

盐酸小檗碱的含量甚至达到或超过一些小檗属植物根的含量<sup>[9]</sup>。因此作者在利用云南黄连根茎的同时,也要积极开发利用其非传统药用部位,通过提取其生物碱减少资源的浪费,实现可持续发展。

#### [参考文献]

- [1] 黄骥,龙春林. 云南黄连的传统种植及其在生物多样性保护中的价值[J]. 生物多样性, 2006, 14(1): 79.  
[2] 黄骥,裴盛基,张明宇,等. 云南黄连的生物学、生态学特性与地理分布研究[J]. 云南植物研究, 2004, 26(3): 255.  
[3] 赵永生. 怒江州云黄连生产经营状况[J]. 中国民族民间医药杂志, 2002, 56: 159.  
[4] 刘岱,杨立新,崔淑莲,等. 不同品种和产地黄连的生物碱

- 含量测定[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(2): 79.  
[5] 吴春红,谢颖. RP-HPLC法测定黄连中小檗碱含量的研究[J]. 华西医学, 2006, 21(3): 467.  
[6] 刘芳. 黄连品质评价的研究及其应用. 四川大学硕士学位论文[D]. 2005: 19.  
[7] 濮社班,张宇和,周雪林. 江苏省引种黄连的生长状况及生物碱积累[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(11): 659.  
[8] 鲁开功,雷青文. 林下栽培黄连与棚下栽培黄连综合效益比较[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(8): 758.  
[9] 徐文芬,黄勇其,何顺志,等. 贵州省小檗属药用植物根中小檗碱含量的测定[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(3): 144.

[责任编辑 张宁宁]

## HPLC分析天山雪莲组培苗与实生苗3种有效成分含量

欧元<sup>1,2</sup>, 袁晓凡<sup>1\*</sup>, 陈文浩<sup>1,2</sup>, 赵兵<sup>1</sup>, 王晓东<sup>1</sup>, 王玉春<sup>1</sup>

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

菊科植物天山雪莲, 又称新疆雪莲 *Saussurea involucrata* Kar. et Kir, 属多年生的高山草本植物, 5~8年一次开花结实, 是我国珍稀名贵中药材, 具有极高的临床应用和食疗保健价值。近年来, 天山雪莲在抗炎镇痛、抗早孕、抗衰老及抑制癌细胞增生方面的作用备受关注<sup>[1]</sup>。由于严重的滥采乱挖, 野生资源已经濒临灭绝, 远远无法满足市场需求, 而且野生天山雪莲种子自然萌发率极低, 难于收集, 现已被国家作为濒危植物受到保护。因此, 组织培养与人工种植成为保护野生天山雪莲资源和解决供需矛盾的有效途径。目前, 国内已开展了不少有关天山雪莲组织培养的研究<sup>[2-5]</sup>, 人工种植天山雪莲也已取得初步成果<sup>[6]</sup>。而组培再生植株与人工种植植株的品质如何, 能否真正替代野生天山雪莲, 尚缺乏系统的研究工作。本实验采用 HPLC, 测定了天山雪莲组培苗、实生苗中 3 种有效成分的含量, 并与野生药材进行比较, 进行早期监测, 为组织培养和人工种植途

径实现天山雪莲资源的可持续利用提供依据。

### 1 仪器与材料

高效液相色谱仪 (Waters 2695), 配自动进样器, 四元泵, 柱温箱, 二极管阵列检测器 (Waters 2996), Empower 色谱工作站; TDL-5-A 型低速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); 超纯水器 (美国 Millipore 公司)。

甲醇、乙腈 (色谱纯, J&K Chemical); 无水甲醇、醋酸 (分析纯, 北京化工厂); 三乙胺 (分析纯, 北京化学试剂公司); 超纯水; 芦丁、绿原酸对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0080-200105, 11075-200312); 紫丁香苷 (安徽 DELTA 公司, 纯度 > 98%); 天山雪莲对照药材 (中国药品生物制品检定所, 批号 121205-0101); 天山雪莲组培苗、实生苗由本实验室培育, 后经移栽, 在新疆天池雪莲种植基地种植 2 年以上。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 安谱 C<sub>18</sub> 保护柱。流动相甲醇-水 (含 0.8% 醋酸, 0.2% 三乙胺, pH 3.5 ~ 4.0) 初始条件 (0: 100) 0 ~ 5 min 线性梯度变至 (10: 90), 5 ~ 15

[收稿日期] 2007-01-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (20506027)

[通讯作者] \*袁晓凡, Tel: (010) 62574372, E-mail: yuanxf99@

yahoo.com.cn

min 线性梯度变至(30:70),15~35 min 线性梯度变至(50:50),35~50 min 线性梯度变至(90:10),等强洗脱10 min后,回到初始条件平衡15 min。检测波长270 nm,柱温30℃,流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量20 μL,分析时间60 min。绿原酸、紫丁香苷、芦丁3种对照品的保留时间分别为18.27,19.51,35.13 min(图1)。

**2.2 检测波长的选择** 采用二级管阵列检测器对检测波长进行了考察,分别比较绿原酸、紫丁香苷、芦丁混合对照品在220~400 nm波长的色谱图,结果在270 nm处各色谱峰均有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富,并且3种对照品在此波长下都有最大吸收峰,因此选择270 nm作为检测波长。

**2.3 供试品溶液的制备** 植物材料经烘箱50℃干燥至恒重后,用粉碎机粉碎,过40目筛后精确称取样品粉末0.1 g。在密闭容器中经10 mL 70%甲醇超声提取40 min后,4 000 r min<sup>-1</sup>离心10 min,用0.20 μm有机相针式滤器过滤后取续滤液进行色谱分析。

**2.4 流动相的选择** 天山雪莲含有多种化学成分,如黄酮、生物碱、内酯、甾醇、多糖等活性物质,成分较为复杂,很难找到较理想的等度洗脱条件,故采用梯度洗脱。黄酮类成分含有多个酚羟基,呈弱酸性,故使用酸性缓冲系统<sup>[7]</sup>。预实验发现用甲醇-0.8%醋酸,添加0.2%三乙胺防拖尾剂做流动相,在线性梯度下各组分得到较好分离。

**2.5 线性关系考察** 分别用甲醇精确配制绿原酸、紫丁香苷、芦丁6个质量浓度的对照品溶液,用HPLC进行分析,进样量为5 μL。以对照品进样含量(μg)为横坐标X,色谱峰面积为纵坐标Y计算回归方程(表1)。各对照品在所示进样含量范围内线性关系良好。

表1 对照品回归方程

对照品	回归方程	线性范围 /μg	r
绿原酸	$Y = 3.60 \times 10^5 X - 1.59 \times 10^4$	0.12~4.64	0.999 3
紫丁香苷	$Y = 1.70 \times 10^6 X + 4.54 \times 10^3$	0.05~1.23	0.999 7
芦丁	$Y = 7.06 \times 10^5 X + 3.25 \times 10^4$	0.12~4.80	0.999 3

**2.6 精密度试验** 取质量浓度均为10 μg·mL<sup>-1</sup>的绿原酸、紫丁香苷、芦丁混合对照品溶液,重复进样6次,进样量为20 μL,测定峰面积,3种对照品RSD分别为1.1%,1.0%,1.1%,表明仪器精密度良好。

**2.7 稳定性试验** 精确称取天山雪莲对照药材粉末0.1 g,制备成供试品溶液,在室温下放置,分别于0,1,4,8,12,24 h进样分析,进样量为20 μL,分别测定绿原酸、紫丁香苷、芦丁峰面积,RSD分别为1.4%,1.2%,1.1%,表明样品溶液制备后24 h内基本稳定。

**2.8 重复性试验** 精确称取同一批天山雪莲对照药材粉末各0.1 g,同法制备6个供试品溶液分别进样分析,进样量为20 μL,测定峰面积,结果样品中绿原酸、紫丁香苷、芦丁平均含量分别为0.73%,0.02%,0.79%;RSD分别为1.3%,1.2%,1.4%,表明重复性良好。

**2.9 回收率试验** 精密称取已知含量的天山雪莲对照药材粉末0.1 g共6份。精确加入浓度已知的绿原酸、紫丁香苷、芦丁混合对照品溶液,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,进样测定,各测定成分的平均回收率在99%~100%,表明回收率良好,结果见表2。

**2.10 样品测定与色谱图比较** 取上述方法制备的天山雪莲组培苗与实生苗样品提取液,利用高效液相色谱仪进行分析,进样量为20 μL,记录色谱图,各样品中绿原酸、紫丁香苷、芦丁含量测定结果见表3。移栽前组培苗绿原酸、紫丁香苷含量低于实生苗,芦丁含量高于实生苗。移栽种植两年后的天山雪莲组培苗与实生苗绿原酸含量分别为0.84%,0.70%;芦丁含量分别为0.54%,1.80%,均高于药典≥0.15%的要求<sup>[8]</sup>。紫丁香苷含量分别为0.59%,0.64%远远高于对照药材。经过对各色谱图的比较(图2,图3),发现移栽大田后各有效成分的含量均显著升高,代谢产物种类增多。植物次生代谢产物的合成,其最重要的原因就是提高植物体对多变的自然环境的适应性<sup>[9]</sup>,试管苗生长条件比较单一,其合成的次生代谢产物种类也就相对减少。因此组培苗与实生苗有效成分移栽前少于移栽后是很正常的。从图2可以看出,移栽种植两年后天山雪莲组培苗、实生苗与对照药材谱图大致相同,成分组成基本相似。

### 3 讨论

HPLC能够比较精确地检测出样品的成分种类和含量差异。从结果分析来看,天山雪莲组培苗、实生苗与对照药材色谱图大致相同,成分种类基本相似,绿原酸、芦丁含量均高于药典≥0.15%的要求。

表2 天山雪莲中绿原酸、紫丁香苷、芦丁的加样回收率

成分	称样量/g	样品中含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均值/%	RSD/%
绿原酸	0.1023	746.8	750.3	1497.9	100.1	100.0	0.12
	0.1127	822.7		1572.6	100.0		
	0.1094	798.6		1548.7	100.0		
	0.1015	741.0		1492.2	100.1		
	0.1086	792.8		1543.8	100.1		
	0.0992	724.2		1473.2	99.8		
紫丁香苷	0.1023	20.46	20.16	40.38	98.8	99.4	1.4
	0.1127	22.54		42.32	98.1		
	0.1094	21.88		41.89	99.3		
	0.1015	20.30		40.54	100.4		
	0.1086	21.72		42.23	101.7		
	0.0992	19.84		39.63	98.2		
芦丁	0.1023	808.2	807.2	1615.4	100.0	100.0	0.04
	0.1127	890.3		1697.1	100.0		
	0.1094	864.3		1671.9	100.1		
	0.1015	801.9		1609.1	100.0		
	0.1086	857.9		1664.8	100.0		
	0.0992	783.7		1590.4	100.0		

表3 不同样品绿原酸、紫丁香苷、芦丁质量分数(n=5) %

成分	移栽前	移栽前	移栽后	移栽后	对照药材
	组培苗	实生苗	组培苗	实生苗	
绿原酸	0.47	0.55	0.84	0.70	0.73
紫丁香苷	0.53	0.62	0.59	0.64	0.02
芦丁	0.08	0.06	0.54	1.80	0.79

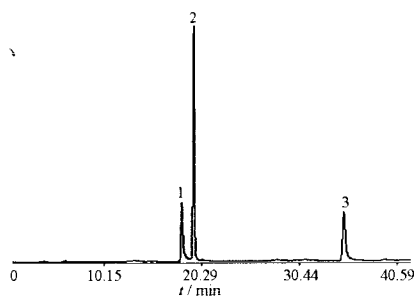


图1 对照品色谱图

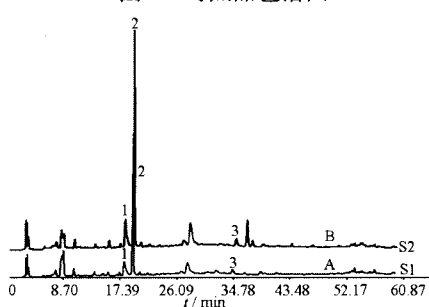


图2 移栽前组培苗(A)与实生苗(B)色谱图比较

1. 绿原酸; 2. 紫丁香苷; 3. 芦丁(表3同)

之所以对组培苗和实生苗进行分析,是为了得到更多组培快繁与人工种植天山雪莲的数据资料,对他们起到早期监测作用,并为分析其成熟植株的后续工作打下基础,来解决野生资源保护与开发之间的矛盾。今

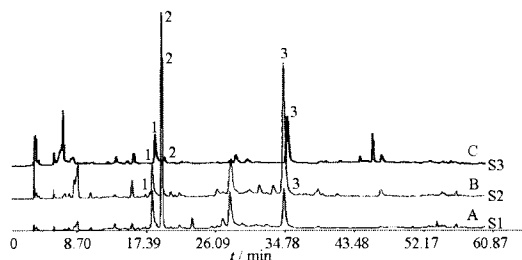


图3 移栽后组培苗(A)、实生苗(B)与天山雪莲对照药材(C)色谱图比较

后在天山雪莲细胞培养阶段可采用代谢调控与诱变筛选技术,定向诱导提高有效成分的含量,培育新品种,实现天山雪莲品质的稳定性和可持续利用。

【参考文献】

- [1] 陈发菊,杨映根,赵德修,等. 我国雪莲植物的种类、生境分布及化学成分的研究进展[J]. 植物学通报,1999,16(5):561.
- [2] 武利勤,郭顺星,肖培根. 新疆雪莲胚芽的组织培养和植株再生[J]. 中国中药杂志,2005,30(11):814.
- [3] 付春祥,金治平,杨睿,等. 新疆雪莲毛状根的诱导及其植株再生体系的建立[J]. 生物工程学报,2004,20(3):366.
- [4] 武利勤,郭顺星,肖培根. 新疆雪莲细胞悬浮系的建立和黄酮类活性成分的产生[J]. 中国中药杂志,2005,30(13):965.
- [5] 杨林,覃筱燕. 新疆雪莲的组织培养及植株再生[J]. 中央民族大学学报(自然科学版),2006,15(1):26.
- [6] 毕永军. 天山雪莲人工栽培技术[J]. 经济作物,2002,3:9.
- [7] 赵明波,邓秀兰,王亚玲,等. 红花 RP-HPLC 指纹图谱的建立及其质量研究[J]. 药学学报,2004,39(3):212.
- [8] 中国药典[S]. 一部. 2005:37.
- [9] 孙瑞强,郭志刚,刘瑞芝,等. 栽培藏红花与藏红花培养细胞的成分对比研究[J]. 中国中药杂志,2004,29(9):850.

【责任编辑 张宁宁】