

黄丝郁金的栽培变种 *C. longa* L. cv. *chuanyujin*。

2.5 白丝郁金与绿丝郁金:从 SRAP 研究结果可见白丝郁金和绿丝郁金有很近的亲缘关系,在分类阈值为 0.22 时,两个品种可以相互聚合。在生长环境上白丝郁金常与绿丝郁金混生在一起。认为白丝郁金可能为蓬莪术 *C. phaeocaulis* 即绿丝郁金的栽培变种,暂定为白丝郁金 *C. phaeocaulis* Val. cv. *baisi*。

3 讨论

SRAP 技术是一种新型标记,现主要用在水稻、油菜和大蒜等植物研究中。本文首次将该技术应用到中药研究领域中来,研究中通过引物的筛选、反应程序的优化,得到了较好的扩增效果,每个引物组合平均产生 14.7 条多态性条带,最多可达 25 条。研究证明,SRAP 技术可用于郁金分子生物学的研究,本研究从 DNA 分子水平上为郁金类药材原植物的分类、遗传多样性和种质资源以及 GAP 研究提供了参考依据,并且为中药研究领域提供了一个新的分析方法。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Xiao X H, Liu F Q, Shi C H, et al. RAPD Polymorphism and authentication of medicinal plants from Turmeric (*Curcuma L.*) in China [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (3): 209-213.
- [3] Chen Y H, Bai S M, Chen K L, et al. RAPD Study of *Curcuma wenyujin* and *C. sichuanensis* [J]. *J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24 (3): 131-133.
- [4] Zhang H, Xie C K. A new species of *Curcuma* of Sichuan [J]. *J West China Univ Med Sci* (华西医科大学学报), 1990, 21 (2): 179.
- [5] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new markers system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genetic*, 2001, 103: 455-461.
- [6] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theor Appl Genetic*, 2003, 107: 168-180.
- [7] Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucubita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genetic*, 2003, 107: 271-282.
- [8] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2003, 48 (15): 1676-1679.

HPLC 法研究雄、雌虎杖不同部位化学成分的变化

张须学¹, 李海霞², 刘延泽³

(1. 南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 450004; 2. 郑州大学药学院, 河南 郑州 450052;

3. 河南中医学院, 河南 郑州 450008)

虎杖在我国广泛分布,在美国东北部也有大量分布。临床可用于痹痛,黄疸,经闭,烫伤,跌打损伤,疮毒,咳嗽、痰多等症。现代药理研究表明虎杖中的蒽醌类大黄素、大黄酸、大黄素甲醚有抗炎、抑菌、抗病毒、抗肿瘤等作用^[1];萜类白藜芦醇、白藜芦醇苷有抑制胃酸分泌、保肝、抗血栓、降血脂、预防动脉硬化、对多种癌症发生阶段的抑制^[2]、强心扩血管、镇咳平喘^[3]、改善微循环、提高烧伤动物存活率和存活时间等作用^[4];黄酮醇苷类槲皮素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素-3-O-阿拉伯糖苷有利尿作用^[5];缩合鞣质有抗肝脂质过氧化物^[6]、降血糖^[7]等作用。虎杖为雌雄异株植物,在生产、采集及使用中从未涉及到其性别问题。尽管雌雄异株现象在植物中也常见到,但其化学成分及药理作用有何异同引起了我们的兴趣。虽然对虎杖的化学成分已有大量报道,但对其性别和

部位间的差异目前未见文献报道;并且中药是整体化学成分发挥作用,现有文献虽有大黄素、白藜芦醇、白藜芦醇苷量的测定方法,但未见用 HPLC 一次分析其尽可能多的化学成分的方法;而且《雷公炮制论》记载“虎杖,采得后,细研,却用虎杖叶裹一夜,出煞干用”,说明虎杖叶对其根及根茎的炮制有一定作用,提示有必要研究虎杖不同部位化学成分异同。鉴于在我国及美国东北部地区具有十分丰富的资源及巨大的开发潜力,因此,本试验用 HPLC 法对我国及美国雌雄虎杖的不同部位进行化学成分变化分析,为评价雌雄虎杖的品质及其合理化的采收、加工、炮制、用药提供依据,并为进一步研究虎杖的药理药效作用提供参考。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪: Waters 1525 HPLC 泵,

Waters 2487 双波长检测器。旋转蒸发仪;水为双重蒸馏水,甲醇为色谱纯;丙酮、醋酸等其他试剂均为分析纯。虎杖药材 6 批,来源见表 1,经刘延泽教授及郑州大学药学院潘成学老师鉴定为蓼科植物虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 相应的部位。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:YMC ODS-A S-5 120A 色谱柱 (150 mm×4.6 mm);流动相:甲醇(A),0.5%醋酸水溶液(B),梯度洗脱条件:0~40 min,20% A-80% B;40~50 min,50% A-50% B;50~90 min,20% A-80% B;体积流量:1.0 mL/min;检测波长 254 nm;柱温为室温;进样量:5 μ L。

2.2 供试品的制备

2.2.1 虎杖叶:取一定量的雄株虎杖叶、雌株虎杖叶,用 70% 含水丙酮溶液组织破碎提取,提取液减压浓缩至干,得提取物,提取率分别为 4.3%、9.8%。

2.2.2 虎杖花:取一定量的虎杖雄花、雌花,用 70% 含水丙酮溶液组织破碎提取,提取液减压浓缩至干,得提取物,提取率分别为 4.8%、5.6%。

2.2.3 虎杖根及根茎:取一定量的雄株虎杖根及根茎、雌株虎杖根及根茎,用 70% 含水丙酮溶液组织破碎提取,提取液减压浓缩至干,得提取物,提取率分别为 5.4%、8.2%。

2.3 供试品溶液的制备:精密称取各个提取物 40.0 mg,用 50% 甲醇溶解并定容至 100 mL,摇匀,再从中精密吸取 1.0 mL,置于 10 mL 量瓶中,用 50% 甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 检测波长的选择:以药材整体色谱图为准,重点比较虎杖药材在 254^[8]、280^[9]、303^[10]、306 nm^[11] 不同检测波长下的 HPLC 图谱,选取色谱峰信息较多,色谱峰较为均匀,基线也较稳定,且各峰分离良好的 254 nm 为检测波长,以提供虎杖中更多化学成分。

2.5 流动相及洗脱梯度的选择:曾采用甲醇-0.1% 磷酸溶液 (85:15)、甲醇-0.2% 磷酸溶液 (80:20)^[8],乙腈-水 (15:85,48:52)^[10,11],1% HAc-H₂O 与 1% HAc-CH₃CN 梯度洗脱^[9]等为流动相,发现存在出峰快,色谱峰重叠或峰数少,峰行不好等情况。经试验采用甲醇-0.5% 醋酸水溶液系统作为流动相,梯度洗脱得到的信息量较丰富,各成分峰形尖锐且分离度较好。

2.6 稳定性试验:取同一虎杖供试品溶液分别在 0、2、4、8、12、16、24 h 不同时间点进样。

各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均低于 3%。

2.7 精密性试验:取同一虎杖供试品溶液,连续进样 5 次,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均低于 2%。

2.8 重现性试验:取同一批虎杖药材分成 5 份,分别按同样的方法提取、制备供试品溶液,分别进样,同法测定,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均低于 3%。

2.9 样品分析:精密吸取供试品溶液,进样 5 μ L,采集 90 min 的 HPLC 图谱,不同性别、不同部位虎杖 70% 含水丙酮提取物化学成分的色谱图见图 1。不同来源虎杖的化学成分色谱图经“计算机辅助相似度评价系统”进行数据处理。即从各样本图谱中综合比较生成对照模式色谱图,并以此模式为基准,计算每个色谱图与之比较的相似度。数据处理结果见表 1。

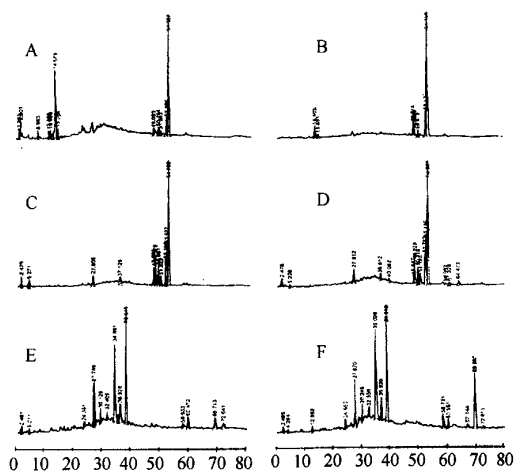


图 1 虎杖雄叶(A)、雌叶(B)、雄花(C)、雌花(D)、雄根及茎(E)、雌根及茎(F)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of *P. cuspidatum* from male leaves (A), female leaves (B), male flower (C), female flowers (D), male roots and stem (E), and female foot and stem (F)

3 讨论

3.1 提取:考虑到虎杖所含蒽醌类、芪类、黄酮类、鞣质类成分大部分均为多元酚类,易被氧化^[10,11],所以采用组织破碎法提取并减压浓缩提取液,以达到快速、完全和不破坏化学成分的目的。

3.2 虎杖各个提取物以相同的浓度进样,而不是以相同剂量的药材得到的提取液进样,是为了避免雌、雄虎杖各个部位所含化学成分量少时受仪器检出限

表 1 6 批不同来源虎杖相似度评价结果 (n=3)
Table 1 Similarity of six batches of *P. cuspidatum*
from various habitats (n=3)

批号	产地	雄株虎杖			雌株虎杖		
		花	叶	根及根茎	花	叶	根及根茎
1	美国波士顿	0.96	0.93	0.95	0.96	0.94	0.97
2	美国伍斯特	0.95	0.97	0.96	0.94	0.96	0.95
3	河南平顶山	0.93	0.96	0.98	0.96	0.95	0.97
4	河南南阳	0.94	0.95	0.96	0.95	0.96	0.96
5	河南登封	0.94	0.96	0.95	0.97	0.97	0.95
6	河南洛阳	0.93	0.94	0.97	0.94	0.93	0.97

的干扰,使结果更有可比性。

3.3 表 1 的评价结果表明,不同来源(特别是来自美国和中国两个国家)雄株虎杖的花、叶、根及根茎相似度较高,同样,雌株虎杖的花、叶、根及根茎相似度也较高,提示不同来源不影响雌或雄虎杖相同部位的化学成分,各地雌或雄虎杖相同部位的质量相差不大。

3.4 不同部位化学成分变化的比较:70%丙酮提取时,雌、雄虎杖相应部位(如均为花或叶、或根及根茎)的主要化学成分差别不大,但相应叶、根及根茎化学成分的相对质量分数差别较大:雄叶与雌叶比较增加了一些非主要化学成分,并且 14.689 min 的成分由 5.0%增加到 29.7%,54.322 min 由 73.4%减少到 48.6%;雄花与雌花比较化学成分与化学成分所占相对质量分数差异均不大;雄根及根茎与雌根及根茎比较化学成分差别不大,但雌根及根茎 38.918 min 的成分由 36.2%减少到 26.9%,69.860 min 的成分由 3.2%增加到 13.4%。雄花与雌花化学成分相差不大的例外,可能是由于所采雄花、雌花大部分为花被片,没有只单独采集雄蕊、雌蕊的原因。中药的疗效不仅与所含化学成分有关,而且与所含物质的量有关,雌、雄虎杖根及根茎化学成分量的差别,提示雌、雄虎杖应分别入药,或用于治疗不同的病症,或用于同样病症时应调整剂量;并且提示如提取 69.860 min 的成分时应以雌根及根茎为原料(并且雌根及根茎提取率 8.2%高于雄根及根茎的 5.4%)。由结果还不难看出,虎杖不同部位的化学成分差异较大:叶与花的不同主要在于增加了 14.689 min 的成分,根及根茎与花、叶的成分明

显不同。

3.5 虎杖叶与根及根茎所含化学成分的明显不同,说明古人用叶裹根及根茎的炮制方法有一定科学道理,经过如此炮制可能使各自的有效成分互为补充,起到增加药效的目的,这提示除了研究虎杖现有的生品、盐炙品、酒炙品、醋炙品炮制品之外,还应研究叶炙品。

3.6 由虎杖根及根茎的 HPLC 图谱可见色谱峰信息较多,各峰分离较好,故本方法尚可用于虎杖药材的质量评价;虎杖化学成分明显不同的部分,如有相关的药理药效学试验与其对应,将使研究更有意义。

References:

[1] Huang T K. *The Manual of Traditional China Medicio pharmaceutical Compositions and Pharmacology in Common Use* (常用中药成分与药理手册) [M]. Beijing: China Medico-pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1992.

[2] Zhao X, Lu Y, Cheng Z N. Advances in research on chemistry and pharmacology of resveratrol [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29 (12): 837-838.

[3] Xue L. Advances in research on pharmacology of *Polygonum cuspidatum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 2 (11): 651.

[4] Wu K Y, Huang Q B. Relationship between disturbances of microcirculation and TNF during burn shock [J]. *Chin J Plastic Surg Burn* (中华整形烧伤外科杂志), 1996, 12 (1): 41-44.

[5] Zhou J H. *Pharmacology of Traditional Chinese Medicine* (中药药理学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1986.

[6] Zeng W C, Cai Q R, Yang H, et al. The inhibiting lipid peroxidation effect of tannin from *Polygonum cuspidatum* [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2002, 18 (6): 18-19.

[7] Shen Z M, Yin J W, Yuan H B. The hypoglycemic effect of tannin from *Polygonum cuspidatum* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16 (3): 220-221.

[8] Jiang H Y, Zhu H, Huang H X, et al. Effect of processing on piceid and emodin in *Polygonum cuspidatum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (5): 412-415.

[9] Chen B, Cai B C, Pan Y, et al. Comparison of HPLC fingerprint chromatography of *Rheum palmatum* of different produring areas [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (5): 457-460.

[10] Jiang H Y, Lu Z P, Pan Y, et al. Determination of piceid in different processing of *Polygonum cuspidatum* by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (5): 523-524.

[11] Zhang M, Cao Y, Yu H Z, et al. Preliminary study on extraction process of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* [J]. *J Chem Indus Forest Prod* (林产化工通讯), 2004, 38 (3): 6-9.