

穿山龙血清指纹图谱分析

于书仪¹, 季芳茹¹, 于栋华², 刘树民^{2*}

(1. 佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154002;
2. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 建立穿山龙大鼠体内 HPLC 血清指纹图谱。方法: 应用 Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 0.1% 磷酸水-乙腈进行梯度洗脱, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 210 nm, 柱温 25 °C。结果: 精密度、重复性、稳定性试验中共有峰相对峰面积、相对保留时间的 RSD 均 < 5.0%; 结论: 该方法简便、实用、可靠, 为继续深入对穿山龙药效物质基础研究、药效作用机制研究等打下了坚实的基础。

[关键词] 穿山龙; 反相高效液相色谱; 血清指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0080-03

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1733.006.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:33

Studies on Chromatography Fingerprint of *Dioscorea nipponica* Serum

YU Shu-yi¹, JI Fang-ru¹, YU Dong-hua², LIU Shu-min^{2*}

(1. First Affiliated Hospital Jiamusi University Jiamusi Municipality of Heilongjiang Province, Jiamusi 154002, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for *Dioscorea nipponica* rats serum HPLC fingerprinting. **Method:** The separation was performed on a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with 0.1%

[收稿日期] 20120227(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173618); 黑龙江省青年基金项目(QC2009C046); 黑龙江卫生厅科研项目(2011-386)

[第一作者] 于书仪, 主管药师, Tel: 15604549030, E-mail: yushuyi888@126.com

[通讯作者] * 刘树民, 教授, 博士生导师, 从事中药临床药效物质基础研究及中药药性理论研究, Tel: 0451-82196181, E-mail: lsm@hljucm.net

[参考文献]

- [1] 徐国钧. 中国药材学. 下册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 1229.
- [2] 李铁云, 李天国, 张国侠, 等. 莱菔子水溶性生物碱对自发高血压大鼠降压作用的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(1): 25.
- [3] 孙越, 曹喜红, 潘艳丽. 大孔吸附树脂在中药研究中的应用[J]. 中医药信息, 2002, 19(2): 23.
- [4] 王雅琦, 龚慕辛, 王智民, 等. 吴茱萸汤大孔树脂精制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 1.
- [5] 秦学功, 陈景超. 以 X-5 型大孔树脂吸附分离苦参生物碱的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16

(8): 29.

- [6] 容蓉, 王小平, 蒋海强. 吸附树脂对麻黄附子细辛汤中麻黄碱的吸附与解吸性能[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 17.
- [7] Kozłowska H, Naczka M, Shahidi F, et al. Canola and rapeseed; production, chemistry, nutrition and processing technology [M]. USA: Van Nostrand Reinhold, 1990: 193.
- [8] 南淑蕾, 吴圣曦, 吴国欣, 等. 白芥子中芥子碱的制备及纯度测定[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(10): 1343.

[责任编辑 顾雪竹]

phosphoric acid water and acetonitrile as mobile phase by gradient elution; the flow rate was $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; detection wavelength was set at 254 nm; the column temperature was maintained at $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. **Result:** The RSD of precision, reproducibility, stability test of relative peak area and relative retention time was less than 5%. **Conclusion:** The method is simple, practical, reliable, which would lay a solid foundation for further studies on pharmacodynamic material basis of *Dioscorea nipponica* and pharmacodynamic action mechanism research.

[**Key words**] *Dioscorea nipponica*; RP-HPLC; serum fingerprint

穿龙薯蓣为薯蓣科植物,根茎入药俗称穿山龙,也称作地龙骨、野山药(东北)、土黄连、黄姜(安徽)、山常山(山东)、土龙骨(山西)、龙草薜(浙江)等^[1],具有祛风湿、止痛、舒筋活血、止咳平喘祛痰等功效^[2]。

民间多用于治疗闪腰岔气、腰腿疼痛、筋骨麻木、大骨节病等症。以往对穿山龙化学成分的研究有很多报道^[3-4],但没有对穿山龙提取液进行过代谢研究。本实验采用 HPLC 对黑龙江省大兴安岭穿山龙药材提取液进行了研究。

1 材料

1.1 样品的采集 穿山龙试样分别在能够反映穿山龙当前种植水平的主产区黑龙江省大兴安岭实地采取,均为秋季茎叶枯萎时采收。品种经黑龙江中医药大学王连芝副教授完成鉴定为 *Dioscorea nipponica* L.,按《中国药典》规定中药材取样法取样 10 批。

1.2 仪器与试剂 Waters 2695 Separation Module HPLC (美国 Waters 公司, Waters 2996 PAD 紫外检测器(美国 Waters 公司)含在线真空脱气机、高压二元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱), Empower 2 色谱管理系统, KQ-500DB 型数控超声清洗仪(江苏昆山超声仪器有限公司),梅特勒 Toledo AG135 型电子天平(瑞士 Mettler 公司), GLYZ-0.5B 型冷冻干燥机(上海浦东冷冻干燥设备有限公司)。

1.3 实验动物 Wistar 大鼠体重为 $(200 \pm 20) \text{ g}$,

黑龙江中医药大学 GLP 实验中心提供。

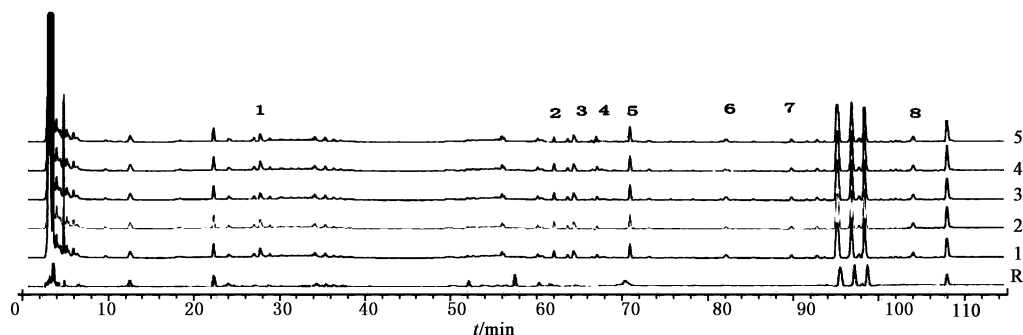
2 方法

2.1 色谱条件 Diamonsil (钻石) C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$), 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B), 梯度洗脱 ($0 \sim 32 \text{ min}$, $5\% \sim 23\% \text{ A}$, $32 \sim 70 \text{ min}$, $23\% \sim 70\% \text{ A}$, $70 \sim 100 \text{ min}$, $70\% \sim 100\% \text{ A}$, $100 \sim 110 \text{ min}$, $100\% \text{ A}$), 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 210 nm, 柱温 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 进样量为 $10 \text{ }\mu\text{L}$ 。

2.2 穿山龙大鼠灌胃药液 取穿山龙药材粉末,用 5 倍量的 30% 乙醇超声提取 30 min, 过滤, 合并滤液, 滤液减压回收至干。1 g 药粉含 4.7 g 生药材。

2.3 空白血清的制备 取 Wistar 大鼠, 禁食 12 h (自由饮水), 称重, 按照 $1.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$, 灌胃给予蒸馏水, 90 min 后用 20% 乌拉坦麻醉, 经肝门静脉取血 5 mL, 血液在 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min, 取上清液 1 mL, 加入已经活化好的 Waters OASIS 固相萃取柱, 先用水冲洗, 再用 20% 甲醇冲洗, 收集 100% 甲醇液, 蒸干, 定容至 $200 \text{ }\mu\text{L}$, $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 备用。

2.4 血清指纹图谱的测定 取 5 批血清样品, 液相色谱仪自动进样 $10 \text{ }\mu\text{L}$ 进行分析, 记录 110 min 的色谱图如图 1。保留时间为 71.039 min 的色谱峰是 HPLC 图谱中峰面积较大且出峰时间稳定的一个峰, 与其他成分分离度很高。以 5 号色谱峰的保留时间和峰面积积分为 1, 计算相对保留时间和相对峰面积, 结果见表 1, 2, 各共有峰相对保留时间均



R. 空白血清; 1~5.5 批血清样品

图 1 穿山龙提取液给药后大鼠的血清指纹色谱

在 3% 以内, 相对峰面积的 RSD 较大, 最高值达 10.986 7%。

表 1 5 批血清样品色谱指纹峰共有峰相对峰面积

No.	相对峰面积					平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5		
1	0.783 0	0.777 6	0.723 9	0.777 0	0.765 9	0.779 9	3.143 1
2	0.457 0	0.465 4	0.453 9	0.451 0	0.446 7	0.454 8	1.547 2
3	0.656 4	0.636 4	0.654 3	0.631 9	0.648 6	0.645 5	1.685 2
4	0.725 2	0.705 8	0.736 2	0.761 4	0.795 0	0.744 7	4.639 3
5	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0
6	0.245 6	0.199 7	0.208 9	0.190 2	0.235 9	0.216 0	10.986 7
7	0.332 5	0.312 7	0.294 7	0.276 4	0.309 7	0.305 2	6.874 1
8	0.485 2	0.432 1	0.441 0	0.477 9	0.464 6	0.460 1	4.998 0

2.5 血清指纹图谱相似度的计算 选取色谱图中的 8 个峰, 由色谱工作站辅助自动进行峰匹配, 确定共有指纹峰 8 个, 以 8 个共有峰峰面积的均值作为

模板, 利用“相关系数”法计算指纹图谱的相似度, 计算的相似度结果均在 0.90 以上。

表 2 5 批血清样品色谱指纹峰共有峰相对保留时间

No.	相对保留时间					平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5		
1	0.392 3	0.391 5	0.392 1	0.391 8	0.391 8	0.391 9	0.078 6
2	0.875 4	0.875 1	0.874 9	0.875 2	0.875 2	0.875 1	0.020 8
3	0.907 8	0.907 2	0.907 8	0.907 8	0.907 6	0.907 6	0.028 8
4	0.946 0	0.946 0	0.945 8	0.945 9	0.945 9	0.945 9	0.010 5
5	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0
6	1.157 9	1.157 7	1.157 7	1.157 7	1.157 8	1.157 4	0.069 1
7	1.264 7	1.262 3	1.263 6	1.259 3	1.257 9	1.261 5	0.229 8
8	1.422 2	1.464 5	1.464 8	1.464 8	1.464 6	1.464 1	0.076 0

3 穿山龙药材提取液的色谱图

药材供试品的制备同 2.2, 色谱条件同 2.1, 测定色谱图见图 2, 找出比较稳定的色谱峰共 21 个。

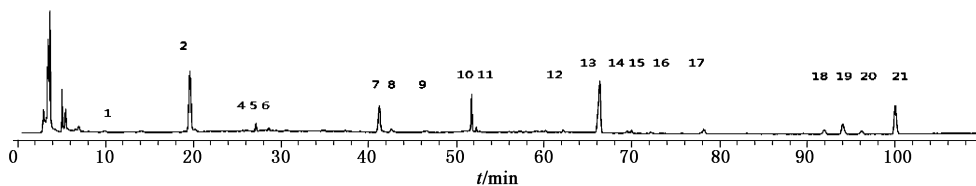


图 2 穿山龙药材提取液色谱图

4 结论

本实验建立了穿山龙给药后大鼠血清色谱指纹图谱, 各共有峰的相对峰保留时间在 3% 以内, 相对峰面积的 RSD 在 11% 以内, 计算结果的相似度都在 0.90 以上, 表明样品相对稳定, 指纹图谱间相似度良好, 说明本实验方法稳定。

血清指纹图中各共有峰相对峰面积的 RSD 较大, 最高达到了 10.986 7%, 这也客观的反映出, 实验中引入的由实验动物个体差异而造成的误差是不可避免的。

由血清色谱图可见, 8 个共有峰都是空白血清中没有的峰, 因此可以推断穿山龙醇提取液给药后产生了 8 个血中移行成分。根据与穿山龙体外图谱对照, 可以推测 1, 2, 4, 5, 7 号峰分别为穿山龙药材所含原型成分直接入血, 分别对应 6, 12, 13, 15, 18 号峰; 推测 3, 6, 8 号峰为穿山龙所含成分在大鼠体

内代谢而产生的代谢产物。

[参考文献]

- [1] 徐国钧. 中国药材学(七)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 668.
- [2] 谢宗万, 余友琴. 全国中草药名鉴(上)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [3] 舒艳, 陈海峰, 王光辉, 等. 穿山龙薯蓣化学成分的研究[J]. 中草药, 2006, 37(增): 190.
- [4] 何宝俊, 刘振庸, 金光石, 等. 穿山龙水溶性有效成分的研究[J]. 药学学报, 1980, 15(12): 764.
- [5] Cheng Y Y, Chen M J, Wu Y J. Measures for determination the similarity of chemical fingerprint and a method of evaluating the measures[J]. Acta Chem Sin, 2002, 60(11): 2017.

[责任编辑 顾雪竹]