

野生与栽培药材麻花秦艽的 HPLC/UV 指纹图谱研究

纪兰菊, 马玉花, 陈桂琛 (中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001)

摘要 采用反相高效液相色谱—二极管阵列的检测方法, 分析了不同产地 11 批麻花秦艽药材, 建立麻花秦艽药材的指纹图谱, 进行野生药材与栽培药材的对比研究。结果表明: 最佳条件可较全面的反映麻花秦艽药材的主要成分, 栽培药材与野生药材相似度较好。

关键词 藏药; 麻花秦艽; 指纹图谱; RP-HPLC/UV

中图分类号 S563 文献标识码 A 文章编号 0517- 6611(2006) 10- 2165- 03

Study on the Chromatographic Fingerprint of Tibet Herb *Gentiana straminea* Maxim by HPLC/UV

Ji Lan-ju et al (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001)

Abstract The chromatographic fingerprint of *Gentiana straminea* Maxim has been set up by high performance liquid chromatography-diode-array detection method for eleven batches herbs collected in different districts of Qinghai-Tibet Plateau compare the chromatogram of wild angplanted samples. The analysis was performed on a Kromasil C18 (250 mm \times 4.60 mm, 5 μ m) eluted with methand and 0.02 % aqueous phosphoric acid as mobile phase and with UV detection at 254 nm. A general fingerprint acquaintance of main constituents in *Gentiana straminea* Maxim can be obtained by HPLC method, and the similarity is excellent between wild and planted samples, which provides scientific indexes for quality of *Gentiana straminea* Maxim.

Key words Tibet herb; *Gentiana straminea* Maxim; Chromatographic fingerprint; RP- HPLC

麻花秦艽 (*Gentiana straminea* Maxim) 为龙胆科 (*Gentianaceae*) 龙胆属 (*Gentiana*) 植物。龙胆科植物在我国约有 23 个属 427 种, 其中有 12 个属 70 多种供药用, 青藏高原分布有 50 多种, 其中有 60 % 用于藏药, 尤其是以龙胆属与獐牙菜属为主的植物大都具有清热、解毒、抗病毒、镇痛、祛风除湿等功效^[1], 多用于治疗肝胆系统、泌尿系统、消化系统和风湿痹症等疾病, 在我国中、藏医药的研究与应用方面均占有重要的地位。麻花秦艽为青藏高原广布种, 为国家三级重点保护植物^[2], 也是秦艽药材中的优良品种^[3]。近年来随着藏医药产业的迅猛发展, 麻花秦艽野生资源日益减少, 局部地区已近枯竭。为了药材资源的可持续利用, 开展了麻花秦艽引种栽培试验和种植药材与野生药材的品质评价等研究。由于药材的人为栽培可能丧失其野生状态下的遗传特性, 因此人工栽培与野生药材的质量评价方面的工作尤为重要。但是, 目前仅限于栽培与野生药材性状的显微鉴别及主要药效成分龙胆苦苷的含量分布等对比试验^[4-5]。为了进一步评价栽培药材的内在质量, 笔者比较了野生和栽培麻花秦艽药用部位 HPLC/UV 指纹图谱, 为栽培药材替代野生药材入药提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 LC-10AT_{VP} 二元泵 (岛津公司); Rheodyne 7725 进样器 (美国); SPD-M10AVP 二极管阵列检测器 (岛津公司); Class-VP 液相色谱工作站 (岛津公司); Milli-Q 超纯水装置。

1.2 试剂 甲醇 (色谱纯, 山东禹王试剂公司); 甲醇 分析纯, 天津市百世化工公司化学试剂厂); 磷酸 分析纯, 天津市百世化工公司化学试剂厂); 醋酸 分析纯, 天津市百世化工公司化学试剂厂); 水为重蒸水, 并经 0.45 μ m 滤膜过滤。

1.3 麻花秦艽样品的采集和配制 按中药注射剂指纹图谱实验研究技术指南 (试行) 的要求, 采集了 11 批青海和四川西北地区不同产地的野生麻花秦艽样品和 2 批人工种植

样品, 采集地见表 1。

表 1 麻花秦艽样品来源

样品	产地	采集时间	样品	产地	采集时间
1	玉树清水河	2004-09	8	果洛班玛	2004-10
2	玉树结古镇西	2004-09	9	青海湖东	2004-09
3	玉树结古镇东	2004-09	10	海南过马营	2004-10
4	玉树囊谦县	2004-09	11	四川西北部	2003-09
5	玉树通天河	2004-09	12	青海西宁栽培	2004-10
6	果洛甘德县	2004-10	13	青海湟中栽培	2004-10
7	果洛上贡麻乡	2004-10			

取麻花秦艽药材, 将根部剪碎, 置粉碎机中粉碎, 精密称取 0.5 g, 置 100 ml 具塞锥形瓶中, 加甲醇 20 ml, 置 80 水浴锅回流 1 h, 冷却至室温, 过滤于 25 ml 量瓶中, 用甲醇淋洗药渣及滤器并定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 滤膜, 弃初滤液, 收集续滤液为供试样品溶液。

1.4 HPLC 指纹图谱分离条件 建立中药材 HPLC 指纹图谱, 应尽可能满足以下条件: 样品中所有的组分都能被检出 (或者检出的组分 (峰) 数目尽可能多; 样品各组分间都能达到满意的分离度; 分析时间尽可能短 (1 h 左右)。基于以上原则, 在建立麻花秦艽药材指纹图谱时, 应该对提取方法、流动相组成、检测方法等作一定程度的优化选择。

分离条件: 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm \times 4.60 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.02 % 磷酸水溶液; 梯度洗脱, 洗脱条件为 0 min 20 min, 甲醇:0.02 % 磷酸水溶液 (V/V, 下同), 25 % 35 %; 20 min 30 min 60 min, 甲醇:40 % 60 % 90 %; 流速为 1 ml/min; 进样量为 10 μ l; 柱温为 30 ; 检测波长为 254 nm。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 精密度试验。 取同一批号的供试溶液, 连续进样 5 次。表 2 表明, 所测得的各共有峰面积和保留时间的 RSD 均小于 5 %, 说明精密度良好。

2.1.2 稳定性试验。 取同一批号供试溶液, 分别在 0、2、4、6、8 h 进样。表 2 表明, 所测得的各共有峰面积和保留时间的 RSD 均小于 5 %, 说明稳定性良好。

2.1.3 重现性试验。 取同一批号的样品 5 份, 精密称量, 分

基金项目 青海省重点科技攻关项目 (2004-N-142); 国家中西部专项 (2001BA901A47)。

作者简介 纪兰菊 (1952-), 女, 北京人, 研究员, 从事藏药药化研究。

收稿日期 2006-02-20

别进样。表2表明,所测得的各共有峰面积和保留时间的RSD小于5%,说明重现性良好。

	共有峰面积			共有峰保留时间		
	精密性	稳定性	重现性	精密性	稳定性	重现性
1	1.06	0.54	4.74	0.32	0.28	0.23
2	1.70	3.00	1.72	0.26	0.49	0.42
S	2.96	0.76	0.93	0.45	0.52	0.65
3	3.64	0.82	1.18	0.72	0.33	0.38
4	0.28	1.65	1.00	0.35	0.37	0.44
5	0.66	0.66	1.83	0.47	0.57	0.48
6	4.49	3.33	4.47	0.22	0.62	0.39

注: S为参考峰。

2.2 指纹图谱和技术参数

2.2.1 指纹图谱的选择和特征峰的标定。按照中药指纹图谱研究技术^[4]要求,根据11批野生药材供试品HPLC图谱所给出的相关参数,麻花秦艽药材中所有水溶性的药用成

分色谱峰在60 min内全部出现。按照中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A),进行对照指纹图谱的模拟,标准指纹图谱的生成原理为中位矢量法,对各个峰紫外光谱图进行对比分析,找到7个共有峰,选择14 min左右的峰为参考峰^[9],其他特征峰依次标号为1~6(图1)。同时,给出了7个特征峰的紫外光谱图,光谱图显示出峰时间一致物质的UV图也完全一致。根据色谱归一化分析,麻花秦艽药材HPLC指纹图谱的共有特征峰面积总和>90%,符合中药注射剂指纹图谱实验研究技术指南(试行)^[9]的要求。

2.2.2 特征峰相对保留时间、相对峰面积积分比值和相似度分析。根据相似度计算软件,选择相似度接近1或等于1的5号样品图谱作为谱峰匹配模板,对1~11野生麻花秦艽样品谱峰的相对峰面积、相对保留时间和相似度进行计算,采用的原理是夹角余弦法。表3表明,以所有峰的峰面积计算相似度,11个样品的相似度为0.933~0.998,平均相似度

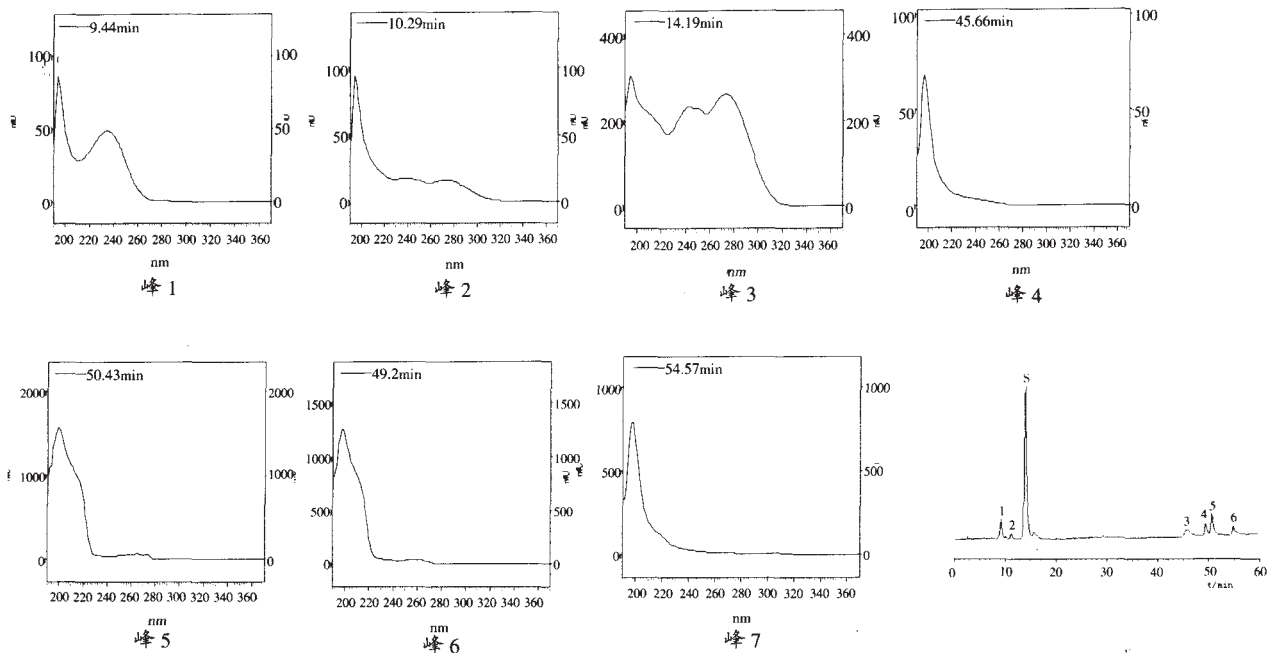


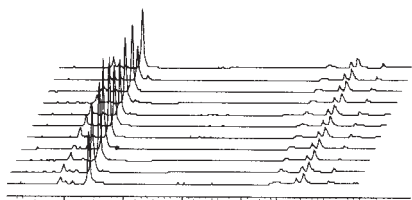
图1 野生麻花秦艽的标准指纹图谱和对应特征峰紫外光谱

表3 野生麻花秦艽样品所有峰、共有峰相对峰面积和相对保留时间的相似度

样品	所有峰的相似度	共有峰相对峰面积								共有峰相对保留时间							
		1	2	S	3	4	5	6	相似度	1	2	S	3	4	5	6	相似度
1	0.965	0.11	0.04	1.00	0.10	0.09	0.22	0.05	0.945	0.66	0.80	1.00	3.25	3.50	3.58	3.89	0.999
2	0.977	0.09	0.03	1.00	0.07	0.06	0.15	0.03	0.938	0.66	0.81	1.00	3.26	3.51	3.59	3.90	0.999
3	0.971	0.11	0.04	1.00	0.08	0.07	0.19	0.05	0.964	0.68	0.81	1.00	3.33	3.58	3.67	3.98	0.998
4	0.980	0.06	0.03	1.00	0.07	0.06	0.15	0.03	0.961	0.66	0.81	1.00	3.32	3.57	3.67	3.97	0.999
5	1.000	0.12	0.03	1.00	0.07	0.06	0.15	0.03	0.961	0.66	0.81	1.00	3.31	3.56	3.64	3.95	0.999
6	0.964	0.15	0.04	1.00	0.12	0.09	0.22	0.06	0.932	0.66	0.81	1.00	3.29	3.55	3.63	3.94	0.999
7	0.969	0.17	0.04	1.00	0.13	0.09	0.22	0.04	0.966	0.66	0.81	1.00	3.29	3.55	3.64	3.94	0.999
8	0.998	0.11	0.04	1.00	0.11	0.07	0.19	0.07	0.983	0.66	0.81	1.00	3.29	3.55	3.63	3.94	0.999
9	0.979	0.09	0.03	1.00	0.10	0.07	0.17	0.04	0.939	0.66	0.81	1.00	3.23	3.49	3.58	3.87	0.999
10	0.933	0.12	0.04	1.00	0.11	0.09	0.19	0.05	0.975	0.66	0.81	1.00	3.22	3.47	3.57	3.85	0.999
11	0.963	0.12	0.04	1.00	0.11	0.08	0.20	0.05	0.980	0.66	0.81	1.00	3.27	3.52	3.61	3.91	0.999

为0.970;以共有峰的相对峰面积计算相似度,11个样品的相似度为0.932~0.983,平均相似度为0.960;以共有峰的相对保留时间计算相似度,11个样品的相似度为0.998~0.999,平均相似度为0.999。同时,对11批药材的色谱分离图进行叠加比较,显示了良好的相似度(图2)。

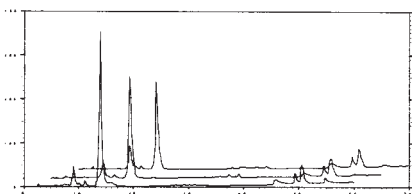
2.3 栽培与野生麻花秦艽的比较 以5号样品谱峰为模板,分别处理2个栽培样品(青海西宁和青海湟中),按色谱条件进样,将所得色谱图用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)进行相似度计算,2个种植药材样品与野生药材样品的相似度分别为0.961和0.932,叠加效果良好(图



注:从下到上依次为样品 1~11。

图 2 野生药材色谱分离叠加

3),同时对 7 个共有峰紫外光谱进行叠加比较,证明种植药材样品与野生药材样品 HPLC/UV 的图谱均有良好的相似度。



注:从下到上为野生、栽培、栽培药材。

图 3 野生与栽培麻花秦艽样品的 HPLC 叠加

3 结论

中药色谱指纹图谱是用于植物药中反映复杂化学成分的有效手段,利用多种检测器,可同时获得化学成分保留信

息和特征光谱,但存在试验条件细微差异下的色谱特征变化。因此,在同一试验条件下,该文首先建立了野生药材麻花秦艽主要药用部位的指纹图谱,并与栽培药材进行了比较,结果显示:野生麻花秦艽药材根部指纹图谱具有良好的稳定性和重现性,特征性和专属性很强。11 批野生麻花秦艽药材样品指纹图谱的平均相似度为 0.970,符合国家药典委员会颁发的中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南的要求。对野生麻花秦艽药材和栽培麻花秦艽药材进行了 HPLC 指纹图谱相似度计算,两者之间有较好的相似度,同时对其共有峰进行了紫外光谱的对比,证明栽培药材与野生药材所反映的化学信息基本一致,为栽培药材替代野生药材入药提供了理论依据。

参考文献

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所.藏药志[M].青海:青海人民出版社,1991:9-11.
- [2] 张恩迪,郑汉臣.中国濒危野生药用动植物资源的保护[M].上海:第二军医大学出版社,2000:28.
- [3] 张西玲,晋玲,刘丽莎.濒危药用植物秦艽的资源利用与保护[J].中药研究与信息,2003,5(9):27-29.
- [4] 刘丽莎,张西玲,候天德.家种和野生秦艽及麻花秦艽的质量对比研究[J].中药材,2002,25(4):231-232.
- [5] 刘丽莎,张西玲,黄晓萍.栽培和野生秦艽及麻花秦艽中龙胆苦苷的含量测定[J].中国中药杂志,2002,27(2):152-153.
- [6] 周玉新.中药指纹图谱研究技术[M].北京:化学工业出版社,2002.

(上接第 2159 页)

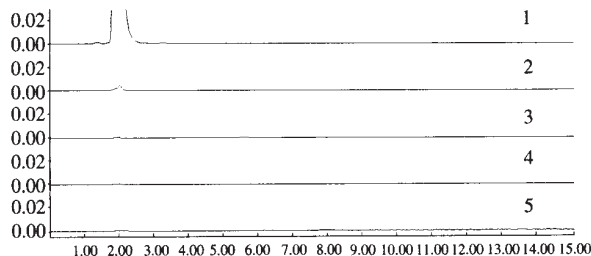
RSD 分别为 1.28%、1.53%、0.78%。

表 3 喹烯酮饲料样品的回收率测定 (n=3)

样品	添加量 mg/kg	平均回收率 %	RSD %
样品 1	40	89.42	1.28
样品 2	80	96.20	1.53
样品 3	200	98.83	0.78

2.5 干扰性试验结果

2.5.1 空白饲料干扰试验结果(图 2)。由图 2 可知,5 个空白饲料样品均未对喹烯酮产生干扰。



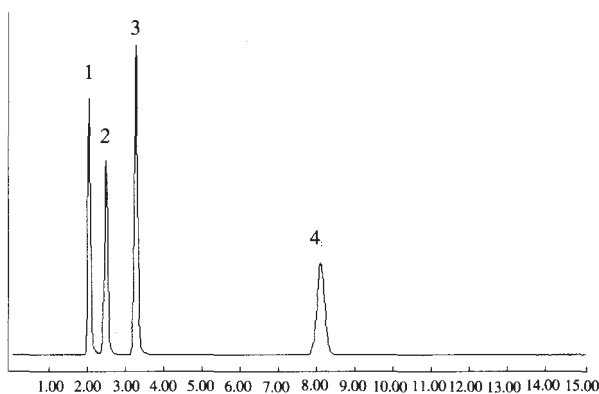
注:1 为仔猪饲料(产地:四川);2 为仔鸡饲料(产地:四川);3 为仔猪饲料(产地:北京);4 为仔鸡饲料(产地:北京);5 为仔鸡饲料(产地:上海)。

图 1 空白饲料色谱

2.5.2 药物干扰试验结果(图 3)。由图 3 可知,卡巴氧、喹乙醇和痢菌净均未对喹烯酮产生干扰。

3 讨论

喹烯酮对光敏感,因此整个试验在光线弱处操作。



注:1 为喹乙酸;2 为卡巴氧;3 为痢菌净;4 为喹烯酮。

图 2 喹烯酮-1,4-二氧化物色谱

样品前处理对饲料样品分析至关重要。在试验过程中分别选用了乙腈、甲醇、醋酸乙酯和氯仿作提取溶剂,结果发现甲醇和醋酸乙酯的空白饲料提取物对喹烯酮有干扰,而氯仿的空白饲料提取物虽对喹烯酮无干扰,但氯仿中的喹烯酮色谱峰的峰型展宽且分裂成双峰。而用乙腈作溶剂提取,喹烯酮色谱峰为尖锐对称峰且饲料提取物对其无干扰。因此确定乙腈为提取溶剂。

参考文献

- [1] 王玉春,赵荣材,严相林,等.喹烯酮对肉用仔鸡的增重试验[J].中兽医医药杂志,1995(3):10-13.
- [2] 徐忠赞,李金善,赵荣材,等.饲料添加新药喹烯酮对仔猪的增重试验[J].中国兽医科技,1995,25(6):37-39.