

小海马 DPPH 自由基清除作用及 HPLC 指纹图谱研究

王虹¹, 陈军辉^{2*}, 王磊磊¹, 张道来², 王小如^{2,3}, 黎先春², 杨东方¹ (1.上海海洋大学生命学院, 上海 200090; 2.国家海洋局第一海洋研究所, 青岛市现代分析技术及中药标准化重点实验室, 山东 青岛 266061; 3.厦门大学化学化工学院化学系, 现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 目的 采用体外 1, 1-二苯基苦基苯肼 (DPPH) 抗氧化模型对海马提取物的抗氧化性质进行评价, 并建立小海马 HPLC 特征指纹图谱, 用于小海马药材的鉴别及质量评价。方法 利用离线 DPPH 抗氧化评价体系对海马不同提取物进行评价, 结果表明, 海马水提取物抗氧化能力最强, 在此基础上又探明了海马水提取物抗氧化能力随时间和浓度的变化规律, 为海马抗氧化活性提供了科学依据。依据抗氧化活性实验结果, 建立了海马水提取物 HPLC 特征指纹图谱分析方法。结果 海马水提取物大部分化合物达到基线分离, 方法的精密性、重现性、稳定性良好; 建立小海马药材 HPLC 指纹图谱, 采用中药指纹图谱相似度计算软件, 对小海马进行真伪鉴别和质量评价。结论 表明该方法简捷、有效, 是小海马药材鉴别及质量控制的有效方法。

关键词: 海马; 抗氧化; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-2494(2009)16-1221-05

Evaluation of DPPH Free Radical Scavenging Capability of *Hippocampus japonicus* Kaup. and Their HPLC Fingerprint

WANG Hong¹, CHEN Jun-hui^{2*}, WANG Lei-lei¹, ZHANG Dao-lai², WANG Xiao-ru^{2,3}, LEE Sen-Chun², YANG Dong-fang¹ (1. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China; 2. Qingdao Key Lab on Analytical Technology Development and Standardization of Chinese Medicine First Institute Oceanography of SOA, Qingdao 266061, China; 3. Department of Chemistry and Key Laboratory of Analytical Science of the MOE, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the antioxidant activity of the extracts of Haima, and to establish the HPLC fingerprint of Haima for the discrimination and the quality evaluation of Haima. **METHODS** Antioxidant properties of Haima extracts with different solvent were assayed in terms of antioxidant activity by scavenging activities on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). The effect of time and concentration of Haima extract on the antioxidant activity was also studied. Secondly, a chromatographic fingerprint method was developed. **RESULTS** The antioxidant activity of water extract of Haima was higher than all the other extracts of Haima. The developed HPLC method was simple, accurate and reliable for the development of Haima fingerprint. Ten Haima samples collected from different medicine store were analyzed and the Haima HPLC fingerprint was established. The similarity of the HPLC chromatogram was performed for authentication and quality control of Haima. **CONCLUSION** The HPLC fingerprinting techniques have high potential in authentication or source-tracing types of applications.

KEY WORDS: Haima; antioxidation; fingerprint; HPLC

海马为名贵海产中药材, 具温肾壮阳、散结消肿、镇静安神之功效。传统中医学理论认为海马主治阳痿、遗尿等病症。近年来国内外研究表明, 海马水、醇提取物具有抗衰老^[1]、抗疲劳作用^[2]。易美华等^[3]报道海马提取物具有油脂抗氧化作用, 因此, 开展海马提取物的抗氧化特性研究具有重要意义。目前尚无利用 1, 1-二苯基苦基苯肼 (DPPH) 自由基清除法研究海洋药物海马的报道, 本实验采用 DPPH 自由基清除抗氧化实验模型^[4-5], 对小海马

提取物的 DPPH 自由基清除能力进行了评价。

《中国药典》2005 年版 (一部) 仅从外观性状方面对海马进行了描述, 尚无确切的真伪鉴别和质量控制方法。董婷霞等^[6]用 HPCE 法对不同来源的海马进行了鉴别分析, 但 HPCE 法存在重现性较差、线性范围窄和灵敏度较低等不足。中药指纹图谱是借助于波谱和色谱等技术获得的中药化学成分的光谱 (或色谱) 图, 它是一种综合的、可量化的鉴别手段, 用于鉴别中药材和中成药的真伪, 评价原料

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (20235020); 青岛市共建生物医药研发测试中心资助项目 (LS-05-KJZX-76)

作者简介: 王虹, 女, 硕士研究生 研究方向: 海洋天然产物化学相关研究 *通讯作者: 陈军辉, 男, 博士, 助理研究员 研究方向: 海洋天然产物化学、中药现代化相关研究 Tel: (0532) 88966705 E-mail: jhchen@fio.org.cn

中国药学杂志 2009 年 8 月第 44 卷第 16 期

Chin Pharm J, 2009 August, Vol. 44 No. 16

• 1221 •

药材、半成品和成品质量的均一性和稳定性^[7]。目前中药指纹图谱已公认为鉴别品种和评价质量的手段之一^[8-10]。因此,开展小海马药材的 HPLC 指纹图谱研究,对有效控制药用海马质量具有一定的意义。

1 材料

1.1 试剂

DPPH(95%, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), 咖啡酸 (99%, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), 海马、海龙等海洋生物样品为市售,均经过国家海洋局第一研究所黎先春教授鉴定。甲醇、乙腈、乙酸、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪 2 台,配有四元泵, DAD 检测器,自动进样器,手动进样器等(美国 Agilent 公司); G1969A 型电喷雾飞行时间质谱仪,配有电喷雾离子源(美国 Agilent 公司); KQ-400KDE 型高功率数控超声波仪(昆山市超声仪器有限公司); R201 型旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); FA1104 型电子天平(上海精天电子仪器厂); 加速溶剂萃取仪 (ASE100) 配带 34 mL 萃取池(美国 Dionex 公司)。

2 方法

2.1 DPPH 和咖啡酸溶液及供试品溶液的配制

2.1.1 DPPH 和咖啡酸溶液的配制 精密称量 DPPH 标准品,溶解配制成 $6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲醇溶液。由于 DPPH 溶液的吸光值随温度变化较大,因此将配制好的 DPPH 溶液立即置于冰箱中 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用时再以无水甲醇稀释成不同浓度溶液,同法配制 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的咖啡酸的甲醇溶液。

2.1.2 海马 DPPH 自由基清除实验样品的制备 将供试样品干燥粉碎,精密称取样品 0.5 g ,置于 100 mL 具塞锥形瓶,加入 50 mL 提取溶剂(水,甲醇,正丁醇,乙酸乙酯,三氯甲烷),于室温条件下超声辅助提取 25 min ,过滤提取液,将滤液在 $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行旋转蒸发浓缩至干,用甲醇溶解提取物并定容至 10 mL ,过 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.1.3 海马指纹图谱实验样品的制备 准确称取海马样品(20~40目) 1.0 g ,置于 ASE100 萃取池中,萃取池底部提前加入过滤膜,将萃取池放在萃

取池固定装置上,关闭萃取池门。设定 ASE100 提取方法参数:以水为提取溶剂, $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下静态提取 10 min ,60%的冲洗体积,循环提 2 次。启动快速溶剂萃取仪,提取完成后自动停止,取提取液在 $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下旋转蒸发浓缩至约 10 mL ,将浓缩液用 70% 乙醇定容至 50 mL ,置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱醇沉 2 h 取出,过滤,滤液旋转蒸发浓缩至乙醇挥净,用超纯水定容于 25 mL 量瓶,过 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.2 海马提取物的 DPPH 自由基清除实验

采用高效液相色谱法(不接色谱柱)代替紫外分光光度计,手动进样方式,以色谱纯甲醇作为流动相,流速 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,室温,紫外检测波长 517 nm ,进样量为 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 。海马提取物样品溶液,与相应体积的 DPPH 溶液迅速均匀混合,然后进 HPLC 仪器进行测定,以同体积的甲醇作为试剂空白,通过 DPPH 色谱峰面积的减小值来评价提取物的 DPPH 自由基清除作用。

2.3 小海马 HPLC 指纹图谱工作条件

Alltima C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$, Alltech),流动相 A: 0.1% 乙酸水溶液-B: 甲醇组成,流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,室温,检测波长为 254 nm ,带宽 16 nm ,进样量为 $20 \text{ }\mu\text{L}$,梯度洗脱程序为: 0~10 min,甲醇由 0 增加到 5%, 10~30 min 甲醇由 5% 增加到 50%, 30~40 min 甲醇为 50%~50%, 40~50 min 甲醇由 50% 增加到 100%。

2.4 质谱工作条件

ESI-TOF/MS 工作条件: 正离子电离模式,毛细管电压 $4 \text{ } 500 \text{ V}$,喷雾气压 310.27 kPa ,干燥气 (N_2) 流速 $12 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,干燥气温度 $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$,破碎电压 100 V ,实验过程采用质荷比 (m/z) $121.050 \text{ } 9$, $922.009 \text{ } 8$ 为参比离子对测定结果进行时时校正,以保证结果的准确性,分辨率 m/z 在 $922.009 \text{ } 8$ 处为 $11 \text{ } 300$,全扫描 m/z 范围为 $120 \sim 1 \text{ } 000$ 。

3 结果与讨论

3.1 海马提取物 DPPH 自由基清除作用

3.1.1 海马不同溶剂提取液对 DPPH 自由基清除作用的比较 按“2.1.2”供试品溶液制备方法,使用 5 种不同提取溶剂(水、甲醇、正丁醇、乙酸乙酯、三氯甲烷)制备海马提取物;所得海马不同溶剂提取物溶液,按“2.2”项下条件进样分析,以同体积甲醇作为空白溶液, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 咖啡酸甲醇溶液作为阳性对照物, 1 min 进样 1 次,连续测定 3 次,

以测得色谱峰峰面积评价不同提取物的 DPPH 自由基清除能力, 峰面积越小 DPPH 清除率越高, 所得结果见图 1, 从图 1 可以看出用水作提取溶剂, 海马提取物 DPPH 自由基清除能力最强, 其次是甲醇提取物, 正丁醇、三氯甲烷、乙酸乙酯提取物的 DPPH 自由基清除能力差别不大, 说明海马中具有潜在抗氧化作用的成分为极性较大的水溶性物质, 与文献^[5]的研究结果一致。

3.1.2 海马水提物 DPPH 自由基清除量效关系 使用 5 种不同用量的小海马水提取物溶液 (15, 35, 55, 85, 100 μL) 与 100 μL 的 DPPH 溶液迅速均匀混合, 并用甲醇定容至 200 μL , 按“2.2”项下的实验方法进样分析, 实验结果表明, 随着小海马提取物用量增大, 对 DPPH 自由基的清除率也越高, 计算线性回归方程和相关系数 ($Y=99.998-0.698X$, $r^2=0.960$) 可以看出, 小海马水提取物用量与 DPPH 自由基清除作用基本正相关。

3.1.3 海马水提物清除 DPPH 自由基反应动力学

将海马水提物溶液与 DPPH 溶液按体积 1:1 迅速混合(以等体积的甲醇溶液作为空白), 按“2.2”项下实验条件进样测定, 前 1~5 min 每分钟测定 1 次, 6~30 min 每 5 min 测定 1 次, 31~80 min 每 10 min 测定 1 次, 结果见图 2, 由图谱中 DPPH 自由基清除率曲线图可知, 随时间增加, 海马提取物的 DPPH 自由基清除量逐渐增加, 在前 15 min 清除速度较快, 15 min 以后海马提取物中抗氧化成分与 DPPH 自由基反应速度明显减缓。

3.2 指纹图谱样品溶液制备方法优化

本实验采用“2.3”色谱条件, 对海马不同溶剂(水、甲醇、正丁醇、乙酸乙酯、三氯甲烷)提取物溶液进行分析, 以正丁醇, 甲醇, 乙酸乙酯及三氯甲烷为提取溶剂时, 色谱峰分离效果差, 出峰数量少且各峰响应值较低, 基线不平稳; 而用水作提取溶剂时, 所得色谱图色谱峰较多、各峰分离度好、基线平稳; “3.1”项下抗氧化实验证明海马的抗氧化

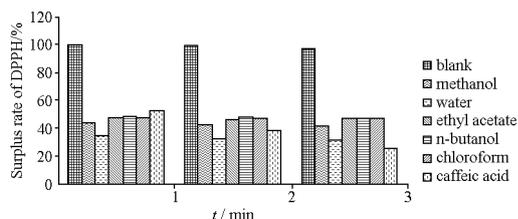


图 1 海马不同提取溶剂提取液 DPPH 自由基清除能力比较
Fig.1 Evaluation of DPPH free radical scavenging capability of Haima extracts with different solvents

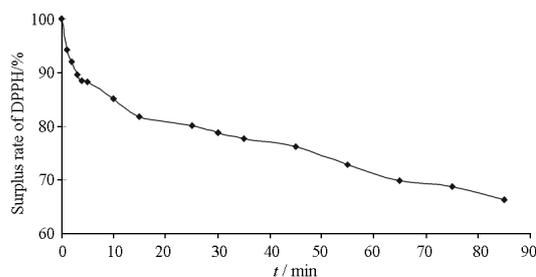


图 2 海马水提物溶液 85 min 内清除 DPPH 自由基的反应动力学

Fig.2 Kinetics of DPPH free radical scavenging by water extract of Haima in eighty-five minutes

化活性成分主要集中在水提取物中, 因此选择水作为海马指纹图谱样品提取溶剂, 所得到的指纹图谱即有明显的指纹特征, 又能反映海马的活性功能。

本实验同时比较了加速溶剂萃取法和超声辅助提取法对样品进行提取的效果, 结果显示, 加速溶剂萃取法较超声辅助提取法提取效率高、自动化程度高、节省时间和提取溶剂, 因此选择加速溶剂萃取法用于后续样品提取。

3.3 HPLC 条件优化

根据文献^[11-14]报道, 海马成分复杂含有丰富的脂肪酸、蛋白质、氨基酸和微量元素等, 采用等度洗脱的方法很难将这些成分分离开, 因此采用梯度洗脱的方式进行分离。实验比较了 C_8 和 C_{18} 二种色谱柱的分离效果, 结果表明, 使用 C_{18} 色谱柱获得的色谱指纹图谱各峰分离度高, 色谱峰分布均匀, 峰型好看, 谱图信息量大, 特征性强, 具有较好的代表性, 因此选择 C_{18} 柱用于海马等药材的指纹图谱研究。采用二极管阵列检测器通过全波段扫描, 考察了不同检测波长对指纹图谱的影响, 结果表明, 在 254 nm 下检测到的色谱指纹图谱信息量大, 特征性强, 具有较好的代表性, 因此选择 254 nm 为海马等药材 HPLC 指纹图谱研究的检测波长。

通过对比用甲醇和乙腈做流动相 B 的高效液相图谱, 可知二者得到的图谱分离效果差别不显著, 因此在本实验中选择低毒, 价格相对便宜的甲醇做流动相。本实验还对不同浓度的乙酸和磷酸对分离的影响进行了考察, 实验结果表明, 磷酸作流动相 A 分离效果不好, 且基线不平; 采用 0.05% 的乙酸较 0.1% 的乙酸作流动相 A, 信号响应值低, 最终确定采用 0.1% 乙酸水溶液做流动相 A。此外, 实验中对不同柱温进行了比较, 从实验结果可以看出随温度升高, 出峰时间加快, 但温度过高时分离度下降, 综合比较可知, 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下各峰分离效果最令人满意。

3.4 方法学考察

3.4.1 精密度 按“2.3”项下 HPLC 工作条件,对同一供试品溶液重复进样 6 次测定,分别测得其中 3 个主峰的峰面积和保留时间,分别计算其相对标准偏差 (RSD)。3 个主峰峰面积和保留时间 RSD 值在 0.93%~2.43% 和 0.49%~1.00% 之内,表明仪器精密度良好。

3.4.2 重现性 精密称取同一样品 5 份,按“2.1.3”项下处理方法制成供试品溶液,按照“2.3”项下的 HPLC 工作条件进样测定,测得 3 个主峰的峰面积和保留时间,并计算其相对标准偏差,3 个主峰面积和保留时间的 RSD 值分别为 2.76%~4.80% 和 0.78%~1.01%,表明该方法重现性良好。

3.4.3 稳定性 将供试品溶液按照“2.3”项下 HPLC 工作条件,分别在 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 h 进样测定,结果显示,供试品溶液中小海马提取物溶液的峰面积和保留时间无明显变化,3 个主峰面积和保留时间的 RSD 值分别在 2.67%~4.90% 和 1.59%~2.19% 内,说明供试品溶液在 48 h 内化学性质稳定。

3.5 海洋药物小海马指纹图谱的建立

取 10 批不同的小海马样品,按“2.1.3”项下处理方法将其制备成供试品溶液,按“2.3”项下 HPLC 色谱条件进样分析,记录色谱图,建立小海马样品的 HPLC 指纹图谱,10 批小海马样品的色谱图见图 3。然后进行色谱图积分获得各色谱峰保留时间、峰面积等信息,再根据分析时的基线噪声水平,将信噪比小于 10 的色谱峰除去不作计算。在本实验所建立的分析系统下,海马水提物成分出峰时间均在 35 min 之前,主要有 12 个色谱峰,这 12 个色谱峰即构成海马指纹图谱的指纹特征,也是鉴别真伪、评价海马质量的主要变量。为了消除系统误差,本实验采用相对保留时间和相对峰面积进行计算,计算结果表明,各小海马样品的谱图中各峰出峰时间的相对标准偏差很小,但是峰面积相差较大,说明各样品中的化学成分种类差异不大,而各成分的含量差别较大,推测可能是由于小海马中的化学成分受各产地生长环境影响较大造成的。

指纹图谱反映的是样品的整体特征,但是单纯的直观比较指纹图谱的峰的多少和峰的大小,带有个人的主观性,难以获得客观的评价结果。相似度分析可以定量的描述比较指纹图谱,可以客观的对样品进行评价^[15]。本实验采用“中药指纹图谱相似度计算软件”^[16],对 10 批不同供试样品指纹图谱

的相似性进行计算,结果表明,10 批小海马中只有 10 号样品(相似度为 0.68)和 8 号样品(相似度为 0.88)的相似度值低于 0.90,其他 8 批样品的相似度值均在 0.93 以上,说明只有 2 批海马样品的质量差别较大。

为了探讨采用海马指纹图谱辨别海马真伪的可行性,本实验采用“2.1.3”供试品处理方法,对另外 4 种常见海洋药物样品进行处理,按“2.3”项下 HPLC 方法进样分析,得到各样品的 HPLC 指纹图谱,结果见图 4,由图 4 可知,小海马指纹图谱与海燕和海龙、海狗样品指纹图谱差异显著,但与大海马指纹图谱有一定的相似性,采用相似度计算软件,按小海马指纹图谱相似度计算方法进行计算,结果表明,大海马和小海马的相似度仅为 0.58,说明本实验建立的小海马 HPLC 指纹图谱结合相似度计算可以用于小海马的真伪鉴别及质量评价。

对 10 批海马共有峰中 3 个较高的峰(图 4 中的 1, 2, 3 号峰),进行高效液相色谱-电喷雾飞行

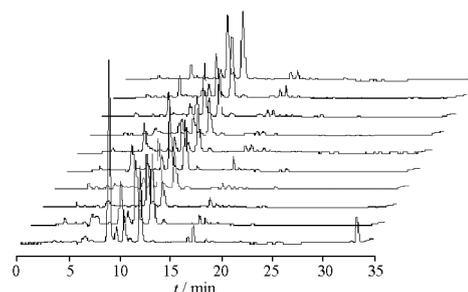


图 3 不同海马样品 HPLC 指纹图谱. $n=10$
Fig.3 HPLC Fingerprints of different Haima samples. $n=10$

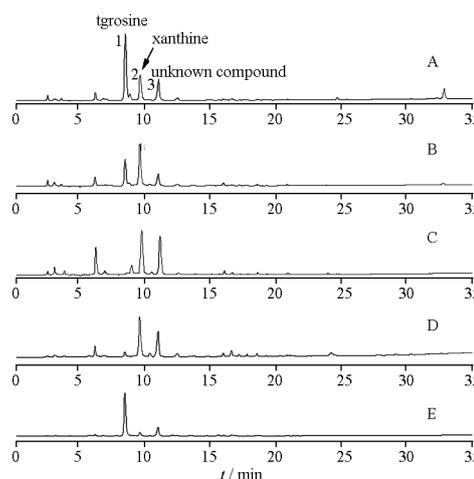


图 4 不同海洋药物指纹图谱
A-小海马; B-大海马; C-海龙; D-海狗; E-海燕
Fig.4 HPLC Fingerprints of different marine drugs
A-Hippocampus japonicus Kat; B-Hippocampuskuda Bleeker; C-Syngnathusacus Linnaens; D-Harp seal; E-Asterinapectinifera

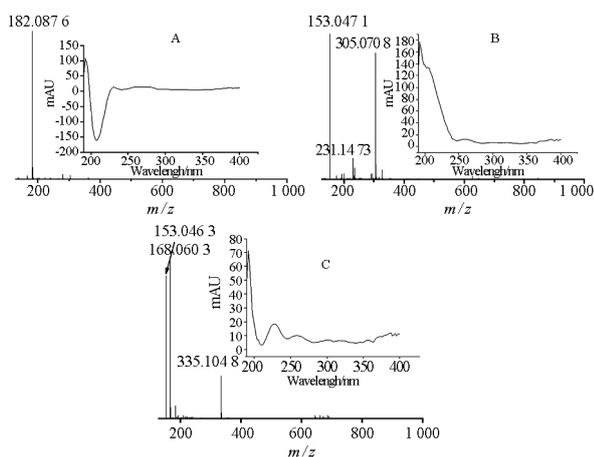


图5 海马药材中3个主峰化合物的质谱图和紫外光谱图

A-酪氨酸; B-黄嘌呤; C-未知化合物

Fig.5 Mass spectra and UV spectra of 3 compounds in Haima
A-tyrosine; B-xanthine; C-unknown compound

时间质谱联用分析,得到3个待测组分的质谱图及紫外光谱图,见图5(图5A, B, C分别对应1, 2, 3号峰)所示,查阅海马化学成分研究的相关文献和中国科学院上海有机化学研究所中药与有效成分数据库,发现1号峰为酪氨酸、2号峰为黄嘌呤、3号峰可能为没有文献报道的新化合物。

4 结论

小海马不同溶剂提取物均具有一定的清除DPPH自由基的作用,不同溶剂提取物的抗氧化活性强弱为:水>甲醇>乙酸乙酯>氯仿>正丁醇,小海马水提物的DPPH自由基清除作用明显强于其他溶剂提取物,并且提取物用量与DPPH自由基清除作用正相关,说明小海马水提取物可以作为潜在的抗氧化剂用作抗衰老药物或食品的保鲜剂。

本实验在小海马提取物抗氧化活性研究指导下,发展了小海马药材液相色谱指纹图谱分析方法,在拟定的色谱条件下,小海马水提取物中的各类化合物分离良好,且方法的精密度、重现性、稳定性实验结果令人满意,可以用于海马不同批次样品指纹图谱的构建。根据不同批次小海马药材的指纹图谱特征,结合相似度分析,可以成功实现小海马药材的真伪鉴别,亦能区分质量差异明显的小海马样品。

REFERENCES

- [1] ZHANG Z, XU G J, XU L S, *et al.* Inhibitory effects of *Hippocampus* SPP. Extracts on L-Glutamic acid induced Ca^{2+} influx in rats' neurons [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 1994, 13(4): 6-9.
- [2] WANG Q, ZHANG C, ZANG X X, *et al.* Chemical studies on *Hippocampus histrix* Kaup [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 29(1): 24-25.
- [3] YI M H, LI G Q, XIAO H, *et al.* Study on the antioxidative activities of extracts of *Hippocampus trimaculatus* Leach and *Syngnathus* on fat and oil [J]. *China Trop Med* (中国热带医学), 2006, 6(10): 1784-1785.
- [4] MELLORS A, TAPPEL A L. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol [J]. *J Biol Chem*, 1996, 241(19):4353.
- [5] XU S. Study on antioxidative effect of *Pelargonium hortorum* Bailey [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2000, 35(1): 234-236.
- [6] DONG T X, LU Z Q, ZHAN H Q. The identification of *Hippocampus* by HPCE [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2001, 24(5): 328-329.
- [7] XIE P S. The development trend of quality control mode for traditional Chinese medicine [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*(中药新药与临床药理), 2001, 12(3):188-188.
- [8] OMAR F P, NOVO M, MASA A. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1094(1-2): 34-41.
- [9] SPRINGFIELD E P, EAGLESA P K F, SCOTT G. Quality assessment of south African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 101(1-3):75-83.
- [10] ABOURASHED E A, GANZERA M, Khan I A, *et al.* Fingerprinting and estimation of the bioactive components of *Clutia richardiana* L. as a potential hypoglycemic herbal tea [J]. *Phytother Res*, 2003(17): 657-660.
- [11] YUE X J, YANG T W, WEI B H. Analysis of fatty acids in *Hippocampus* and *Syngnathus* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 1996, 21(2): 105-106.
- [12] YUE X J, YANG T W, WEI B H. Comparison of the contents of amino acid and trace element in *Hippocampus* and *Syngnathus* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1996, 7(1): 18.
- [13] ZHANG Z, XU G J, XU L S, *et al.* Chemical study on *Syngnathus acus* L [J]. *J Nanjing Mil Med Coll* (南京军医学院学报), 1997,19(1): 1-5.
- [14] ZHANG Z H, XU G J, XU L S, *et al.* Physical and chemical analysis of medicinal animals of *Syngnathidae* [J]. *Chin Med Mat* (中药材), 1997, 20(3): 140-144.
- [15] ZHANG K R, BI K S. Identification on white peony roots fingerprint patterns and similarity degree of different fingerprint patterns [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2004, 29(4): 380-381.
- [16] LIU Y S, MENG Q H, JIANG S M, *et al.* Similarity system theory to evaluate similarity of chromatographic fingerprints of traditional chinese medicine [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2005, 23(2): 158-163.

(收稿日期: 2008-10-05)

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告