

能是两地的生境相似,均为平原湖区,气候单一,自然选择导致适应相同自然环境的基因型保存下来,从而使两地样品具有很高的遗传相似性。另外有少数樟树的样品(Z24~Z27)和丰城的样品聚在一个大支上,说明物种内部不同居群的遗传分化并不很大,不可能像具有很长生殖隔离历史的物种之间那样毫不含糊地区分每一个个体,这也是分子标记分析常用居群的基因频率而非个体作为分析单元的原因。这类问题可通过增加位点数目得到解决。

可见,基于栀子的 ISSR 遗传多态性的聚类分析结果与栀子产区的地理分布比较吻合,这为从分子生物学角度研究栀子的道地性提供了新的启示。可以说药材的道地性不仅仅是一个地理上的概念,同时也具有丰富的遗传特质。而作为现代分子生物学的重要手段,ISSR 分子标记技术对揭示道地药材与非道地药材之间的地理-生态-遗传的差异是一种有效的手段。

#### 参考文献:

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1980.
- [2] 中国药典 [S]. 2005.
- [3] 付小梅, 赖学文, 葛菲, 等. 中药栀子类药材资源调查和商品药材鉴定 [J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(5): 23-25.
- [4] 高增平, 江佩芬, 邬国庆, 等. 栽培栀子与野生栀子化学成分对比研究 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(11): 654-656.
- [5] Shaw P C, Wang J, But P P H. *Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology* [M]. Singapore: World Scientific Publishing, 2002.
- [6] Ash G J, Raman R, Crump N S. An investigation of genetic variation in *Carthamus lanatus* in New South Wales, Australia, using intersimple sequence repeats (ISSR) analysis [J].

- Weed Res*, 2003, 43: 208-213.
- [7] Pradeep R M, Sarla N, Siddiq E A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. *Euphytica*, 2002, 128: 9-17.
- [8] 曹雅男, 李庆章, 孙岳, 等. 正品龙胆遗传多样性的 RAPD 及 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 100-103.
- [9] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 怀区地黄遗传多样性的 ISSR 鉴定 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 257-261.
- [10] 沈颖, 徐程, 万小凤, 等. ISSR-PCR 在石斛种间鉴别中的应用 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 423-427.
- [11] 左云娟, 朱培林, 刘强, 等. 道地药材江枳壳品种遗传学关系的 ISSR 证据 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(18): 1416-1419.
- [12] 李靖, 程舟, 杨晓伶, 等. 人参农家类型遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 257-261.
- [13] 曹进, 徐燕, 张永知, 等. 栀子药材的指纹图谱整体性分析 [J]. 分析化学, 2004, 32(7): 875-879.
- [14] 田智勇, 于培明, 许启泰. 中药栀子的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(11): 782-784.
- [15] Yeh F C, Yang R, Boyle T, et al. *POPGENE, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis: Release 1.31* [M]. Edmonton: University of Alberta, 1999.
- [16] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11.
- [17] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, 1992, 131: 479-491.
- [18] Swofford D L. *PAUP 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony* [M]. Washington: Smithsonian Institution, 2001.
- [19] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76: 5629-5273.
- [20] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150-163.
- [21] 赵祥军, 曹琳, 韩玉梅, 等. 不同产地栀子的质量研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(6): 508.
- [22] 罗群, 马丹炜, 王跃华. 川乌遗传多样性的 ISSR 鉴定 [J]. 中草药, 2006, 37(10): 1554-1557.
- [23] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 怀区地黄遗传多样性的 ISSR 鉴定 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 257-261.

## 粗茎秦艽药材 HPLC 指纹图谱研究

王妍妍<sup>1</sup>, 赵志礼<sup>1\*</sup>, 吴新荣<sup>1</sup>, 王峥涛<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学 生药学教研室, 上海 201203; 2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

**摘要:**目的 建立粗茎秦艽药材的 HPLC 指纹图谱, 为科学评价及有效控制其质量提供可靠方法。方法 以龙胆苦苷为内参照物, 分析 13 批粗茎秦艽药材的 HPLC 色谱行为, 并进行相似度计算, 色谱条件: Ultimate XB-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.05% 磷酸水梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25℃, 检测波长 240 nm。结果 标定了 10 个共有峰, 建立了 HPLC 指纹图谱, 该图谱相关系数均在 0.98~1.0。结论 该方法准确可靠, 重现性好, 可为控制粗茎秦艽药材内在质量提供科学依据。

**关键词:**粗茎秦艽; 指纹图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)01-0120-04

收稿日期: 2008-06-29

基金项目: 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金资助项目 (2006A-14)

作者简介: 王妍妍 (1983—), 女, 硕士, 研究方向为中药质量评价。E-mail: wuyan830406@126.com

\*通讯作者 赵志礼 Tel: (021) 51322202 E-mail: zhilzhao@sohu.com

## HPLC Fingerprint of Radix Gentianae Crassicaulis

WANG Yan-yan<sup>1</sup>, ZHAO Zhi-li<sup>1</sup>, WU Jir-rong<sup>1</sup>, WANG Zheng-tao<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacognosy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract : Objective** To establish HPLC fingerprint of *Radix Gentianae Crassicaulis*. **Methods** The fingerprints were obtained on an Ultimate XB-C<sub>18</sub> column (250 mm ×4.6 mm, 5 μm) with the gradient elution solvent system composed of acetonitrile and 0.05% phosphoric acid. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was maintained at 25 °C, and the detection wavelength was set at 240 nm. **Results**

Ten common peaks were selected as the fingerprint peaks and the fingerprints also were evaluated by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint with the correlation coefficient of 0.98—1.0. **Conclusion** This method with good precision and reproducibility is reliable for the quality control of *Radix Gentianae Crassicaulis*.

**Key words :** *Radix Gentianae Crassicaulis*; fingerprint; HPLC

秦艽临床可用于风湿痹痛、骨节酸痛及小儿疳积发热等病症的治疗。其原植物来源较为复杂,除了 2005 年版《中国药典》<sup>[1]</sup> 记载的秦艽 *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. 4 种外,经实地调查,龙胆科龙胆属秦艽组多种植物的根在不同地区均作秦艽使用<sup>[2,3]</sup>。同时,由于市场需求量大以及过度采挖,秦艽野生资源状况令人担忧。为缓解产销矛盾,各地开展了秦艽药材种植研究,并形成一定规模。目前建立科学的质量评价体系是当务之急。中药指纹图谱是中药品种鉴定、质量评价与控制等方面的有效方法之一,从麻花秦艽 *G. straminea* Maxim. 药材 HPLC 指纹图谱来看,可作为生产过程中药材投料的重要依据<sup>[4]</sup> 或作为麻花秦艽道地药材品质评价的方法之一<sup>[5]</sup>。目前,尚未见到有关粗茎秦艽 HPLC 指纹图谱的研究报道。本研究在秦艽品种鉴定与资源考察的基础上,在同一时期内收集了 10 批云南产粗茎秦艽药材栽培品以及 3 批野生粗茎秦艽药材样品,拟建立其 HPLC 指纹图谱,为秦艽多来源品种的鉴定、粗茎秦艽栽培品的质量评价以及秦艽类药材共有标准图谱的建立提供基础资料。

## 1 实验材料

1.1 仪器: Waters 600 泵, Waters In-Line Degaser AF 在线脱气机, Waters 717 plus Autosampler 自动进样器, Waters 996 Photodiode Array Detector 检测器, Empower Pro 工作站。

1.2 试剂: 乙腈为色谱纯 (LEDA), 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂均为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 试药: 龙胆苦苷对照品 (上海中药标准化研究中心提供, 经 HPLC 分析, 质量分数大于 98%) ; 獐牙菜苦苷对照品 (中国药品生物制品检定所提供, 批号 0785-200203)。

1.4 实验样品与凭证标本: 不同产地粗茎秦艽原植物花期标本与实验样品均为自采, 并经上海中医药大学赵志礼教授鉴定为粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.; 凭证标本存放于上海中医药大学中药学院药用植物标本室。见表 1。

表 1 样品来源及凭证标本

Table 1 Sample sources and vouchers

批号	来源	采集日期	凭证标本	备注
1	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡甸北村	2007-08-07	赵志礼 2007501	栽培
2	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡甸头村	2007-08-07	赵志礼 20075012	栽培
3	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡甸北村	2007-08-08	赵志礼 20075013	栽培
4	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡甸北村	2007-08-08	赵志礼 20075014	栽培
5	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡甸北村	2007-08-08	赵志礼 20075015	栽培
6	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡甸东村	2007-08-08	赵志礼 20075016	栽培
7	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡甸南村	2007-08-08	赵志礼 20075017	栽培
8	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡甸西村	2007-08-08	赵志礼 20075018	栽培
9	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡四兴村	2007-08-08	赵志礼 20075019	栽培
10	云南省玉龙纳西族自治县鲁甸乡甸西村	2007-08-08	赵志礼 20075020	栽培
11	四川省甘孜州道孚县麻孜乡	2007-08-14	王妍妍 20070814	野生
12	四川省甘孜州康定县榆林乡	2007-08-14	赵志礼 2007601	野生
13	云南省丽江玉龙雪山山东侧黑山坡	2007-08-10	赵志礼 2007505	野生

## 2 方法与结果

本实验参考《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行)》中的药材指纹图谱的相关规定而建立<sup>[6]</sup>。

2.1 色谱条件: Ultimate XB-C<sub>18</sub> 柱 (250 mm ×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-0.05% 磷酸水 (B), A 为 0~10 min (5%~13%), 10~25 min (13%), 25~

45 min(13%~45%);体积流量:1 mL/min;检测波长:240 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.2 对照品溶液的制备:取龙胆苦苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成 0.22 mg/mL 的对照品溶液。取獐牙菜苦苷对照品,精密称定,加甲醇溶解,制成 0.89 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取粗茎秦艽药材粉末(过三号筛)约 1.0 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 100 kHz) 30 min,取出,冷却至室温,再称定,用甲醇补足质量,摇匀,静置,取上清液,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.4 测定方法:分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL,注入高效液相色谱仪,记录 45 min 色谱图(图 1、2),即得。在测定的色谱图中,7 号峰为獐牙菜苦苷峰,8 号峰为龙胆苦苷峰。同时,分析 13 批粗茎秦艽药材的 HPLC 色谱行为,确定指纹区与共有峰。供试品色谱中,以参照物龙胆苦苷对应的色谱峰(8 号峰)的相对保留时间为 1,计算各共有指纹峰的相对保留时间。

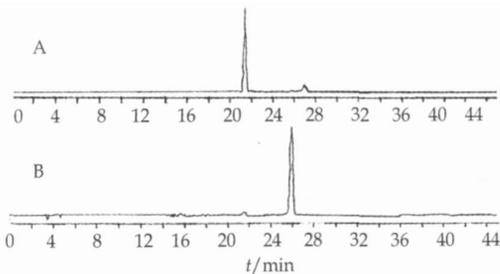
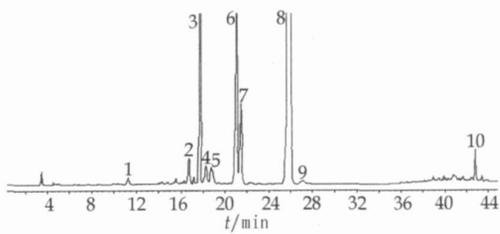


图 1 獐牙菜苦苷(A)和龙胆苦苷(B)对照品色谱图  
Fig. 1 HPLC Chromatogram of swertiamarin (A) and gentiopicroside (B)



7-獐牙菜苦苷 8-龙胆苦苷  
7-swertiamarin 8-gentiopicroside  
图 2 粗茎秦艽样品色谱图  
Fig. 2 HPLC Chromatogram of Radix Gentianae Crassicaulis samples

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验:取同一供试品(2007501)溶液,连续进样 5 次,测得各共有峰相对保留时间,结果 RSD 均小于 1.5%;测得主要峰相对峰面积的 RSD

均小于 3%。

2.5.2 重现性试验:取同一个样品(2007501)5 份,分别按供试品溶液的制备方法制备供试品并测定,测得各共有峰相对保留时间,结果 RSD 均小于 1%;测得主要峰相对峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.5.3 稳定性试验:取同一供试品(2007501)溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 检测,测得各共有峰相对保留时间,结果 RSD 均小于 1%;测得主要峰相对峰面积的 RSD 均小于 3%。

2.6 指纹图谱及技术参数

2.6.1 指纹图谱:按 2.4 项测定 13 批粗茎秦艽药材,根据检测结果,建立粗茎秦艽药材的高效液相色谱指纹图谱(图 3)。指纹图谱中共有指纹峰的相对保留时间的计算结果见表 2。

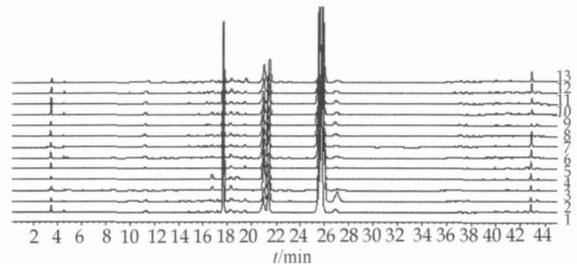


图 3 13 批不同产地粗茎秦艽药材的指纹图谱

Fig. 3 HPLC Fingerprint of 13 batches of Radix Gentianae Crassicaulis from various habitats

表 2 粗茎秦艽药材指纹图谱共有指纹峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks for fingerprint of Radix Gentianae Crassicaulis

批号	各峰相对保留时间									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.440 8	0.651 5	0.687 6	0.711 4	0.730 5	0.816 6	0.833 8	1	1.050 5	1.669 1
2	0.438 0	0.650 5	0.686 9	0.711 1	0.730 5	0.816 9	0.833 3	1	1.050 2	1.670 8
3	0.437 8	0.650 5	0.687 5	0.711 2	0.730 5	0.816 4	0.833 0	1	1.050 0	1.671 3
4	0.439 8	0.644 1	0.688 0	0.711 7	0.731 0	0.817 2	0.834 1	1	1.050 0	1.673 5
5	0.440 4	0.651 9	0.688 0	0.712 4	0.731 7	0.817 9	0.834 1	1	1.049 8	1.673 5
6	0.439 6	0.651 5	0.687 8	0.712 1	0.731 3	0.817 0	0.834 2	1	1.050 0	1.674 6
7	0.438 7	0.650 7	0.687 0	0.710 7	0.730 2	0.816 6	0.833 6	1	1.050 9	1.671 3
8	0.440 2	0.651 8	0.687 3	0.711 9	0.730 8	0.816 7	0.833 4	1	1.049 2	1.670 4
9	0.439 1	0.650 3	0.686 3	0.711 0	0.729 1	0.815 6	0.832 2	1	1.051 0	1.667 4
10	0.437 3	0.649 2	0.685 8	0.710 4	0.730 8	0.815 1	0.831 2	1	1.048 8	1.664 2
11	0.437 4	0.648 3	0.684 9	0.708 7	0.727 3	0.814 1	0.830 2	1	1.050 6	1.661 4
12	0.437 2	0.648 8	0.685 5	0.708 8	0.727 5	0.815 0	0.831 1	1	1.050 2	1.661 7
13	0.438 0	0.643 1	0.684 6	0.709 5	0.727 8	0.814 4	0.830 3	1	1.048 7	1.659 9
RSD/%	0.289 1	0.435 3	0.171 9	0.164 9	0.203 4	0.133 6	0.177 2	0	0.070 4	0.304 9

2.6.2 共有指纹峰的最终确定:采用相对保留时间标定共有指纹峰。在比较分析各色谱图的基础上,用国家药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版 1.0 版,根据 13 个供试品 HPLC 谱给出的相关技术参数,标定中药材的共有指纹峰。进行色谱峰的自动匹配,观察样本图谱的匹配结果,其中 10 个峰是 13 批供试品所共有的,因

此最终确定这 10 个峰为共有指纹峰。

2.7 粗茎秦艽药材 HPLC 指纹图谱的相似度评价:用国家药典委员会颁布的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版 1.0 版,通过中位数对 13 个样品的数据处理,得到各自的相关系数(表 3)。结果显示 13 批样品图谱与标准对照指纹图谱的相关系数均在 0.98~1.0,建立的粗茎秦艽药材的 HPLC 指纹图谱的相似度极高。

表 3 样品相似度评价

Table 3 Similarity of 13 batches of samples

批号	相关系数	批号	相关系数
1	0.998	8	0.999
2	1	9	0.999
3	1	10	1
4	1	11	0.980
5	1	12	0.999
6	0.997	13	0.992
7	1	对照指纹图谱	1

### 3 讨论

3.1 检测波长的选择:采用 PDA 对指纹图谱的检测波长进行了选择,从 190~400 nm 进行紫外扫描,结果表明检测波长为 240 nm,色谱图所包含的信息量大,各色谱峰分离较好。

3.2 流动相的选择:选用了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水、乙腈-0.05%甲酸水、乙腈-0.05%乙酸水、甲醇-0.05%磷酸水、甲醇-0.05%甲酸水、甲醇-0.05%乙酸水、乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.1%乙酸水等体系进行梯度洗脱,结果以乙腈-0.05%磷酸水体系梯度洗脱得到的色谱峰形较好,且较稳定。

3.3 参照峰的选择:粗茎秦艽药材有效成分中龙胆苦苷的量高且相对稳定,因此选其作为参照物。

3.4 供试品提取方法选择:分别考察了乙醇、甲醇、甲醇-水(8:2)、甲醇-水(5:5)、醋酸乙酯、丙酮等不同提取溶剂,超声、回流等不同提取方式,以及提取时间和提取次数,结果表明,以甲醇超声,30 min 一次即可提取完全,因此确定该提取方法。

3.5 13 个不同产地的粗茎秦艽指纹图谱中,主要峰群的整体图貌基本一致,特征峰的相对保留时间 RSD 小于 1%,但特征指纹峰的相对峰面积积分比值有较大差别。由此建立的指纹图谱基本反映了粗茎秦艽药材的内在化学特征。

3.6 从指纹图谱中可以看出,云南产粗茎秦艽药材栽培品的化学成分背景与野生药材十分相近,栽培品的品质良好。

3.7 本试验方法操作简单,干扰小,用于控制粗茎秦艽的质量是切实可行的。

致谢:野外考察与样品采集工作得到中国科学院昆明植物研究所杨立新女士、扬州大学淮虎银教授及上海中医药大学倪梁红老师的大力协助!

#### 参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 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):521-522.
- [3] 赵志礼,苏洁,王峰涛.管花秦艽的生药学研究[J].中草药,2006,37(12):1875-1878.
- [4] 李晓蒙,何新荣.秦艽药材 HPLC 指纹图谱研究[J].中成药,2004,26(1):4-7.
- [5] 张明锦,关启勋,安燕.青海道地药材秦艽 HPLC 指纹图谱研究[J].中草药,2007,38(5):759-761.
- [6] 国家药品监督管理局.中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)[J].中成药,2000,22(10):671-675.

## 回心草药材 HPLC 指纹图谱研究

蔡鹰<sup>1,2</sup>,陆晓和<sup>1</sup>,魏群利<sup>1\*</sup>,陈锐华<sup>1</sup>

(1. 解放军南京军区总医院,江苏南京 210002; 2. 解放军第四五四医院,江苏南京 210002)

**摘要:**目的 建立回心草药材的指纹图谱。方法 采用反相高效液相色谱,色谱条件为:Dikma Platisil ODS C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 A:0.5%醋酸乙腈,B:0.5%醋酸水溶液;洗脱方法:0~50 min,A 为 20%~55%;50~60 min,A 为 55%~95%;60~85 min,A 为 95%~100%,保持 5 min;体积流量 1.0 mL/min,波长 360 nm,柱温:30。运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 版(国家药典委员会)进行分析。结果 构建了回心草药材的指纹图谱。结论 该法准确,重现性好,可作为回心草药材的质控方法。

**关键词:**回心草药材;高效液相色谱法;指纹图谱

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)01-0123-05

收稿日期:2008-04-25

作者简介:蔡鹰(1967—),女,江苏宜兴人,博士后在读,研究方向为中药学。

Tel:(025)80863169 13813914158 E-mail:caiying1967@126.com

\*通讯作者 魏群利 Tel:(025)80865139 E-mail:weiqunli@126.com