

- Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(7): 567-573.
- [15] Ding X Y, Xu L S, Wang Z T, *et al.* Allele-specific diagnostic PCR authentication of *D. devonianum* from other *Dendrobium* species [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(11): 897-901.
- [16] Ma X J, Wang X Q, Xiao P G, *et al.* Comparison of ITS sequences between wild ginseng DNA and garden ginseng DNA [J]. *Chnia J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(4): 206-209.
- [17] Bao Y, Ge S. Identification of *Oryza* species with the CD genome based on RFLP analysis of nuclear ribosomal ITS sequences [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2003, 45(7): 762-765.
- [18] Qu L H, Chen Y Q. Key to molecular taxonomy principles and methods [J]. *Acad J Sun Yat-Sen Univ - Nat Sci* (中山大学学报·自然科学版), 1999, 38(1): 1-6.

当归 HPLC 指纹图谱研究(I)

马华侨, 邱多隆, 邵士俊, 刘 霞, 蒋生祥*

(中国科学院兰州化学物理研究所 西北天然药物研究发展中心, 甘肃 兰州 730000)

摘要:目的 建立甘肃当归药材 HPLC 指纹图谱。方法 以联苯为参照物, 采用 C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 以甲醇-水 (水中含体积比为 0.5 % 醋酸) 为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.6 mL/min, 检测波长为 275 nm, 参比波长为 400 nm。结果 精密度、重现性、稳定性试验中共有峰相对峰面积、相对保留时间的 RSD 均小于 5.0 %; 不同产地当归相似度大于 98.5 %。结论 该方法简便、实用、可靠, 可以作为评价当归药材的质量标准。

关键词: 当归; 高效液相色谱; 指纹图谱; 联苯; 质量控制

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)08-0930-03

HPLC fingerprint of *Angelica sinensis* (I)

MA Hua-qiao, DI Duo-long, SHAO Shi-jun, LIU Xia, JIANG Sheng-xiang

(Research and Development Center of Northwest Natural Products, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Object Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) fingerprint of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. grown in Gansu Province was established. **Methods** Chromatographic conditions were available as follows: Biphenyl as reference material, C_{18} column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), methanol and water including 0.5 % acetic acid as mobile phase, flow rate 0.6 mL/min, gradient elution, the detection wavelength was set to 275 nm and 400 nm as reference wavelength. **Results** The RSD of relative peak areas and retention time of common peak in precision, repeatability, and stability has not reached 5.0 %, respectively. Similarity was over 98.5 % in *A. sinensis* collected from different habitats. **Conclusion** All results above exhibited that this method is simple, practicable, and reliable as a standard method in controlling the quality of *A. sinensis*.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; HPLC; fingerprint; biphenyl; quality control

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 作为临床中常用药材, 已有两千多年的药用历史。当归有活血化瘀, 润肠止痛之功效^[1,2], 是传统的名贵药材。产于甘肃岷县的当归 (又称岷归) 是《中华人民共和国药典》收载的正品当归, 其资源极为丰富, 有资料显示, 仅甘肃定西地区, 岷归种植面积和产量均占全国的 70 % 左右。

当归化学成分复杂^[3,4], 单一成分的确认难以代表其质量, 为了控制当归药材质量, 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”的要求, 并参照相关文献^[5,6], 采用 HPLC 方法对甘肃岷县等地种植的当归药材进行了指纹图谱研究。实验证明, 该方法简便、可靠、重现性好, 可作为当归药材及其制剂指纹图谱研究的基

* 收稿日期: 2004-02-07

基金项目: 中国科学院 2001 年度“西部之光”资助项目; 中国科学院兰州化学物理研究所 2000 年度知识创新领域前沿项目

作者简介: 马华侨 (1979 -), 男, 安徽宿州人, 硕士研究生, 主要研究方向为中药色谱指纹图谱。

* 通讯作者 Tel: (0931) 8275941 Fax: (0931) 8277652 E-mail: sxjiang@ns.lzb.ac.cn

础,也可当归药材 GAP 生产基地建设提供技术和理论依据。

1 材料

1.1 当归样品的采集:当归试样分别在能够反映当归当前种植水平的主产区,甘肃岷县、渭源县、漳县实地采取[品种经甘肃省药品检验所宋平顺主任药师鉴定为 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels],按《中华人民共和国药典》规定中药材取样法取样 10 批,具体如表 1。

表 1 当归样品来源

Table 1 Origin of *A. sinensis*

样品批号	产 地	样品批号	产 地
1	甘肃省岷县	6	甘肃省渭源县
2	甘肃省岷县	7	甘肃省渭源县
3	甘肃省岷县	8	甘肃省漳县
4	甘肃省岷县	9	甘肃省漳县
5	甘肃省渭源县	10	甘肃省漳县

1.2 仪器与试剂:Agilent 1100 系列高效液相色谱仪;水为二次蒸馏水,醋酸为分析纯(天津化学试剂厂),甲醇为色谱纯(山东省禹王实业集团禹城化工厂),联苯(Aldrich 公司,美国)。

2 方法

2.1 色谱条件: C_{18} 反相色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m,中国科学院兰州化学物理研究所色谱研究发展中心),流动相为 0.5 %醋酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱:0 min A-B (70 %~30 %),20 min A-B (30 %~70 %);70 min A-B (0~100 %);紫外检测波长为 275 nm,参比波长为 400 nm;进样体积 20 μ L;柱温 25 $^{\circ}$ C。

2.2 供试品的制备:取当归干燥根粉碎,过 40 目筛,准确称取 2.00 g 于具塞三角烧瓶中,加 50 %甲醇水溶液 40 mL,超声提取 45 min,离心 15 min,0.45 μ m 膜滤过,备用。

2.3 内标溶液的配制:用联苯做内标,称取 5.9 mg 溶于 50 mL 甲醇中,备用。

2.4 方法学的考察

2.4.1 精密度试验:取 5 号供试品溶液,连续进样 5 次,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5 %,表明精密度良好。

2.4.2 稳定性试验:取 7 号供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 5 %,表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验:取供试品 10 号样 6 份,精密称量,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样,测得各共有峰相对峰面积的 RSD 小于 5 %,表明其重

复性较好。

3 结果与讨论

3.1 共有峰的标定:对上述条件下的液相色谱指纹图谱分析比较和对已知化合物的确认,找出比较稳定的色谱峰共 18 个,具体如图 1,表 2。

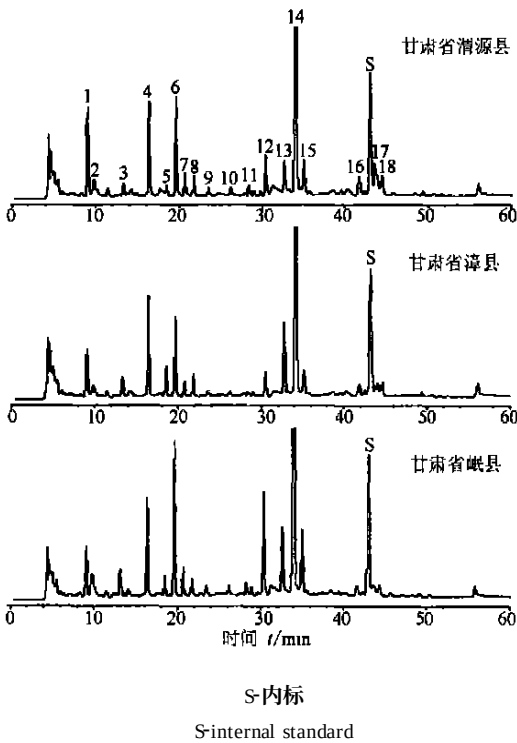


图 1 3 种不同产地当归 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of *A. sinensis* collected from three different habitats

3.2 相似度计算:指纹图谱相似度的测定方法有多种,文献^[7]表明夹角余弦测度用于度量指纹图谱间峰比例的波动较适宜,峰匹配测度可较灵敏地检测小峰个数波动,夹角余弦测度更适于分析评价不同批次间药品质量稳定性。本实验就是以供试品的各峰平均值为对照模板,初步采用夹角余弦的方法来计算当归指纹图谱相对峰面积的相似度,并计算相关系数,结果如表 3。

3.3 色谱条件的选取与优化:以甲醇作为有机改性剂用于流动相,并用不同的梯度方式考察了色谱分离能力。以甲醇为流动相添加剂时,色谱峰容量大,分离度较好,稳定性较高,最终选取以甲醇为有机改性剂时的梯度洗脱方式,当归 HPLC 分离结果如图 1。

3.4 波长的选取:在上述“2.2”提取条件和“2.1”色谱分离条件下,对全当归药材提取物进行了 DAD 紫外扫描,经分析研究,选定了 275 nm 为检测波长,400 nm 为参比波长时,色谱峰较为均匀,基线也较稳定。

3.5 本研究中相对保留时间数据表明,当归有很好

表 2 当归药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peak for fingerprint of *A. sinensis*

批号	相 对 峰 面 积																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	S	17	18
1	0.439	0.324	0.113	0.556	0.064	0.416	0.096	0.115	0.052	0.058	0.057	0.090	0.436	3.558	0.286	0.077	1.000	0.063	0.089
2	0.648	0.320	0.152	0.832	0.090	0.513	0.147	0.190	0.092	0.076	0.097	0.175	0.526	4.411	0.358	0.116	1.000	0.092	0.120
3	0.591	0.212	0.128	0.713	0.075	0.482	0.100	0.132	0.050	0.053	0.065	0.115	0.443	3.874	0.377	0.076	1.000	0.075	0.100
4	0.692	0.229	0.055	0.534	0.038	0.293	0.073	0.063	0.081	0.021	0.032	0.216	0.425	5.635	0.194	0.174	1.000	0.392	0.197
5	0.453	0.330	0.125	0.631	0.059	0.412	0.099	0.132	0.053	0.060	0.043	0.075	0.412	3.123	0.271	0.084	1.000	0.071	0.068
6	0.509	0.145	0.123	0.575	0.081	0.371	0.100	0.096	0.040	0.064	0.053	0.018	0.331	1.084	1.199	0.093	1.000	0.062	0.098
7	0.572	0.241	0.097	0.502	0.067	0.528	0.129	0.124	0.059	0.077	0.078	0.271	0.365	3.083	0.292	0.173	1.000	0.393	0.205
8	0.463	0.259	0.150	0.862	0.062	0.555	0.119	0.151	0.070	0.065	0.074	0.025	0.421	4.932	0.411	0.081	1.000	0.177	0.083
9	0.300	0.266	0.205	0.438	0.118	0.720	0.154	0.147	0.136	0.115	0.110	0.737	0.518	3.497	0.448	0.128	1.000	0.075	0.106
10	0.474	0.101	0.125	0.114	0.734	0.049	0.461	0.109	0.093	0.057	0.071	0.063	0.417	5.381	0.349	0.077	1.000	0.180	0.082

表 3 不同产地当归相似度比较

Table 3 Comparison of similarity of *A. sinensis* collected from ten habitats

批 号	夹角余弦	相关系数
1	0.995 4	0.994 4
2	0.998 5	0.998 5
3	0.999 0	0.998 9
4	0.992 6	0.994 1
5	0.997 7	0.997 4
6	0.986 0	0.985 1
7	0.987 5	0.987 9
8	0.997 7	0.997 9
9	0.985 0	0.984 0
10	0.994 7	0.997 0

的指纹性。虽然不同产地的当归共有指纹峰面积是有差异的,有的相差还很大。但三地当归相似性很好,说明三地当归总体上是无差异的。有关当归质量控制与评价方面的进一步研究工作将另文报道。

References:

[1] Liu J, Burdette J, Xu H, et al. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 2472-2479.

[2] Yin T K, Wu W K. Myocardial protection against ischemia-reperfusion injury by a *Polygonum multiflorum* extract supplemented "Dang-Gui decoction for enriching blood", a compound formulation, *ex vivo* [J]. *Phytother Res*, 2000, 14: 195-199.

[3] Wang H J, Shen X, Yang J, et al. Determination ferulic acid in Danggui Buxue Decoction by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1998, 4(5): 9-10.

[4] Lin L Z, He X G, Lian L Z, et al. Liquid chromatographic electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of *Z*-ligustilide [J]. *J Chromatogr (A)*, 1998, 810: 71-79.

[5] Xie P 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.

[6] Xie P S. A feasible strategy for applying chromatography fingerprint to access quality of Chinese herbal medicine [J]. *Clin Drug Res Chin Pharm* (中药新药与临床药理), 2001, 12(3): 141-151.

[7] Cheng Y Y, Chen M J, Wu Y J. Measures for determination the similarity of chemical fingerprint and a method of evaluating the measures [J]. *Acta Chem Sin* (化学学报), 2002, 60(11): 2017-2021.

黄花岗头体细胞胚胎发生及其植株再生

于荣敏^{1,3},徐秀泉²,赵 昱^{3*}

(1. 暨南大学药学院,广东 广州 510632; 2. 江苏大学生物与环境工程学院,江苏 镇江 212013;
3. 浙江大学药学院,浙江 杭州 310031)

摘要:目的 对不同植物激素及其配比对黄花岗头体细胞胚胎诱导及植株再生进行研究,为药用植物黄花岗头的资源开发提供理论依据。方法 以黄花岗头的茎、叶、胚轴、胚根和子叶为外植体考察不同植物激素对黄花岗头愈伤组织诱导、体细胞胚胎发生及植株再生的影响。结果 外植体接种于 MS+2,4-D 1 mg/L +6-BA 0.5 mg/L 的培养基上愈伤组织诱导率最高,愈伤组织在 MS+2,4-D 0.2 mg/L +6-BA 0.5 mg/L

* 收稿日期:2004-02-07
作者简介:于荣敏(1955-),男,教授,博士,研究方向为中药生物技术、创新药物的研制开发。