

定的成分中,除一般挥发油所含有的共同成分外,含有两类具有较强的生理活性的物质,它们是这类植物挥发油的特征成分。一类是苯酚类衍生物,如3-丁基苯酚等,具有较强的抗惊厥作用^[3]和平喘作用^[4]。另一类是烯丙基苯的衍生物,如肉豆蔻醚、茴香素等,具有麻醉镇痛作用。藁本挥发油中上述两类成分的量高低直接决定了藁本药材的品质。《中国药典》规定的正品藁本药材为伞形科植物藁本 *Ligusticum sinense* Oliv. 或辽藁本 *L. jeholense* Nakai et Kitag. 的干燥根茎及根,上述两正品藁本药材都有较高量的苯酚类和烯丙基苯的衍生物,而其他地方习用藁本药材中苯酚类衍生物量很低。从实验数据可以看出遂川产西芎藁本中苯酚类和烯丙基苯的衍生物的量较高,符合正品藁本的要求,实验结果遂川藁本有18个共有峰。

3.2 通过比较全国各产区的西芎藁本挥发油 and 不同习用藁本药材挥发油的气相指纹图谱,发现不同产区 and 不同品种藁本药材挥发油在化学组成和各成分量上差异较大,故药效上差别相应也比较大。因此,为了保证中药制剂的质量稳定,一定要固定药材的产地和种类,在建立藁本药材挥发油气相指纹图

谱时,应针对不同产地、不同品种的藁本药材分别建立其指纹图谱。

3.3 本实验气相指纹图谱在比较藁本药材正常根茎和空心根茎的实验表明,两者挥发油在整体化学组成上几乎无差异,而化学组成是决定药材药理作用的基础,故认为两者挥发油的药理功能是等效的,这与传统的评价方式是不同的。

3.4 在藁本药材的规范化种植实验中,发现大多数规范化种植的藁本药材挥发油的气相色谱峰面积都远大于本地农家传统种植的藁本药材,这说明藁本药材的规范化种植是非常有意义的,选择理想的种植方式,规范化种植模式将会大大提高并控制藁本药材的品质。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2005.
- [2] Huang Y Z, Pu F D. The analysis of the chemical components of essential oils from three *Ligusticum* species [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1989, 9 (3): 147-151.
- [3] Yu P L. The anti-convulsion function of butylphthalide [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1984, 19 (8): 560-570.
- [4] Cui Z G. The asthma relieving function of *n*-Butyl-tetrahydrophthalide and its derivatives in volatile oils of *Angelica sinensis* Oliv. [J] *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1982, 13 (2): 17-21.

三七剪口指纹图谱研究及应用

张敏¹, 胡坪^{1*}, 罗国安^{2,3*}, 王义明³

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 华东理工大学药学院 中药现代化工程中心, 上海 200237;

3. 清华大学生命科学与医学研究院, 北京 100084)

摘要:目的 建立三七剪口的 HPLC 指纹图谱,同时用于不同产地药材的皂苷成分定量。方法 采用梯度洗脱法,对三七剪口水提物进行 HPLC 测定,流动相为水-乙腈,检测波长 203 nm,记录时间 65 min。结果 运用梯度洗脱的方法能分离三七剪口的各类组分,并可对其中三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g1}、R_e、R_{b1} 和 R_d 进行定量。结论 本实验建立的 HPLC 指纹图谱和测定方法可作为三七剪口有效组分的控制手段。

关键词:三七剪口; 高效液相色谱; 指纹图谱

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)01-0442-04

Application of HPLC fingerprint to analysis of rhizome of *Panax notoginseng*

ZHANG Min¹, HU Ping¹, LUO Guo-an^{2,3}, WANG Yi-ming³

(1. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Modern Engineering Center of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. Institute of Biomedicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint method of the rhizome of *Panax notoginseng*

收稿日期:2006-05-20

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2003AA2Z2021)

作者简介:张敏(1980—),男,博士研究生,专业为制药工程与技术。Tel:(010)62794103

*通讯作者 罗国安 Tel:(010)62781688 E-mail:luoga@mail.tsinghua.edu.cn

胡坪 Tel:(021)64252844 E-mail:huping@ecust.edu.cn

and set up a method for content determination of the main ginsenosides in the rhizome of *P. notoginseng* from various habitats. **Methods** HPLC Analysis was carried on C_{18} column with flow phase water-acetonitrile. The detection wavelength was at 203 nm, record time was 65 min. **Results** The components can be separated well and the ginsenosides R_{g_1} , Re, R_{b_1} , and Rd and notoginsenoside R_1 can be determined using this method. **Conclusion** The HPLC fingerprint of the rhizome of *P. notoginseng* and the determination method which developed in this paper are suitable for the quality control of the rhizome of *P. notoginseng*.

Key words: the rhizome of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; HPLC; fingerprint

中药的质量控制是中药现代化的重要组成部分,中药指纹图谱作为中药质量稳定性的有效检定方法,在中药材的质量评价和中药生产的质量控制中有着广泛的应用^[1]。三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的根,具有滋补强壮、止血、活血化瘀和消肿止痛的功效,一般认为皂苷类成分是三七的主要成分,其中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、Re、 R_{b_1} 、Rd 为主要皂苷,但经研究表明,三七中除含有皂苷外,还含有氨基酸、多糖、黄酮、挥发油、油脂和微量元素等多类成分^[2]。三七剪口也称芦头,约占三七药用部位产量的 24%~28%^[3],传统上仅作为三七的副产品使用。但三七剪口中皂苷不仅成分相似,而且量比块茎中高^[4],故常作为工业提取三七总皂苷的主要原料。为了合理利用三七药材,提高其利用率,本实验以梯度洗脱法建立 HPLC 指纹图谱,重现性较好,不仅适用于对三七剪口的鉴定及质量评价,而且可以对其皂苷类成分进行定量分析。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器, Agilent 1100 色谱工作站;北京医疗器械二厂 CX-300 型超声清洗机。乙腈(色谱纯,美国 Mallinckrodt Baker 公司出品);密里博超纯水(MILLIPORE 公司)。《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(国家药典委员会,2004A)。

三七剪口药材共 16 批,均产于云南省文山地区,产地信息如表 1 所示。三七皂苷 R_1 (批号 110745—200313,质量分数 99%)、人参皂苷 R_{g_1} (批号 11703—200332,质量分数 99%)、Re (批号 110754—200320,质量分数 99%)、 R_{b_1} (批号 11704—200318,质量分数 99%)对照品购自中国药品生物制品检定所,人参皂苷 Rd 对照品(批号 ASB—00007205—010,质量分数 99%)购自美国 ChromaDex 公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:采用资生堂 MG C_{18} 柱(150 mm ×

4.6 mm, 5 μ m);流动相:水(A)-腈(B)梯度洗脱, 0~2 min (100%A), 2~14 min (100%~86% A, 0~14%B), 14~15 min (86%~80% A, 14%~20%B), 15~35 min (80%~77%A, 20%~23%B), 35~50 min (77%~55%A, 23%~45%B), 50~60 min (55%~20%A, 45%~80%B);体积流量 0.7 mL/min;柱温 25 $^{\circ}$ C;检测波长 203 nm。

表 1 药材样品信息表

Table 1 Information of different samples

编号	产地	编号	产地
1	文山平坝镇	9	文山乐诗冲地区
2	文山平坝镇	10	文山乐诗冲地区
3	文山平坝镇	11	文山苗乡(马鞍山)
4	文山平坝镇	12	文山苗乡(马鞍山)
5	文山平坝小街地区	13	砚山县水泥厂旁
6	文山平坝小街地区	14	砚山县水泥厂旁
7	文山城边地区	15	邱北县腻脚地区
8	文山城边地区	16	邱北县腻脚地区

2.2 对照品溶液制备:精密称取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、Re、 R_{b_1} 和 Rd 各 10 mg 置 10 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,制得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备:精密称取不同产地三七药材粉末(40 目)4.0 g,置于具塞锥形瓶中,精确加入 40 mL 水,浸泡 1 h 后超声 15 min。提取液离心分离,上清液用 0.45 μ m 滤膜滤过,取续滤液即得。

2.4 标准曲线的制备:分别精密吸取混合对照品溶液 1、3、7、15、30、45、60 μ L 进样分析。按 2.1 项操作,记录峰面积积分值,以峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标作图,得三七皂苷 R_1 的回归方程为 $Y=1.726 \times 10^4 X + 2.212 \times 10^4$, $r=0.9997$;人参皂苷 R_{g_1} 的回归方程为 $Y=2.012 \times 10^4 X + 1.366 \times 10^3$, $r=0.9993$;人参皂苷 Re 的回归方程为 $Y=1.495 \times 10^4 X + 1.540 \times 10^4$, $r=0.9977$;人参皂苷 R_{b_1} 的回归方程为 $Y=1.549 \times 10^4 X + 961.0$, $r=0.9993$;人参皂苷 Rd 的回归方程为 $Y=1.751 \times 10^4 X + 6.462 \times 10^3$, $r=0.9991$ 。以上各皂

苷在 1~60 μg 范围内均呈现良好的线性关系。

2.5 指纹图谱方法学考察

2.5.1 精密度考察:按 2.3 项下制备供试品溶液,连续进样 5 次,计算峰面积的精密度。以人参皂苷 Rb_1 为对照峰,主要色谱峰的相对峰面积 RSD 均小于 1.3%($n=5$),相对保留时间 RSD 均小于 0.9%($n=5$)。表明仪器精密度良好。

2.5.2 重现性考察:取同一产地药材 5 份,按 2.3 项制备供试品溶液,进样并记录色谱图。以人参皂苷 Rb_1 为对照峰,主要色谱峰的相对峰面积 RSD 均小于 3.5%($n=5$),相对保留时间 RSD 均小于 2.1%($n=5$)。表明方法重现性好。

2.5.3 稳定性考察:按 2.3 项下制备供试品溶液,分别放置 0、2、4、8、16、24 h,同时取样分析并记录色谱图。以人参皂苷 Rb_1 为对照峰,主要色谱峰的相对峰面积 RSD 均小于 3.8%($n=5$),相对保留时间 RSD 均小于 2.3%($n=5$)。表明试验方法稳定。

2.6 加样回收率试验:以产地为邱北县腻脚地区的 15 号样品为研究对象,精密称定已测定的样品 5 份,每份 400 mg,分别加入三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 和 Rd 对照品适量,按 2.3 项方法制备,取续滤液 20 μL 测定,计算各自的量,得出三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 和 Rd 的平均回收率分别为 97.1%、99.3%、93.7%、102.6%、104.3%,RSD 分别为 1.8%、2.1%、2.8%、2.9%、2.5%($n=5$)。

2.7 定量结果:本实验采用同一 HPLC 方法不仅对三七剪口药材的指纹图谱进行表达,同时对三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 和 Rd 这 5 种皂苷进行测定,不同产地三七剪口中 5 种主要皂苷的测定结果见表 2。

表 2 表明在三七剪口中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 Rg_1 和 Rb_1 的量较高,人参皂苷 Re 和 Rd 的量较低。其中人参皂苷 Rg_1 的量约为三七皂苷 R_1 和人参皂苷 Rb_1 的 1~2 倍,而三七皂苷 R_1 与 人参皂苷 Rb_1 的量大致相当。在各产地中文山平坝镇的样品中皂苷量较高,而文山乐诗冲地区的量较低。但同一个产地的各样品中皂苷量差异较大,如文山平坝镇和邱北县腻脚地区,这可能与药材的生长情况有关。

2.8 对 16 批药材的指纹图谱相似度分析:用已建立的指纹图谱方法,对收集的 16 批三七剪口药材进行检测,各图谱见图 1,用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》计算相似度,以系统生成的对照图谱 R 为参照谱,结果见表 3。

表 2 样品定量结果

Table 2 Determination of samples

编号	产地	质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)				
		R_1	Rg_1	Re	Rb_1	Rd
1	文山平坝镇	9.83	10.13	2.52	9.34	1.03
2	文山平坝镇	11.56	13.67	2.03	8.07	1.87
3	文山平坝镇	10.53	14.51	2.58	8.95	1.85
4	文山平坝镇	14.52	20.45	2.81	10.13	2.76
5	文山平坝小街地区	9.74	15.05	2.43	10.38	2.29
6	文山平坝小街地区	9.51	12.40	2.10	6.89	1.38
7	文山城边地区	9.70	12.42	2.00	8.39	1.22
8	文山城边地区	9.31	15.00	2.21	8.21	1.47
9	文山乐诗冲地区	5.17	9.70	1.33	6.36	1.08
10	文山乐诗冲地区	4.94	7.39	1.00	4.78	0.74
11	文山苗乡(马鞍山)	9.36	15.62	2.41	8.88	1.73
12	文山苗乡(马鞍山)	9.17	12.44	2.04	7.41	2.15
13	砚山县水泥厂旁	9.57	14.83	2.32	9.56	2.36
14	砚山县水泥厂旁	9.79	14.14	2.60	8.70	1.78
15	邱北县腻脚地区	9.16	14.57	2.55	10.02	2.53
16	邱北县腻脚地区	13.30	14.48	2.86	9.87	2.40

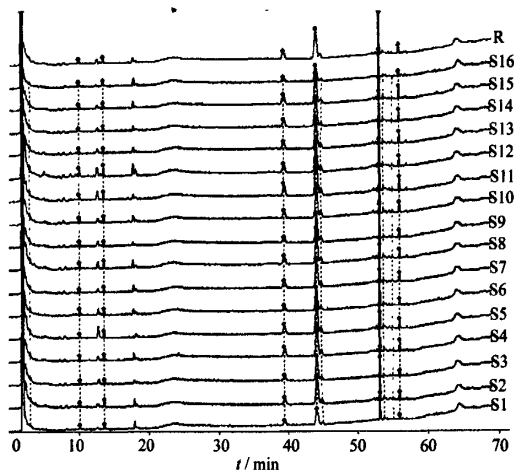


图 1 16 批三七剪口指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of 16 batches of rhizome of *P. notoginseng*

表 3 16 批三七剪口指纹图谱相似度

Table 3 Similarity of 16 batches of rhizome of *P. notoginseng*

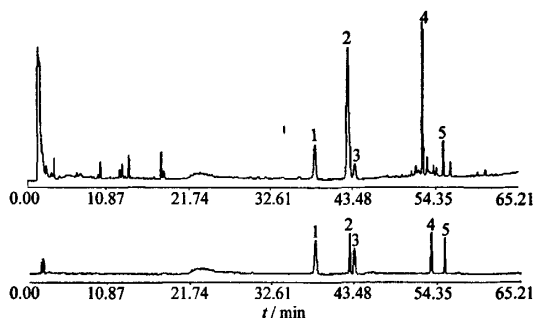
编号	相似度	编号	相似度
1	0.968	9	0.975
2	0.964	10	0.971
3	0.965	11	0.929
4	0.968	12	0.931
5	0.938	13	0.981
6	0.930	14	0.980
7	0.973	15	0.983
8	0.976	16	0.981

相似度计算结果显示,16 批三七剪口药材指纹图谱相似度均大于 0.92。不同产地之间相似度有差异,如文山平坝镇地区与文山平坝小街地区;而在同一产地差异较小,如文山平坝镇、文山苗乡(马鞍山)、砚山县水泥厂旁和邱北县腻脚地区。相似度分析结果说明本实验建立的指纹图谱方法可以作为三七剪口的质量评价手段。

3 讨论

3.1 提取条件的选择:三七药材中的有效成分除了皂苷类外,还有三七素及黄酮类,在测定其指纹图谱时,这些成分应在图谱中得到反映。如采用甲醇作为提取溶剂,得到的三七指纹图谱只能表达皂苷类成分,无法表达在甲醇中溶解性较差的化学成分^[5],因此最终选定以水为提取溶剂。

3.2 色谱条件的确定:比较了水-甲醇和水-乙腈不同体系下,色谱峰的分离情况。结果表明选择水-甲醇体系的基线波动较大,而水-乙腈体系则可以得到较好的分离结果。分别对水-乙腈体系的不同洗脱梯度进行了试验,结果以本实验中所列梯度出峰较多且色谱峰分离度较好。同时对三七药材供试品溶液进行了 120 min 的 HPLC 测定,结果 65 min 后无色谱峰出现,所以选定指纹图谱记录时间为 65 min。典型的三七剪口药材指纹图谱见图 2-A,指纹图谱中 20 min 之前的色谱峰紫外吸收最大值为 254 nm,为黄酮类成分^[6],35 min 后色谱峰的紫外吸收与对照品的色谱峰(2-B)的紫外吸收对照后,确认为皂苷类成分。



1-三七皂苷 R₁ 2-人参皂苷 R_{g1} 3-人参皂苷 Re

4-人参皂苷 R_{b1} 5-人参皂苷 Rd

1-notoginsenoside R₁ 2-ginsenoside R_{g1} 3-ginsenoside Re

4-ginsenoside R_{b1} 5-ginsenoside Rd

图 2 三七剪口 (A) 和对照品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC Fingerprint of rhizome of *P. notoginseng*

(A) and reference substance (B)

References

- [1] Luo G A, Wang Y M. Classification and development of TCM fingerprint [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2002, 11 (1): 46-51.
- [2] Zheng G Z, Yang C R. *The Biological Research and Application of Panax Notoginseng* (三七生物学及应用) [M]. Beijing: Science Press, 1994.
- [3] Wei J X. *Modern Research and Application of Panax Notoginseng* (三七现代研究及应用) [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Publishing House, 1976.
- [4] Cui X M, Wang Z L, He C F. Study on the planting of *Panax notoginseng* with farm film [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1993, 16 (11): 3-6.
- [5] Zhou Y X, Yuan Y S, Gao X, et al. Studies on the fingerprint of *Radix Notoginseng* and its preparation [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26 (2): 122-123.
- [6] Cui X M, Dong T X, Huang W Z, et al. Determination of flavonoids in *Panax notoginseng* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (7): 611-612.

广西地不容组培快繁研究

黄宁珍, 唐凤鸾, 付传明, 李 锋, 赵志国

(广西壮族自治区中国科学院 广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘 要:目的 研究广西地不容的组培快繁技术, 为大量生产种苗提供方法和技术。方法 以嫩茎节段为外植体, 以 MS 为基本培养基, 通过不同的激素种类和浓度配比, 选择出最佳的诱导、继代增殖和生根培养基配方。结果 MS+NAA 0.1 mg/L+BA 1.0 mg/L 利于诱导出芽, 可用于初代培养。继代增殖则以 MS+IBA 0.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L+GA 0.5~1.0 mg/L、MS+NAA 0.1 mg/L+GA 1.0 mg/L 和 MS+IBA 0.2 mg/L+BA 0.4~0.8 mg/L+GA 0.5~1.0 mg/L 3 种培养基交替培养, 繁殖系数 6.0 倍/50 d。1/2 MS+IBA 0.8 mg/L 适宜诱导生根获得再生植株, 生根率 75%。生根苗春夏之交移栽最好, 成活率 90%。结论 本研究得出的方法可用于工厂化生产广西地不容种苗。

关键词:广西地不容; 组培快繁; 种苗

中图分类号: R282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)03-0445-05

收稿日期: 2006-05-12

基金项目: 广西壮族自治区科技攻关项目 (桂科攻 0322024-3B)

作者简介: 黄宁珍 (1968-), 女, 广西大化县人, 副研究员, 从事药用植物生物技术研究工作。

E-mail: huangnz@gxib.cn hnzhn68@yahoo.com.cn