

云南野生抚育粗茎秦艽药材的品质评价

段宝忠^{1,2}, 黄林芳^{1*}, 尚飞能², 曹昌娥², 郑司浩¹

(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;
2. 大理学院药学院, 云南 大理 671000)

[摘要] **目的:**研究野生抚育粗茎秦艽药材的有效成分和化学指纹图谱,以期评价其质量,为粗茎秦艽药材的 GAP 种植提供科学依据。**方法:**采用 Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相甲醇-水,梯度洗脱,流速 1 mL·min⁻¹,检测波长 238 nm,柱温为 25 ℃。利用国家药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 A 版软件,对 15 批 3 年生野生抚育粗茎秦艽药材进行指纹图谱分析。**结果:**15 批粗茎秦艽药材环烯醚萜苷类有效成分及浸出物含量符合 2010 年版《中华人民共和国药典》要求,各样地药材化学指纹图谱相似度 > 0.981,质量均一性好。**结论:**方法具有良好的精密性、重复性、稳定性,可用于粗茎秦艽药材的质量综合评价。野生抚育模式药材可作为粗茎秦艽主要种植发展模式,对云南建设“云药之乡”和发展道地药材具有重要的现实意义。

[关键词] 粗茎秦艽; 野生抚育; 高效液相色谱; 指纹图谱; 品质评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0082-05

[doi] 10.11653/syfy2013210082

Quality Evaluation of Wildlife Tending *Gentiana crassicaulis* in Yunnan Province

DUAN Bao-zhong^{1,2}, HUANG Lin-fang^{1*}, SHANG Fei-neng², CAO Chang-e², ZHENG Si-hao¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** Radix *Gentiana crassicaulis* is the major cultivated *Gentiana* species in Yunnan Province. Wildlife tending is a major cropping pattern. In this study, an improved and comprehensive HPLC fingerprints were developed for the quality evaluation of *G. crassicaulis*, together with the simultaneous determination of four iridoid and secoiridoid glycosides. Loganic acid, swertiamarin, gentiopicroside, sweroside were also detected. **Method:** HPLC separation was performed on an Agilent Zorbax SB C₁₈ column. The mobile phase was methanol and water with linear gradient change of methanol from 0 to 40% in 20 min. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was set at 238 nm. **Result:** The HPLC chromatograms of fifteen samples from different regions of China showed a similar pattern. Thirteen peaks were selected as the characteristic peaks to evaluate the similarities among different *G. crassicaulis* samples. **Conclusion:** This is the first report on an HPLC method for the simultaneous determination of four bioactive components and fingerprint analysis of wildlife tending *G. crassicaulis*. The results indicate that this comprehensive method is suitable for evaluate the quality of *G. crassicaulis* for GAP planting.

[Key words] *Gentiana crassicaulis*; wildlife tending; HPLC; fingerprint; quality evaluation

[收稿日期] 20121213(012)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130069);云南省科技计划项目(2012CG019)

[第一作者] 段宝忠,副教授,从事中药资源与质量控制研究,Tel:13887296403,E-mail:bzduan@126.com

[通讯作者] * 黄林芳,Tel:010-57833197,E-mail:lfhuang@implad.ac.cn

秦艽始载于《神农本草经》,列为中品,已有两千多年的药用历史,是制药生产的重要原料。近年来,秦艽用量增长较快,野生资源逐渐减少,已处于濒危灭绝境地^[1],2010年版《中华人民共和国药典》(一部)收录的4种秦艽基原植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、麻花秦艽 *G. straminea* Maxim.、粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 及小秦艽 *G. dahurica* Fisch.,在1987年就被列为《国家重点保护野生药材物种名录》,保护级别 III 级。其中,粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 主要分布于云南、四川及西藏等地,是云南外销出口的大宗药材之一。近年来,粗茎秦艽在云南快速发展,特别是野生抚育是云南粗茎秦艽的主要发展模式^[2]。对云南栽培的粗茎秦艽质量评价方面已有文献报道^[3],但对野生抚育粗茎秦艽药材的质量评价尚未见文献报道,一定程度上限制了当地中药材产业发展。本文对15批野生抚育粗茎秦艽药材的环烯醚萜苷类有效活性成分及浸出物含量和化学指纹图谱进行研究,以为野生抚育粗茎秦艽药材的品质评价提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂 Agilent 1200 HPLC 系统(Agilent Technologies, USA),包括四元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、恒温柱箱、DAD 检测器、Chemstation 色谱工作站。Agilent Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), KQ-5200DB 型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), GH-252 型电子分析天平(A&D, 1/10 万), DKS-28 型电热恒温水浴锅(嘉兴市中新医疗仪器有限公司), 电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器公司)。色谱级甲醇、乙腈(Fisher Scientific, Fairlawn New Jersey), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

1.2 试药 粗茎秦艽为当地农户撒播在山地上的3年生药材, 2011年8月13至14日采于云南省云龙县、兰坪县和维西县, 详见表1(S5、S6由兰坪恒通农业开发有限公司提供, 采集日期2011年8月1日)。经黄林芳副研究员鉴定为粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 的干燥根, 凭证标本存放于大理学院药学院标本馆。药材水洗后自然阴干, 粉碎前30℃烘干至恒重后粉碎, 过40目筛, 备用。对照品马钱苷酸(批号 MUST-11042501, Loganic acid), 獐牙菜苦苷(批号 MUST-11012401, Swertiamarin), 龙胆苦苷(批号 MUST-11011401, Gentiopicroside) 和獐牙菜苷(批号 MUST-11020802,

Sweroside) 购于成都曼斯特生物科技有限公司, 对照品纯度经 HPLC 峰面积归一化法计算 >98%。

表1 粗茎秦艽样品的来源

No.	采集地	海拔/m	加工方式
S1	维西县永春乡四保村	2 800	阴干
S2	维西县永春乡四保村	2 612	阴干
S3	维西县永春乡庆福村	2 400	阴干
S4	维西县永春乡庆福村	2 541	阴干
S5	兰坪县金顶镇	2 700	烘干
S6	兰坪县金顶镇	2 610	烘干
S7	兰坪县金顶镇干竹河村	2 992	阴干
S8	兰坪县通甸镇河边村	2 314	阴干
S9	兰坪县通甸镇龙潭村	2 803	阴干
S10	兰坪县通甸镇龙潭村	2 865	阴干
S11	兰坪县通甸镇福登村	2 501	阴干
S12	兰坪县河西镇箐花村	2 335	阴干
S13	兰坪县河西镇箐花村	2 450	阴干
S14	兰坪县河西镇箐花村	2 652	阴干
S15	云龙县关坪乡关坪村	2 320	阴干

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax-SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~4 min, 25% A; 4~10 min, 25%~35% A; 10~20 min, 35%~40% A), 检测波长 238 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 进样量 5 μL。

2.2 系统适用性 在 2.1 色谱条件下检测各相邻色谱峰之间的分离度均 >1.5, 拖尾因子在 1.04~1.10, 理论塔板数均 >13 430, 对照品及粗茎秦艽药材样品中 4 个环烯醚萜苷类成分基线分离。

2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取上述对照品适量, 分别加水制成每 1 mL 含马钱苷酸 1.135 mg, 獐牙菜苦苷 0.540 mg, 龙胆苦苷 5.610 mg, 獐牙菜苷 0.645 mg 的溶液, 加甲醇超声溶解, 即得, 分别精密吸取一定量各对照品溶液, 置于 1 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 混合均匀, 得混合对照品储备液, 备用。

2.4 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末 0.5 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加水 15 mL, 混匀, 称重, 60℃ 下超声提取 60 min (200 W, 40 kHz), 取出, 放冷, 补足质量, 摇匀, 过滤, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5 标准曲线与线性关系考察 取含有马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷的混合对照品储备液, 用甲醇稀释得 7 个不同浓度的混标溶液。在上

述色谱条件下进样进 5 μL ,测定各色谱峰峰面积,每个浓度进样 3 次,取平均值。以对照品质量浓度

(X)为横坐标,色谱峰峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果见表 2。

表 2 4 种环烯醚萜苷类成分的线性关系及范围

对照品	线性方程	R^2	线性范围/ μg	LOQ/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	LOD/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
马钱甘酸	$Y = 7\ 109.0X - 10.724$	0.999 9	0.124 1 ~ 5.675 0	12.40	3.72
獐牙菜苦苷	$Y = 6\ 778.7X - 3.942\ 9$	0.999 8	0.059 1 ~ 2.700 0	7.09	3.60
龙胆苦苷	$Y = 3\ 993.1X - 63.738$	0.998 7	0.245 0 ~ 28.050 0	14.70	2.45
獐牙菜苷	$Y = 5\ 792.5X - 10.813$	0.999 9	0.070 6 ~ 3.225 0	8.47	2.11

2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,在上述色谱条件下,连续进样 6 次,每次 5 μL ,记录峰面积。各色谱峰面积的 $\text{RSD} < 0.97\%$,表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一样品 6 份按 2.4 项下方法制备,进样测定。计算 4 个环烯醚萜苷类成分含量,其 $\text{RSD} < 1.34\%$,表明该实验方法重复性良好。

2.8 稳定性试验 取上述供试品溶液分别在 0,4,8,12,18,24,48 h 进行测定,计算含量, RSD 均 $< 1.51\%$,说明各对照品溶液在 48 h 内稳定。

2.9 回收率试验 取已知含量的药材细粉 6 份精密称定,分别精密加入一定量的对照品,按 2.4 项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算回收率,平均回收率在 $99.67\% \sim 100.86\%$, $\text{RSD} \leq 1.60\%$ 。见表 3。

2.10 样品分析 将 15 批样品按 2.4 方法制备供试品溶液,平行操作 3 次,样品及对照品 HPLC 色谱图见图 2。用回归方程计算马钱甘酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷 4 个环烯醚萜苷类成分的含量,测定结果见表 3。从测定的 15 批样品来看,均含有马钱甘酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和獐牙菜苷,4 个成分含量分布呈现一定的规律性,即龙胆苦苷 $>$ 马钱甘酸 $>$ 獐牙菜苦苷 $>$ 獐牙菜苷。15 批药材马钱甘酸和龙胆苦苷总量在 $9.71\% \sim 19.42\%$,平均含量 13.34% ,全部符合要求。

2.11 药材指纹图谱的建立及相似度评价 将所得的 15 批粗茎秦艽药材色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 A 版软件,以 S12 批药材图谱作为参照谱进行指纹匹配,确定了 13 个共有峰,粗茎秦艽特征指纹图谱的共有模式色谱图见图 2,15 批粗茎秦艽药材指纹色谱图见图 3。各样品相似度均 > 0.981 ,见表 4。从分析结果可看出,野生抚育粗茎秦艽药材质量稳定,均一性较好。

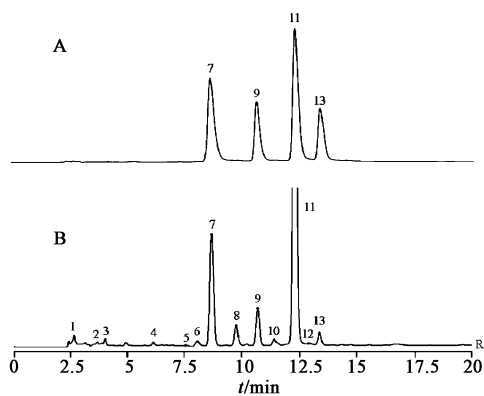
3 讨论

考察了超声和回流提取 2 种方法,二者提取效

表 3 粗茎秦艽药材提取物中 4 个成分加样回收率

成分	取样量 /g	样品中量/mg	加入量 /mg	实测量 /mg	平均回收率/%	RSD /%
马钱甘酸	0.500 1	2.95	2.93	5.87	99.67	1.45
	0.500 0	2.95	2.93	5.87		
	0.500 2	2.95	2.93	5.92		
	0.499 9	2.95	2.93	5.81		
	0.499 8	2.95	2.93	5.94		
獐牙菜苦苷	0.500 2	2.95	2.93	5.88		
	0.5001	2.15	1.98	4.13	100.01	1.10
	0.500 0	2.15	1.98	4.17		
	0.500 0	2.15	1.98	4.11		
	0.499 9	2.15	1.98	4.12		
龙胆苦苷	0.500 0	2.15	1.98	4.13		
	0.500 0	2.15	1.98	4.13		
	0.500 0	46.95	35.93	83.66	100.86	1.02
	0.499 9	46.94	35.93	82.82		
	0.500 1	46.96	35.93	82.79		
獐牙菜苷	0.500 2	46.97	35.93	82.86		
	0.500 0	46.95	35.93	83.37		
	0.500 0	46.95	35.93	82.86		
	0.500 1	0.48	0.46	0.93	100.30	1.60
	0.500 0	0.48	0.46	0.94		
獐牙菜苷	0.500 0	0.48	0.46	0.95		
	0.500 1	0.48	0.46	0.94		
	0.500 2	0.48	0.46	0.95		
	0.499 9	0.48	0.46	0.94		

率相当,超声提取简便易操作,浸提过程中无化学反应,因此选择用超声提取法。在此基础上,考察了氯仿、乙醇、甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、30% 甲醇和 H_2O 作为提取溶剂,比较发现 50% 甲醇提取物的提取效率最高,且色谱峰峰形较好。另外还考察了提取时间、温度和提取液用量,最终确定提取方法为 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下 15 mL 50% 甲醇超声提取 60 min。

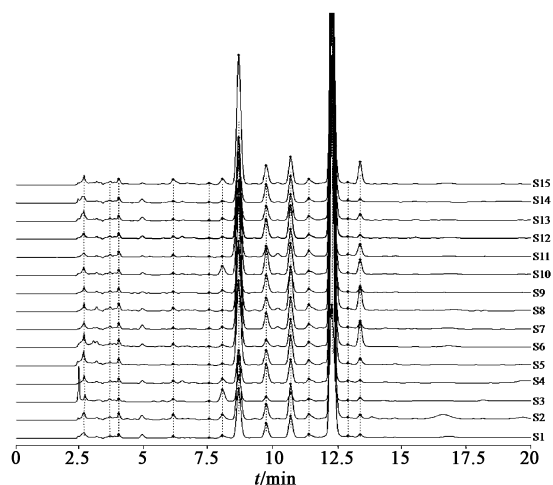


A. 混合对照品;B. 共有模式(R)

7. 马钱苷酸;9. 獐牙菜苦苷;

11. 龙胆苦苷;13. 獐牙菜苷

图2 对照品 HPLC 色谱图及粗茎秦艽药材共有模式图谱



S1 ~ S15 分别代表各批药材(样品来源见表1)

图3 15批粗茎秦艽药材 HPLC 色谱

表4 粗茎秦艽药品样品含量、浸出物测定及相似度

No.	马钱苷酸/%	獐牙菜苦苷/%	龙胆苦苷/%	獐牙菜苷/%	马钱苷酸+龙胆苦苷/%	浸出物含量/%	相似度
S1	2.28	0.50	10.32	0.47	12.60	32.72	0.998
S2	2.26	0.76	17.16	0.52	19.42	35.78	0.995
S3	2.31	0.56	14.04	0.17	16.35	40.79	0.981
S4	1.84	0.50	11.58	0.47	13.42	35.35	0.993
S5	1.50	0.53	10.61	0.18	12.11	33.84	0.999
S6	1.09	0.61	14.34	0.11	15.44	31.92	0.997
S7	1.82	0.47	11.29	0.30	13.11	36.58	0.998
S8	0.59	0.43	9.39	0.10	9.98	31.89	1
S9	0.88	0.40	9.57	0.11	10.45	36.69	0.996
S10	0.84	0.41	8.87	0.10	9.71	34.15	0.995
S11	1.04	0.47	11.93	0.16	12.97	36.94	1
S12	1.78	0.58	12.80	0.10	14.58	28.93	1
S13	1.67	0.47	12.36	0.25	14.03	34.23	0.998
S14	2.38	0.55	12.60	0.33	14.98	36.97	0.996
S15	0.82	0.46	10.19	0.13	11.01	38.11	0.988

环烯醚萜苷类化合物均有显著的紫外吸收,本实验依据所测定的各化合物紫外最大吸收波长,分别考察了 272, 252, 242, 238, 230 nm 波长的样品色谱图,结果表明在 238 nm 处,各对照品有较大吸收,且样品色谱峰峰形良好,兼顾四者选择了 238 nm 作为含量测定波长。

考察了 Zorbax Extend-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 和 SunFire™ C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。实验结果表明 Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 柱出峰较多,且各成分分离良好,同时比较了甲醇和乙腈

洗脱,发现甲醇分离较乙腈分离效果好,因此最终选择了 Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱和甲醇作为流动相洗脱。

云南粗茎秦艽药材根粗大、较长,色黄,品质较西北出产者为佳^[4]。道地药材的形成与其原植物所处环境的土壤、气候、植物群落结构等生态因子都有着密切的联系,植物生态型是道地药材形成的生物学实质之一^[5-6]。实验结果表明,云南野生抚育粗茎秦艽有效成分和浸出物含量均符合《中华人民共和国药典》2010 年版秦艽项下规定;药材化学指纹色谱相似度均 > 0.981,质量均一性好。相比药典

HPLC 同时测定消癌平注射液中 7 种主要成分的含量

谢丽艳¹, 徐洁¹, 戴国梁¹, 居文政^{1,2*}, 谈恒山³

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210009; 2. 南京中医药大学附属医院临床药理科, 南京 210029;
3. 南京军区总医院, 南京 210002)

[摘要] 目的:测定消癌平注射液中绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、香草酸和 4-香豆素的含量。方法:Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.2% 磷酸, 梯度洗脱, 检测波长 300 nm; 柱温 30 ℃, 流速 0.8 mL·min⁻¹。结果:新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、香草酸和 4-香豆酸的线性范围分别为 0.1~3.2 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 3$), 0.025~0.8 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.1~3.2 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 8$), 0.075~2.4 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.037 5~1.2 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.02~0.64 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 0.01~0.32 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 加样回收率分别为 99.6% (RSD 0.24%), 100.0% (RSD 0.15%), 98.7% (RSD 1.00%), 99.1% (RSD 1.36%), 96.4% (RSD 1.37%), 98.3% (RSD 1.80%), 97.3% (RSD 1.64%)。结论:该方法简便, 准确, 重复性好, 可为消癌平注射液提供质量控制依据。

[关键词] 消癌平注射液; 新绿原酸; 原儿茶醛; 绿原酸; 隐绿原酸; 香草酸; 咖啡酸; 4-香酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0086-04

[doi] 10.11653/syfy2013210086

Simultaneous Determination of Seven Major Compound in Xiaoaiping Injection by HPLC

XIE Li-yan¹, XU Jie¹, DAI Guo-liang¹, JU Wen-zheng^{1,2*}, TAN Heng-shan³

[收稿日期] 20130726(015)

[基金项目] 重大新药创制(2012ZX09303009-002); 江苏省中医药领军人才项目(LJ200906); 江苏高校优势学科建设工程项目 2010

[第一作者] 谢丽艳, 硕士研究生, 从事中药学研究, E-mail:xieliyan_2008@163.com

[通讯作者] *居文政, 主任药师, 博士生导师, 从事中药临床药代动力学研究, Tel:025-86617141-80518, E-mail:wzhu333@163.com

收载的另外 3 种秦艽, 粗茎秦艽在产量方面有明显优势^[7], 药效亦较好^[8]。粗茎秦艽野生抚育不仅解决了秦艽商品药材紧缺的情况, 对满足临床应用和成药生产需求, 保护和合理利用濒危药材秦艽野生资源都具有重要意义。云南西北部兰坪县、维西县等地有大面积的荒地, 轮歇地及高山草地, 是粗茎秦艽生长的适宜之地^[9], 在适生区大力发展粗茎秦艽野生抚育种植, 对云南建设“云药之乡”和发展道地药材具有重要的现实意义。

[参考文献]

- [1] 朱俊儒, 宋平顺, 马潇, 等. 甘肃产秦艽植物资源及商品调查[J]. 中药材, 2000, 23(9):521.
- [2] 聂燕琼, 孙娜, 周洋, 等. 粗茎秦艽资源研究进展[J]. 中国现代中药, 2012, 14(5):37.

- [3] 曹晓燕, 王喆之. 云南粗茎秦艽不同采收期 4 种环烯醚萜苷类成分的测定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4):623.
- [4] 曾育麟. 云南的秦艽[J]. 药学通报, 1959, 5(7):340.
- [5] 陈士林, 贾敏如, 王瑀, 等. 川贝母野生抚育之群落生态研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(5):398.
- [6] 陈士林. 道地药材与生态型的相关性[J]. 中草药, 1988(8):40.
- [7] 曹晓燕. 秦艽种质资源研究[D]. 西安:陕西师范大学, 2010.
- [8] 楼之岑. 常用中药材品种整理和质量研究. 北方编写组第 3 册[M]. 北京:北京医科大学出版社, 2003.
- [9] 赵仁. 秦艽栽培技术[M]. 昆明:云南科技出版社, 2009.

[责任编辑 顾雪竹]