

蓝种类,由于云南高原的气候、地理条件独特,形成了几个地区特有种,特有种狭域分布,生境要求较高,野外采集、采收较为困难,同时关于其药理学研究背景尚不清楚,故本实验暂时未作讨论,有待进一步研究。

我国市场上绞股蓝药材来源于野生采摘与人工栽培两条途径。绞股蓝资源开发的初期,以野生采摘、就地取材为主,该属植物在不同地区被广泛采集,由于全草入药,植株往往被连根拔起,对野生绞股蓝属资源造成严重破坏。随着绞股蓝研究的深入与药材市场需求的提高,人工栽培现已成为绞股蓝药材来源的重要途径。我国现拥有多家绞股蓝栽培基地,主要集中于陕西、河南、湖北等地区,通过野生驯化、无性繁殖等技术已实现绞股蓝的人工栽培,栽培品种由广布种绞股蓝向其他种类扩展,同时栽培种皂苷的量不断得到提高。人工栽培为市场提供充足、优质药材来源的同时也保护了有限的野生绞股蓝属资源。

本实验首次将 ISSR-PCR 方法引入绞股蓝属种间鉴定,实验表明,ISSR 技术具有操作简便、多态性高、稳定可靠的特点,引物 UBC873 与 UBC895 均可独立区分 7 种绞股蓝属植物,可用于该属植物的分类鉴定,同时也可对野生种与栽培种进行有效区分。该方法对样品质量要求较低,可以为新鲜或干燥绞股蓝茎叶,但由于市场上的商品绞股蓝大多经历一系列的高温加工处理,制成干品后,DNA 破坏严重,给商品绞股蓝的分子鉴定带来较大难度,寻找商品绞股蓝快速 DNA 提取方法并进行分子鉴定是下一步需要解决的课题。

致谢:本研究得到中国科学院昆明植物研究所陈书坤研究员热心的指导与大力的支持,在吉首大学刘世彪副教授悉心指导下完成样品采集工作,标本由陈书坤研究员与中国西北农林科技大学陈彦生研究员鉴定。

参考文献:

- [1] 陈书坤. 绞股蓝属植物的分类系统和分布 [J]. 植物分类学报, 1995, 33(4): 403-410.
- [2] 陈剑雄, 廖端芳. 绞股蓝总皂苷对氧自由基所致脑血管痉挛的保护作用 [J]. 中草药, 1997, 28(4): 219-221.
- [3] 齐刚, 张莉, 吴光亮, 等. 绞股蓝总皂苷对血管性痴呆大鼠海马一氧化氮合酶及核酸的保护作用 [J]. 中草药, 2003, 34(7): 630-632.
- [4] 蔡太生, 张善峰, 王明臣. 绞股蓝对衰老大鼠的抗氧化作用 [J]. 中国临床康复, 2005, 35(9): 106-107.
- [5] 刘世彪, 林如, 胡正海. 绞股蓝属 5 种植物的茎叶结构和总皂苷含量差异 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2006, 35(5): 495-499.
- [6] 丁树利, 朱兆仪, 李勇. 绞股蓝及同属植物的生药学研究 [J]. 中国药理学杂志, 1994, 29(2): 79-83.
- [7] 刘贤铭, 王铁僧. 绞股蓝及其混滑品种的鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 610-611.
- [8] Zietkiewicz E, Rafalake A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple squencen repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplycation [J]. *Genome*, 1994, 20: 178-183.
- [9] 肖小河, 陈士林, 尹国萍, 等. 四川绞股蓝属的生态分布及资源利用 [J]. 中药材, 1991, 14(3): 16-19.
- [10] 李纯, 孟洁. 安徽省绞股蓝资源调查及质量评价 [J]. 安徽农学通报, 1997, 3(3): 22-24.
- [11] 蒋伟哲, 周燕文, 李锦荣等. 6 种广西产绞股蓝中总黄酮的含量测定 [J]. 中国药房, 2006, 17(1): 74-75.
- [12] 孙航, 陈书坤. 绞股蓝属植物种皮微结构特征及其分类学意义 [J]. 云南植物研究, 1998, 20(3): 309-311.
- [13] 高信芬, 陈书坤, 顾志建, 等. 绞股蓝属的染色体研究 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(3): 312-316.
- [14] 张智, 谢中稳, 李遥. 安徽绞股蓝属植物资源分布及其过氧化物酶同工酶的研究 [J]. 安徽农业大学学报, 1993, 20(4): 372-376.

罗布麻叶 HPLC 指纹图谱构建及在种属鉴别中的应用

韩利文^{1,2}, 侯晋军¹, 赵亮¹, 梁泰刚¹, 李青山^{1*}

(1. 山西医科大学药学院, 山西太原 030001; 2. 山东省科学院生物研究所, 山东济南 250014)

摘要:目的 建立罗布麻叶的 HPLC 指纹图谱,用以控制罗布麻叶的内在质量,并对罗布麻叶药材与其混淆品进行鉴别。方法 采用 HPLC 梯度洗脱的方法建立指纹图谱,“计算机辅助相似度评价系统”软件进行数据处理,据此对不同种属的药材进行比较。结果 建立的罗布麻 HPLC 指纹图谱方法的精密性、稳定性和重现性较好。罗布麻叶(红麻叶) HPLC 指纹图谱共标定 12 个共有指纹峰,与白麻属样品图谱之间呈显著差异,可以依此鉴别。结论

收稿日期:2007-10-01

基金项目:山西省自然科学基金(NO. 20031102);山西省教育厅攻关基金(No. 51250001-2023);山西医科大学大学生创新基金资助项目(NO. 200444)

作者简介:韩利文(1980—),男,山西省原平市人,硕士,研究方向为天然药物质量控制及药物筛选。

Tel: 0531-82605352 E-mail: hanliwen08@yahoo.com.cn

* 通讯作者 李青山 E-mail: qingshanl@yahoo.com

HPLC 指纹图谱可以用作罗布麻叶药材的质量控制。

关键词:罗布麻叶; HPLC; 指纹图谱; 鉴别

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0591-04

Establishment of HPLC fingerprint and its application in identification of *Folium Apocyni Veneti*

HAN Li-wen^{1,2}, HOU Jin-jun¹, ZHAO Liang¹, LIANG Tai-gang¹, LI Qing-shan¹

(1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Institute of Biology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract: Objective To establish chromatographic fingerprint of *Folium Apocyni Veneti* by HPLC and identify *Folium Apocyni Veneti* from its adulterants. **Methods** HPLC Gradient elution was applied to establish the chromatographic fingerprint and "Computer-Aided Similarity Evaluation System" was used in data analyses. **Results** This chromatographic fingerprint method has good precision, stability, and repeatability. Twelve common peaks were marked. There are notable differences in chromatographic fingerprints between *Folium Apocyni Veneti* and its adulterants. **Conclusion** This chromatographic fingerprint method can be used to evaluate the quality of *Folium Apocyni Veneti*.

Key words: *Folium Apocyni Veneti*; HPLC; fingerprint; identification

罗布麻叶为夹竹桃科罗布麻属植物罗布麻 *Apocynum venetum* Linne (别名红麻) 的干燥叶,具有平肝安神、清热利水的功效。民间俗称罗布麻的还有两种植物,为夹竹桃科白麻属大叶白麻 *Poacynum hendersonii* (Hook. f.) Woodson 和白麻 *Poacynum pictum* (Schrenk) Baill.^[1]。2005 年版《中国药典》记载品种罗布麻叶为红麻叶。罗布麻叶在我国作药用和茶饮有悠久的历史,近年来国内外研究发现,罗布麻叶所含药用成分复杂,目前发现有黄酮类、黄烷-3-醇及其取代物、苷类、有机酸类等。近年来一系列研究发现罗布麻叶不仅具有降压、降脂作用,而且具有显著的肝保护^[2]、抗抑郁^[3]、抗糖尿病血管病变^[4]、抗氧化^[5]等功效,引起了国内外研究人员的关注。但是,目前国内罗布麻叶应用混乱,大叶白麻叶和白麻叶混同“罗布麻叶”入药的情况时有发生。为此,本实验对目前市场上流通的罗布麻叶进行调查,对收集样本进行了 HPLC 指纹图谱研究,考察了不同种属和产地之间罗布麻叶的差异,为罗布麻叶的分类学研究、真伪优劣控制等方面提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器:日本岛津 LC10A-VP 高效液相色谱仪;二元梯度泵,在线脱气机,紫外检测器,柱温箱,CLASS-VP 色谱工作站。

1.2 药品与试剂:色谱柱为 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。异槲皮苷 (isoquercitrin) 由山西医科大学药学院药物研究所提供, HPLC 法检测质量分数为 98.3%。罗布麻叶对

照药材购自中国药品生物制品检定所,批号为 0979-200001。罗布麻叶样品来源及产地见表 1,所有样品均由山西医科大学药学院生药学教研室高建平教授鉴定。乙腈(色谱纯,天津科密欧公司),其余试剂均为分析纯。

表 1 样品信息表

Table 1 Information of samples

编号	样品名	产地及来源
L1	罗布麻	山西运城
L2		山西河津(津华药业公司赠送)
L3		山西运城
L4		河北(购自北京京隆堂大药房)
L5		河北(购自北京宏生堂药店)
L6		陕西
L7		陕西(购自太原京都药店)
L8		广东(购自太原天益堂大药房)
L9		吉林(购自北京同仁堂)
L10		对照药材
B1	大叶白	山西运城
B2	麻	山西运城
B3		广西
B4		青海格尔木(亚宝药业公司赠送)
D1	白麻	青海格尔木(亚宝药业公司赠送)
D2		青海格尔木(亚宝药业公司赠送)

2 方法与结果

2.1 色谱条件:以十八烷基键合硅胶为填充剂;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 360 nm;柱温 25 °C;进样量 20 μL。流动相:0.05% 磷酸乙腈溶液(A)-0.05% 磷酸水溶液(B),非线性梯度洗脱,0~45 min A 从 17%~100%,45 min 后为等度洗脱,记录 60 min 的色谱图。

2.2 对照品溶液:精密称取异槲皮苷对照品 2.1 mg

置 50 mL 量瓶中,加 60% 甲醇溶解并定容至刻度,制成含有异槲皮苷 0.042 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液:精密称取罗布麻叶粉末(阴干,粉碎过 60 目筛)0.5 g 置 25 mL 量瓶中,加 60% 甲醇 20 mL,超声 20 min,放冷,加 60% 甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 测定法:分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μ L,注入液相色谱仪,记录 60 min 的色谱图,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验:取样品 L1,按“2.3”项下方法制备供试液,连续进样 5 次,测定指纹图谱。结果表明,各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,RSD% 均小于 3%。

2.5.2 稳定性试验:取样品 L1,按“2.3”项下方法制备供试液,分别在 0、2、4、8、16 h 进样测定指纹图谱。结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积基本无明显变化,RSD% 均小于 3%,说明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.5.3 重现性试验:分别取 L1 药材 5 份,按“2.3”项下方法制备供试液,测定指纹图谱。结果表明,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,RSD% 均小于 5%,符合指纹图谱技术要求。

2.6 指纹图谱及技术参数

2.6.1 罗布麻叶药材 HPLC 指纹图谱特征峰的标定:根据所有罗布麻叶样品指纹图谱的检测结果,利用“中药指纹图谱相似度计算软件(DEMO 版)”,标定 12 个共有指纹峰,结果见图 1 及表 2。其中 3 号峰为对照品异槲皮苷(20.2 min)的色谱峰。

2.6.2 不同产地罗布麻叶的指纹图谱相似度评价:本试验旨在研究不同产地与种属之间的差别,故确定罗布麻叶对照药材为参比指纹图谱,各样品图谱与之比较计算得相似度。采用“中药指纹图谱相似度

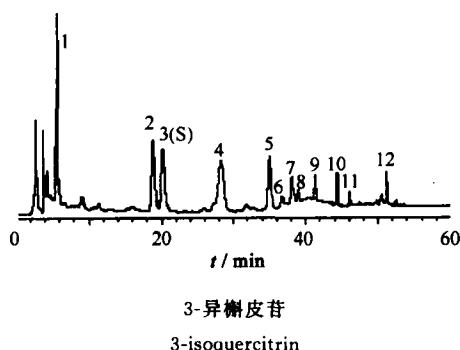


图 1 罗布麻叶 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC Fingerprint of *Folium Apocyni Venetii*

表 2 罗布麻叶指纹图谱特征峰保留时间
Table 2 Retention time of characteristic peaks in fingerprint of *Folium Apocyni Venetii*

峰号	保留时间/min	相对保留时间	峰号	保留时间/min	相对保留时间
1	1	0.25	7	38.1	1.89
2	18.8	0.93	8	39.0	1.93
3	20.2	1.00	9	41.3	2.04
4	28.3	1.40	10	44.4	2.20
5	35.0	1.73	11	46.1	2.28
6	36.8	1.82	12	51.2	2.53

计算软件”对不同产地的罗布麻叶的指纹图谱进行分析,样品 L1~L9 的指纹图谱与对照药材(L10)生成的参比指纹图谱比较见图 2,各样品相似度分别为 0.92、0.94、0.93、0.94、0.97、0.94、0.95、0.92、0.88。从上述结果可以看出,各产地罗布麻叶的指纹图谱主要特征十分相似,软件计算相似度与参比图接近,表明药材随着产地的不同变化较小。

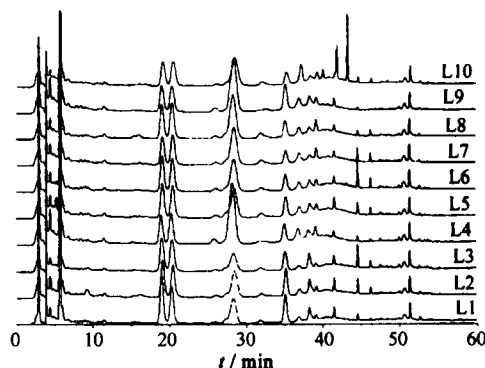


图 2 样品 L1~L10 号的指纹图谱
Fig. 2 Fingerprints of samples L1-L10

2.6.3 HPLC 指纹图谱在种属鉴别中的应用:对收集到的白麻属大叶白麻叶(B1~B4)和白麻叶(D1、D2),按照“2.3”项下分别制备供试液,制备指纹图谱进行分析,结果仍以罗布麻叶对照药材的参比图谱为标准,同时随意选取 3 种罗布麻叶样品 L2、L5、L6 与白麻属样品进行对比,结果见表 3 及图 3。可以看出,与罗布麻相邻属种的白麻属植物与罗布麻叶在 HPLC 指纹图谱中的出峰数目、种类与相似度都呈现了明显的差异。采集到的白麻属相似度在 0.50~0.60,与罗布麻叶的指纹图谱特征有明显的差异,可以据此加以鉴别。

表 3 不同种属罗布麻叶的相似度评价结果

Table 3 Similarities of samples from different species

样品号	相似度	样品号	相似度
L2	0.94	B3	0.56
L5	0.97	B4	0.50
L6	0.94	D1	0.60
B1	0.51	D2	0.55
B2	0.56	L10	1.00

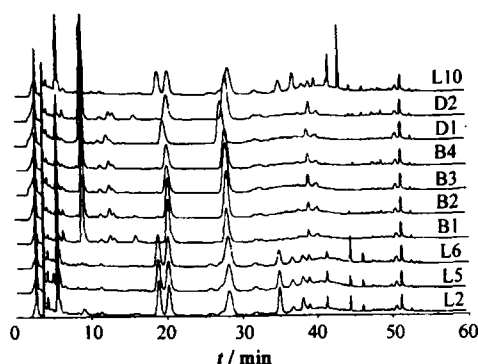


图 3 不同种属样品的指纹图谱

Fig. 3 Fingerprints of samples from different species

3 讨论

3.1 研究表明,罗布麻叶中主要含有黄酮类、黄烷类、有机酸类、香豆素类成分,其中黄酮类成分是罗布麻叶降压、调脂、肝保护、抗氧化等作用的主要有效成分,主要有金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素等。所以,本实验建立的指纹图谱以黄酮类化合物为主要研究对象,以兼顾药材的“特征性”和“有效性”。由于不同种属罗布麻叶中均含有异槲皮苷,且量较高,保留时间居中,故选择异槲皮苷作为参照成分(3号峰)。

3.2 笔者曾比较过甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水(含磷酸)3种体系,结果发现乙腈-水系统的分离效果明显优于甲醇-水系统,加入少量的磷酸有助于改善峰形及进一步改善分离度,故选择乙腈(含0.05%磷酸)-水(含0.05%磷酸)体系。试验发现梯度陡度(即B相的比例随时间的非线性变化情况)也对分离度有重要影响,分别测试梯度陡度为0、2、5、7、9时的指纹图谱比较,发现梯度陡度为9时各色谱峰分离度基本能达到基线分离,故确定梯度陡度为9。

3.3 分析对照药材及样品的指纹图谱中各峰的大小和种属之间的特征峰,共标定12个共有峰。对所有的样品的图谱综合分析可以看出,红麻叶在18~35 min内,出现明显的4重峰(峰2、3、4、5),其中2号峰(18.8 min)与3号峰(20.2 min,异槲皮苷)构成了最明显的双峰,5号峰(35.0 min)也为红麻所独有。而白麻属植物则出现了包括异槲皮苷的特征单峰以及8.9和12.4 min附近的特征峰。已有文献报道红麻叶与大叶白麻中的黄酮成分有差异,本

实验建立的指纹图谱明显可以看出二者的差异,可以据此加以鉴别。另外对照药材的图谱在43.1 min处出现明显的尖峰(槲皮素),而该峰在各样品中信号都很弱,可能是对照药材存放时间久,部分黄酮苷类成分水解所致。

3.4 以对照药材指纹图谱为对照模板,对不同类别的样品进行比较可以看出:两属植物的指纹图谱面貌有明显差异,相似度为0.5~0.6,从整体上分析,罗布麻属出现18~38 min的特征区,白麻属出现8~20 min的特征区域,从而可以容易地把《中国药典》收载品种红麻鉴别出来;来源于不同产地的红麻叶相似度为0.88~1.00,相似性较好,差异主要体现在峰1(5.8 min)和峰(28.3 min)上,其中1号峰的相对峰面积RSD为84.93%,4号峰RSD为64.20%,体现了产地之间的品质差异可能与此二峰有关。白麻属(大叶白麻和白麻)之间从HPLC指纹图谱上未见明显差异,二者在出峰数、出峰时间等方面都非常相似,与文献报道相似^[6]。

3.5 本实验建立了罗布麻叶的HPLC指纹图谱,方法学考察符合要求,科学合理,进而从不同种属和产地的罗布麻叶的差异入手,找出了其他两种混淆品与《中国药典》收载品种的区别点,重现性好,图谱易于辨认,为解决目前市场上的混用问题、进一步规范中药罗布麻叶的质量标准奠定坚实基础。

致谢:山西医科大学药学院生药学教研室高建平教授对样品进行了基源鉴定。

参考文献:

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志第36卷[M]. 北京:科学出版社, 1977.
- [2] Xiong Q, Fan W, Yokozawa T, et al. Hepatoprotective effect of *Apocynum venetum* and its active constituents [J]. *Planta Med*, 2000, 66(2): 127-133.
- [3] Butterweck V, Nishibe S, Sasaki T, et al. Antidepressant effect of *Apocynum venetum* leaves in a forced swimming test [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(7): 848-851.
- [4] Yokozawa T, Nakagawa T. Inhibitory effects of Luobuma tea and its components against glucose-mediated protein damage [J]. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42(6): 975-981.
- [5] Kim D W, Yokozawa T, Hattori M, et al. Inhibitory effects of an aqueous extract of *Apocynum venetum* leaves and its constituents on Cu^{2+} induced oxidative modification of low density lipoprotein [J]. *Phytother Res*, 2000, 14(7): 501-504.
- [6] 戴斌. 大花罗布麻叶的生药鉴定 [J]. *中药材*, 1991, 14(9): 19-23.