

2.1.2 BA浓度对不定芽的影响:在2,5,6号培养基中KT NAA浓度相同,BA浓度不同。培养结果显示:BA为1.0 mg/L时分化率和平均出芽数都是最高的,BA浓度高于或低于1.0 mg/L都会抑制不定芽的产生和生长。

综合BA和NAA对不定芽诱导和生长的影响,3号培养基是最适宜的培养基。不仅不定芽诱导率高,而且平均出芽数最多、生长也最好。

2.2 继代培养:培养2周后,芽苗基部膨大并长出许多绿色小芽,30 d后,芽丛增殖4~6倍。增殖的芽丛可切成小簇继续增殖培养;也可将芽苗的较大叶片切下培养,再次诱导其产生不定芽,从而达到扩大增殖倍率的目的。

2.3 芽的伸长和生根培养:经增殖培养后的丛生芽高生长缓慢,几乎没有茎段,需进行芽的伸长培养。在MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L的培养基上培养1周后,丛生芽快速伸长,20 d后可达8 cm左右。将伸长后的芽苗接种生根培养基上,可诱导出根,形成完整植株。从表2可看出,不同培养基上的生根时间、生根率、平均生根数有差异。其中不加激素的1/2MS培养基上第7天即开始长根,20 d后的生根率达100%,平均生根数为5.3,是最佳生根培养基;添加0.2 mg/L NAA的1/2MS培养基上的芽苗第10天开始长根,20 d后的生根率为75%,平均生根数为3.3。添加0.5% IBA的1/2MS培养基上的芽苗始终没有长根。

2.4 炼苗移栽:据初步统计,乌头移栽后的成活率可达80%。乌头试管苗的叶片很薄,极易失火而死亡,因此在练苗移栽过程中保持较高的空气湿度和适宜的温度是提高成活率的关键所在。

3 讨论

胡延玉等在乌头的组织培养中采用的培养基,需加入维生素B₆、维生素B₁₂、烟酸、肌醇、生物素、腺嘌呤、泛酸钙、胱氨酸、酪蛋白水解物等多种有机物,成本较高。而采用MS培养基作为基本培养,并配以适当的激素进行乌头的组织培养,也可使植株再生,从而降低了成本。

林静等用带叶腋的茎段作为外植体进行培养,增殖率仅为1,繁殖系数低,不能满足快速繁殖的需要;并且所用乌头的叶片作为外植体进行培养,诱导出了愈伤组织,但没有分化出芽。而本次实验以无菌叶片为外植体,配以适当的激素配比,直接诱导不定芽的产生并得到生根植株。这种方法不仅外植体来源丰富,且增殖倍率高,有利于乌头的工厂化育苗;同时也为乌头的多倍体育种、基因工程研究提供了依据。

References

- [1] The Flower Teaching Section of Landscape Architect Department, Beijing Forest University. *Flower Science* (花卉学) [M]. Beijing: China Forest Press, 1990.
- [2] Hu Y Y, Wu G Q. Tissue culture and regeneration of *Aconitum carmichaeli* Debx. [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1985(5): 37-40.
- [3] Lin J, He Y. Investigation of tissue culture of *Aconitum carmichaeli* Debx. and its rapid propagation [J]. *Guizhou Sci* (贵州科学), 1998, 16(2): 120-123.

黄连的毛细管电泳特征指纹图谱研究

魏英勤,袁久荣,闫滨*

(山东中医药大学中药学院,山东 济南 250014)

摘要:目的 建立黄连的高效毛细管电泳指纹图谱。方法 采用毛细管电泳考察了不同批药材季铵碱的保留时间和峰面积的相关性,并以小檗碱作为参照物计算了各色谱峰的相对保留时间和峰面积比值。结果 不同批号的黄连样品色谱组分的保留时间和峰面积的相关系数均大于0.999 0。结论 建立的黄连高效毛细管电泳指纹图谱稳定、可靠,可作为黄连的特征指纹图谱。

关键词:黄连;毛细管电泳;指纹图谱

中图分类号:R282.710.3

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2003)06-0563-03

Study on fingerprint spectrum of *Coptis chinensis* by HPCE

WEI Ying-qin, YUAN Ju-rong, YAN Bin

* 收稿日期:2002-09-06

作者简介:魏英勤(1971-),男,山东郯城人,山东中医药大学2000级博士,研究方向为中药及复方活性成分与质量控制。
Tel (0531) 2612433, 2612425 E-mail wyqsdu@sina.com

(College of Chinese Materia Medica, Shandong University of TCM , Jinan 250014, China)

Abstract Object To establish the fingerprint spectrum of *Coptis chinensis* Franch. by HPLC. **Methods** The correlation relativity of retention time and peak area of each chromatographic peak in different batches of medicinal materials were explored respectively, and beberine was chosen as the reference to calculate the relative retention time and the ratio of peak area for each chromatographic peak. **Results** The correlation coefficients of relative retention time and the ratio of each chromatographic peak were all higher than 0.999 0 in different batches of medicinal materials. **Conclusion** The established fingerprint spectrum is stable and credible, and could be used as characteristic fingerprint spectrum for *C. chinensis*.

Key words *Coptis chinensis* Franch.; HPLC; fingerprint

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎,系名贵中药材,其中黄连习称味连。指纹图谱技术是近年来发展起来的采用色谱或光谱方法对中药材或中成药中共有的、具有特征性的某类或某几类成分进行标示的图谱,目前主要应用于中药的鉴定及质量控制^[1]。高效毛细管电泳 (HPCE)较高效液相色谱分离效率高,对于成分复杂的中药体系分离效果更加理想,更适于中药指纹图谱的检测。本实验利用 HPCE检测了中药黄连的指纹图谱,为黄连中药材的鉴定及其质量控制提供了新的手段,并且采用的直观量化的数据化图谱,为黄连色谱指纹图谱的制作提供了新的思路。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂: P/ACE System 5500 Beckman 毛细管电泳仪 (附紫外检测器),弹性石英毛细管 (50 μm× 50 cm) (河北省永年光纤厂), Beckman P/ACE Station, PHS-3B型酸度计 (上海精密仪器有限公司);黄连 (味连) *C. chinensis* Franch 购自山东建联中药店 (经建联中药店姚庭芝主任药师鉴定),盐酸小檗碱对照品 (berberine hydrochloride) 购自中国药品生物制品检定所,其他试剂均为分析纯,所用水为亚沸蒸馏水。

1.2 HPCE测定条件^[2]: 采用经 CH₃COOH pH=7.0的 0.05 mol/L Na₂B₄O₇-CH₃OH (85∶15)溶液作为缓冲溶液,电压 14 kV,压力进样 5 s,紫外 254 nm检测, Beckman P/ACE Station记录检测结果。

1.3 样品制备^[3]: 称取经粉碎过 20目筛的黄连粉末约 0.1 g,置 100 mL容量瓶中,加入盐酸-甲醇 (1∶99)约 95 mL于 60℃水浴加热 15 min,取出,超声 30 min,室温放置过夜,甲醇定容至 100 mL,取续滤液作为供试液。

2 结果与讨论

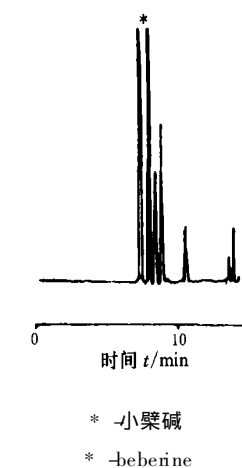


图 1 黄连的 HPCE 图谱

Fig. 1 HPCE fingerprint spectrum of *C. chinensis*

2.1 参照物的选择: 采用添加法对样品中小檗碱进行定性,图谱中小檗碱峰强度大且稳定,故选用小檗碱作为参照物对图谱中其他色谱进行了相对保留值和峰面积比的计算。黄连的 HPCE图谱见图 1。

2.2 数据化图谱的建立: 取 3 批黄连,每批 3 份,按“样品制备”方法制备供试液并在上述条件下实验,找出其共有峰,并以小檗碱作为参照物对图谱中其他峰进行相对保留值和峰面积比的计算,建立了黄连的数字化指纹图谱。结果见表 1。

表 1 黄连的 HPCE数据化指纹图谱

Table 1 Digital fingerprint of *C. chinensis*

峰序号	相对保留时	相对保留时	峰面积	峰面积比值
	间 /min	间 RSD %	比值	RSD %
1	0.968 0	0.105	0.275 7	8.10
2	1.000 0		1.000 0	
3	1.026 0	0.119	0.135 7	7.66
4	1.051 0	0.190	0.219 3	1.04
5	1.145 0	0.250	0.075 6	8.16
6	1.318 8	0.580	0.034 9	17.20
7	1.339 7	0.625	0.085 8	3.48

2.2.1 精密度试验: 取供试品溶液一份,连续进样 5 次。结果表明各色谱峰相对保留时间和峰面积基本一致 (相对保留时间 RSD < 0.2%, 峰面积比值 RSD < 0.3%)。

2.2.2 稳定性试验: 取供试品溶液一份,分别于 0, 2, 4, 8, 10 h 检测。结果表明,各色谱峰相对保留时间 RSD < 0.3%, 峰面积比值 RSD < 0.7%。

2.2.3 重现性试验: 称取同批样品 5 份,按“样品制

备”方法制备并检测 结果 5份样品各色谱峰相对保留时间 $RSD < 0.3\%$, 峰面积比值 $RSD < 0.5\%$ 。

2.2.4 样品制备方法的影响: 取经粉碎过 20目的同一批次的黄连 2份各 0.1 g, 分别按“样品制备”方法和沸水浴盐酸 甲醇 (1: 99)回流 0.5 h, 均定容至 100 mL。两种样品提取方法获得的检测结果经相关分析, 各色谱峰相对保留时间相关系数 $r = 0.9995$, 各色谱峰峰面积比值 $r = 0.9991$ 说明两种样品提取方法结果基本一致

2.2.5 药材粒度的影响: 分别取粉碎过 20, 60, 100目的同一批次的黄连粉末, 按“样品制备”方法操作并检测。结果表明不同药材粒度的黄连数据化指纹图谱各色谱峰相对保留时间 $RSD < 0.5\%$, 各色谱峰峰面积比值 $RSD < 4.8\%$ 。

3 讨论

以上研究表明, 本实验建立的黄连的数据化

HPCE指纹图谱稳定可靠 3批黄连药材数据化指纹图谱组分保留时间和组分峰面积比值经相关分析, 相关系数均 > 0.9990 , 预示不同批次的黄连所含化学成分不仅在组成上基本相同, 而且所含化学成分的比例也基本相同。当然不同的产地、不同的生长条件可能会对某些组份的含量比例产生影响, 但是否均在某一范围内波动, 有待继续探讨。不同批次的黄连 HPCE数据化图谱基本相同的实验结果, 也表明 HPCE数据化图谱在中药黄连品种鉴定以及质量控制方面有着广阔的应用前景

References

- [1] Nie J, Tian S J, Wang G R. The development of fingerprinting research on TCM [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(12): 881.
- [2] Qiao L, Zhou H L, Wei L X. Assay the content of coptisine in Huanglian combined with Ejaio through high efficiency capillary electrophoresis [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 1999, 22(4): 25.
- [3] *Ch P* (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol II.

RP-HPLC法测定槐米中槲皮素的含量

徐雄良¹, 张志荣¹, 柯尊洪², 田 锋^{2*}

(1. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 2. 成都康弘科技实业(集团)有限公司, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 建立 RP-HPLC法测定槐米中槲皮素的含量。方法 使用 Shim-pack CLC-ODS柱 (6.0 mm× 150 mm, 5 μ m), 以甲醇-0.4% 磷酸溶液 (7: 3) 为流动相, 375 nm 波长, 测定槐米水解液中槲皮素的含量。结果 该方法的线性为 10.03~ 100.3 ng, $r = 0.9997$; 平均回收率为 99.06%, $RSD = 2.07\%$ ($n = 9$)。结论 该方法测定样品分离效果佳, 灵敏度高, 重现性好, 结果准确可靠。

关键词: 槐米; 槲皮素; 反相高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2003)06-0565-03

Quantitative analysis of quercetin in bud of *Sophora japonica* L. by RP-HPLC

XU Xiong-liang¹, ZHANG Zhi-rong¹, KE Zun-hong², TIAN Feng²

(1. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Chengdu Kanghong

Science & Technology Industry (Group) Co., Ltd., Chengdu 610041, China)

Key words bud of *Sophora japonica* L.; quercetin; RP-HPLC

槐米为豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的干燥花蕾, 具有凉血止血、清肝泻火之功效, 用于多种血热出血症、肝火上亢之头痛、目赤等症。槐米主要含芦丁 (rutin) 10%~28%、桦皮醇 (betulin)、槐二醇 (sophoradiol) 以及槐花米甲、乙、丙素 (sophorin

A, B, C), 还含有槲皮素 (quercetin)、槐花皂苷 I, II, III (kaikasaponin I, II, III) 等^[1]。芦丁在酶或酸的作用下水解成槲皮素。现代药理研究认为, 槲皮素具有较好的祛痰、止咳作用, 并具有一定的平喘作用, 此外还具有降低血压、增强毛细血管抵抗力、调

* 收稿日期: 2002-10-20

基金项目: 四川省重点科技项目: 中药制剂现代化研究 (批准号: 01SG008-01)

作者简介: 徐雄良 (1969-), 男, 湖北鄂州人, 现为四川大学华西药学院 2000级硕士生, 研究方向为药物新制剂和新剂型、中药质量的标准化。Tel (028) 85503798 Fax (028) 85456898 E-mail xlx999@hotmail.com