

栽到自然环境中生长。

致谢:在切片观察中曾得到华南农业大学生命科学学院严学成教授的热心帮助。

References:

- [1] Ding A W. *Clinical Handbook of Modern Chinese Traditional Medicine* (现代中药临床手册) [M]. Nanjing: Jiangsu Publishing House of Science and Technology, 2000.
- [2] Dhenuka S, Balakrishna P, Ajith A. Indirect organogenesis from the leaf explants of medicinally important plant *Curculigo orchoides* Gaertn. [J]. *J Plant Biochem Biotechnol*, 1999, 8(2): 113-115.
- [3] Prajapati H A, Patel D H, Mehta S R, et al. Direct *in vitro* regeneration of *Curculigo orchoides* Gaertn., an endangered anticarcinogenic herb [J]. *Curr Sci*, 2003, 84(6): 747-749.
- [4] Xu Z H, Liu G Y. Histo-cytological observations on callus and bud formation in cultures of *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1980, 22(1): 1-5.
- [5] Guo Q S. Cytohistological study on morphogenesis of the adventitious bud in the *in vitro* culture of micro-cross sectioned leaf midveins from hybrid *Populus* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1997, 39(12): 1131-1137.
- [6] Chen M X, Li M J, Guo J L, et al. A study on early changes of cotyledon cells of *Dioscorea opposita* Thunb. in the process of dedifferentiation [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2003, 25(5): 517-519.
- [7] Ji S Y, Yan X C, Wang Y J. Cytohistological observations on callus formation from leaf cultures in *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze. [J]. *J Tea* (茶叶), 1995, 21(2): 11-13.
- [8] Wang W H, Deng X, Hu W Y, et al. Histological study on the formation of callus and the differentiation of the regenerated bud in tissue culture of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) [J]. *J Shenyang Agric Univ* (沈阳农业大学学报), 1998, 30(4): 430-433.
- [9] Chen H M, Teng S Y, Yu J J. Callus induction and organ formation from young leaf of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1980, 22(1): 112-115.
- [10] Li C Y. The morphology and histology of callus formation in cultured sugarcane leaf sheath and leaf blade [J]. *J Guangxi Normal Univ* (广西师范大学学报), 1994, 12(2): 65-69.

防己药材的 HPLC 指纹图谱研究

崔金国^{1,2}, 饶毅^{1*}, 魏惠珍¹, 黎莉², 刘隆洪³, 王跃生¹, 杨世林¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006;

3. 江西翔云生物药业有限公司, 江西 遂川 343900)

摘要:目的 用 HPLC 法对防己药材指纹图谱进行研究。方法 采用色谱条件: Shimadzu VP-ODS 柱(250 mm×4.6 mm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱进行色谱分离; 检测波长为 282 nm; 以防己诺林碱作为参照物。结果 初步建立了防己药材的 HPLC 指纹图谱, 并进行相似度评价。结论 方法简单可行, 能够有效地控制防己药材的内在质量。

关键词: 防己; 指纹图谱; HPLC; 相似度

中图分类号: R282.7 R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)02-0269-04

HPLC Fingerprint of *Radix Stephaniae Tetrandrae*

CUI Jin-guo^{1,2}, RAO Yi¹, WEI Hui-zhen¹, LI Li², LIU Long-hong³,

WANG Yue-sheng¹, YANG Shi-lin¹

(1. National Pharmaceutical Engineering Center (NPEC) for Solid Preparation in Chinese Materia Medica, Nanchang

330006, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

3. Jiangxi Xiangyun Biology Pharmaceutical Co., Ltd., Suichuan 343900, China)

Abstract: Objective To study the fingerprint of *Radix Stephaniae Tetrandrae* by HPLC. **Methods** HPLC condition: column Shimadzu VP-ODS (250 mm×4.6 mm); the mobile phase was acetonitrile with 0.1% phosphoric acid and the gradient elution mode was applied in chromatographic separation; the detection wavelength was 282 nm; fangchinoline was used as the reference compound. **Results** HPLC Fingerprint of *Radix Stephaniae Tetrandrae* was established and the similarity of the fingerprint was compared.

收稿日期: 2006-04-25

作者简介: 崔金国(1978—), 男, 江西中医学院药物分析专业硕士研究生。E-mail: lan_shu_2005@163.com

* 通讯作者 饶毅 Tel: (0791) 7119609 E-mail: raoyi99@126.com

Conclusion The method is simple, accurate, and can be used to control the quality of *Radix Stephaniae Tetrandrae* availablely.

Key words: *Radix Stephaniae Tetrandrae*; fingerprint; HPLC; similarity

防己为防己科粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根,粉防己根中含有粉防己碱、防己诺林碱、轮环藤酚碱等成分,具有解热镇痛、风湿止痛、利尿消肿之功效^[1]。自古以临床常用的中药防己分为汉防己(粉防己)^[2]和木防己两大类,素有“治风用木防己,治水用汉防己”之说,可见其品种不一,功用也有所不同^[3]。为了使粉防己药材在 GAP 生产管理中更加规范,本实验采用 HPLC 法建立了防己药材的指纹图谱。

1 仪器与试药

岛津 LC-10ATVP 高效液相色谱仪,SPD-M10AVP DAD 检测器,SIL-10ADVP 自动进样器,CLASS-VP 色谱工作站;Shimadzu AUW220D 型(十万分之一)电子天平;梅特勒 AB-104N 型电子天平。乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为 Millipore 超纯水。粉防己碱、防己诺林碱(中国药品生物制品检定所,批号分别为 0711-200005 供定量测定用,0793-200003 供鉴别用);防己药材来源于江西遂川基地和市售样品,见表 1,由江西中医学院中药鉴定教研室傅小梅博士鉴定为粉防己 *S. tetrandra* S. Moore 的干燥根。

表 1 防己药材测试样品

Table 1 Test sample of *Radix Stephaniae Tetrandrae*

编号	产地	生长期	编号	产地	生长期
1	江西遂川(基地一)	3 年生	8	江西遂川(基地二)	6 年生
2	江西遂川(基地一)	5 年生	9	江西遂川(基地二)	7 年生
3	江西遂川(基地一)	6 年生	10	江西遂川(基地二)	10 年生
4	江西遂川(基地一)	7 年生	11	江西九江(市售)	—
5	江西遂川(基地一)	10 年生	12	江西上饶(市售)	—
6	江西遂川(基地二)	3 年生	13	安徽(市售)	—
7	江西遂川(基地二)	5 年生	14	浙江(市售)	—

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Shimadzu VP-ODS 柱(250 mm×4.6 mm);检测波长:282 nm;体积流量:1.0 mL/min;进样体积:10 μL;柱温:25 ℃;流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液,梯度洗脱:0 min:乙腈-0.1%磷酸溶液(15:85);20 min:乙腈-0.1%磷酸溶液(30:70);40 min:乙腈-0.1%磷酸溶液(40:60);60 min:乙腈-0.1%磷酸溶液(80:20)。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取粉防己碱、防己诺林碱对照品适量,用甲醇溶解,含防己诺林碱

0.05 mg/mL,含粉防己碱 0.1 mg/mL,即得,色谱图见图 1。

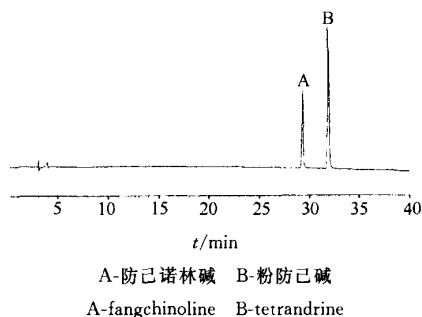


图 1 防己诺林碱和粉防己碱的混合对照品图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of fangchinoline and tetrandrine

2.3 供试品溶液的制备:取同一批号药材样品粉末(过 3 号筛)约 0.5 g,精密称定,精密加入甲醇溶液 25 mL,称定质量,加热回流 1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,滤过,即得。

2.4 重现性试验:取同一批号防己药材粉末 6 份,精密称量,制备供试品溶液,分别进样,测得结果表明,各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明样品重现性良好。

2.5 精密度试验:取重现性试验供试品溶液,连续进样 5 次,测得结果表明,各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验:取同一批号防己药材粉末,精密称量,制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、16、24 h 进样,测得结果表明,各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 指纹图谱的建立

2.7.1 指纹图谱的测定:分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录 60 min 的色谱图。

2.7.2 共有峰的确定:按照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》规定^[4],测定 14 批不同产地不同生长时期及不同产地防己药材的指纹图谱,其中 8 个峰为药材的共有指纹峰,以 5 号峰(防己诺林碱)作为参照峰,计算各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的比值,结果见图 2、3 和表 2、3。

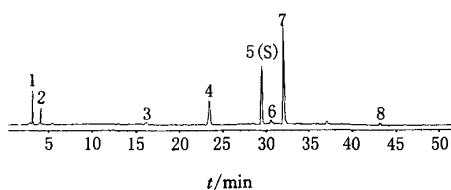


图 2 1 号防己药材的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatogram of *Radix Stephaniae Tetrandrae* (No. 1)

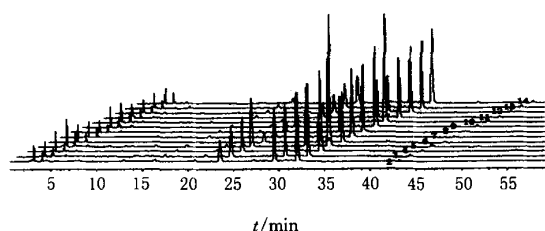


图 3 2~14 号防己药材的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC Chromatogram of *Radix Stephaniae Tetrandrae* (No. 2-14)

表 2 14 批防己药材指纹图谱中共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in fingerprint of 14 batches of *Radix Stephaniae Tetrandrae*

编号	各峰相对保留时间							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.105	0.137	0.550	0.790	1.000	1.038	1.686	1.466
2	0.106	0.136	0.554	0.797	1.000	1.048	1.086	1.464
3	0.106	0.136	0.553	0.796	1.000	1.023	1.084	1.463
4	0.105	0.136	0.554	0.795	1.000	1.024	1.085	1.462
5	0.106	0.137	0.552	0.795	1.000	1.045	1.083	1.468
6	0.105	0.136	0.551	0.795	1.000	1.038	1.086	1.464
7	0.106	0.136	0.555	0.797	1.000	1.038	1.085	1.463
8	0.105	0.136	0.555	0.797	1.000	1.040	1.086	1.464
9	0.106	0.136	0.553	0.796	1.000	1.045	1.085	1.464
10	0.106	0.136	0.555	0.796	1.000	1.047	1.083	1.464
11	0.106	0.135	0.553	0.797	1.000	1.041	1.080	1.464
12	0.105	0.131	0.553	0.792	1.000	1.039	1.085	1.460
13	0.103	0.133	0.550	0.787	1.000	1.045	1.081	1.463
14	0.106	0.133	0.552	0.793	1.000	1.041	1.082	1.464

表 3 14 批防己药材指纹图谱中共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks in fingerprint of 14 batches of *Radix Stephaniae Tetrandrae*

编号	各峰相对峰面积							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.113	0.066	0.044	0.358	1.000	0.079	1.206	0.027
2	0.102	0.078	0.048	0.791	1.000	0.043	1.436	0.024
3	0.096	0.075	0.067	1.139	1.000	0.034	2.087	0.042
4	0.094	0.058	0.059	0.991	1.000	0.037	1.817	0.038
5	0.181	0.108	0.054	1.677	1.000	0.096	3.961	0.093
6	0.111	0.062	0.046	0.349	1.000	0.067	1.181	0.026
7	0.182	0.124	0.089	0.504	1.000	0.278	1.960	0.038
8	0.179	0.117	0.065	1.104	1.000	0.019	2.007	0.033
9	0.081	0.061	0.046	0.833	1.000	0.017	1.598	0.028
10	0.142	0.089	0.046	1.309	1.000	0.054	3.074	0.072
11	0.060	0.092	0.055	0.596	1.000	0.022	1.077	0.046
12	0.056	0.103	0.010	1.062	1.000	0.047	1.567	0.012
13	0.055	0.102	0.037	0.798	1.000	0.029	1.080	0.037
14	0.085	0.127	0.071	0.997	1.000	0.077	1.475	0.055

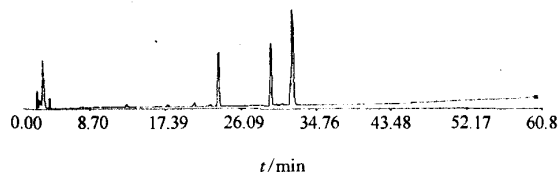


图 4 防己药材对照指纹图谱

Fig. 4 Comparison fingerprint of *Radix Stephaniae Tetrandrae*

表 4 14 批防己药材指纹图谱相似度结果

Table 4 Similarity of fingerprint in 14 batches of *Radix Stephaniae Tetrandrae*

编号	相似度	编号	相似度
1	0.938	8	0.976
2	0.969	9	0.986
3	0.965	10	0.957
4	0.980	11	0.950
5	0.951	12	0.948
6	0.940	13	0.957
7	0.985	14	0.969

2.7.3 指纹图谱的相似度计算:采用药典委员会推荐的相似度评价软件(A、B 版),对 14 批防己药材进行相似度评价。将药材指纹图谱导入相似度评价软件,设定匹配模版,进行谱峰自动匹配,生成对照指纹图谱,进行相似度评价,结果见图 4 和表 4。

3 讨论

3.1 利用高效液相色谱仪的二极管阵列检测器对样品的吸收波长进行分析,结果在 282 nm 检测波长下,基线较稳定,色谱峰较多,信息丰富,故选择 282 nm 为最终检测波长。

3.2 采用多种提取方法,分别用三氯甲烷、醋酸乙酯、甲醇、流动相作为溶剂进行回流提取。研究中发

现三氯甲烷和醋酸乙酯作为溶剂提取样品色谱峰形较差,防己诺林碱和粉防己碱的峰面积很小,说明此两种溶剂不能很好地将防己药材中的成分提取出来;用流动相作为提取溶剂的样品峰基线不平衡;甲醇作为提取溶剂的样品峰基线平衡,防己诺林碱和粉防己碱峰能够很好地分离,峰面积较大,因此选用甲醇为提取溶剂。

3.3 采用回流和超声两种方式对药材进行提取,以峰面积为评价指标,结果发现回流的效果明显优于超声;同时对回流时间进行考察,发现回流 1、2、3 h 对结果影响不大,最终提取方式选用回流 1 h。

3.4 试验中选取了大连依利特 Hypersil ODS2

(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Shimadzu VP-ODS (250 mm×4.6 mm), Diamonsil™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 结果显示 Shimadzu VP-ODS (250 mm×4.6 mm) 柱能够将药材各组峰很好地分开, 达到比较理想的效果。

3.5 由生成指纹图谱可以看出, 14 批防己药材指纹图谱中主要色谱峰的整体图貌基本一致。同时相似度评价结果表明, 同一基地和不同产地的相似度计算结果均在 0.9 以上, 相似度较高, 说明地域性差异不明显。利用药典委员会颁布的指纹图谱软件, 能

够很好地对防己药材指纹图谱进行相似度评价。

References:

- [1] Li J P, Di L Z, Xu H. Extract and isolation of non-hydroxybenzene alkaloid in *Stephania tetrandra* S. Moore [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 407.
- [2] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1995.
- [3] Sheng M Z, Zheng W G. Statement of the reasonable application of *Radix Stephaniae Tetrandrae* [J]. *J Pract Tradit Chin Med* (实用中医药杂志), 2004, 20(6): 326.
- [4] *Technical Requirements of the Fingerprint in Injection of Chinese Materia Medica (Tentative Standard)* (中药注射剂色谱指纹图谱实验研究的技术要求(试行)) [S]. 2000.

青牛胆 SRAP 标记反应体系的建立与优化

杨 兵, 王天志*, 罗 禹, 陈 璐

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘 要:目的 为青牛胆的物种鉴定和遗传图谱的构建寻找一种新的途径。方法 采用序列相关扩增多态性(Sequence related amplified polymorphism, SRAP)技术对青牛胆 DNA 进行 PCR 扩增, 逐级优化反应参数。结果 优化得到稳定重复性好的青牛胆 SRAP 反应体系。结论 SRAP 技术在分子水平上对青牛胆进行鉴定是一种行之有效的手段, 为今后进一步的青牛胆物种鉴定、遗传图谱的构建等研究奠定基础。

关键词: 青牛胆; SRAP; 分子标记

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)02-0272-04

Establishment and optimization of SRAP reaction system in *Tinospora sagittata*

YANG Bing, WANG Tian-zhi, LUO Yu, CHEN Lu

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To develop a new method for *Tinospora sagittata* species identification and genetic map construction. **Methods** Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) was applied for *T. sagittata* to carry on PCR amplification of its DNA and optimize the reaction parameter grade by grade. **Results** The stable and reproducible SRAP reaction system of *T. sagittata* has been developed. **Conclusion** SRAP is an effective method for *T. sagittata* identification in molecular degree and it has set up a foundation for the further species identification and genetic map construction of *T. sagittata*.

Key words: *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep; sequence-related amplified polymorphism (SRAP); molecular marker

青牛胆 *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep 是防己科青牛胆属植物, 药用其块根, 又称金果榄, 为《中国药典》历版所收载。有清热解毒、利咽止痛等功效。目前药用青牛胆为野生, 复杂的野外环境造成其植株的形态变异。本课题材料采自四川巴中地区, 其植株形态差异极大。因此, 从分子水平对青牛胆进行

物种鉴定以控制其药材质量变得日益重要。SRAP (sequence related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性) 是由 Li 等^[1]提出的一种新的分子标记技术。SRAP 标记是针对基因外显子中 GC 丰富而启动子、内含子里 AT 丰富的特点来设计引物进行 PCR 扩增, 因不同个体的内含子、启动子与间隔

收稿日期: 2006-08-08

作者简介: 杨 兵 (1981-), 男, 四川遂宁人, 生药学研究生在读, 主要从事天然药物品质评价与化学成分研究。

E-mail: only-miracle@tom.com

* 通讯作者 王天志 Tel: (028) 85503639