

试将PMT和H6H构建到双价载体上,通过发根农杆菌转化莨菪,增加发根提高酶的表达活力,使东莨菪碱量最高的转化发根系比野生型(43 mg)提高了9倍,据了解这是目前利用遗传代谢工程在莨菪中获得的最大的东莨菪碱的量^[13]。

本实验利用发根农杆菌Ri质粒首次成功地从莨菪 *H. niger* L. 中诱导出毛状根,筛选出了各自的生长快速的优质株系,建立了发根培养体系,为进一步利用遗传代谢工程手段调节莨菪次生代谢物的量和进行药用活性成分的工业化生产奠定了基础。

References:

- [1] Hamill J D, Parr A J, Rhodes M J C, *et al.* New routes to plant secondary products [J]. *Biol Technol*, 1987, 5: 800-804.
- [2] Wang G L. *The Principle and Technology of Plant Genetic Engineering* (植物基因工程原理与技术) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [3] Perlak F J, Fuchs R L, Dean D A, *et al.* Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 3324-3328.
- [4] Dixon M S, Jones D A, Keddle J S, *et al.* The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding Leucine-Rich repeat proteins [J]. *Cell*, 1996, 84: 451-459.
- [5] Canel C, Lopez-Cardoso M I, Whitmer S, *et al.* Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *Planta*, 1998, 205: 414-419.
- [6] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [7] Phunchindawan M, Hirata K. Application of scopolamine in clinical practice [J]. *Neurol Psychiatr Ceskoslov*, 1950, 13 (1): 1-23.
- [8] Walton N, Christou P. A comparison of the central and peripheral effects of atropine, scopolamine and some synthetic atropine-like compounds [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1952, 104 (4): 387-395.
- [9] Ruegenhagen C, Dietze P, Fecker L F, *et al.* Treatment of sprains with levorotatory scopolamine hydrobromide [J]. *Strasb Med*, 1953, 4 (3): 169-170.
- [10] Hashimoto T. Alkaloid biogenesis: molecular aspects [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 45: 257-285.
- [11] Matsuda J. Molecular cloning of hyoscyamine 6-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger* [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 9460-9464.
- [12] Jauhikainen K, Lindgren L, Jokelainen T, *et al.* Enhancement of scopolamine production in *Hyoscyamus muticus* L. hairy root cultures by genetic engineering [J]. *Planta*, 1999, 208: 545-551.
- [13] Zhang L, Ding R X, Chai Y R, *et al.* Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 6786-6791.

甘草药材 HPLC 指纹图谱研究

吴昭晖¹, 罗佳波¹, 游文玮²

(1. 南方医科大学 中药新药研究重点实验室, 广东 广州 510515; 2. 南方医科大学 化学系, 广东 广州 510515)

摘要:目的 建立甘草药材的 HPLC 指纹图谱。方法 采用反相高效液相色谱法, 选用 Zorbax SB-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-1.2% 醋酸溶液 (梯度洗脱); 分析时间 70 min; 检测波长为 254 nm。结果 建立了甘草药材的 HPLC 指纹图谱, 标定了甘草药材 38 个共有指纹峰, 方法学考察结果符合指纹图谱技术要求。结论 方法稳定、可靠、重复性好, 可为甘草药材质控标准的制定和含甘草的中药方剂的物质基础研究提供参考。

关键词: 甘草; 指纹图谱; HPLC

中图分类号: R282.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)12-1868-05

Fingerprints of *Radix Glycyrrhizae* by HPLC

WU Zhao-hui¹, LUO Jia-bo¹, YOU Wen-wei²

(1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and New Drug of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Department of Chemistry of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of *Radix Glycyrrhizae*. **Methods** The RP-HPLC method was used, Zorbax SB C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was employed; the

收稿日期: 2005-02-12

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (30030150)

作者简介: 吴昭晖 (1964—), 女, 福建省漳州市人, 1985 年厦门大学化学系毕业, 现为南方医科大学分析测试中心高级工程师, 研究方向为现代仪器分析。Tel: (020) 61648172 E-mail: youww@fimmu.com

acetonitrile-1.2% acetic acid (gradient elution) was used as mobile phase, analytic time was 70 min, and detective wavelength was at 254 nm. **Results** The HPLC fingerprints of *Radix Glycyrrhizae* were set up. The result showed that 38 peaks were common in different sources. The results of method validation met technical standard of fingerprints. **Conclusion** The method is stable and reliable with a good reproducibility and provides a reference standard for the quality control of *Radix Glycyrrhizae*.

Key words: *Radix Glycyrrhizae*; fingerprints; HPLC

甘草为豆科植物 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Batal.、光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根及根茎,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效。甘草是重要的常用中药,素有“国老”之称,为中药方剂的常见配伍成分。东汉成书的《神农本草经》将其列为上品,此后历代本草都有记载。1977年起,《中国药典》各版均有收载。甘草所含成分复杂,含有甘草酸等三萜类、黄酮类化合物以及香豆素类和生物碱类化合物等^[1]。由于受产地、气候和生态环境等的影响,不同甘草药材所含的成分也存在着一定差异。《中国药典》对甘草药材的质量控制仅限于甘草酸单一成分的测定^[2],不能系统、完整地反映甘草的内在质量。目前,指纹图谱已成为国际公认的控制中药和天然药物质量最有效的手段。为了有效地控制甘草药材及含甘草的中药复方制剂的质量,为了对含甘草的中药方剂的物质基础和配伍规律进行深入研究,笔者通过考察甘肃产的甘草药材,建立了甘草药材的高效液相色谱指纹图谱。

1 仪器与试剂

1.1 仪器:美国惠普 HP-1100 高效液相色谱仪;四元泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器(DAD)。

1.2 试剂:乙腈(色谱纯)、甲醇(分析纯)、冰醋酸(分析纯),水为超纯水。

甘草酸单铵盐对照品(中国药品生物制品检定所,测定用,批号 0731-9704),甘草药材(10批):市售,产地均为甘肃,经第一军医大学中医系刘传明老师鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-1.2%醋酸溶液(梯度洗脱:0~70 min,乙腈体积由 4%上升至 65%),体积流量 0.6 mL/min;柱温:室温;检测波长:254 nm;分析时间:70 min;进样体积 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备:取甘草药材粉末(过 60

目)约 2.0 g,精密称定,置于 100 mL 的圆底烧瓶中,加水 50 mL,加热提取 40 min。待药液冷却后,移取适量药液离心,精密移取上清液 10.0 mL 置于 25 mL 量瓶中,加入甲醇至刻度,摇匀,静置 2 h 后离心,取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 参照物溶液的制备:选择甘草酸单铵盐对照品作为参照物。精密称取甘草酸单铵盐对照品适量,加 40%甲醇溶解,制备质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品贮备液。精密移取对照品贮备液适量,用 40%甲醇适当稀释,制备为 101.0 μg/mL 的对照品溶液,即得参照物溶液。

2.4 测定方法:分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,注入高效液相色谱仪,记录 70 min 色谱图。供试品色谱中,以参照物甘草酸对应的色谱峰(S)的相对保留时间和峰面积为 1,计算各共有指纹峰的相对保留时间及峰面积比值。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验:取同一供试品溶液,连续进样 5 次,测得各共有峰相对保留时间和峰面积>10%的共有峰的峰面积比值,结果 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱技术要求^[3]。

2.5.2 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 检测,测得各共有峰相对保留时间和峰面积>10%的共有峰的峰面积比值,结果 RSD 均小于 3%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.3 重现性试验:取同一批号的样品 5 份,分别按供试品溶液的制备方法制备供试品并测定,测得各共有峰相对保留时间和峰面积>10%的共有峰的峰面积比值,结果 RSD 均小于 3%,符合指纹图谱技术要求。

2.6 指纹图谱及技术参数

2.6.1 指纹图谱:按 2.4 项测定 10 批甘草药材。根据 10 批供试品的检测结果,建立甘草药材的高效液相色谱指纹图谱(图 1)。测定结果见表 1.2。

2.6.2 共有指纹峰的标定:采用相对保留时间标定共有指纹峰。根据 10 批供试品 HPLC 谱给出的相关参数,比较供试品谱图,其中 38 个峰是 10 批供试

表 2 10 批甘草药材共有指纹峰的峰面积比值
Table 2 Relative areas of common peaks for ten batches of *Radix Glycyrrhizae*

批次	12 号共有峰峰面积比值	非共有峰面积占总峰面积的百分数	批次	12 号共有峰峰面积比值	非共有峰面积占总峰面积的百分数
1	0.730	6.73	7	0.687	4.11
2	0.645	7.12	8	0.660	5.74
3	0.617	5.45	9	0.656	7.08
4	0.612	6.88	10	0.486	4.90
5	0.497	4.54	平均值	0.609	5.83
6	0.504	5.78			

2.6.3 共有指纹峰峰面积的比值:在共有指纹峰

中,只有 12、34(S)号峰的峰面积大于总峰面积的 10%,故只考虑 12 号峰的峰面积比值,其余各共有峰均按其相对保留时间定性。共有峰的峰号(峰面积比值):12 (0.609)。

2.6.4 共有指纹峰的紫外吸收图谱:在甘草的 38 个共有指纹峰中,单峰面积占总峰面积 3% 以上的有 11、12、17、23、24、26、29、34 号等 8 个峰,利用 DAD 检测器考察了这 8 个峰的紫外吸收图谱,如图 2 所示。

3 讨论

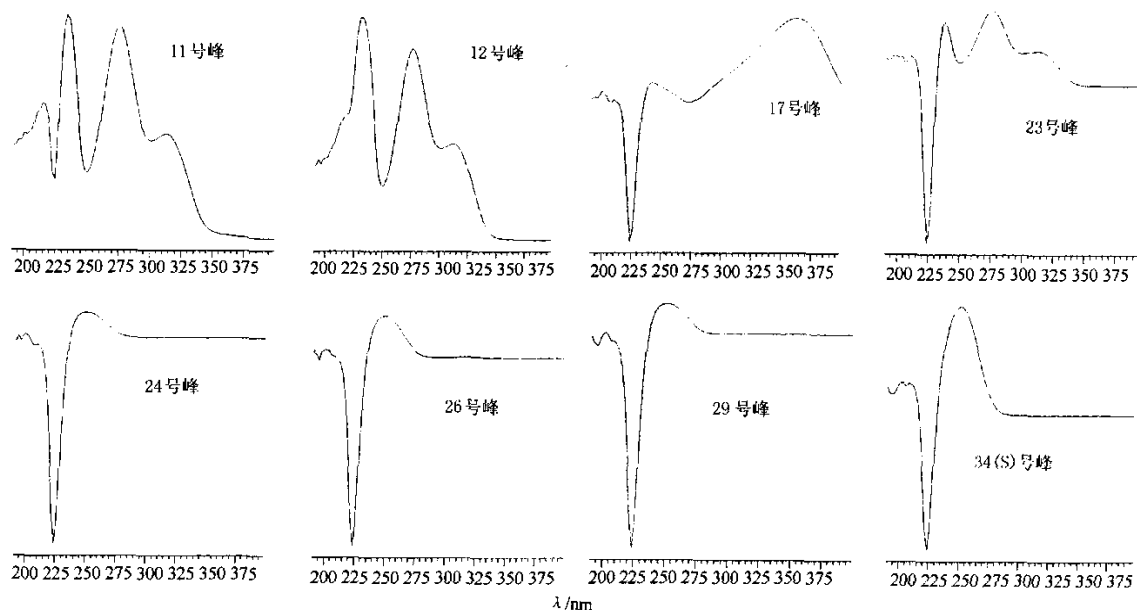


图 2 甘草药材部分共有峰的紫外吸收图谱(DAD 检测)

Fig. 2 UV spectra of some common peaks of *Radix Glycyrrhizae* (detected by DAD)

3.1 检测波长的选择:采用 DAD 对指纹图谱的检测波长 280、254、210 nm 进行了选择,结果表明检测波长为 254 nm,色谱图所包含的信息量大,各色谱峰分离较好。

3.2 流动相的选择:考虑到甘草所含三萜类多为有机酸类物质,在流动相中加入了一定比例的冰醋酸,以抑制有机酸的解离,各峰分离较好且峰型对称。比较了等度洗脱与梯度洗脱对甘草指纹图谱的影响,结果发现等度洗脱时,改变流动相的组成或比例只能得到较少的色谱峰。改用梯度洗脱,样品中不同极性组分都获得了合适的保留,在 70 min 内各组分全部出峰,色谱峰数增加到 40 个以上。实验证明,梯度洗脱条件容易控制,溶剂对甘草指纹图谱中共有峰检出无干扰,样品保留时间重现性好,分离度和柱效都令人满意。曾试用甲醇-1.2% 醋酸梯度洗脱,分离

效果不好,改用乙腈-1.2% 醋酸后,基线平直且分离度良好。

3.3 参照物的选择:甘草药材有效成分中甘草酸的量较高且相对稳定,因此选其作为参照物。

3.4 甘草药材为多品种来源,各品种所含化学成分及量有较大差别,故应针对不同品种建立相应的指纹图谱。

3.5 指纹图谱指纹区域的划分:甘草指纹图谱的共有指纹峰有 38 个,峰数较多,为便于研究,可以将指纹图谱划分为 A、B、C、D、E、F、G、H 共 8 个指纹区: A 区有 1 个指纹峰,只有 1 号峰; B 区有 5 个指纹峰,包括 2、3、4、5、6 号峰; C 区有 6 个指纹峰,包括 7、8、9、10、11、12 号峰; D 区有 7 个指纹峰,包括 13、14、15、16、17、18、19 号峰; E 区有 6 个指纹峰,包括 20、21、22、23、24、25 号峰; F 区有 3 个指纹峰,包括

26、27、28号峰;G区有6个指纹峰,包括29、30、31、32、33、34号峰;H区有4个指纹峰,包括35、36、37、38号峰。若要比不同品种来源的甘草指纹图谱的差异,可以在8个指纹区分别考察。

3.6 本方法稳定、可靠、重现性好,可为甘草药材及其它含甘草的中药复方制剂制定质量标准提供参

考,也为含甘草的中药方剂的物质基础研究与配伍规律研究提供分析方法。

References:

- [1] Hui S N, Dong A L. Advances in the study on chemical constituents of *Glycyrrhiza uralensis* in China [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30 (4): 313-315.
- [2] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.

鱼腥草白绢病发生发展规律及防治方法研究

唐莉, 吴锡明, 马曲, 马勇

(雅安三九中药材科技产业化有限公司, 四川雅安 625000)

摘要:目的 通过对鱼腥草白绢病的发生发展规律和防治方法的研究,为该病的综合防治提供一定的依据。方法 采用田间调查、田间试验和室内实验相结合的方式。结果 种茎处理以多菌灵的效果最好,发病率最低,产量最高;PDA平板测定表明木霉对鱼腥草白绢病拮抗作用极强,优于常用农药处理;在3个木霉菌剂质量浓度中,20 g/m²的防治效果最好,其防治效果达到了60.28%。结论 采用多菌灵处理鱼腥草种茎和20 g/m²木霉制剂处理土壤能较好地防治鱼腥草白绢病。

关键词: 鱼腥草;白绢病;防治方法

中图分类号: R282.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)12-1872-04

Occurrence and spreading dynamics and control methods of Southern blight in *Houttuynia cordata*

TANG Li, WU Xi-ming, MA Qu, MA Yong

(Ya'an Sanjiu Chinese Medicinal Materials Science and Technology Industrialization Co., Ltd., Ya'an 625000, China)

Abstract: Objective To study the occurrence and spreading dynamics of Southern blight *Houttuynia cordata* and search for the control method so as to provide scientific basis for its integrated pest management (IPM). **Methods** The field investigation and the combined methods in both field trial and laboratory test were carried out for the research. **Results** After treated by Carbendaxim, the morbidity of Southern blight in *H. cordata* was the lowest and the yield of *H. cordata* reached to the highest level among all treatment groups. The PDA test revealed that *Trichoderma huzirum* had stronger antagonism to Southern blight in *H. cordata* than common fungicides. The best concentration of *T. huzirum* used in the soil treatment was 20 g/m², which had a preventive effect against Southern blight up to 60.28%. **Conclusion** The Southern blight of *H. cordata* could be well suppressed while both Carbendaxim and *T. huzirum* are used to treat the seeds and soil, respectively.

Key words: *Houttuynia cordata* Herb; Southern blight; control methods

鱼腥草药、蔬兼用,原植物为三白草科蕺菜属蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb.。具清热解毒、消肿排脓、利尿通淋等功能,还可增强机体免疫力^[1,2]。随着鱼腥草需求量不断地增大,其人工栽培的规模不断扩大,造成了一些病害的发生。目前危害鱼腥草的病害主要是白绢病,对其产量和质量造成了严重的影响。

木霉防治白绢病已有大量的报道^[3~6],其效果显著,但有关鱼腥草栽培管理的报道中尚未见有关白绢病发生发展规律及木霉防治鱼腥草白绢病的报道,本研究试图对该病的发生发展规律和防治方法作初步探讨,为鱼腥草白绢病的综合防治提供一定的依据。

1 材料与方法

收稿日期:2005-03-15

作者简介:唐莉(1974—),女,四川雅安人,雅安三九中药材科技产业化有限公司技术副经理,硕士研究生(植物病理学专业),主要负责中药材生产和规范化种植技术研究工作。Tel: (0835) 2876056 Fax: (0835) 2876101 E-mail: tangli@ya999.com