

图 3 PCR 扩增谱带

Fig 3 PCR extension pattern

需 DNA 量少, 是一种分子水平上鉴定体细胞杂种的好方法, 但此法检测的基因位点数目较少, **RAPD** 技术无需专门设计 **RAPD** 扩增反应的引物, 也无需预知被研究的生物基因组核苷酸顺序, 引物是随机合成或随机选定的, 并易于程序化, 方便、快捷, 且检测的基因位点数目多, 但重复性较差。两种分子检测技术相结合, 对体细胞杂种中的异源基因能作出更精确、更全面的定位和分析。

通过原生质体融合获得的体细胞杂种中, 包含有不等量的双亲的遗传物质, 造成这种情况的原因一种可能是两亲本游离原生质体的供体细胞生长(分裂)活跃程度的差异而导致不对称杂种; 另一种可能是两亲本细胞核的 DNA 复制速度不同而造成分配到每个杂种细胞核中的染色体数不相同。

不同产地掌叶大黄 HPLC 指纹图谱的比较

陈 斌¹, 蔡宝昌^{1*}, 潘 扬², 王天山², 郭胜伟², 钱继红^{2*}

(1. 南京中医药大学 江苏省中药质量控制工程技术中心, 江苏 南京 210029; 2 江苏中康新药指纹图谱开发有限责任公司, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 应用 RP-HPLC (DAD) 对不同产地掌叶大黄药材进行指纹图谱比较。方法 用 Inertsil ODS-3 分析柱, 1% HAe-H₂O 与 1% HAe-CH₃CN 梯度洗脱, 流速 1 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 280 nm, 参比波长 380 nm。结果 建立了 HPLC 指纹图谱共有模式, 并对其他产地药材进行了相似度比较。结论 对大黄药材中各成分均得到很好分离, 可作为大黄药材的具有专属性的指纹图谱。

关键词: 大黄; 指纹图谱; 高效液相色谱; 梯度洗脱法

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)05-0457-04

Comparison of HPLC fingerprint chromatography of *Rheum palmatum* of different producing areas

CHEN Bin¹, CAI Bao-chang¹, PAN Yang², WANG Tian-shan², GUO Sheng-wei², QIAN Ji-hong²

(1. Jiangsu Engineering and Technical Center for Quality Control of Chinese Materia Medica, Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China, 2 Jiangsu Zhongkang New Drug & Fingerprint Chromatography Development Co., Ltd., Nanjing 210029, China)

Abstract: **Object** To apply RP-HPLC (DAD) to compare the fingerprints of *Rheum palmatum* Linn.

* 收稿日期: 2002-09-08

作者简介: 陈 斌(1977-), 男, 南京中医药大学 2000 级在读硕士研究生, 主要从事新药开发与指纹图谱研究。

* 通讯作者 Tel: (025) 6798281

References:

- [1] Xing W X, Bi H M, Tian L, *et al.* RAPD (random amplified polymorphic DNAs) technology and application of RAPD in pharmacognosy study [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 1999, 15(3): 25-28.
- [2] Cox A V, Bennett M D, Dyer T A. Use of the polymerase chain reaction to detect spacer size heterogeneity in plant 5S rDNA gene clusters and to locate such clusters in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 684-690.
- [3] Zanke C, Borisjuk N, Ruoss B, *et al.* A specific oligonucleotide of the 5S rDNA spacer and species-specific elements identify symmetric somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. pinnatisectum* [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 720-726.
- [4] Sun J S, Gui Y L. *Plant Cell Engineering Experimentation Technology* (植物细胞工程实验技术) [M]. Beijing: Science Press, 1995.
- [5] Zhou A F, Xu C H, Xiang F N, *et al.* Study on identification of somatic hybrids by PCR with 5S rDNA sequence primers [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1999, 15(4): 529-532.
- [6] Xiang F N, Xia G M, Zhou A F, *et al.* Intergeneric asymmetric, somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and bromus inermis [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41(5): 458-462.
- [7] Huang L Q. *Molecular Pharmacognosy* (分子生药学) [M]. Beijing: Beijing University of Medical Science and Peking Union Medical College Publishing House, 2000.

collected from different producing areas. **Methods** Inertsil ODS-3 column was used, with mixtures of 1% acetic acid-water and 1% acetic acid-acetonitrile as mobile phase in a gradient mode. The flow rate was 1 mL/min. The temperature of column was 30 ℃. The wavelength of detection was 280 nm. The reference wavelength was 380 nm. **Results** After the mutual mode of HPLC fingerprint was set up, comparison of similar degree to the crude drugs of other producing areas has been carried on. **Conclusion** According to the selected chromatographic conditions, a good fingerprint of *R. palmatum* has been described. The method is simple, accurate with good reproducibility. It may be practical value for the quality control of sample for *R. palmatum*.

Key words: *Rheum palmatum* Linn.; fingerprint chromatography; HPLC; gradient elution

大黄为蓼科多年生草本植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* Linn.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的根及根茎。掌叶大黄和唐古特大黄药材称北大黄,主产于青海、甘肃等地;药用大黄药材称南大黄,主产于四川。大黄中主要化学成分为蒽醌类、蒽酮类、苯骈丁酮类、黄烷醇类、原花青素类、没食子酰葡萄糖类、酰基葡萄糖类化合物。

按指纹图谱的目的即对原料药材进行质控,要求对药材应固定一个品种,掌叶大黄是《中华人民共和国

药典》中收载的品种且主产地资源丰富,采收较容易,资源易得到保证。故实验主要对掌叶大黄 *R. palmatum* 进行指纹图谱研究。可区分不同产地大黄药材质量的异同,为大黄的鉴别提供新的依据,也为以大黄为处方组成的注射剂的指纹图谱研究奠定基础。

1 材料

1.1 样品来源:见表 1。

据笔者实地考察并结合文献报道,甘肃陇南地

表 1 大黄的来源

Table 1 Source of *R. palmatum*

编号	样 品	采收时间	编号	样 品	采收时间
1	华亭大黄 1	2001-11	9	庄浪大黄(干货)	2000-11
2	华亭大黄 2	2001-11	10	礼县大黄立冬前	2001-10
3	华亭大黄 3	2001-11	11	礼县大黄立冬后	2001-11
4	华亭大黄 4	2001-11	12	礼县大黄(干货)	2001-11
5	华亭大黄(1+ 2+ 3+ 4 混合)	2001-11	13	礼县大黄(干货)	2000-11
6	庄浪大黄 1	2001-11	14	宕昌大黄(干货)	2001-11
7	庄浪大黄 2	2001-11	15	宕昌大黄(干货)	2000-11
8	庄浪大黄(1+ 2 混合)	2001-11			

区和平凉地区为掌叶大黄的主产地,资源丰富,采收季节为立冬前后,当地加工方法为去须根,刮去外皮,切块烟熏干燥。

掌叶大黄药材共 15 个样品(经实地考察、采收结合当地分管药材种植部门的介绍和南京中医药大学鉴定教研室鉴定为掌叶大黄),其中 5 个为甘肃华亭样品,4 个为庄浪样品,4 个为礼县样品,2 个为宕昌样品。

1.2 仪器与试剂:METTLER AE240 电子天平,HH-6 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);Agilent 1100 液相色谱仪(自动进样器),DAD 检测器;乙腈(美国 Tedia 公司,色谱纯)、甲醇(上海化学试剂有限公司,分析纯;Tedia 公司,色谱纯)、冰醋酸(南京化学试剂一厂,分析纯)、重蒸去离子水。

2 实验方法

2.1 色谱分析条件:Inertsil ODS-3 分析柱(250

mm×4.6 mm, 5 μm),1% HAc-H₂O 与 1% HAc-CH₃CN 梯度洗脱;流速:1 mL/min;柱温:30 ℃;检测波长:280 nm;参比波长:380 nm。所有组分均 90 min 被检测完。

2.2 供试品的制备:精密称量 0.5 g 大黄药材粉末(过 20 目筛),加 40 mL 甲醇回流 1 h,过滤。残渣加甲醇 40 mL,继续回流 1 h,过滤,合并 2 次滤液。置蒸发皿水浴挥干溶剂,加甲醇溶解并定容至 25 mL。0.45 μm 的微孔滤膜过滤,滤液为大黄药材检测供试品。

2.3 方法学考察:为了考察分析方法的可靠性,以庄浪大黄药材样品(样 1)为例,对其稳定性、仪器精密密度、实验方法重现性作了相应考察。

2.3.1 稳定性试验:取庄浪大黄(样 1)供试品溶液分

别在 0, 2, 4, 7, 11, 16, 22, 29, 36 h 不同时间点进行检测, 考察色谱峰相对保留时间的一致性, 各主要色谱峰相对保留时间的 *RSD* 分别为 0.1% ~ 2.8%。

2.3.2 仪器精密性试验: 取庄浪大黄(样 1)供试品溶液, 连续进样 5 次, 考察色谱峰相对保留时间的一致性, 各色谱峰相对保留时间的 *RSD* 均低于 3%。

2.3.3 重现性试验: 取庄浪大黄(样 1)供试品溶液, 同法测定, 考察色谱峰相对保留时间的一致性, 以 $t_{R42.3\text{ min}}$ 的 4 号峰的化合物为自身内标, 计算 6 个共有峰的相对保留时间(min) 分别为 0.1705 ± 0.8119 , 0.4229 ± 0.2395 , 0.7229 ± 0.04093 , 1 ± 0 , 1.2469 ± 0.05198 , 1.4285 ± 0.06486 。各色谱峰相对保留时间的相对标准偏差 *RSD* 均低于 3%。直观观察叠加的色谱图, 也可判断峰位有良好的重合(图 1)。

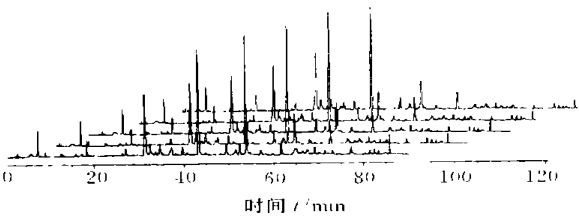


图 1 掌叶大黄指纹图谱的重现性

Fig 1 Fingerprint reproducibility of *R. palmatum*

3 实验结果

3.1 大黄高效液相色谱可分离出 90 个左右的峰, 经比较所有测定和记录的色谱图, 从中选定了 6 个共有峰作为可以构成指纹图谱的稳定的特征峰(图 2)。

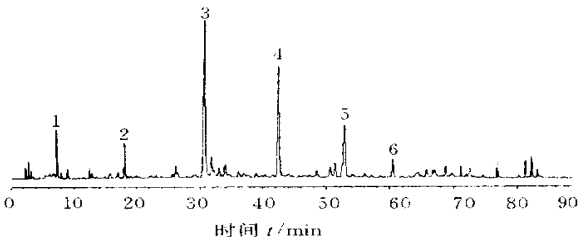
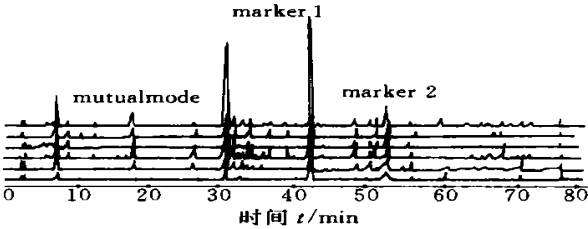


图 2 掌叶大黄指纹图谱特征峰

Fig 2 Fingerprint characteristic peak of *R. palmatum*

3.2 将实验数据导入中药指纹图谱相似度计算软件, 经选峰, 设定匹配模板, 将谱峰自动匹配; 然后设定标准模板, 进行谱峰差异性评价和整体相似性评价。据实地考察, 甘肃庄浪、礼县大黄种植面积约有 6666.67 hm^2 , 年产大黄约 5 万吨。资源充足, 因此将两地样品合并比较, 通过中药指纹图谱相似度计算软件得出掌叶大黄指纹图谱的共有模式(图 3)。共有模式的样品的相似度见表 2。其他样品均和共有模式比较, 其相似度结果见表 3。各地之间样品

所建立的共有模式及比较将另文报道。



样品见表 2, 以样本 1 为谱峰匹配的匹配模板, 以均值为相似性评价标准模板。以 $t_{R42.3\text{ min}}$ 的 4 号峰的化合物为自身内标, 计算相对保留时间(min) 分别为 0.1715 ± 0.3302 , 0.4238 ± 0.3164 , 0.7234 ± 0.06285 , 1 ± 0 , 1.2476 ± 0.09449 , 1.4246 ± 0.3628 ; 相对峰面积分别为 0.1402 ± 39.83 , 0.09141 ± 25.11 , 0.9272 ± 24.53 , 1 ± 0 , 0.2890 ± 20.32 , 0.09392 ± 39.27

Samples in Table 2, regard sample 1 as table match template that peak matched, regard mean value as similar evaluation criterion template. Chemical compound of peak for mark inside while being one's own with one in $t_{R42.3\text{ min}}$, relative time (min) by calculating is 0.1715 ± 0.3302 , 0.4238 ± 0.3164 , 0.7234 ± 0.06285 , 1 ± 0 , 1.2476 ± 0.09449 , 1.4246 ± 0.3628 . The relative area of peak is 0.1402 ± 39.83 , 0.09141 ± 25.11 , 0.9272 ± 24.53 , 1 ± 0 , 0.2890 ± 20.32 , 0.09392 ± 39.27

图 3 掌叶大黄 HPLC 指纹图谱共有模式图

Fig 3 Plot of mutual mode of HPLC fingerprint of *R. palmatum*

表 2 组成共有模式的大黄样品的相似度评价

Table 2 Evaluation of resemblances among samples of *R. palmatum* formed in mutual mode

编号	相似度	编号	相似度
12	0.98	7	0.99
10	0.98	8	1.00
6	0.99		

表 3 与共有模式比较的大黄样品的相似度评价

Table 3 Evaluation of resemblance among samples of *R. palmatum* compared with mutual mode

编号	相似度	编号	相似度
1	0.96	9	0.83
2	0.90	11	0.94
3	0.90	13	0.80
4	0.93	14	0.78
5	0.95	15	0.79

3.3 从指纹图谱中可以看出, 虽然都出现了相应的主成分峰, 但是峰面积比值不尽相同。提示中药必须在固定原药材产地及提取工艺的前提下, 才可能保证中药的质量稳定可控。

3.4 从指纹图谱的峰差异评价及整体性评价可以看出, 各地之间样品相似度较高, 四地大黄药材之间既有较好的相关性, 又有区别。

4 讨论

4.1 通过一系列对大黄粉碎度、不同提取溶剂、提取方法(包括超声、索氏提取)等方面的考察以及结合有关文献确定了以上供试品的制备方法。

4.2 采用 DAD 对最佳检测波长进行了比较研究,确立 280 nm 为最佳检测波长^[1]。

4.3 目前虽有文献报道有关大黄药材的指纹图谱的研究,但对于其指纹谱特征峰的辨认采用的方法有待商榷^[2],按本方法不仅能将大黄中的成分较好的分离,对指纹谱特征峰的辨认也采用了新的分析系统,能较好的体现图谱间的相似性,可以为药材质量的分析与控制提供可靠的依据。按照国家药典委员会关于“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)的通知”,以 HPLC 梯度洗脱法对大黄原药材进行了指纹图谱研究,实验证明,该方法可操作性强、重现性好,可作为大黄药材及含大黄主成分制剂指纹图谱研究的基础。

4.4 以线性梯度洗脱法进行检测得到的液相色谱图,可作为大黄原药材及其制剂的指纹图谱,该方法对注射剂(TY719 注射液)可直接取样配制,中间

环节少、操作过程引入的误差较小^[3]。

4.5 按本方法建立的共有模式提示不仅对同品种不同产地的大黄样品,也可对不同品种的大黄样品乃至大黄伪品如河套大黄和土大黄进行相似度计算,可反映其内在质量,从而鉴别。

4.6 从药材整体色谱图入手,选取特征峰,并大致判断其峰位和比例关系,构成该药材特有的色谱指纹图谱全貌,本文模拟的共有模式比以单一化学对照品作为鉴别标准更全面,能提供更多质控的信息。对提高中药质控科技含量具有重要的现实意义。

致谢:浙江大学程翼宇教授、范晓辉博士提供指纹图谱相似度计算软件。

References:

- [1] Liu J, Wang Y H, Fu C X. Studies on determine ginsenosides using HPLC-photosensitive diode array method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(4): 228.
- [2] Hong X K, Wang Z H, Li X. HPLC-relatively retain fingerprint chromatography distinguishes the rhubarb [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18(11): 650-652.
- [3] Yan Y Z, Lin Q L, Xie P S. Studies on thin layer fingerprinting chromatography of *Coptis chinensis* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1993, 18(6): 329-331.

黄芪质量的化学模式识别研究

马英丽¹, 赵怀清², 田振坤¹, 王学娅², 曲 燕², 崔洪斌^{3*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 3. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要:目的 建立黄芪质量评价的化学模式识别方法。方法 用甲醇回流提取黄芪中皂苷类成分,以氯仿-甲醇水(65:30:10)为展开剂,采用双波长薄层扫描法,在 $\lambda_s=390\text{ nm}$, $\lambda_R=590\text{ nm}$ 下,对 18 个产地的黄芪样品进行了定量分析,以黄芪甲苷为指标成分,用系统聚类分析对其进行了化学模式识别研究。结果 蒙古黄芪和膜荚黄芪中的黄芪甲苷含量较高,这与《中华人民共和国药典》2000 年版将蒙古黄芪和膜荚黄芪列为正品相一致。结论 此方法可用于黄芪质量评价。

关键词:黄芪;黄芪甲苷;薄层扫描;化学模式识别

中图分类号:R282.4 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2003)05-0460-03

Studies on chemical pattern recognition of quality assessment of *Radix Astragali*

MA Ying-li¹, ZHAO Hua-qing², TIAN Zhen-kun¹, WANG Xue-ya², QU Yan², CUI Hong-bin³

(1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. College of Public Health, Harbin University of Medical Science, Harbin 150010, China)

Abstract: **Object** To establish a method for chemical pattern recognition on the quality assessment of *Radix Astragali*. **Methods** The contents of astragaloside in 18 samples of *Astragalus* Linn. in different

* 收稿日期:2002-12-12

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(B9803)

作者简介:马英丽(1954-),女,哈尔滨人,黑龙江中医药大学药学院教授、博士生导师,主要从事中药有效成分与质量评价方法研究。

Tel: (0451) 2114402 E-mail: MYLT666@163.net