

时,也只选取了具有初级文饰的区域而未能观察到具有次级文饰的区域,固而得出此结论

华中五味子果实含有的活性成分主要包括五味子甲素和五味子酯甲等木脂素成分^[1],因此本实验选择这两种成分为对照品进行薄层色谱鉴别。结果表明,产于陕西平利、河南栾川、山西阳城、湖南衡山的华中五味子、绿叶五味子和红花五味子果实中,都含有五味子酯甲和五味子甲素,但紫外灯下,产于衡山的华中五味子和绿叶五味子、红花五味子在与对照品相同的位置上只有弱的暗斑,推测样品中这两种成分的含量较低。翼梗五味子仅在与五味子酯甲相同的位置有弱的暗斑,推测其果实中含有少量的五味子酯甲。甘肃小陇山、陕西留坝产的南五味子中检测不到这两种成分,这与黄梅芬用 HPLC法对不同产区华中五味子木酯体成分分析的结果相吻合^[3],建议这两个产地的华中五味子果实不宜作为南五味子入药。因此薄层色谱不仅可以用于鉴别不同产地的华中五味子果实和绿叶五味子、红花五味子及翼梗五味子果实,而且对其有效成分含量可以做出初步的判别。

致谢:西北大学胡正海教授、任毅教授、汉中师范学院赵桦教授、河南鸡公山自然保护区喻泓主任在标本采集中给予大力协助;郑州大学药学院

潘成学老师帮助采集一份实验材料,湖南南岳树木园李明红主任帮助采集两份实验材料,甘肃小陇山植物园裴会明主任帮助采集一份实验材料。

References

- [1] Biotechnology Research Institute, Hong Kong Technological University. *Traditional Chinese Medicine Research and Development Reviews* (中药研究与开发综述) [M]. Beijing Science Press, 2000.
- [2] Lou Z C, Qin B. *Species Systematization and Quality Evaluation of Commonly Used Chinese Traditional Drugs* (常用中药品种整理和质量研究) [M]. North-China Edition Vol 2. Beijing: The United Publishing House of Beijing Medical University and Peking Union Medical University, 1995.
- [3] Huang M F, Fang S D, Gao Y L. Studies on the constituents of *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. III. The constituents of the lignan in different districts and the structure of d-epigalbacin [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1982, 24(5): 451-453.
- [4] Song W Z, Xiao P G. The medical plants and lignans of *Schisandraceae* in China [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1982, 13(1): 40-48.
- [5] Liu J S, Fang S D, Huang M F, et al. Studies on *Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils. [J]. *Sci Sin* (中国科学), 1978, 21(2): 232-247.
- [6] Sun C R. Micromorphological features of the seed surface of *Schisandraeae* and their systematic significance [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 2002, 40(2): 97-109.
- [7] Yang Z R, Lin Q, Liu J, et al. Seed morphology of the Genus *Schisandra* and its taxonomic significance [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2002, 24(5): 627-637.

丹参品质鉴定和评价的 HPLC指纹条形码技术

李 磊^{1,2,3}, 黎先春¹, 王小如^{1,2}, 王文慎^{2*}

(1. 香港浸会大学中医药学院 GAP实验室, 香港 九龙塘; 2. 厦门大学 化学系现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 江西农业大学 食品科学系, 江西 南昌, 330045)

摘要:目的 建立丹参水溶性有效成分 HPLC指纹条形码图谱,以此图谱鉴别不同来源丹参与其他鼠尾草属丹参伪品并进行质量评价。方法 以不同产地正宗丹参和市场上充作丹参的其他鼠尾草属植物为分析对象,选择适宜的水溶性成分萃取方法和 HPLC分析条件,构建丹参 HPLC指纹图谱,并进行归一化处理,将相同条件下的指纹条形码图谱相互进行比较。结果 所建立的构建丹参水溶性成分 HPLC指纹条形码图谱的方法有较好的重现性和稳定性。正品丹参药材有 18个共有指纹峰,各峰相对保留时间和峰面积的相对标准偏差分别小于 1.18%和 25%。以原儿茶醛(保留时间为 33.71 min, RSD= 1.5%)为界,指纹图谱可分为非指纹区和指纹区两个区,非指纹区主要用于有效成分的半定量,指纹区则可同时用于鉴别和成分的半定量。其他鼠尾草属植物的指纹图谱与丹参有较大差异。其差异主要表现在指纹区中。结论 指纹条形码图谱技术能对丹参的道地性进行鉴别并对有关成分进行半定量,从而能对丹参品质进行全面评定。

关键词:丹参; HPLC指纹图谱; 条形码; 品质评价

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)07-0649-05

* 收稿日期: 2002-10-28

基金项目: 香港创新科技署创新基金(UIM/6); 福建省青年科技人才创新项目(2001J063)

作者简介: 李 磊(1968-),男,河南夏邑人,博士,副教授,主要从事中药及保健食品中功能活性物质研究和保健品开发。

Tel (0592) 2186401

Development of HPLC fingerprint bar code technique for authentication and quality assessment of *Radix Salvia Miltiorrhiza*

LI Lei^{1,2,3}, LEE Frank S C¹, WANG Xiao-tu^{1,2}, WANG Wen-shen²

(1. GAP Laboratory, Research and Development Division of SCM of HKBU, Hong Kong, China; 2. Key Laboratory of Modern Analytical Science of MOE, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China;

3. Food Department of Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract Object To discuss the development of a “bar coded” HPLC chromatographic fingerprint system for the assay of water-soluble components in *Radix Salvia Miltiorrhiza* (RSM). The technique has been used for the species authentication and quality assessment of RSM and other species of *Salvia* L. originated from different locations. **Methods** Authentic RSM species originated from different geographic locations were compared with different species of *Salvia* L. obtained commercially using an analytical protocol involving water extraction, followed by HPLC of the extract, and finally the normalization of all peak intensities in the HPLC chromatogram. The last step resulted in “bar coded” chromatograms which could be used as fingerprints for the qualitative and quantitative comparison of different species of *Salvia* L. **Results** The HPLC bar code fingerprint was found to be highly stable and reproducible. A total of 18 common peaks were identified in the HPLC chromatogram with their average *RSD* of relative retention time and peak area less than 1.18% and 25%, respectively. Separated by the protocatechuic aldehyde peak (retention time 33.71 min and *RSD* of 1.5%), the HPLC chromatogram could be separated into two groups: the early eluting group of peaks in the “non-specific” region, and the late eluting group of peaks in the “fingerprinting” region. The former group of peaks could be used for the semi-quantification of bioactive components, whereas the later group of peaks could be used for both identification and semi-quantification purposes. HPLC chromatograms of other species of *Salvia* L. showed fingerprints distinctively different from those of authentic species of *Salvia* L.; and the difference lay mainly in the fingerprinting region of the HPLC chromatograms. **Conclusion** The developed bar-coded HPLC chromatographic fingerprints can be used effectively for the authentication of species of *Salvia* L., and the quality assessment of RSM or its derived products based on the semi-quantitative analysis of bioactive components in the samples.

Key words *Radix Salvia Miltiorrhiza* (RSM); HPLC fingerprint; bar code; quality assessment

丹参系唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根及根茎。有活血化瘀、理气止痛及改善微循环的作用^[1]。近年来,越来越多的丹参水溶性成分被发现,其药理活性研究也日益显示水溶性成分在动物实验和临床应用上的良好效果^[2-7]。由于人类心脑血管病及丹参的用途日益增多,原以野生入药的丹参远远满足不了市场需求。目前,全国各地均有大量丹参种植,但丹参品质有较大差别,而且大量鼠尾草属植物也作为丹参配伍入药,因此,对丹参进行质量控制和鉴定非常必要。

对中药鉴别和品质评定的方法很多,从传统的形态鉴别、性状比较和感官评定等到现代的显微结构观察、光谱和色谱学评价等。近年来所提出的指纹图谱技术为中药的质量评定和品质鉴定注入了新的活力^[8-10]。

1 材料与方法

1.1 仪器及条件: 美国 HP1100型高效液相色谱

仪。色谱柱为: Alltima(4.6 mm×250 mm, 5 μ m) C₁₈反相柱及保护柱;流动相为乙腈和 0.45% 醋酸水溶液;检测器检测波长为 199~400 nm (带宽 16 nm);参比波长 360 nm(带宽 100 nm);柱温: 室温;流速: 1.0 mL/min;进样 10~20 μ L。采用梯度洗脱方式,采样时间为 80 min。

超声波提取器 (Branson 5210, USA)。控制提取温度 30 $^{\circ}$ C。

1.2 试剂: 甲醇 (HPLC级), 乙腈 (HPLC级), 冰醋酸 (AR级), 蒸馏水。

1.3 样品及供试液制备

1.3.1 丹参及鼠尾草属样品: 四川中江丹参 GAP 基地各等级混杂的正品丹参商品药材共 10批。同一株丹参的不同部位,包括: 根、茎、叶、花、皮及木质部,共 5株。其他产地正品丹参包括: 陕西丹参、山东丹参、安徽丹参和江西丹参。所用鼠尾草属植物包

括: 甘西鼠尾草 *Salvia przewalskii* Maxim 新疆鼠尾草 *S. deserta* Schang 滇丹参 *S. yunnanensis* C. H. Wright 南丹参 *S. bowleyana* Dunn 拟丹参 *S. paramiltiorrhiza* H. W. Li et X. L. Huang 由中国科学院昆明植物研究所李锡文教授鉴定。

1.3.2 5种水溶性成分标准液的制备: 分别精密称取减压干燥至恒重的原儿茶醛、原儿茶酸及丹参素(钠)、咖啡酸、丹酚酸乙(中国药科大学提供)适量, 配制 5 种标准样品 100 mg/L 单标溶液, 溶剂为 50% 的酸性甲酸(冰醋酸调至 pH3~4), 进样前配成 20 mg/L 混合标准工作溶液 临用时配制

1.3.3 丹参水溶性成分指纹特征的提取: 用四分法取样 准确称取 0.5 g 丹参粉末样品(过 50 目筛), 置于 100 mL 有刻度的具塞瓶中, 加入 50 mL 萃取剂, 用玻璃纸封好并标记 超声波萃取 1 h, 取出, 除去玻璃纸, 置沸水浴中加热 45 min, 放入通风处冷却至室温 用冰醋酸调节 pH3.0, 并用蒸馏水补足至原刻度 静置 1 h, 用慢速定性滤纸过滤 取滤液 2 mL 过 C₁₈ 小柱(Alltech Co.), 并用 10 mL 甲醇分 3 次洗涤 滤液即为供试液

代表性控制采用每一样品测定 3 个平行样, 所取数据为其平均值。

2 结果与讨论

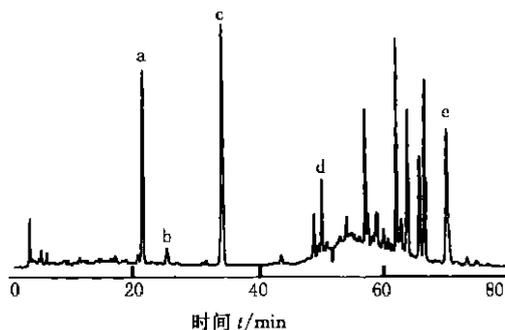
2.1 稳定性试验: 取同一试验样品供试液, 每测定 10 个其他样品插入测定 1 次, 共测定 5 次 5 种成分的相对保留时间比值平均小于 1.03, 峰面积比值平均小于 1.05 说明同一样品在相同条件下所测成分的保留时间和色谱峰面积较一致 仪器较稳定。

2.2 精密度试验: 取样品 1 供试液连续 5 次进样, 5 种成分相对保留时间和峰面积比值平均分别小于 1.02 和 1.03 说明同一样品在相同条件下连续进样时, 各成分保留时间和色谱峰面积较一致 仪器较精密可靠。

2.3 重现性试验: 取同一批丹参药材的 5 份样品, 在同一条件下进行检测 5 种成分的相对保留时间比值平均小于 1.09, 峰面积比值平均小于 1.12 说明实验方法和仪器重现性较好。

2.4 共有峰的确定

2.4.1 商品丹参的指纹图谱比较: 根据丹参中主要水溶性药效成分的吸收特性, 为突出显示丹酚酸信息, 本研究比较了不同波长下所得图谱的化学信息量。发现 290~300 nm 反映的化学信息量较多(图 1), 尤其是丹酚酸类成分较为完全, 且基线平稳。下述研究以 290 nm 波长处的指纹图谱为主, 并对这



a-丹参素 b-原儿茶酸 c-原儿茶醛 d-咖啡酸 e-丹酚酸乙
a-danshensu b-protocatechuic acid c-protocatechuic aldehyde
d-coffee acid e-salvianic acid B

图 1 丹参水溶性成分 HPLC 指纹图谱 ($\lambda = 290 \text{ nm}$)
Fig. 1 HPLC fingerprint of water-soluble components from *S. miltiorrhiza* ($\lambda = 290 \text{ nm}$)

种图谱做出分析。

不同产地(四川、陕西、山东等地)正品丹参水溶性成分在同样条件下的研究结果, 显示丹参有 18 个共有指纹特征峰。

2.4.2 共有峰的相对保留时间: 从丹参 GAP 基地随机抽取 10 批丹参样品, 不同批次商品丹参间 HPLC 指纹图谱极为相似 除其中第 10 批样品某些成分的信号强弱有波动外, 其余 9 批丹参样品化学信息没有较大差异 为了找出其共有特点, 参考“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求”^[11], 确定了 18 个共有指纹峰 其原则是: (1) 每批样品中都含有这种成分; (2) 峰形分离度 $R \geq 0.8$; (3) 各峰相对保留时间的 $RSD \leq 5\%$; (4) 各峰峰面积的 $RSD \leq 30\%$ 。以原儿茶醛的保留时间为标准, 其余各共有指纹峰的保留时间与此相比, 得出各峰相对保留时间 结果, 随机抽取的 10 批丹参样品测定中, 18 个共有指纹峰相对保留时间的 RSD 皆小于 1.18%。说明在实际样品测定中, 所得各峰相对保留时间比值较为一致。所建立的方法精确及仪器运行稳定。

HPLC 指纹图谱是中药鉴别的有力工具, 在同一条件下进行比较分析时, 也是指标成分半定量的参考。比较不同产地丹参化学成分的 HPLC 指纹图谱不难看出(文中没有列出), 与其他产地丹参比较, 安徽丹参中所含主要药效指标成分数量少, 质量较差 四川和陕西生产的丹参质量较优, 山东和江西的丹参质量次之。

2.4.3 共有指纹峰面积的比值: 在所测定的 10 批丹参药材中, 18 个共有指纹峰的总峰面积 RSD 为 12.9%。每批药材中占总峰面积 5% 以上的共有峰有 6 个, 分别为 4, 8, 12, 14~16 号峰 这些峰峰面积的 RSD 不超过 20.3%。其他成分峰面积相对较大

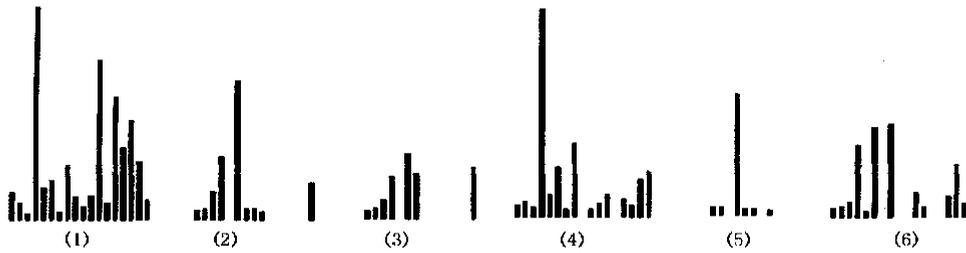
的峰有 1, 5, 6和 16号峰,他们的峰面积 RSD分别为 8. 17% , 17. 4% , 13. 7%和 25. 1%。说明丹参药材的质量相对稳定

2.5 不同样品指纹图谱的比较和峰形分析:以指纹图谱中各共有指纹峰峰号为横坐标,以相应峰号的峰面积为纵坐标,进行归一化处理,作柱形条形码图。图 2是为了便于丹参与其他鼠尾草属植物 HPLC指纹图谱条形码进行比较而放在一起的组合图。其中,(1)是正品丹参统货;(2),(3),(4),(5),(6)分别为几种丹参伪品。比较分析不难看出正品丹参和其他 5种同属植物的差异:在正品丹参 18个共有峰中,甘西鼠尾草缺少 5, 10~ 14, 16~ 18号峰;新疆鼠尾草缺少 5, 8~ 13, 15~ 18号峰;滇丹参缺少 7, 9~ 10, 13~ 14, 18号峰;拟丹参缺少 9, 13, 18号峰;南丹参缺少 3, 7, 9~ 18号峰。从共有峰的成分含量上分析,拟丹参中所含原儿茶醛与正品丹参接近,但丹参酚酸类成分远不如正品丹参高。其它同属植物中的化学成分也不如正品丹参高。最近 20年来的研究表明,丹参水溶性有效成分除了丹参素和原儿茶醛外,丹参酚酸类成分起着重要作用。可见,其他同属植物是不宜充作丹参进行药用的。

与单纯的 HPLC指纹图谱比较,本文所建立的

指纹条形码图更有利于样品间峰形的比较分析,更容易获得主要指标成分相对含量的信息,从而能快速地样品的鉴别和品质优劣作出评判。利用这种技术给正品丹参以防伪激光条码,就会很容易将其其它非正品丹参鉴别出来

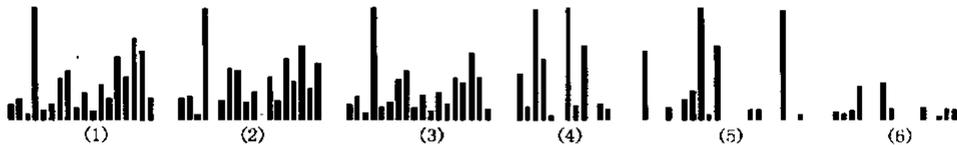
图 3是同一株丹参不同部位化学成分 HPLC指纹图谱条形码组合比较图。与图 2一样,其中每一副指纹条形码图只是给出 18个共有峰并以其为比较标准,因为,这些信息对于比较各部位的不同和进行品质分析是足够的,包含了目前所明确的主要水溶性指标成分。图中(1)(2)(3)(4)(5)和(6)分别为II级丹参、丹参木质部、丹参根皮部、丹参花、丹参叶和丹参茎部相关成分 HPLC指纹条形码图。从整体上看,丹参根、丹参根皮和丹参木质部的条形码图较为接近,而丹参花、叶和茎的图谱有较大差异。主要表现在两个方面,一是在成分的种类上:丹参根皮中含有丹参中全部 18种共有成分,而木质部中缺少峰 5和峰 11。丹参花中缺少峰 6、峰 10、峰 13和 14和峰 16~ 18。丹参叶中缺少峰 2、峰 8~ 10、峰 13和 14、峰 16和峰 18。丹参茎中缺少峰 5和 6、峰 9~ 11、峰 13和峰 17和 18。另一方面,从各图的纵坐标长度上可以明显看出每一种成分的相对数量的不同。



(1)-丹参 (2)-甘西鼠尾草 (3)-新疆鼠尾草 (4)-拟丹参 (5)-南丹参 (6)-滇丹参
(1)-*S. miltiorrhiza* (2)-*S. przewalskii* (3)-*S. deserta* (4)-*S. paramiltiorrhiza* (5)-*S. bowleyana* (6)-*S. yunnanensis*

图 2 丹参与其他鼠尾草属植物条形码比较

Fig. 2 HPLC fingerprint bar code of components from *S. miltiorrhiza* and other species of *Salvia* L.



(1)-II级丹参 (2)-丹参木质部 (3)-丹参根皮部 (4)-丹参花 (5)-丹参叶 (6)-丹参茎
(1)-*S. miltiorrhiza* (2)-xylem (3)-cortex (4)-flower (5)-leaves (6)-stem

图 3 丹参不同部位化学成分条形码比较

Fig. 3 HPLC fingerprint bar code of components from *S. miltiorrhiza* and its different tissues.

一些重要的水溶性指标成分在丹参地上部分叶子和花中均有较多分布。这一结果从一个侧面说明了对丹参进行综合开发的可行性。但是,由于地上部分化学成分 HPLC条形码图与地下部分有明显区

别,其药用价值还有待进一步的药效学研究

进一步分析条形码图 2和图 3不难发现:丹参与其他同属鼠尾草植物间,丹参与其不同的组织部位间及不同等级丹参样品间的区别主要在 4号峰以

后的共有峰 该峰是原儿茶醛,对应的保留时间为 33.71 min ($RSD=1.5\%$)。因此,宜将丹参水溶性成分 HPLC 指纹图谱分为两个区:从开始到保留时间 33.71 min 的区域称为非指纹区;33.17~80 min 之间的区域称为指纹区。指纹区具有鉴别功能和半定量功能,而非指纹区主要用于半定量。这一分区的重要性在于简化繁杂的指纹图谱识别程式,同时利于中药材有效成分的特征鉴别。

利用上述技术对从四川中江 GAP 丹参基地所取的 246 个样品进行了研究。结果表明:对 46 个不同部位样品识别准确率为 99%,对 200 个不同等级丹参识别准确率为 98.5%。而对 38 个不同来源的丹参及伪品能全部鉴别出来。而条形码中指纹区和非指纹区的划分可简化图谱识别程式,从而为丹参的真伪优劣和品质评价提供特征性方法。但本文只是初步的结果,特别是对于不同等级样品间的比较结果还有待大量样品的实践验证。

3 结论

3.1 本实验所建立的丹参水溶性成分 HPLC 指纹图谱有较高的稳定性、精密度和良好的重现性。290~300 nm 波长的指纹图谱能反映较多的指标成分信息量。其中含量 18 个共有指纹峰,其相对保留时间的 $RSD < 1.18\%$,主要峰面积 $RSD < 25\%$ 。能用于直接评价不同产地丹参的质量。

3.2 用归一化数学法处理 HPLC 指纹图谱得到不同类别丹参的典型指纹条形码图。该图简单明了,能直观快捷地对不同等级和质量的丹参做出评价,并

对不同来源及真伪丹参做出准确鉴别。

3.3 指纹条形码中指纹区和非指纹区的划分可简化图谱识别程式,从而为丹参的真伪优劣和品质评价提供特征性方法。

References

- [1] XU R S. *Danshen-Biology and Its Application* (丹参生物学及其应用) [M]. Beijing: Science Press, 1990.
- [2] DU G H, Zhang J T. Research development on the active ingredients of saviianolic acids in Danshen [J]. *Basic Med Sci Clin* (基础医学与临床), 2000, 20(5): 10-14.
- [3] Zhou C X, Luo H W, Dan Y Z. Studies on the water-soluble components from Danshen [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1999, 30(6): 411-416.
- [4] Lu Y R, Yeap Foo L. Polyphenolic of *Salvia a* review [J]. *Phytochemistry*, 2000, 59: 117-140.
- [5] Yokozawa T, Lee T, Ouar H, et al. Haemodynamic effects of magnesium lithospermate B in rats with renal failure [J]. *Phytother Res*, 1992, 6: 187-192.
- [6] Liu J, Shen H M, Ong C N. *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Cancer Lett*, 2000, 153: 85-93.
- [7] Chen X R, LU J B, Shi H P. New development of Danshen pharmacology [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2001, 21(1): 44-45.
- [8] Xie B S. On the feasibility of application of chromatographic fingerprint identification to herbal medication [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(6): 391-394.
- [9] Tu P F. Discuss for establishing fingerprinting of Chinese medicinal materials and its injection by HPLC [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 2(7): 516.
- [10] Sha M, Wang J Y, Cao A M, et al. Application of HPLC fingerprint technique in quality control of new drug of Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(2): 181-183.
- [11] Regulation for Fingerprinting Technology of Chinese Traditional Medicine Injection [S]. 2000.

野葛幼叶细胞悬浮培养生产葛根素等异黄酮类化合物的研究

张春荣^{1,2},李玲^{1*}

(1. 华南师范大学生命科学学院,广东 广州 510631; 2. 中山大学生命科学学院,广东 广州 510275)

摘要:目的 建立野葛幼叶细胞悬浮培养体系。方法 将由野葛幼叶外植体诱导的愈伤组织进行悬浮培养,研究了悬浮培养物生长的动态和葛根素及总异黄酮类化合物产量积累的动态。结果 细胞在培养的第 1~5 天为对数生长期,第 8 天时细胞干重达最大值。葛根素的合成与细胞生长呈紧密偶联型,在第 8 天时葛根素产量达最大值。总异黄酮类化合物的积累与葛根素积累存在一定差异,异黄酮类化合物的总产量在第 10 天最大值。结论 野葛幼叶细胞悬浮培养体系中总异黄酮类化合物的产量高于野生原植株,葛根素产量低于野生原植株。

关键词:野葛;悬浮培养;葛根素;异黄酮类化合物

中图分类号: R282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)07-0653-05

* 收稿日期: 2002-11-18

基金项目: 1999 年教育部优秀青年教师项目 (003062); 广东省科技计划项目 (C11703)

作者简介: 张春荣 (1976-), 男, 山东淄博人, 中山大学在读博士研究生, 研究方向为植物发育及分子生物学。

E-mail: zhangchun@eyou.com

* 通讯作者 Tel: (020) 85211378 E-mail: bioliling@eyou.com