

源反转录酶(M-MLV RTase)并应用高效置换合成法反转录双链cDNA,预先将RNA溶于65℃加热5 min,有效地提高了逆转录的反应效率,得到的完整cDNA满足红花cDNA-AFLP的需要。根据实验结果,“两步法”在连接时可不用担心酶的过度消化,提高了连接效率,分别在限制性内切酶和T₄连接酶的最佳温度下,完成酶切和连接反应。采用E₊₂/M₊₂的引物组合,在cDNA-AFLP两次的扩增中,产物稀释10倍进行预扩增,再稀释150倍进行选择扩增,扩增效果较好。聚丙烯酰胺凝胶电泳检测是非常关键的一步,也是较难操作的步骤,染色后的洗涤时间需要根据不同的物种摸索合适的洗涤时间,如果凝胶洗涤时间太长,银颗粒会脱离DNA,产生很少或没有序列信号,如果洗涤时间过长,染色步骤需要重新进行。本研究的银染检测系统一次可扩增均分辨出50~70条扩增带。在建立cDNA-AFLP体系的PCR扩增中,除扩增程序相对稳定不需要对其进行较大变动外,聚合酶的特异性,Mg²⁺引物的浓度对结果的影响都很大,某一个试剂用量的偏差都有可能整个实验的失败,因此保证每一个试剂的质量和在工作液浓度的准确也至关重要。

本研究获得了高质量的红花cDNA模板,建立了红花的cDNA-AFLP特异性反应体系,为筛选与红花重要性状相关的功能基因乃至直接的调控基因

奠定了基础。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 樊兰英. 近十年来红花的临床应用进展[J]. 江西医学院学报, 2002, 42(6): 185-188.
- [3] 郭美丽, 张芝玉, 张汉明等. 不同产地红花药材的质量评价[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(8): 5-7.
- [4] Bachem C W B, Van der Hoeven R S, de Bruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *J Plant*, 1996, 9(5): 745-753.
- [5] Habu Y, Fukada-Tanaka S, Hisatomi Y, et al. Amplified restriction fragment length polymorphism based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence [J]. *Biochem Biophysical Res Commun*, 1997, 234: 516-521.
- [6] Huang J, Bachem C, Jacobsen E, et al. Molecular analysis of differentially expressed genes during postharvest deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) tuberous roots [J]. *Euphytica*, 2001, 120: 85-93.
- [7] Jaakola L, Pirttilä A M, Halonen M, et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit [J]. *Mol Biotechnol*, 2001, 19: 201-203.
- [8] Gubler U. A one tube reaction for the synthesis of blunt-ended-double-stranded cDNA [J]. *Nucleic Acid Res*, 1988, 16: 2726.
- [9] Vos P, Hoger R, Blecker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucl Acid Res*, 1995, 23(21): 4407.
- [10] 郭美丽, 姜伟, 张志珍, 等. 红花种质的RAPD分子鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(10): 1116-1119.
- [11] 张阵阵, 郭美丽, 张军东. 红花基因组扩增片段长度多态性反应体系的建立和优化[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(3): 327-330.

菝葜药材脂溶性成分指纹图谱研究

周艳林^{1,2}, 严海², 钟小清², 王力生², 邹节明^{1,2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 桂林三金药业股份有限公司, 广西 桂林 541004)

摘要:目的 建立菝葜药材的脂溶性成分的HPLC指纹图谱分析方法。方法 采用Phenomenex C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%的磷酸溶液梯度洗脱, 体积流量1.0 mL/min, 柱温35℃, 检测波长303 nm。结果 不同产地菝葜药材的指纹图谱有较好的相似度, 通过比较对应了山龙眼苷A、落新妇苷、白藜芦醇及黄杞苷4个对照品。结论 建立的方法能较好地反映了菝葜中二氢黄酮醇苷及二苯乙烯两类主要成分。

关键词:菝葜; 脂溶性成分; 指纹图谱; 梯度洗脱

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)08-1246-03

Fingerprint of hydrophobic components in *Smilax china*

ZHOU Yan-lin^{1,2}, YAN Hai², ZHONG Xiao-qing², WANG Li-sheng², ZOU Jie-ming^{1,2}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Guilin Sanjin Pharmaceutical Co., Ltd., Guilin 541004, China)

收稿日期: 2008-01-06

基金项目: 广西优势中草药产业化资助项目(桂科产0444002-1)

作者简介: 周艳林(1972—), 男, 江西资溪人, 在读博士, 研究方向为中药化学与质量控制。E-mail: zhouyanlinzhou@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 邹节明, 男, 教授级高工, 博士生导师。Tel: (0773) 5842588 E-mail: Sanjin@gl.gx.cninfo.net

Abstract: Objective To establish a fingerprint of hydrophobic components in *Smilax china* by RP-HPLC. **Methods** The samples were separated on a Phenomenex C₁₈ column with gradient elution of methanol and 0.1% phosphoric acid at a flow rate of 1.0 mL/min and detected wavelength at 303 nm. **Results** The similarity of *S. china* fingerprints from different habitats is better and four major active constituents in *S. china* can be detected simultaneously, which named helioside A, astilbin, resveratrol, and engeletin. **Conclusion** The fingerprints can be used as a quality control method for dihydroflavonoids and stilbenes in *S. china*.

Key words: *Smilax china* L.; hydrophobic components; fingerprints; gradient elution

菝葜为百合科植物菝葜 *Smilax china* L. 的干燥根茎,俗称金刚藤、金刚刺。具有祛风除湿,解毒散瘀之功效,主治筋骨酸痛,小便淋漓,带下量多,疔疮痈肿。系《中国药典》2005年版收载品种,也是三金片、金刚藤糖浆、银屑颗粒及血尿胶囊等名优中成药的主要原料,《中国药典》采用水解产物薯蓣皂苷元为指标对菝葜进行质量控制^[1]。文献报道^[2],菝葜的醋酸乙酯提取物是其抗炎、镇痛的活性部位,笔者对菝葜根茎进行了系统的化学成分研究,从醋酸乙酯部位分离得到一系列二氢黄酮醇苷类成分,其中落新妇苷、黄杞苷和山龙眼苷A,以及二苯乙烯类化合物白藜芦醇为其中量较大的成分。采用 HPLC 法建立了菝葜药材脂溶性成分的指纹图谱,并以上述4个主成分作为参照指标,为进一步研究菝葜的药材质量标准提供依据。

1 仪器与试剂

美国 Waters 2690 色谱仪,996DAD 检测器,Empower 液相色谱工作站;不同批次药材来源见表1(药材经专人采集,经笔者邹节明教授鉴定为正品菝葜 *Smilax china* L.)。甲醇、乙腈(色谱纯);水(超纯水);磷酸(分析纯)。山龙眼苷A、落新妇苷、黄杞苷及白藜芦醇对照品(自制,HPLC 检测质量分数>98%,归一化法)。

表1 10批药材来源

Table 1 Origins of ten batches of samples

No.	采集地点	采集时间	No.	采集地点	采集时间
S1	广西桂林	2006-09	S6	贵州凯里	2005-06
S2	广西永福	2006-09	S7	云南昆明	2005-06
S3	湖北赤壁	2006-09	S8	广西河池	2005-06
S4	湖南邵阳	2006-09	S9	广西柳州	2005-06
S5	湖北通城	2006-09	S10	江西新余	2005-06

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱 Phenomenex C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以甲醇为流动相 A,0.1% 磷酸溶液为流动相 B,时间 0~35 min,A:20%;35~45 min,A:20%~32%;45 min 以后,A:32%;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 35℃;检测波长为 303

nm。理论板数按落新妇苷计算应不低于 6 000。

2.2 对照品溶液的制备:分别精密称取山龙眼苷A、落新妇苷、黄杞苷及白藜芦醇对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别约为 0.02 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取药材粉末(过2号筛)各约 2 g,精密称定,分别置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 丙酮 50 mL,密塞,摇匀,称定质量,超声提取 30 min,加入 70% 丙酮补足减失质量,滤过,取续滤液 25 mL 蒸干,加水 25 mL 使溶解,用醋酸乙酯振摇提取 2 次,每次 20 mL,合并醋酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇溶解,定容至 5 mL,即得。

2.4 测定方法:精密吸取上述混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,记录 100 min 的色谱图,即得。

2.5 精密度试验:精密吸取同一供试品溶液,连续进样 5 次,结果保留时间 28 min(山龙眼苷A)、58 min(落新妇苷)、67 min(白藜芦醇)、77 min(黄杞苷)4 个对照峰峰面积的 RSD 分别为 0.79%、0.87%、0.45% 和 1.04%,符合指纹图谱要求。

2.6 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于 0、4、8、12、16、20、24 h 进样分析,考察4个对照峰相对保留时间和峰面积的稳定性,各对照峰相对保留时间 RSD 均小于 0.2%;峰面积 RSD 均小于 2.0%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 重现性试验:称取同批号的菝葜药材(广西桂林)粉末(过2号筛)约 2 g 共 6 份,精密称定,制备供试品溶液,分别对 4 个对照峰的相对保留时间和峰面积进行考察,各对照峰相对保留时间 RSD 均小于 0.2%;峰面积 RSD 均小于 3.0%,表明重现性良好。

2.8 指纹图谱分析软件:计算软件:采用国家药典委员会编的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”。参数设置:(1)参照谱图:采用湖北通城的菝葜的色谱图作为相似度计算时校正的参照谱图。(2)时间窗宽度:0.20。(3)数据剪切:剪切前 10

min。(4)校正方式:多点校正。校正色谱峰的确定:本品色谱图中主要色谱峰在0~90 min内基本分布均匀,为保证不同批次指纹图谱匹配时校正的准确性,选择了4个主要指纹峰作为校正的Mark峰,其中保留时间28 min为山龙眼苷A、58 min为落新妇苷、67 min为白藜芦醇、77 min为黄杞苷。(5)指纹图谱的生成:采用平均值法,由10批菝葜药材指纹图谱生成,见图1;4个对照品的色谱图见图2。(6)指

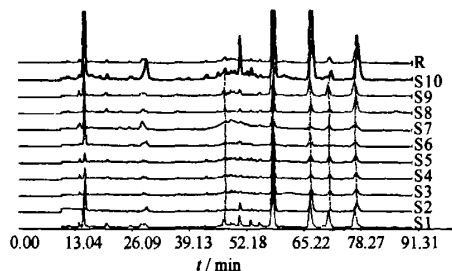
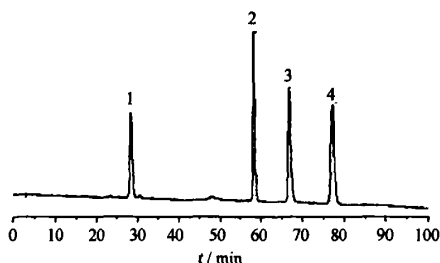


图1 菝葜药材指纹图谱
Fig.1 Fingerprints of *S. china*



1-山龙眼苷A 2-落新妇苷 3-白藜芦醇 4-黄杞苷
1-helicioside A 2-astilbin 3-resveratrol 4-engeletin

图2 菝葜4个主要成分对照指纹图谱
Fig.2 HPLC Chromatograms of four main constituents

纹图谱相似度计算结果:以对照谱图作为参照,各样品指纹图谱与对照谱图进行比较,计算得各批次菝葜药材指纹图谱相似系数,均大于0.9,见表2。

3 讨论

3.1 因菝葜脂溶性成分主要是多羟基酚类化合物,在流动相中加入适量的磷酸,能使相似组分有较好的峰形和分离度;供试品溶液制备时,对比了甲醇、

表2 10批不同产地菝葜药材之间相似系数

Table 2 Similarity of ten batches of *S. china* from different habitats

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1	0.926	0.883	0.877	0.905	0.989	0.869	0.873	0.996	0.950
S2	0.926	1	0.991	0.989	0.979	0.945	0.976	0.911	0.931	0.991
S3	0.883	0.991	1	0.998	0.970	0.913	0.986	0.894	0.890	0.970
S4	0.877	0.989	0.998	1	0.969	0.907	0.981	0.891	0.885	0.967
S5	0.905	0.979	0.970	0.969	1	0.905	0.955	0.885	0.896	0.971
S6	0.989	0.945	0.913	0.907	0.905	1	0.905	0.887	0.993	0.958
S7	0.869	0.976	0.986	0.981	0.955	0.905	1	0.888	0.875	0.958
S8	0.873	0.911	0.894	0.891	0.885	0.887	0.888	1	0.875	0.911
S9	0.996	0.931	0.890	0.885	0.896	0.993	0.875	0.875	1	0.952
S10	0.950	0.991	0.970	0.967	0.971	0.958	0.958	0.911	0.952	1

乙醇及70%丙酮溶液超声处理效果,均能较好地提取相关成分,但以70%丙酮提取杂质较少,继以醋酸乙酯提取能较好地实现富集纯化,操作简单,重现性好。

3.2 比较了不同流动相等度洗脱及梯度洗脱的影响,结果以选定的甲醇-磷酸溶液梯度洗脱,菝葜中的主要成分与其他色谱峰能较好地分离。

3.3 由DAD检测器比较了波长在210~400 nm所测得的图谱,可知山龙眼苷A、落新妇苷、白藜芦醇和黄杞苷的最大吸收波长分别为283、290、306、292 nm,而在303 nm下,基线平稳,各目标峰均有较好的峰形及分离度,故选取303 nm作为测定波长。

3.4 不同产地的菝葜的指纹图谱有较好的相似性,样品间的相似度均在0.9以上,且4个主成分均能检测出来,只是量有较大的差异,可以作为药材品质优劣的判断标准。

3.5 从菝葜正丁醇部位的成分分离中,得到的主要是甾体皂苷类成分,这些成分大多只有紫外末端吸收,其醇溶性部位的指纹图谱研究,有待用ELSD检测器做进一步的研究,以对菝葜的质量做更为全面的评价。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部,2005.
- [2] 舒孝顺,高中洪,杨祥良.菝葜醋酸乙酯提取物对大鼠和小鼠的抗炎作用[J].中国中药杂志,2006,31(3):239-242.

菝葜药材脂溶性成分指纹图谱研究

作者：[周艳林](#), [严海](#), [钟小清](#), [王力生](#), [邹节明](#)
作者单位：[周艳林, 邹节明 \(北京中医药大学中药学院, 北京, 100102; 桂林三金药业股份有限公司, 广西桂林, 541004\)](#), [严海, 钟小清, 王力生 \(桂林三金药业股份有限公司, 广西桂林, 541004\)](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39 (8)
被引用次数: 5次

参考文献(2条)

1. [中华人民共和国药典\(一部\)](#) 2005
2. [舒孝顺, 高中洪, 杨祥良](#) [菝葜醋酸乙酯提取物对大鼠和小鼠的抗炎作用](#) [期刊论文] - [中国中药杂志](#) 2006 (03)

本文读者也读过(10条)

1. [周艳林, 钟小清, 严海, 吕高荣, 邹节明](#) [HPLC测定菝葜属4种植物中落新妇苷的含量](#) [期刊论文] - [中国中药杂志](#) 2008, 33 (8)
2. [周艳林, 钟小清, 吕高荣, 邹节明](#) [RP-HPLC同时测定菝葜中落新妇苷和黄杞苷的含量](#) [期刊论文] - [中国药学杂志](#) 2008, 43 (14)
3. [陈德经, 孟仟祥, CHEN De-jing, MENG Qian-xiang](#) [板栗仁的脂溶性成分及其特征](#) [期刊论文] - [食品科学](#) 2007, 28 (11)
4. [阎磊, 徐淑珍, 李秋怡, 何再安, 刘焱文](#) [20种菝葜近缘种的薯蓣皂苷元含量测定](#) [期刊论文] - [中药材](#) 2006, 29 (11)
5. [舒孝顺, 高中洪, 杨祥良, SHU Xiao-shun, GAO Zhong-hong, YANG Xiang-liang](#) [RP-HPLC同时测定菝葜中山奈酚和槲皮素的含量](#) [期刊论文] - [中国药学杂志](#) 2006, 41 (6)
6. [张浩, 张俊宏, 耿晓秀, 雒西萍](#) [金刚藤软胶囊质量控制方法研究](#) [期刊论文] - [西北药学杂志](#) 2010, 25 (6)
7. [郭永庆, 王奎玲, 刘庆华, 刘庆超](#) [菝葜组织培养研究](#) [期刊论文] - [安徽农业科学](#) 2008, 36 (13)
8. [杜素兰, 张晋宏, 耿爱萍, 宋慧, 侯运生, 朱云, 杨眉, 吴冬宏, Du Sulan, Zhang Jinhong, Geng Aiping, Song Hui, Hou Yuansheng, Zhu yun, Yang Mei, Wu Donghong](#) [短梗菝葜的定性定量检测方法研究](#) [期刊论文] - [中国药事](#) 2008, 22 (3)
9. [吕永宁, 陈东生, 付磊, 李玉倩](#) [菝葜三种提取物活血化瘀药理作用研究](#) [期刊论文] - [中国药科大学学报](#) 2001, 32 (6)
10. [干国平, 江维, 孙进, 刘炎文](#) [菝葜提取物黄酮类成分的HPLC指纹图谱研究](#) [会议论文] - 2008

引证文献(5条)

1. [周雪苹, 艾又生](#) [菝葜高效液相色谱指纹图谱的建立](#) [期刊论文] - [医药导报](#) 2012 (4)
2. [黄慧莲, 刘丽莎, 刘荣华, 邵峰, 任刚, 舒积成, 林涛](#) [用高效液相色谱法鉴别小叶菝葜](#) [期刊论文] - [世界中医药](#) 2013 (1)
3. [李进, 陈涛, 王洋, 宋洁瑾, 马志平, 孟萌](#) [陇西产黄芪药材HPLC-DAD-ELSD指纹图谱的研究](#) [期刊论文] - [中草药](#) 2009 (5)
4. [杨立勇, 李雨生, 王祥培, 杨焯, 吴红梅, 靳风云](#) [菝葜药材HPLC指纹图谱的鉴别](#) [期刊论文] - [中国实验方剂学杂志](#) 2011 (8)
5. [杨安金, 郭晓秋](#) [长托菝葜化学成分研究](#) [期刊论文] - [中国中药杂志](#) 2010 (17)