

四川若尔盖产麻花苳药材 HPLC 指纹图谱研究

李清峰¹, 吴靳荣¹, 赵志礼¹, 尕让甲²

1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 西藏自治区藏医药研究院, 西藏 拉萨 850000

摘要: 目的 建立四川若尔盖地区产麻花苳 *Gentiana straminea* Maxim. 药材 HPLC 指纹图谱。方法 以龙胆苦苳为内参照物, 分析 10 批麻花苳药材的 HPLC 色谱行为, 同时以当地产近缘种黄管秦苳 *Gentiana officinalis* H. Smith 及国家药典品种粗茎秦苳 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 为外类群进行比对。色谱条件: Ultimate XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.02% 乙酸水梯度洗脱; 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 240 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。结果 标定 16 个共有峰, 确定其中 2 个峰的归属, 建立了可与上述 2 个外类群相区别的麻花苳指纹图谱。结论 该图谱基本反映了四川若尔盖地区产麻花苳化学背景特征, 可为道地药材评价及相关中藏药品种鉴定提供基础资料。

关键词: 四川若尔盖; 麻花苳; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 道地药材

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2012.03.019

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-5304(2012)03-0049-03

HPLC Fingerprint of Radix Gentianae Stramineae from Ruergai, Sichuan LI Qing-feng¹, WU Jin-rong¹, ZHAO Zhi-li¹, GA Rang-jia² (1. Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 2. Tibet Institute of Traditional Tibetan Medicine, Lhasa 850000, China)

Abstract: **Objective** To establish HPLC fingerprint of Radix Gentianae stramineae from Ruergai, Sichuan. **Methods** Ten samples of Radix Gentianae stramineae were determined on an Ultimate XB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) eluted with the mobile phase of water containing 0.02% acetic acid and acetonitrile in gradient elution mode, and volume flow was 1 mL/min. The detection wavelength was set at 240 nm and the temperature was 30 °C. Also, a parallel determination of the roots of *Gentiana officinalis* H. Smith and *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. was carried out. **Results** Sixteen common peaks were fixed, two of which were identified and HPLC fingerprint of Radix Gentianae stramineae was established. The fingerprint is differentiated from those of the two other species. **Conclusion** The fingerprint describes the chemical background of Radix Gentianae stramineae from Ruergai, Sichuan, and provides the basic information of evaluation of geoherb and identification of the related species.

Key words: Ruergai, Sichuan; Radix Gentiana straminea; HPLC; fingerprint; geoherb

基金项目: 上海市教育委员会科研创新项目 (09ZZ131)

通信作者: 赵志礼, Tel: 021-51322202, E-mail: zhilzhao@sohu.com

若尔盖县位于四川阿坝藏族羌族自治州北部, 青藏高原东缘地带, 境内药用植物资源丰富, 盛产多种中藏药材, 而麻花苳 *Gentiana straminea* Maxim. 是常见品种之一。我们在实地考察及标本采集中注意到, 该产区还常见形态与麻花苳颇为相

氯甲烷-浓氨试液 (30 : 1) 提取, 三氯甲烷-甲醇-浓氨试液 (20 : 4 : 0.2) 为展开系, 效果理想, 重复性好。显色剂茚三酮试液配好后, 应不超过 24 h, 并且用滤纸过滤。

在供试品溶液制备过程中, 参照文献 [4-5], 对提取溶剂进行了筛选, 分别采用甲醇和流动相 (乙腈 : 水 = 13 : 87) 作为溶媒进行提取。结果发现, 选甲醇作为提取溶媒时, 分离效果好。对提取时间的考察超声处理 5、10、20、30、40 min, 测定结果显示, 20~40 min 含量无明显变化, 表明超声处理 20 min 溶出也达到平衡, 故定为样品处理方法。

参考文献:

- [1] 姚宗玲, 陆洋, 杜守颖, 等. 醒脑静滴鼻液中栀子苷家兔体内药理学研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(14): 1872.
- [2] Choi HJ, Park YS, Kim MG, et al. Isolation and characterization

of the major colorant in Gardenia fruit[J]. Dyes Pigm, 2001, 49(1): 15-20.

- [3] 李保华, 栀子的研究概况[J]. 时珍国医国药, 2008, 15(6): 370.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 231-232.
- [5] 陈阳, 赵璨, 张浩, 等. 栀子黄 OD 值、色价与西红花苷和栀子苷的相关性研究[J]. 食品科技, 2010, 35(5): 262-265.
- [6] Militao GC, Ferreira PM, Freitas RM. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine induced seizures[J]. Neurochem Int, 2010, 56(1): 16-20.
- [7] 陈芳, 董志, 傅亚. 栀子总环稀醚萜苷纯化工艺研究[J]. 激光杂志, 2010, 31(2): 95-96.

(收稿日期: 2011-05-24, 编辑: 陈静)

似的近缘种黄管秦艽 *Gentiana officinalis* H. Smith; 同时, 四川阿坝州还分布有粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 等其他近缘种类^[1]。

中药秦艽为多来源品种, 基源植物除麻花苳 *Gentiana straminea* Maxim. 外, 还包括龙胆科其他 3 种植物: 秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 及小秦艽 *Gentiana dahurica* Fisch.^[2]。但实际情况较为复杂, 一些非国家药典品种在不同地区亦作秦艽药用^[3-4], 同时, 药典部分品种以及近缘种类作为藏药解吉的原植物在我国藏区广泛使用^[5], 品种呈现多样化。

为此, 我们在前期工作基础上^[6-9], 收集 10 批当地产麻花苳及 1 批黄管秦艽样品, 并以黄管秦艽及国家药典品种之一粗茎秦艽为外类群, 拟建立可反映该道地产区化学特征、并具有一定种间鉴别意义的麻花苳药材高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 以期为该地区产麻花苳药材品质评价及相关中藏药品种鉴定提供基础资料。

1 仪器及试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 超声仪(上海之信有限公司)。龙胆苦苷对照品(上海中药标准化中心提供), 马钱苷酸对照品(购自上海同田生物技术有限公司)。乙腈为色谱纯(LEDA), 水为娃哈哈纯净水; 其余试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

2 试验样品来源与凭证标本

所有样品均为自采, 原植物经上海中医药大学赵志礼教授鉴定为麻花苳 *Gentiana straminea* Maxim.、黄管秦艽 *Gentiana officinalis* H. Smith 及粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. (见表 1), 凭证标本保存于上海中医药大学中药学院药用植物标本室。

表 1 样品来源及凭证标本

样品号	原植物	来源	采集日期	凭证标本
1	麻花苳	四川若尔盖县	2010-08-22	杂让甲 2010SC002
2	麻花苳	四川若尔盖县	2010-08-25	杂让甲 2010SC003
3	麻花苳	四川若尔盖县	2010-09-03	杂让甲 2010SC004
4	麻花苳	四川若尔盖县	2010-09-03	杂让甲 2010SC005
5	麻花苳	四川若尔盖县	2010-09-03	杂让甲 2010SC006
6	麻花苳	四川若尔盖县	2010-09-03	杂让甲 2010SC007
7	麻花苳	四川若尔盖县	2010-09-05	杂让甲 2010SC009
8	麻花苳	四川若尔盖县	2010-09-06	杂让甲 2010SC010
9	麻花苳	四川若尔盖县	2010-09-06	杂让甲 2010SC011
10	麻花苳	四川若尔盖县	2010-09-08	杂让甲 2010SC012
11	黄管秦艽	四川若尔盖县	2010-09-05	杂让甲 2010SC008
12	粗茎秦艽	云南玉龙纳西族自治县鲁甸乡	2008-10-31	赵志礼 2008LD09

3 方法与结果

3.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.02%乙酸水(B), A 为 0~20 min(10%~13%), 20~40 min(13%~45%), 40~50 min(45%~90%); 体积流量:

1 mL/min; 检测波长: 240 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μL。

3.2 对照品溶液的制备

分别取龙胆苦苷和马钱苷酸适量, 加甲醇溶解, 制成 0.26、0.16 g/L 的混合对照品溶液, 冷藏备用。

3.3 供试品溶液的制备

取药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置于 25 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称重, 超声处理(功率 120 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出, 冷却后补重, 摇匀, 静置, 取续滤液即得。

3.4 方法学考察

3.4.1 精密度的试验 取 8 号(2010SC010)同一样品供试液连续进样 6 次, 测得各共有峰相对保留时间 RSD<1.0%, 各共有峰相对峰面积 RSD<3.0%。表明仪器精密度高。

3.4.2 稳定性试验 取 8 号(2010SC010)同一供试液, 分别在 0、4、12、24、48 h 测定, 测得各共有峰相对保留时间 RSD<1.0%, 各共有峰相对峰面积 RSD<3.0%。表明供试液在 48 h 内检测是可行的。

3.4.3 重复性试验 取 8 号(2010SC010)同一样品 5 份, 分别制备并测定, 测得各共有峰相对保留时间 RSD<1.0%, 各共有峰相对峰面积 RSD<3.0%。表明该方法重复性良好。

3.5 指纹图谱及技术参数

3.5.1 样品测定 按“3.1”项下色谱条件对 10 批麻花苳供试液及混合对照品溶液分别进行色谱测定; 同时测定外类群 11 号黄管秦艽(2010SC008)及 12 号粗茎秦艽(2008LD09)供试液。

3.5.2 参比峰的选择 在各批次图谱中, 龙胆苦苷色谱峰(6 号峰)分离良好, 峰位居中, 峰面积较大, 且为所有样品共有, 故确定龙胆苦苷为参照物。

3.5.3 指纹图谱的建立 分析 10 批麻花苳样品的色谱行为, 并与外类群相比较, 以参照物龙胆苦苷峰的保留时间计算各指纹峰的相对保留时间, 由此标定出 16 个共有指纹峰, 其中 1 号峰确定为马钱苷酸, 6 号峰为龙胆苦苷(见图 1、图 2), 各指纹峰相对保留时间见表 2, 指纹图谱见图 3。

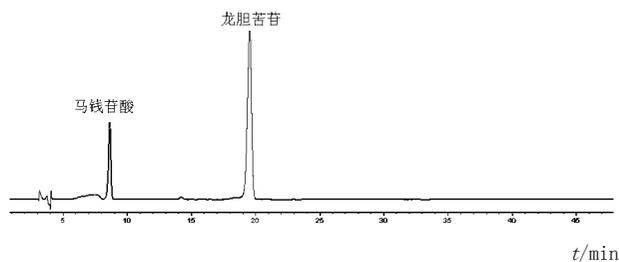


图 1 马钱苷酸及龙胆苦苷混合对照品 HPLC 图

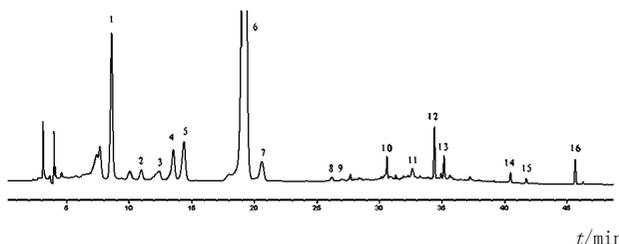


图 2 麻花苳 1 号样品 HPLC 指纹图谱

表2 麻花苳药材指纹图谱共有指纹峰的相对保留时间

批号	1	2	3	4	5	S	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0.446	0.571	0.644	0.702	0.747	1	1.073	1.372	1.415	1.615	1.719	1.812	1.854	2.135	2.203	2.411
2	0.445	0.571	0.644	0.701	0.747	1	1.073	1.372	1.415	1.614	1.719	1.812	1.854	2.134	2.202	2.409
3	0.449	0.572	0.647	0.702	0.748	1	1.073	1.373	1.417	1.616	1.725	1.814	1.857	2.136	2.204	2.413
4	0.447	0.571	0.645	0.701	0.747	1	1.073	1.373	1.418	1.618	1.725	1.815	1.858	2.139	2.207	2.415
5	0.448	0.572	0.646	0.702	0.748	1	1.073	1.374	1.418	1.619	1.726	1.818	1.861	2.141	2.209	2.418
6	0.446	0.571	0.644	0.701	0.747	1	1.073	1.374	1.418	1.619	1.725	1.818	1.861	2.141	2.209	2.418
7	0.447	0.571	0.645	0.701	0.747	1	1.073	1.373	1.416	1.615	1.721	1.813	1.855	2.136	2.204	2.412
8	0.446	0.568	0.644	0.701	0.744	1	1.074	1.369	1.411	1.605	1.708	1.801	1.841	2.121	2.187	2.393
9	0.447	0.571	0.645	0.701	0.747	1	1.074	1.373	1.417	1.616	1.721	1.814	1.855	2.136	2.204	2.413
10	0.448	0.571	0.645	0.702	0.748	1	1.073	1.371	1.414	1.611	1.719	1.809	1.851	2.131	2.199	2.407
RSD(%)	0.251	0.167	0.158	0.094	0.121	0	0.031	0.128	0.164	0.261	0.304	0.281	0.295	0.284	0.287	0.297

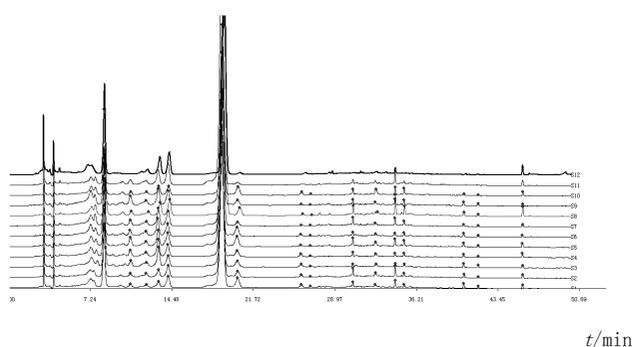


图3 10批麻花苳药材及2个外类群的HPLC指纹图谱

3.5.4 相似度评价 应用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)”对所建指纹图谱进行相似度评价。以8号(2010SC010)样品图谱做为参照图谱,中位数法形成对照指纹图谱,并进行相似度计算(见表3)。

表3 样品相似度评价

批号	相似度	批号	相似度
1	0.997	7	0.999
2	0.997	8	0.995
3	0.998	9	0.998
4	0.997	10	0.998
5	0.998	对照指纹图谱	1
6	0.998		

3.6 外类群比对分析

对10批麻花苳药材样品进行色谱峰匹配并构建指纹图谱时,考虑了11、12号2个外类群的色谱峰异同,初步确定2个鉴别指纹区。

4 讨论

对提取溶剂进行了考察,比较了甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯及水,结果表明,甲醇提取的样品中,色谱峰较多,且峰面积较大,故提取溶剂选择甲醇。考察超声、回流方法及提取时间和提取溶剂量,结果表明,甲醇20 mL超声30 min可提取完全,故确定此法。

考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.02%磷酸水、乙腈-0.02%乙酸水、乙腈-0.02%甲酸水5个溶剂组合,结果以乙腈-0.02%

乙酸水作为流动相系统,基线比较平稳,各峰之间分离度较好。

用DAD检测器进行紫外区全波长扫描,在240 nm处,小极性部位的峰响应较大,故选择240 nm为检测波长。

本研究建立了包括16个共有指纹峰的麻花苳HPLC指纹图谱,10批样品图谱与标准对照图谱的相似度均大于0.99,所建立的指纹图谱基本反映了四川若尔盖地区产麻花苳化学背景特征。通过与外类群比对,初步发现2个区域存在明显差异,可以作为物种间辨识的指纹区:粗茎秦艽不具有10.8 min处共有指纹峰(2号峰);黄管秦艽不具有25.982 min(8号峰)及26.796 min(9号峰)2个共有指纹峰。所建立的指纹图谱具有一定的种间鉴别意义。

下一步将加大外类群种类数及样本量,以评价该指纹区的普适性。在此基础上进行相关化合物的分离与结构鉴定,有望获得可用于相关中藏药品品质评价的指标性成分。

参考文献:

- [1] 杨青山,马宗华,方成武,等.四川松潘县秦艽资源调查及鉴别[J].安徽中医学院学报,2011,30(1):72.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:253.
- [3] 刘丽莎,吴迪,张西玲.黄管秦艽的生药学研究[J].中药材,2008,31(11):1635.
- [4] 赵志礼,苏洁,王峥涛.管花秦艽的生药学研究[J].中草药,2006,37(12):1875.
- [5] 中国科学院西北高原生物研究所.藏药志[M].西宁:青海人民出版社,1991:9.
- [6] 王妍妍,赵志礼,吴新荣,等.粗茎秦艽药材HPLC指纹图谱研究[J].中草药,2009,40(1):120.
- [7] 顾成玉,赵志礼,吴新荣,等.全萼秦艽与长梗秦艽的生药学研究[J].中国中医药信息杂志,2010,17(11):41.
- [8] 吴新荣,赵志礼,孟千万.粗茎秦艽种子生物学研究[J].中国中药杂志,2011,36(5):552.
- [9] Zhao ZL, Gaawe Dorje, Wang ZT. Identification of medicinal plants used as Tibetan traditional medicine Jie-Ji[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 132(1): 122.

(收稿日期:2011-08-29,编辑:华强)