

延胡索药材 HPLC 指纹图谱研究

程 林 浦锦宝 郑军献 梁卫青 胡轶娟 魏克民

摘要 目的 应用 RP-HPLC 建立延胡索的指纹图谱。方法 Thermo hypersil GOLD C₁₈ (250.0mm × 4.6mm, 粒径 5.0μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (pH5.0) 梯度洗脱, 流速 1.0ml/min, 检测波长为 280nm, 柱温 30℃, 记录时间: 108min。结果 获得了该药材的 HPLC 指纹图谱, 含有共有峰 23 个。结论 本方法样品处理简便, 重复性好, 可用于延胡索药材的质量控制。

关键词 延胡索 HPLC 指纹图谱

HPLC Fingerprint of *Corydalis yanhusuo*. Cheng Lin, Pu Jinbao, Zheng Junxian, Liang Weiqing, Hu Yijuan, Wei Kemin. Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengjiang 310007, China

Abstract Objective To establish the HPLC fingerprint of *Corydalis yanhusuo*. **Methods** Thermo hypersil GOLD C₁₈ (250mm × 4.6mm, 5.0μm) was used with the mobile phase methanol and 0.1% phosphoric acid (pH5.0). Flow rate was at 1.0ml/min; detecting wavelength was at 280nm; temperature was at 30℃ and the chromatography was recorded in 108 minutes. **Results** HPLC-fingerprint of *Corydalis yanhusuo* was established, which contained 23 common peaks. **Conclusion** The method can be used as a quality control method for *Corydalis yanhusuo*.

Key words *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang; HPLC; Fingerprint

延胡索为罂粟科紫堇属植物延胡索 (*corydalis yanhusuo* W. T. Wang) 的干燥块茎, 具有活血、利气、止痛的功效, 用于治疗胸肋、脘腹疼痛, 经闭痛经, 产后瘀阻, 跌打肿痛等症^[1,2]。延胡索含多种生物碱, 其中以延胡索甲、乙、丙素 (原阿片碱) 等为其主要成分^[3]。延胡索为著名的浙八味之一, 主产浙江省东阳、磐安一带, 本文参考相关文献^[4~11]对延胡索药材的指纹图谱进行了研究。

材料与方 法

1. 实验材料: Varian 高效液相色谱系统 (Prostar 230, 330, 410), BP 211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司), 色谱纯甲醇 (Merck), 高纯水, 其余试剂为分析纯。延胡索乙素购于中国药品生物制品检定所 (批号为 110726-201011)。13 批药材作为供试品 1~13 号, 其来源依次为: 浙江磐安新渥镇新渥村下坞、浙江磐安新渥镇新渥村方岗岭、浙江仙居田市、浙江磐安安文镇胡村下百称、浙江磐安深泽乡上岭头、浙江磐安安文镇王隐坑村、浙江磐安安文镇胡村上门、浙江磐安安文镇王隐坑村、陕西佛平县、陕西汉中城固县、陕西汉中城固县、陕西汉中城固县、浙江磐安深泽乡上亨塘村。

2. 实验方法: (1) 标准品溶液制备: 延胡索乙素对照品溶

液 0.300mg/ml, 与 4℃ 冰箱保存。(2) 供试品溶液制备: 取延胡索生品粉末约 0.5g, 精密称定, 置平底烧瓶中, 精密加入浓氨: 甲醇 (1: 20) 30ml, 称定重量, 冷浸 1h 后, 加热回流 1h, 放冷称重, 用浓氨: 甲醇 (1: 20) 补足重量, 摇匀, 滤过, 精密吸取续滤液 20ml, 蒸干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 10ml 量瓶中, 并稀释至刻度, 摇匀, 微孔滤膜 (0.45μmol/L) 过滤即得。(3) 层析条件: 层析柱: Thermo hypersil GOLD C₁₈ (250mm × 4.6mm, 粒径 5.0μm); 流动相: A 相 (甲醇), B 相 (0.1% 磷酸水 pH5.0); 梯度洗脱程序见表 1。进样体积 15μl, 柱温 30℃, 检测波长 280nm。(4) 方法学考察: ① 对照试验: 取延胡索乙素对照品溶液, 进样 5μl, 记录层析图, 结果见图 1; ② 精密度试验: 取同一供试品溶液 (1 号样品), 连续进样 5 次, 记录层析图, 经中药层析指纹图谱相似度评价系统评价后, 相似度 > 0.95, 表明仪器精密度良好; ③ 重现性试验: 取同一批样品 (1 号样品) 5 份, 分别按供试品溶液的制备方法制备供试品并进行测定, 经中药层析指纹图谱相似度评价系统评价后, 相似度 > 0.95, 表明重现性良好; ④ 稳定性试验: 取同一供试品溶液 (1 号样品), 分别在 0、2、4、6、8、12、24h 进样, 记录层析图, 经中药层析指纹图谱相似度评价系统评价后, 相似度 > 0.95, 表明供试品溶液在 24h 内稳定。

表 1 流动相梯度洗脱程序 (%)

流动相	时间					
	0min	25min	55min	58min	103min	105min
A 相	15	30	40	46	75	80
B 相	85	70	60	54	25	20

基金项目: 浙江省科技厅重大科技专项重点社会发展项目基金资助项目 (2009C13030); 浙江省科技厅科研院所专项基金资助项目 (2010F10033)

作者单位: 310007 杭州, 浙江省中医药研究院

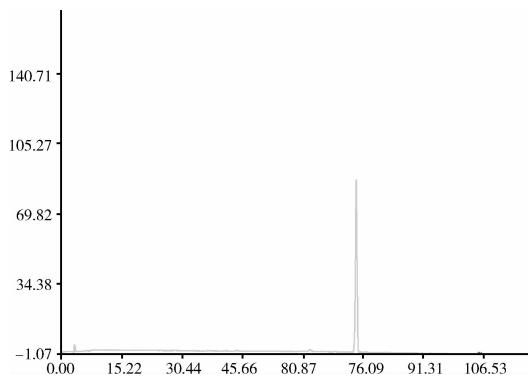


图1 延胡索乙素的层析图

结 果

1. 指纹图谱的测定:13批延胡索药材按上述实验方法制成供试品溶液,在上述层析条件下,分别进样并记录108min层析图。

2. 共有峰的标定:108min内共有23个主要特征峰,且均为共有峰,2号样品的层析图见图2。13批延胡索药材指纹图谱匹配后的图谱见图3。其中19号峰为延胡索乙素,由于14号峰含量最高且比较稳定,故将其作为参比峰(S),计算其他各特征峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表2和表3。13批延胡索药材层析图中非共有峰面积占总峰面积的百分比<6%,符合指纹图谱技术要求。

3. 相似度评价:运用“中药层析指纹图谱相似度

评价系统(2004A版)”软件,计算13批延胡索药材的相似度,结果见表5。除13号延胡索药材的相似度为0.926外,其余12批样品色谱图与对照指纹图谱的相似度均>0.95。

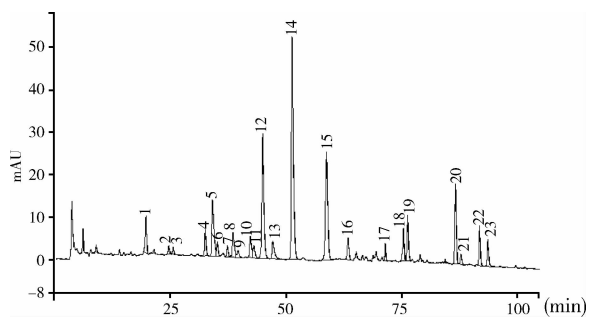


图2 元胡药材生品指纹图谱(2号样品)

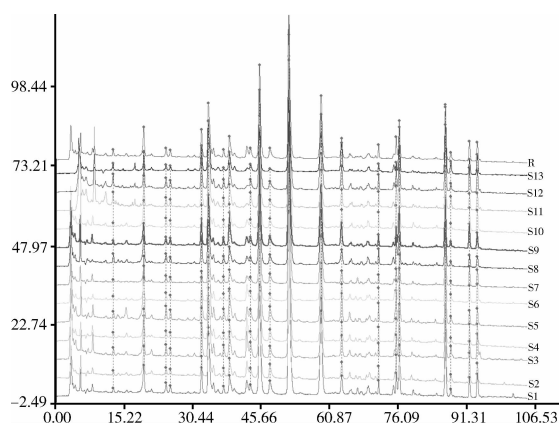


图3 13批元胡药材指纹图谱

表2 元胡药材 HPLC 指纹图谱共有峰的相对保留时间

峰号	样品													RSD(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	0.378	0.382	0.371	0.383	0.371	0.371	0.375	0.381	0.375	0.373	0.377	0.377	0.377	1.08
2	0.473	0.479	0.466	0.478	0.467	0.470	0.472	0.477	0.470	0.468	0.473	0.473	0.473	0.87
3	0.492	0.497	0.485	0.497	0.486	0.490	0.491	0.495	0.488	0.486	0.491	0.492	0.491	0.82
4	0.627	0.633	0.620	0.631	0.622	0.625	0.625	0.628	0.621	0.618	0.622	0.625	0.621	0.69
5	0.657	0.663	0.648	0.660	0.655	0.650	0.657	0.658	0.651	0.647	0.652	0.655	0.649	0.76
6	0.679	0.684	0.671	0.681	0.674	0.676	0.679	0.679	0.672	0.669	0.673	0.677	0.672	0.66
7	0.723	0.727	0.716	0.723	0.718	0.720	0.723	0.722	0.717	0.714	0.716	0.721	0.716	0.53
8	0.750	0.750	0.740	0.747	0.741	0.743	0.750	0.749	0.744	0.741	0.741	0.747	0.740	0.55
9	0.770	0.772	0.763	0.769	0.764	0.765	0.770	0.769	0.765	0.762	0.763	0.768	0.761	0.46
10	0.823	0.823	0.817	0.820	0.817	0.818	0.829	0.823	0.820	0.818	0.817	0.827	0.816	0.51
11	0.839	0.839	0.833	0.836	0.833	0.834	0.840	0.839	0.837	0.834	0.833	0.838	0.831	0.34
12	0.878	0.876	0.873	0.873	0.872	0.873	0.877	0.876	0.875	0.873	0.873	0.875	0.871	0.24
13	0.920	0.918	0.917	0.917	0.916	0.917	0.921	0.920	0.920	0.918	0.920	0.920	0.920	0.18
14	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
15	1.132	1.146	1.145	1.146	1.153	1.148	1.134	1.135	1.134	1.135	1.128	1.138	1.131	0.68
16	1.219	1.237	1.236	1.235	1.247	1.241	1.218	1.224	1.219	1.224	1.213	1.226	1.218	0.87
17	1.379	1.394	1.396	1.393	1.409	1.401	1.372	1.386	1.378	1.387	1.373	1.384	1.377	0.82
18	1.454	1.472	1.474	1.470	1.489	1.472	1.445	1.462	1.452	1.462	1.446	1.459	1.449	0.88
19	1.465	1.489	1.489	1.487	1.507	1.494	1.458	1.472	1.463	1.472	1.457	1.472	1.462	1.07
20	1.661	1.691	1.691	1.687	1.712	1.696	1.652	1.671	1.659	1.669	1.653	1.669	1.657	1.14
21	1.685	1.714	1.714	1.710	1.734	1.720	1.676	1.695	1.683	1.693	1.676	1.693	1.678	1.11
22	1.765	1.793	1.794	1.789	1.813	1.799	1.754	1.777	1.763	1.774	1.758	1.773	1.759	1.04
23	1.799	1.828	1.829	1.824	1.848	1.834	1.789	1.810	1.797	1.808	1.790	1.808	1.791	1.06

表 3 元胡药材 HPLC 指纹图谱共有峰的相对峰面积

峰号	样品												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.1001	0.1169	0.1287	0.1065	0.2182	0.1106	0.0550	0.1214	0.0670	0.0837	0.1465	0.1295	0.1890
2	0.0340	0.0242	0.0356	0.0236	0.0468	0.0381	0.0291	0.0413	0.0237	0.0253	0.0394	0.0345	0.0461
3	0.0253	0.0182	0.0223	0.0205	0.0331	0.0228	0.0246	0.0248	0.0187	0.0202	0.0249	0.0266	0.0357
4	0.1020	0.0838	0.1269	0.1190	0.1681	0.1340	0.0569	0.1352	0.0982	0.0806	0.2129	0.1264	0.2550
5	0.3569	0.2720	0.3690	0.2964	0.3703	0.3885	0.3400	0.3397	0.2671	0.3102	0.4617	0.3989	0.7087
6	0.0397	0.0451	0.0465	0.0369	0.0503	0.0513	0.0425	0.0416	0.0270	0.0301	0.0379	0.0362	0.0204
7	0.0278	0.0348	0.0420	0.0235	0.0427	0.0292	0.0302	0.0372	0.0273	0.0274	0.0431	0.0352	0.0281
8	0.1018	0.1154	0.1376	0.0949	0.1616	0.0870	0.0867	0.1098	0.1523	0.1062	0.1716	0.1278	0.2735
9	0.0327	0.0362	0.0371	0.0096	0.0368	0.0108	0.0021	0.0111	0.0064	0.0101	0.0357	0.0113	0.0648
10	0.0718	0.0856	0.1234	0.1179	0.0718	0.1213	0.0576	0.0605	0.0436	0.0468	0.0355	0.0213	0.0459
11	0.0457	0.0540	0.0843	0.0481	0.0687	0.0777	0.0406	0.0429	0.0408	0.0428	0.1096	0.0411	0.0922
12	0.5656	0.5432	0.6076	0.5573	0.7085	0.5812	0.5142	0.6262	0.5252	0.4905	0.0645	0.5413	0.6164
13	0.0957	0.0968	0.0748	0.0893	0.0995	0.0661	0.0819	0.0817	0.0658	0.0573	0.0704	0.0570	0.0604
14	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
15	0.5075	0.5534	0.2720	0.4581	0.3778	0.5842	0.5918	0.4552	0.3670	0.4361	0.2776	0.4905	0.6110
16	0.0806	0.0823	0.0894	0.0884	0.1286	0.1051	0.0728	0.0965	0.0958	0.0742	0.0929	0.1043	0.3246
17	0.0338	0.0366	0.0320	0.0376	0.0468	0.0442	0.0307	0.0481	0.0270	0.0359	0.0366	0.0388	0.0441
18	0.0550	0.1020	0.0401	0.0962	0.1263	0.0843	0.0555	0.0895	0.0465	0.0565	0.0710	0.0604	0.0660
19	0.1404	0.1498	0.1613	0.1519	0.1733	0.1824	0.1404	0.1459	0.1361	0.1306	0.1729	0.1582	0.4278
20	0.2447	0.2645	0.1980	0.2397	0.2113	0.3048	0.2647	0.2351	0.1832	0.2075	0.2063	0.2604	0.6623
21	0.0312	0.0367	0.0478	0.0208	0.0347	0.0427	0.0140	0.0195	0.0189	0.0192	0.0565	0.0244	0.1251
22	0.0710	0.1164	0.0618	0.0743	0.0501	0.0849	0.0934	0.0497	0.0815	0.0730	0.0691	0.0863	0.1277
23	0.0897	0.0889	0.0749	0.0864	0.0658	0.1089	0.0858	0.5697	0.0618	0.0759	0.0708	0.0944	0.1797

表 4 13 批元胡药材生品相似度结果

峰号	样品												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	1.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	0.983	1.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	0.949	0.963	1.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	0.994	0.985	0.954	1.000	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	0.959	0.955	0.943	0.967	1.000	—	—	—	—	—	—	—	—
6	0.979	0.993	0.969	0.977	0.944	1.000	—	—	—	—	—	—	—
7	0.993	0.983	0.931	0.987	0.937	0.977	1.000	—	—	—	—	—	—
8	0.994	0.977	0.953	0.993	0.970	0.972	0.981	1.000	—	—	—	—	—
9	0.990	0.976	0.957	0.991	0.965	0.965	0.979	0.991	1.000	—	—	—	—
10	0.993	0.987	0.961	0.991	0.958	0.980	0.986	0.989	0.994	1.000	—	—	—
11	0.941	0.926	0.938	0.940	0.933	0.927	0.920	0.948	0.946	0.943	1.000	—	—
12	0.986	0.977	0.946	0.979	0.950	0.974	0.981	0.980	0.979	0.986	0.967	1.000	—
13	0.918	0.907	0.881	0.906	0.876	0.924	0.911	0.909	0.894	0.904	0.905	0.936	1.000
R	0.995	0.990	0.970	0.994	0.971	0.986	0.985	0.994	0.992	0.995	0.959	0.991	0.926

讨 论

1. 提取溶剂的选择: 分别用浓氨: 甲醇(1:20), 浓氨: 乙醇(1:20), 浓氨: 50% 甲醇(1:20) 3 种提取溶剂对供试品进行提取。经比较, 当提取溶剂为浓氨: 甲醇(1:20) 时, 层析图显示层析峰数较多且层析峰较高, 所以选择浓氨: 甲醇(1:20) 为提取溶剂。

2. 层析柱的选择: 层析柱比较了 YMC - Pack

ODS - A(250.0mm × 4.6mm, 粒径 5.0 μ m) 和 Thermo hypersil GOLD C₁₈(250.0mm × 4.6mm, 粒径 5.0 μ m) 的分离效果, 选择 Thermo hypersil GOLD C₁₈ 柱。

3. 流动相的选择: 流动相 A 相分别选择甲醇和乙腈, 相同洗脱梯度程序下, 经比较, 流动相 A 相为甲醇时, 层析峰分离度良好。流动相 B 相 pH 值分别选择 4.0、5.0、6.0, 经比较, 当 pH 值为 5.0 时, 层析

峰形及分离度较好,所以 B 相 pH 值选择 5.0。

4. 检测波长的选择:经二极管阵列检测器,在 190~400nm 波长检测,得到三维光谱图。结果显示 280nm 层析峰形较好,出峰数目较多,各层析峰之间分离度较好,故选择 280nm 作为检测波长。

5. 相似度评价:从表 5 相似度结果来看,13 批延胡索药材指纹图谱与对照指纹图谱的相似度,除 13 号样品外,其余都高于 0.95,表明该 13 批延胡索样品的共有特征峰基本保留,相似度良好。

本实验建立了延胡索药材的 HPLC 指纹谱的测定方法,实验方法简便,重复性好,得到延胡索药材 HPLC 指纹图谱及相关数据,为延胡索药材及其他含延胡索的中药复方制剂制定质量标准提供参考。

参考文献

1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 130
 2 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志(总论)[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993: 256

3 贺凯, 高建莉, 赵光树. 延胡索化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(12): 1909 - 1912
 4 谢培山. 中药色谱指纹图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 10
 5 周玉新, 等. 中药指纹图谱研究技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002:131
 6 窦志英, 孙巍, 张敏, 等. 陕西产延胡索药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 天津中医药大学学报, 2007, 26(3): 150 - 153
 7 游修琪, 顾雪竹, 毛淑杰, 等. 延胡索产地不同加工品 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2009, 31(10): 1481 - 1484
 8 刘梅汤, 树良, 张文惠. HPLC 色谱指纹图谱鉴别夏天无和延胡索药材[J]. 中药材, 2003, 26(9): 629 - 631
 9 施菁, 王炜, 陈柳蓉. 白花土元胡药材的高效液相色谱法指纹图谱研究[J]. 医药导报, 2008, 27(9): 1108 - 1110
 10 李先端, 马志静, 毛淑杰. 不同品种醋制延胡索指纹图谱的比较研究[J]. 中药材, 2007, 30(2): 144 - 146
 11 程星辉, 石钺. 延胡索抗心肌缺血活性部位指纹图谱中化学成分分析[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(14): 1717 - 1719

(收稿:2011-02-18)

(修回:2011-03-04)

急性髓系白血病干细胞免疫表型和信号通路蛋白活化检测及意义

郑 瑞 陈葆国 千灵红 章卫国

摘要 目的 为了解急性髓系白血病干细胞(AML-LSCs)免疫表型特点和信号转导通路活化状态,以探讨其生物学特征。**方法** 应用流式细胞术检测(AML-LSCs)免疫表型、P-gp、PTEN、p-Akt、p-ERK 的表达,以正常造血干细胞(HSCs)为对照。**结果** 正常 HSCs 主要免疫表型:CD34⁺、CD38⁻、CD123⁻、CD96⁻、CD117⁺、CD44⁺、CD33⁻、CD13⁻。PTEN 蛋白阳性率为 72.09%,p-Akt 及 p-ERK 蛋白均阴性,P-gp 蛋白阴性。AML-LSCs 主要免疫表型:CD123⁺、CD96⁺、CD117⁻、CD44⁺、CD13⁺、CD33⁺,与 HSCs 免疫表型差异主要为 CD123⁺、CD96⁺、CD117⁻、CD13⁺、CD33⁺。LSCs PTEN 蛋白阳性率为 25.58%,低于正常 HSCs($\chi^2 = 30.88, P < 0.01$),p-Akt 阳性率为 63.95%,p-ERK 阳性率为 70.93%,高于正常 HSCs($\chi^2 = 24.43, 30.87, P$ 均 < 0.01)。P-gp 蛋白阳性率为 67.44%。79 例 AML 患者预后分析表明,高 AML-LSCs 的患者较低 AML-LSCs 患者复发率增高($\chi^2 = 5.69, P < 0.05$);无病生存率(DFS)分析显示,高 AML-LSCs 的患者无病生存时间中位数 14 个月,较低 AML-LSCs 患者无病生存时间中位数 28 个月明显缩短($P < 0.01$)。**结论** LSCs 免疫表型特征为 CD34⁺、CD38⁻、CD123⁺、CD96⁺、CD117⁻,P-gp 高表达。AML-LSCs 数量高的 AML 患者复发率高、无病生存时间短、预后差。MEK/ERK, PI₃K/PTEN/Akt 信号通路被激活,可能与 LSCs 克隆性增殖和自我更新有关。

关键词 急性髓系白血病 白血病干细胞 免疫表型 p-Akt p-ERK

Clinical Significance of the Immunophenotype and Signal Transduction Protein in Acute Myeloid Leukemia Leukemic Stem Cells. Zheng Rui, Chen Baoguo, Gan Linghong, Zhang Weiguo. Central Laboratory of Affiliated Taizhou Hospital, Wenzhou Medical College, Zhejiang 317000, China

基金项目:台州市“211 人才工程”基金资助项目[台人专(2009)236 号]

作者单位:317000 临海,温州医学院附属台州医院中心实验室

通讯作者:陈葆国,副主任医师,电子信箱:baoguo.chen@126.com