (13.01– 60.00 min). **Results** Fingerprint of 20 batches of *A. orientalis* from Fujian and Sichuan Provinces was established, and 18 and 23 characteristic peaks were identified, respectively, of which three peaks were identified. **Conclusion** The HPLC dual-wavelength chromatographic fingerprint method established in this study could provide the evidence for identification and quality control of *A. orientalis*.

Key words: *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.; dual wavelength; fingerprint

泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep 的干燥块茎^[1]。首载于《神农本草经》，列为上品，又名水泻，性味甘、寒，归肾、膀胱经，具有利水、渗湿、泻热的功能，用于小便不利、水肿胀满、泄泻、尿少、痰饮眩晕、热淋涩痛、高血脂等证。产自福建、江西者称“建泽泻”，产自四川者称“川泽泻”。泽泻的化学成分含多种四环三萜、倍半萜、二萜类化合物^[2]，主要成分为三萜类化合物，其中 24-乙酰泽泻醇 A (24-acetate alisol A) 具有利尿、降血脂等活性，泽泻醇 A (alisol A) 具有抗变态反应等作用^[3]，23-乙酰泽泻醇 B (23-acetate alisol B) 具有较强的保肝作用^[4]。《中国药典》2005 年版一部该品种项下无测定项，只有理化指标的鉴别。文献报道采用测定 24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B 来评价其质量优劣^[5]。指纹图谱可以综合反应药材中各主要成分及相对量，能提供更全面丰富的质量评价信息^[6-9]。许枏等^[10]对不同来源的泽泻药材指纹图谱进行了初步研究，确定了 7 个共有峰。刘洪昌等^[11]只建立了四川产泽泻药材的指纹图谱，确定了 2 个色谱峰。本研究收集了 20 批不同来源的泽泻，其中 12 批产地为福建，8 批产地为四川。采用双波长 HPLC 法分别建立了两个产地泽泻的色谱指纹图谱，该方法准确、重现性好、操作简便，为泽泻的鉴别和全面质量控制提供依据。

1 材料

SHIMADU LC-2010A 高效液相色谱仪，CLASS-VP 工作站，METTLER TOLEDO AB135-S 十万分之一天平。对照品：泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B 和 24-乙酰泽泻醇 A 均为自制(采用面积归一化法，质量分数> 99.0%)。乙腈为色谱纯，甲醇为分析纯，水为自制重蒸水。泽泻药材样品购自福建、四川等地，经沈阳药科大学药用植物教研室孙启时教授鉴定为泽泻 *Alisma orientalis* (Sam.) Juzep 的干燥块茎，样品产地见表 1。

2 方法与结果

2.1 检测波长的确定：本研究考察了 210 nm 和 254 nm 单一波长检测结果。在 210 nm 检测时，谱

表 1 泽泻样品的产地

Table 1 Origins of *A. orientalis*

编号	产地	编号	产地
1	福建 I	11	福建 XI
2	福建 II	12	福建 XII
3	福建 III	13	四川 I
4	福建 IV	14	四川 II
5	福建 V	15	四川 III
6	福建 VI	16	四川 VI
7	福建 VII	17	四川 V
8	福建 VIII	18	四川 VI
9	福建 IX	19	四川 VII
10	福建 X	20	四川 VIII

图的前 13 min 不成峰型，而 13~ 60 min 有大量的色谱峰，见图 1A。在 254 nm 检测时，前 13 min 有 7 个色谱峰，而 13~ 60 min 只有少量的几个色谱峰，见图 1B。因此本研究采用了双波长切换法，在 0~ 13.00 min 检测波长设定为 254 nm，13.01 min 时将检测波长切换至 210 nm，并保持至色谱图记录完成(58 min)。本研究采用的双波长切换法将两个不同波长检测到的色谱信息记录在同一张色谱图上，而且两波长检测到的色谱峰没有相互掩盖，采集的色谱峰丰富，更加全面地反映了泽泻的质量。

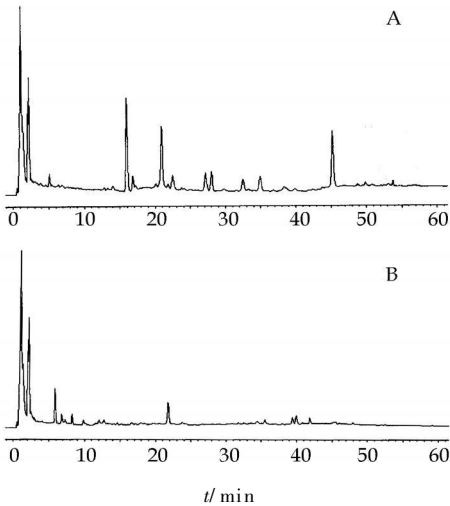


图 1 210 nm 波长(A)与 254 nm 波长(B)检测泽泻样品色谱图
Fig 1 Chromatograms of 210 nm (A) and 254 nm (B) wavelength of *A. orientalis*

2.2 色谱条件：Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-水；检测波长：254 nm

(0~13.00 min), 210 nm(13.01~60.00 min); 柱温: 35 ℃; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备: 分别取泽泻醇 A、24-乙酰泽泻醇 A 和 23-乙酰泽泻醇 B 对照品适量, 精密称定, 加乙腈溶解并定容, 配制成质量浓度分别为 0.637 0、0.470 0、0.526 0 mg/mL 的混合对照品溶液, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

2.3.2 供试品溶液的制备: 取泽泻药材粉末(粉碎, 过 40 目筛), 约 1.0 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加入甲醇 100 mL, 超声提取 30 min, 提取液滤过, 回收溶剂, 甲醇溶解残渣并转移至 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验: 取泽泻药材(N_o 8), 制备供试品溶液, 在上述色谱条件下连续进样 6 次, 测定结果表明各共有色谱峰与内参比峰(10 号色谱峰)的相对保留时间和相对保留峰面积 RSD 均小于 3.0%, 表明仪器精度良好。

2.4.2 重现性试验: 取泽泻药材(N_o 8), 制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 在上述色谱条件下测定, 结果各共有色谱峰与内参比峰(10 号色谱峰)的相对保留时间和相对保留峰面积 RSD 均小于 2.5%, 表明方法重现性良好。

2.4.3 稳定性试验: 取泽泻药材(N_o 8), 制备供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12 h 在上述色谱条件下测定, 结果各共有色谱峰与内参比峰(10 号色谱峰)的相对保留时间和相对保留峰面积 RSD 均小于 2.8%, 表明供试品在 12 h 内稳定。

2.5 样品色谱指纹图谱的建立: 以鉴定的 20 批泽泻药材为研究对象, 进行特征指纹图谱研究。在上述色谱条件下分析, 记录色谱图。获得包括泽泻醇 A、24-乙酰泽泻醇 A、23-乙酰泽泻醇 B 在内的 20 多个峰, 从建泽泻和川泽泻图中分别选定 18 个和 23 个共有峰作为指纹图谱的特征峰, 组成建泽泻和川泽泻的指纹图谱。

2.6 系统聚类分析: 本研究应用 SPSS 软件, 对 20 个批次样品同时聚类分析, 采用组间均联法, 以夹角余弦作为样品相似性的测度。聚类分析结果将 20 批样品分为两类, 分类结果基本与产地相同, 除 J3(N_o 3)外, 其余批次的建泽泻和川泽泻均分别聚为同一类, 川泽泻样品中, C3(N_o 15)的欧氏距离也与其他批次相差较大。根据以上结果, 确定建泽泻 J3

(N_o 3)和川泽泻 C3(N_o 15)为非推荐品, 其余各批准均为推荐品。聚类谱系图见图 2。

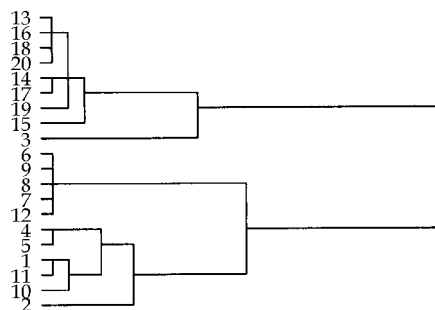
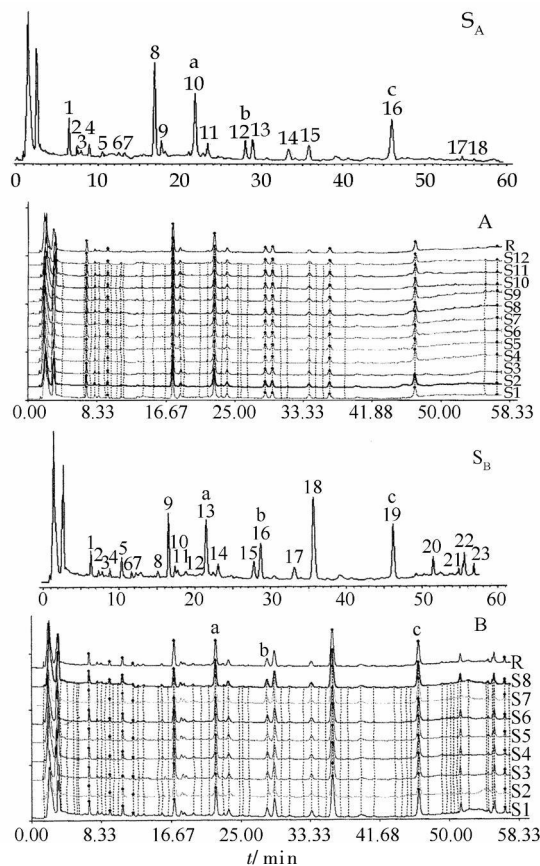


图 2 聚类分析结果

Fig 2 Dendrogram of clustering analysis

2.7 特征图谱相似度评价: 结合聚类分析结果, 选取福建和四川两产地共 18 批推荐品, 按产地分别建立共有模式。将色谱图导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”, 生成特征图谱和对照图谱, 见图 3。



α 泽泻醇 A b 24-乙酰泽泻醇 A c 23-乙酰泽泻醇 B

α alisol A b 24-acetate alisol A c 23-acetate alisol B

图 3 对照图谱(S_A, S_B), 建泽泻(A)和川泽泻(B)共有模式图谱

Fig 3 HPLC Specific chromatograms of reference (S_A and S_B), A orientalis from Fujian (A) and Sichuan (B) Provinces

再将对照谱图和样品色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004B)”,既可计算出样品与对照谱图的相似度,结果见表 2。相似度分析结果与系统聚类分析结果一致,2 种方法得到了相互验证。根据相似度和聚类分析结果确定相似度在 0.90 以上的样品为推荐品,0.90 以下的为非推荐品。

表 2 相似度分析

Table 2 Analysis of similarity

编号	相似度	编号	相似度
1	0.976	11	0.997
2	0.993	12	0.975
3	0.642	13	0.959
4	0.983	14	0.941
5	0.982	15	0.779
6	0.975	16	0.984
7	0.973	17	0.991
8	0.974	18	0.994
9	0.972	19	0.987
10	0.980	20	0.924

3 讨论

3.1 内参照物的选择:泽泻药材主要含三萜类化合物,以泽泻醇 A 为其药理活性的主要成分之一,其量较高,峰面积稳定,出峰时间居中,分离度较好,故选定泽泻醇 A 作为内参比峰。

3.2 聚类分析和相似度评价结果分析:泽泻药材中化学成分复杂,仅以单一成分控制其质量不够全面,因此有必要建立其特征图谱^[12]。本研究以各产地的特征色谱峰为量化指标进行聚类分析,将共 20 批不同产地的泽泻样品分为推荐品和非推荐品 2 类,相似度评价结果和聚类分析结果基本一致,2 种方

法得到了相互验证。

3.3 不同产地泽泻指纹图谱比较结果:建立的泽泻指纹图谱显示,建泽泻有 18 个共有峰,川泽泻有 23 个共有峰。川泽泻指纹图谱中 8、11、12、21 和 23 号色谱峰均为川泽泻特有,建泽泻指纹图谱中相同的保留时间无峰,表明两产地泽泻中所含有效成分不尽相同。建泽泻中的 5、13 和 15 号等色谱峰与川泽泻中的 5、16 和 18 号等色谱峰保留时间相同,但峰面积大小有明显差异,表明两产地泽泻中含有的相同有效成分量不同。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 朱玉岚,彭国平. 泽泻的萜类化学成分研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 348-356
- [3] 尹仁杰,吴继洲. 泽泻的研究进展[J]. 医药导报, 2003, 22(5): 295-296
- [4] 彭国平,潘林梅,文红梅. 泽泻的对照品研究[J]. 南京中医药大学学报, 2001, 17(3): 154-156
- [5] 周坛树,施大文. 不同产地泽泻中主要成分 HPLC 测定[J]. 中药材, 2000, 23(11): 687-688
- [6] 崔红花,郭 娇,高幼衡,等. 佛手和属间药用植物的主成分聚类分析及 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(6): 978-984
- [7] 崔 洋,王 巧,张兰桐,等. 河北道地药材连翘的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(2): 297-301
- [8] 逢楠楠,毕开顺,闫宝庆,等. 芫花高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药, 2010, 41(5): 818-821
- [9] 罗 文,刘 斌,王 伟,等. 山楂药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(1): 39-42
- [10] 许 桐,杨松松. 泽泻指纹图谱的初步研究[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(12): 727
- [11] 刘洪昌,杨文钰,陈兴福. 四川道地药材泽泻的指纹图谱建立及其质量研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(18): 1844-1847

不同水分处理对夏枯草花期生长和生理特性的影响

郭巧生*,周黎君,武 征,张志远

(南京农业大学 中药材研究所,江苏 南京 210095)

摘 要:目的 研究不同水分处理对夏枯草花期生长与生理的影响。方法 采用每天定时定量称其质量的方法处理夏枯草植株,测定相关指标,结合统计方法进行分析比较。结果 随水分胁迫处理时间的延长,植株以 S_2 长势最好, S_3 增量最大且抽蔓数最多;超氧化物歧化酶(SOD)呈现出先上升后下降趋势,脯氨酸(Pro)呈上升趋势;相同处理时间下,随水分胁迫梯度不同,SOD、丙二醛(MDA)与 Pro 呈先上升后下降趋势,并以 S_2 量最低;可溶性糖量随逆境加深而下降。结论 夏枯草保护酶与渗透调节物质是一个整体,当植株受到外界胁迫时,共同发挥保护与协调作用;花期夏枯草所需水分以 65%~70% 最有利于成花,以 80%~85% 抗氧化与渗透调节物指标最低,形态生长最好。

关键词:夏枯草;水分处理;生理;花期生长

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)08-1715-05

①收稿日期:2009-12-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772730,81072986);国家科技基础条件平台工作项目(2005DKA21004)

作者简介:郭巧生(1963—),男,江苏苏州人,教授、博士生导师,长期从事药用植物的教学、科研工作。

Tel: (025) 84396591 E-mail: gqs@njau.edu.cn