

组培广藿香与扦插广藿香中百秋里醇和广藿香酮的含量对比分析

汪小根, 莫小路, 蔡岳文, 陈瑜珍

(广东食品药品职业学院, 广州 510520)

摘要 目的: 分析广藿香经组织培养技术获得的再生植株中百秋里醇和广藿香酮的含量, 并与扦插药材进行比较, 为广藿香药材的组织培养条件以及品质鉴定提供实验依据。方法: 采用 GC法分别对 3批组培与 3批扦插广藿香药材中百秋里醇和广藿香酮进行定量分析。色谱条件为: 安捷伦 DB-1毛细管柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); FID检测器; 程序升温: 初始温度 120 °C, 停留 3 min后以每分钟 10 °C的速度升至 220 °C; 载气为高纯氦气, 流速: 1 mL · min⁻¹, 进样口温度和检测器温度均为 230 °C, 分流比: 50: 1。结果: 组培药材中百秋里醇和广藿香酮的含量与扦插药材相比, 无显著性差异。结论: 组织培养适于广藿香药材的繁殖, 并能保证药材的质量。

关键词: 广藿香; 组培; 扦插; 百秋里醇; 广藿香酮; 对比

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0096-04

Content comparison of patchouli alcohol and pogostone in *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth produced by tissue culture and cutting propagation

WANG Xiao-gen¹, MO Xiao-lu², CAI Yue-wen², CHEN Yu-zhen²

(Guang Dong Professional Food and Drug Vocational College Guangzhou 510520 China)

Abstract Objective To analyze and compare the contents of patchouli alcohol and pogostone in *Pogostemon cablin* produced with tissue culture and cutting propagation in order to offer references for tissue culture condition and quality evaluation. **Methods** The contents of patchouli alcohol and pogostone in three batches medicinal herbs produced with tissue culture and three batches cutting propagation under GC conditions. Capillary column Agilent DB-1 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); FID detector with programmed temperature promoted by 10 °C · min⁻¹ to 220 °C at initial temperature being 120 °C remaining 3 minutes. High purity helium was used as carrier gas and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹; Both injector and detector temperature are 230 °C, split ratio 50: 1. **Results** The contents of patchouli alcohol and pogostone in two kinds of medicinal herbs showed no significant difference. **Conclusion** Tissue culture can be use as the propagation method and can ensure the quality of *Pogostemon cablin*.

Key words *Pogostemon cablin*; tissue culture; cutting propagation; patchouli alcohol; pogostone; comparison

广藿香 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] 为唇形科刺蕊草属植物, 因产地的自然环境条件、种植习惯、栽培管理、采收加工等的不同, 其产品形态、气味、质量有所差异, 有关研究也证实了石牌藿香和海南藿香在外观形态及体内化学成分的组成上都有较明显的差异^[1, 2]。广藿香的药用成分主要为挥发油, 称广藿香油。百秋里醇和广藿香酮作为油中的主要成分对白色念珠菌、新型隐球菌、黑根霉菌等真

菌具有明显的抑制作用, 对金黄色葡萄球菌、甲型溶血性链球菌等细菌亦具有抑制作用^[3, 4]。引种广藿香极少见开花, 主要通过无性扦插繁殖, 繁殖速度受环境条件影响大, 易受病菌感染。为保护广藿香的种质资源^[5], 关于广藿香的组织培养有大量的研究。本文对组织培养法获得的广藿香药材挥发油中百秋里醇和广藿香酮含量进行测定, 并与扦插品进行对比分析, 为广藿香的组织培养条件及其品质鉴

定提供依据。

1 仪器和试剂

TRACE GC 气相色谱仪, Xcalibur 色谱工作站 (美国 Finnigan 公司); 十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

内标物: 正十八烷 (广州香雪制药有限公司质检部提供); 对照品: 百秋里醇 (中国药品生物制品检定所, 编号 772-200003), 广藿香酮 (自制, 以药材挥发油为原料, 采用碱溶酸沉法制备, 并经高效液相色谱法测定, 纯度达 99.58%); 样品: 扦插广藿香药材 (采收于广东省中药研究所药用植物园), 组培广藿香药材 (由本所组培研究室提供), 经广东省中药研究所蔡岳文主任鉴定为唇形科植物广藿香全草 [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]。其他溶剂和试剂均为分析纯。

2 气相色谱条件

安捷伦 DB-1 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm); FID 检测器; 进样口温度和检测器温度均为 230 °C, 程序升温: 初始温度 120 °C, 停留 3 min 后以每分钟 10 °C 的速度升至 220 °C; 载气为高纯氮气, 流速: 1 mL · min⁻¹, 分流进样, 分流比: 50:1, 进样量 1 μL。

3 校正因子的测定

取正十八烷适量, 精密称定, 加无水乙醇制成每 1 mL 含 4.0 mg 的溶液, 作为内标溶液; 另精密称取百秋里醇和广藿香酮对照品适量, 分别加无水乙醇制成每 1 mL 含 5.0 mg 单一对照品的溶液, 分别精密吸取对照品溶液 0.5 mL、内标溶液 0.4 mL 置 2 mL 量瓶中, 用无水乙醇定容。分别吸取以上溶液 1 μL, 注入气相色谱仪, 连续进样 3 次, 以平均峰面积分别计算百秋里醇和广藿香酮的校正因子分别为 1.146 和 1.916。

4 供试品溶液的制备

采用水蒸气蒸馏法分别得到组培和扦插广藿香药材挥发油 (挥发油得率为 4.5%), 按照以下方法分别制得供测定百秋里醇和广藿香酮 2 种成分含量的供试品溶液。精密吸取供试品溶液 1 μL, 以外标法计算 2 种成分的含量。2 类药材 2 种成分测定的色谱图见图 1。

4.1 测定百秋里醇的供试品溶液 精密吸取组培和扦插的 2 种挥发油各 8 μL 分别置 2 mL 量瓶中, 各加内标溶液 0.4 mL, 并用无水乙醇定容, 摇匀, 即得。

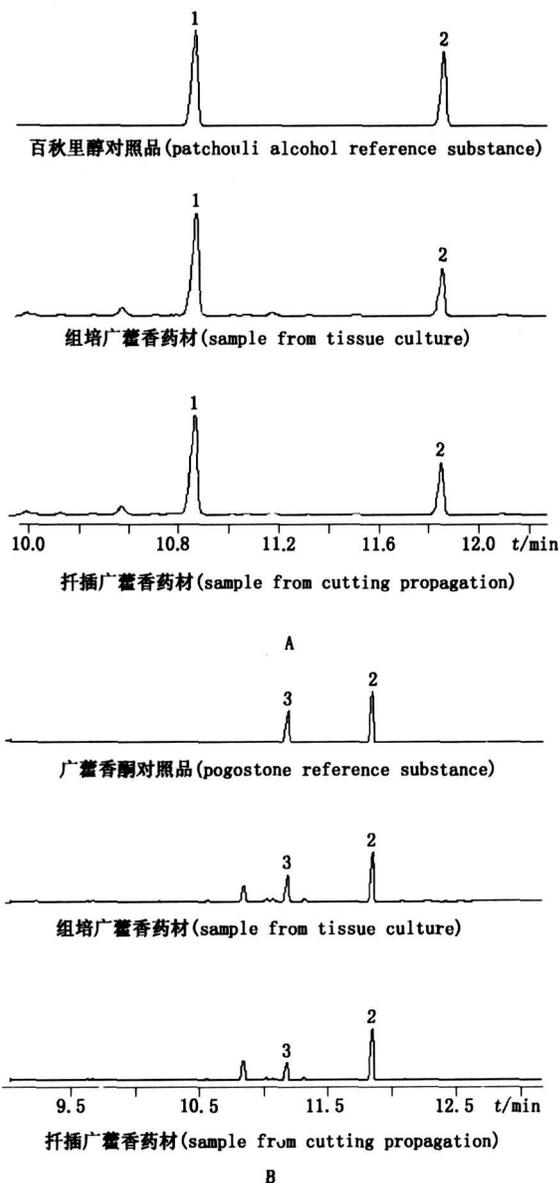


图 1 百秋里醇 (A) 和广藿香酮 (B) GC 图

Fig 1 GC chromatograms of patchouli alcohol (A) and pogostone (B)

1. 百秋里醇 (patchouli alcohol, 10.9 min) 2. 内标正十八烷 (internal standard *n*-octadecane, 11.8 min) 3. 广藿香酮 (pogostone, 11.2 min)

4.2 测定广藿香酮的供试品溶液 分别精密吸取扦插药材挥发油 0.2 mL, 组培药材挥发油 0.5 mL, 加乙醚 5 mL 稀释, 摇匀, 用 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液萃取 5 次, 每次 2 mL, 合并碱液, 用 10% 盐酸调 pH 至 2, 再用乙醚萃取 2 次, 第 1 次 10 mL, 第 2 次 5 mL, 合并乙醚液, 挥干^[6], 用适量无水乙醇转移至 2 mL 量瓶中, 加内标溶液 0.4 mL, 并用无水乙醇定容至刻度, 摇匀, 即得。

5 线性范围试验

分别精密称取百秋里醇、广藿香酮和正十八烷

对照品适量,用无水乙醇制成含 $4.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 正十八烷的内标溶液, $5.06 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 百秋里醇对照品溶液, $5.43 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的广藿香酮对照品溶液。精密吸取百秋里醇对照品溶液、广藿香酮对照品溶液各 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.2 mL, 分别置于 2 mL 量瓶中, 加入内标溶液 0.4 mL, 用无水乙醇稀释至刻度。进样测定内标与百秋里醇及广藿香酮峰面积比。以峰面积比值 Y 为纵坐标, 对照品的浓度为横坐标分别绘制标准曲线, 计算回归方程分别为:

$$Y = 0.676X + 0.0059 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 1.171X - 0.0128 \quad r = 0.9997$$

结果表明百秋里醇进样浓度在 $0.253 \sim 3.036 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 广藿香酮进样浓度在 $0.2715 \sim 3.258 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内具有良好的线性关系。

6 稳定性试验

取扦插广藿香的供试品溶液, 每间隔 2 h 测定内标与百秋里醇、广藿香酮的峰面积比值。结果比值的平均值 ($n = 5$) 分别为 0.8004 和 1.446 RSD 分别为 0.18% 和 0.26%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

7 精密度试验

精密吸取“3”项下供测定校正因子用的含内标对照品溶液 1 μL , 重复进样 5 次, 测定内标与百秋里醇、广藿香酮的峰面积之比。结果峰面积比值的平均值分别为 0.6882 和 1.263 RSD 分别为 0.11% 和 0.19%。

8 重复性试验

取同一批扦插广藿香药材样品, 按“4”项下方法制备 6 份供试品溶液, 进样测定百秋里醇和广藿香酮的含量。结果药材中百秋里醇、广藿香酮的平均含量 ($n = 6$) 分别为 2.90% 和 0.089%, RSD 分别为 1.2% 和 1.3%。

9 加样回收率试验

广藿香挥发油的提取采用水蒸气蒸馏法, 经反复试验, 该法能将广藿香药材中挥发油提取完全, 因此, 加样回收率试验对水蒸气蒸馏提取过程不再考察。

9.1 百秋里醇 精密吸取已知含量 ($645.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的扦插广藿香药材的挥发油 3, 4, 5 μL 各 2 份, 再分别加入百秋里醇对照品约 2.5 mg 按“4.1”项下方法制备溶液, 进样测定, 计算回收率。结果低、中、高 3 个浓度的平均回收率 ($n = 2$) 分别为 97.0%, 97.3%, 97.8%; 偏差分别为 0.20%,

1.08%, 0.96%。

9.2 广藿香酮 精密吸取已知含量 ($19.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的扦插广藿香药材的挥发油 0.08, 0.10, 0.15 mL 各 2 份, 再分别加入广藿香酮对照品约 2 mg 按“4.2”项下方法制备溶液, 进样测定, 计算回收率。结果低、中、高 3 个浓度的平均回收率 ($n = 2$) 分别为 96.6%, 97.3%, 97.4%; 偏差分别为 0.52%, 0.83%, 0.33%。

10 组培和扦插药材成分含量比较

各取组培和扦插广藿香药材 6 批, 对其中的百秋里醇和广藿香酮的含量进行测定比较, 并进行单因素方差分析。结果表明, 组培药材中百秋里醇和广藿香酮的含量与扦插药材相比, $P > 0.05$ 二者无显著性差异。具体测定结果见表 1。

表 1 2 种药材成分含量测定结果 (% , $n = 6$)

Tab 1 Contents of patchouli alcohol and pogostone in *Pogostan on cablin* from tissue culture and cutting propagation

成分 (component)	批次 (Lot No.)	扦插 (cutting propagation)	组培 (tissue culture)
百秋里醇 (patchouli alcohol)	1	2.88	2.83
	2	2.82	2.80
	3	2.79	2.84
	4	2.84	2.82
	5	2.79	2.85
	6	2.82	2.87
广藿香酮 (pogostone)	1	0.086	0.085
	2	0.090	0.091
	3	0.084	0.086
	4	0.095	0.082
	5	0.083	0.089
	6	0.086	0.090

11 讨论

广藿香是广东的道地药材之一, 文献报道栽培于广东和海南等不同地区的广藿香在其主要的药用成分挥发油的含量及挥发油中广藿香酮和百秋里醇的含量都有很大差异^[7], 而药材生产上一直认为原产于广州石牌地区的广藿香为上品, 由于其某些形态上的特征与其他产地的广藿香不同, 因此, 有关广藿香品种分类的探讨仍在进行^[8], 同时, 石牌藿香对生境要求高, 扦插成活率低, 因此, 组织培养是生产石牌藿香的有效途径。从测定结果可知, 组织培养的广藿香药材中百秋里醇和广藿香酮的含量与扦插药材无显著性差异, 提示广藿香药材的繁殖可采用组织培养的方法, 进一步的质量评价可采用指纹图谱分析比较。

参考文献

- LIW eǐ(李薇), LIU Xiang-xiang(刘乡乡), PAN Chao-mei(潘超美), *et al*. The observation and comparison of *Pogostemon cablin* from different habitats(不同产地广藿香特征的观测和比较). *J Chin Mater Med*(中草药), 2002, 25(7): 463
- LIW eǐ(李薇), WEI Gang(魏刚), PAN Chao-mei(潘超美), *et al*. Investigation on the influential factors of the volatile oil and main constituent content in *Pogostemon cablin*(广藿香药材挥发油及主要成分含量影响因素的考察). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2004, 29(1): 28
- LILi-zhong(李立忠), HU Chao-feng(胡朝凤), QUAN Zai-zhe(全载哲). Isolation and identification of dhewangin in *Agastache rugosa*(藿香中广藿香酮的分离及鉴定). *J South-Cent Univ Natl (Nat Sci Ed)*(中南民族大学学报 自然科学版), 2005, 24(1): 14
- YANG De-po(杨得坡). Antifungal activity of the essential oils from *Agastache rugosa* and *Pogostemon cablin* against dermatophytes and opportunistic fungi(藿香和广藿香挥发油对皮肤癣菌和条件致病真菌的抑制作用). *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2000, 35(1): 9
- ZHANG Ying(张英), ZHANG Jin-chao(张金超), CHEN Yao(陈瑶), *et al*. Current progresses in pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of *Pogostemon cablin*(广藿香生药、化学及药理学的研究进展). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006, 37(5): 786
- WANG Xiao-gen(汪小根), ZOU Yu-fan(邹玉繁), WANG Yu-sheng(王玉生). GC-MS assay for the determination of pogostone in essential oil of *Herba Pogostemi*(GC-MS联用技术测定广藿香油中广藿香酮的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(5): 582
- LUO Ji-peng(罗集鹏), LIU Yu-ping(刘玉萍), FENG Yi-fan(冯毅凡), *et al*. Two chemotypes of *Pogostemon cablin* and influence of region of cultivation and harvesting time on volatile oil composition(广藿香的两个化学型及产地与采收期对其挥发油成分的影响). *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2003, 38(4): 307
- XU Song-jun(徐颂军), WANG Xiaofeng(王晓峰), XU Xianghao(徐祥浩), *et al*. The classification of cultivars of *Pogostemon cablin* cultivated in Guangdong province of China(药用广藿香的品种分类探讨). *J South China Norm Univ*(华南师范大学学报), 2003, 1(1): 82

(本文于 2008 年 11 月 21 日修改回)

CNAS实验室技术委员会药品专业委员会会议召开

2008年12月23日,中国合格评定国家认可委员会(CNAS)实验室技术委员会药品专业委员会在北京召开年会。中国合格评定国家认可委员会(CNAS)秘书处宋桂兰秘书长、实验室处曹实处长、挂靠单位中国药品生物制品检定所党委书记、所长李云龙到会并发表了讲话。会议由药品专业委员会秘书李冠民主持。药品专业委员会主任委员、中国药品生物制品检定所常务副所长金少鸿研究员对专业委员会在2008年的工作进行了总结汇报,并提出了2009年的工作思路与设想。

宋桂兰在讲话中介绍了实验室认可国际互认的进展情况、有关国家法规中对认可结果承认的情况、CNAS秘书处的工作情况以及认可工作中存在的问题。曹实对认可工作中的经常遇到的具体问题进行了说明,希望专业委员会就有关技术问题进行研究,提出建议。李云龙在讲话中表示:作为挂靠单位,中检所将继续给予药品专业委员会大力支持,希望专业委员会在CNAS秘书处的指导下,按照科学监管理念的要求,进一步发挥更大的作用,在建立更高标准的基础上,推动全国药检系统技术能力的增强和检验水平的提高。到会的近20位委员们就自己在实际工作经验和发现的问题展开讨论,并对专业委员会下一步的工作提出了建议和设想。

中检所党委副书记 丽霞、质量管理处副处长张庆生应邀出席了会议。

(中国药品生物制品检定所科研管理处供稿)