

• 质量标准 •

建立高效液相指纹图谱分析无机离子 对丹参不定根有效成分影响

王学勇, 崔光红, 何希荣, 黄璐琦*
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立丹参不定根 RP-HPLC 指纹图谱分析方法, 分析无机离子对丹参不定根影响。方法: 高效液相色谱法, RP-Waters C18(150 mm × 3.9 mm, 5 μm), 流动相为 0.5% 醋酸甲醇和 0.5% 醋酸水梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 270 nm, 柱温: 30 °C。对丹参不定根进行指纹图谱分析。结果: 在此色谱条件下, 3 组共 9 份样品的不定根可检测出 11 个相对位置稳定的共有峰, 其中确定 9 个共有峰作为成分变化指示峰, 并确定了 5 个已知成分, 结果显示无机金属离子能明显提高不定根中丹酚酸类成分的含量, 而对丹参酮等脂溶性成分影响不显著。结论: 该方法稳定可靠, 重复性强, 可用于评价对丹参不定根次生代谢成分变化情况, 为丹参不定根的培养及进一步研究奠定基础。

[关键词] 丹参不定根; 高效液相; 指纹图谱; 丹参

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)01-0001-04

The Fingerprint for Adventitious Root of *Radix Salviae Miltiorrhizae* Developed by High-performance Liquid Chromatography and its Active Component Primary Analysis

WANG Xue-yong, CUI Guang-hong, HE Xi-rong, HUANG Lu-qi*

(Institute of Chinese material Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish RP-HPLC fingerprint for adventitious root of *Radix Salviae Miltiorrhizae* and primarily investigate effects of different metal ion on it. **Method:** The Methanol extraction of *Radix Salviae Miltiorrhizae* was filtered through 0.45 μm filters and separated by using a Resolve TM C18 column (Waters, 150mm × 3.9 mm, 5 μm) at 30 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile and water was used as gradient elution for the separation. The flow rate was set at 1.0 mL·min⁻¹ and detection was set at 270 nm. The fingerprint was then established as above condition for adventitious root of *Radix Salviae Miltiorrhizae*. **Result:** 11 peaks in common of 9 samples of treated with 3 kind of metal ion to adventitious root were acquired and 9 of them were chosen as symbolization for the component of *Radix Salviae Miltiorrhizae*. **Conclusion:** The fingerprint profile provides a good approach to value the quality and monitor the change of content of active component in adventitious root of *Radix Salviae Miltiorrhizae*.

[Key words] Adventitious root of *Radix Salviae Miltiorrhizae*; HPLC; Fingerprint profile; *Salvia miltiorrhiza* Bge

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.

的干燥根及根茎, 全国大部分地区均产。丹参活性成分主要为脂溶性二萜醌类和水溶性酚酸类成分两大类, 目前国内外对丹参愈伤组织培养及次生代谢产物的形成进行了广泛的研究^[1,5], 但尚缺乏对丹参组织培养所产生的次生代谢物的多成分定性和量化

[收稿日期] 2006-07-10

[通讯作者] * 黄璐琦, Tel: (010) 84044340; E-mail: huangluqi@263.net

的较为理想的评价方法。本实验通过建立 HPLC 指纹图谱方法,对丹参不定根无机离子处理后各成分的变化进行综合评价,为改善丹参组织培养体系及进一步生物学研究奠定基础。

1 仪器材料与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 二极管阵列检测器, Millennium 32 工作站, RP-Waters C₁₈ (150 mm × 3.9 mm, 5 μm) 柱; 色谱甲醇(天津); 水为三重蒸馏水; 丹参不定根由中国中医科学院中药研究所分子生药实验室诱导培养, 分为对照组(1-1, 1-2, 1-3), (3 个重复, 以下同) 2 倍 Mg²⁺ 处理组(2-1, 2-2, 2-3) 和 2 倍 PO₄³⁺ 处理组(3-1, 3-2, 3-3)。

2 方法

2.1 色谱条件及供试液的制备

2.1.1 检测波长的选择 参考二极管阵列检测结果, 比照各主要波长下的色谱图, 结果发现 270 nm 测定的色谱峰数多, 各主要峰的响应值均最高, 反应信息较完全。因此选择 270 nm 作为丹参药材指纹图谱的检测波长。

2.1.2 色谱条件 色谱柱: RP-Waters C18(150 mm × 3.9 mm, 5 μm), 流动相: 0.5% 醋酸甲醇: 0.5% 醋酸水梯度洗脱。洗脱程序见表 1, 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm, 柱温: 30 °C。在该色谱条件下, 色谱图各主要色谱峰可以良好辨认, 并在 65 min 内出峰完毕。

表 1 丹参不定根流动相梯度洗脱条件

时间(min)	流动相 A(5% 醋酸甲醇, %)	流动相 B(0.5% 醋酸水, %)
0.01	30	70
25	60	40
30	65	35
50	70	30
60	80	20
65	30	70

2.1.3 供试品溶液的制备 取干燥至恒重的丹参不定根适量, 研碎成均能通过 40 目筛的细粉, 混匀。取药材细粉约 0.2 g, 精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇 10 mL, 超声处理 40 min, 取出放冷, 加甲醇补足至原重, 摇匀, 静置, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.4 对照品溶液的制备 分别精密称取丹酚酸 B, 二氢丹参酮 I, 丹参酮 I, 丹参酮 IIA, 隐丹参酮对照品适量, 加入甲醇分别制成 0.1 mg·mL⁻¹ 的溶液, 进样前分别各取 2 mL 置于 10 mL 容量瓶, 加甲

醇溶液定容至 10 mL, 分别吸取各标准品适量制得混合标品即可。

2.1.5 参照峰(S)的选择 在上述色谱条件下测得 2 号峰在 9 份样品中均稳定存在, 峰响应值较高, 分离度较好, 符合参照谱峰设置条件和要求。

2.2 方法学考察

2.2.1 空白试验 吸取流动相 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 未见明显色谱峰。

2.2.2 对照试验 吸取对照品溶液 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图和保留时间, 即得。

2.2.3 精密度试验 取供试品溶液(编号 1-1), 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 分别对各峰的相对保留时间和峰面积进行统计, 结果表明, 峰面积和相对保留时间基本一致(RSD < 3%), 表明丹参不定根指纹图谱精密度试验符合要求。

2.2.4 重复性试验 取丹参不定根(编号 1-1) 分别称取 6 份, 制成供试品溶液, 注入液相色谱仪进行测定, 分别对各峰的相对保留时间和峰面积进行统计, 结果表明, 各共有色谱峰的峰面积和相对保留时间基本一致(RSD < 3%), 因此丹参不定根指纹图谱重复性试验符合要求。

2.2.5 稳定性试验 取丹参不定根供试品溶液在室温下保存, 分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 测定, 分别对各峰的相对保留时间和峰面积进行统计。结果表明共有色谱峰的峰面积和相对保留时间基本一致(RSD < 3%), 因此, 指纹图谱稳定性试验符合要求。

2.3 指纹图谱相似度的计算 相似度以夹角余弦法计算整体相似度, 结果见表 4。

3 结果

按上述色谱条件, 分别精密吸取参照物溶液和供试品溶液各 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定, 记录 65 min 的色谱图, 得标准品色谱图与样品色谱图见图 1 (A), (B)。结果显示, 本研究所处理的 9 个样品中, HPLC 指纹图显示共有峰 11 个, 选定其中 9 个峰为特征指示峰。通过与对照品色谱图(B)对照, 确定了 9 个色谱峰中的 5 个为已知成分, 即 2, 5, 6, 7, 9 号峰分别为丹酚酸 B, 二氢丹参酮, 隐丹参酮, 丹参酮 I, 丹参酮 IIA 成分。在 9 特征指示峰当中, 相对峰面积超过 20% 的有 2 个峰, 分别为 1, 2 号峰; 超过 4% 的共有峰有 4 个分别为 5, 6, 7, 8 号峰; 其他面积较大的峰为: 3, 10 号峰。由表 2、表 4 统计结果可知: 各色谱峰相对保留时间 RSD 在 0.14~ 0.98% 范围

表 2 丹参不定根纹图共有峰相对保留时间测定结果

峰号	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3	RT 均值	RSD%
1	0.677	0.679	0.678	0.678	0.681	0.681	0.678	0.677	0.680	0.679	0.147
2(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1	0
3	1.140	1.144	1.140	1.142	1.148	1.150	1.139	1.137	1.144	1.143	0.403
4	1.404	1.409	1.410 5	1.413	1.420	1.416	1.407	1.405	1.412	1.411	0.489
5	1.553	1.562	1.564	1.567	1.575	1.570	1.560	1.558	1.565	1.564	0.618
6	1.769	1.773	1.780	1.784	1.793	1.786	1.775	1.772	1.780	1.779	0.725
7	2.040 1	2.050	2.053	2.058	2.068	2.062	2.050	2.048	2.056	2.054	0.776
8	2.117	2.127	2.130 1	2.136	2.147	2.140	2.127	2.122	2.132	2.131	0.865
9	2.331	2.342	2.348	2.353	2.365	2.357	2.344	2.336	2.348	2.347	0.985

表 3 丹参不定根指纹图谱共有峰峰面积统计结果

峰号	峰面积 × 1 000								
	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
1	1 057.75	2 111.251	2 205.091	1 779.21	2 531.616	3 136.043	3 635.286	2 657.445	3 764.124
2	1 912.77	1 618.374	2 599.422	1 689.1	2 156.781	2 865.607	4 525.23	3 045.245	3 959.493
3	387.184	501.854	276.842	249.278	547.892	466.025	478.002	470.106	617.594
4	244.682	502.336	389.223	613.941	530.538	551.467	524.249	507.354	652.779
5	497.239	666.092	511.171	842.427	428.373	775.316	848.152	642.691	727.154
6	429.636	1 005.151	754.732	962.428	616.95	1 038.603	833.473	745.562	890.969
7	380.835	267.366	311.66	435.148	416.393	462.487	483.661	491.255	542.813
8	700.663	683.089	677.481	710.338	1 153.629	976.635	748.216	827.421	1 127.842
9	180.255	239.393	250.945	372.893	274.469	404.104	482.183	367.762	421.676

表 4 丹参不定根指纹图谱共有峰相似度统计结果

样号	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
1-1	1								
1-2	0.949	1							
1-3	0.985	0.953	1						
2-1	0.959	0.969	0.955	1					
2-2	0.948	0.998	0.954	0.970	1				
2-3	0.914	0.990	0.922	0.955	0.992	1			
3-1	0.940	0.990	0.949	0.980	0.993	0.991	1		
3-2	0.942	0.990	0.944	0.983	0.992	0.992	0.997	1	
3-3	0.946	0.979	0.958	0.977	0.981	0.975	0.988	0.987	1

内,均小于 1%,相似度均在 0.9 以上。因此,本实验所建立的丹参不定根 RP-HPLC 指纹图谱,稳定性,重复性均较好。

由表 3 和图 2 可知,丹参不定根对照组 3 个重复(1-1, 1-2, 1-3)与 Mg^{+} (2-1, 2-2, 2-3)和 PO_4^{-3} (3-1, 3-

2, 3-3)比较,1 号峰 2 号峰(丹酚酸 B)峰面积均显著大于对照培养组(注:各组别样品供试液浓度均一致即:药材重/MeOH 体积= 1.00 g/5 mL),而对于 5, 6, 7, 9 号峰等脂溶性丹参酮类成分(如:二氢丹参酮,隐丹参酮,丹参酮 I 和丹参酮 IIA 等),各组别的峰面积差别不大。说明无机离子对丹参不定根丹酚酸类成分的影响较大,而对于丹参酮类成分影响不显著。

4 讨论

丹参不定根培养作为丹参组织细胞人工培养的一种,具有易于诱导,培养条件易于控制等优势。但目前关于丹参不定根培养及化学分析测定的研究报道较少。因此建立一种精确、稳定、重复性好的方法,以评价丹参不定根品质,优化不定根培养条件,以提高有效成分的含量等具有重要的意义。

植物组织细胞培养往往存在有效成分含量偏低的问题。无机离子在植物次生代谢过程中具有重要

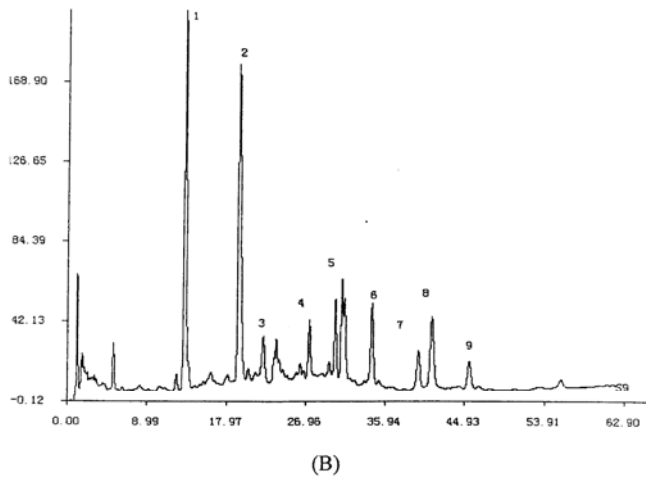
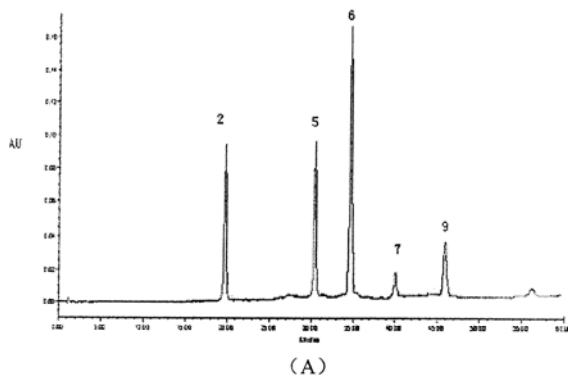


图 1 270 nm 波长条件下, 对照品(A), 丹参不定根(B)液相色谱图

1~9 代表丹参不定根指纹图谱共有特征指示峰, 其中 2, 5, 6, 7, 9 号峰分别为: 丹酚酸 B, 二氢丹参酮, 隐丹参酮, 丹参酮 I, 丹参酮 II A。

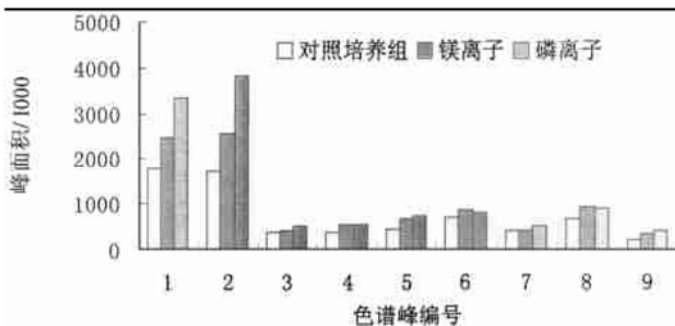


图 2 对照培养组, 2 倍 Mg^{2+} 组和 2 倍 PO_4^{3-} 组, 3 个组别 1~9 号共有色谱峰峰面积值比较图。

其中 2, 5, 6, 7, 9 号峰分别为: 丹酚酸 B, 二氢丹参酮, 隐丹参酮, 丹参酮 I, 丹参酮 II A。

的作用, 改变无机离子浓度以提高植物次生代谢产物不失为一条重要途径。 Mg^{2+} 是植物代谢途径过程重要酶的活化剂, 是核糖核酸聚合酶的活化剂, 对 DNA 和 RNA 的合成具有重要作用^[6]。磷离子主要以 $H_2PO_4^-$ 或 HPO_4^{2-} 的形式被植物吸收, 磷对氮代谢, 有机物的合成和分解代谢, 细胞信号转导, 基因表达调控等过程密切相关^[6]。因此, 改变不定根培养基中无机离子浓度, 研究其对丹参有效成分的影响, 对于提高有效成分含量具有重要价值。

本实验建立了 HPLC 指纹图谱方法, 对 3 个培养组别的 9 份丹参不定根的水溶性酚酸类成分和丹参酮类脂溶性成分进行了比较分析。以丹酚酸 B, 二氢丹参酮, 丹参酮 I, 丹参酮 II A, 隐丹参酮 作为参照物, 通过与对照样品的指纹图谱的比较和峰的归属进行匹配, 确定了部分特征峰的化学成分归属。以单位量样品的峰面积作为特征变量值, 对丹参不定根有效成分含量的差异作了初步分析。结果表明无机离子 Mg^{2+} , 磷离子丹参中丹酚酸类成分代谢影响较大, 而对丹参酮类成分的影响并不显著, 其原因和作用机制还有待于进一步研究和验证。

[参考文献]

- [1] 张荫麟, 宋经文, 吕桂兰, 等. 丹参毛状根培养的建立和丹参酮的产生[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(5): 2693.
- [2] 胡月红, 张瑞, 胡之璧, 等. 丹参愈伤组织的培养及其有效成分[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(6): 4242.
- [3] Shimomura K, Kitazawa T, Okamura N, et al. tanshinone Production in Adventitious Root and Regenerates of *Salvia miltiorrhiza* [J]. J Natur Prod, 1991, 54: 6, 1583.
- [4] Morimoto s, goto Y, Shoyama Y. Production of Lithospermic Acid Band ros marinic acid in callus tissue and Regenerated Plantlets of *S. miltiorrhiza* [J]. J Natur Prod, 1994, 57: 6, 817.
- [5] Hur ZB, Alfer manir AW, diterpenoid production in Hairy Root Cultures of *S. miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 1993, 32: 3, 699.
- [6] 武维华. 植物生理学[M]. 北京: 科学出版社, 2003. 86.