

远志质量控制及资源评价研究

房敏峰, 张文娟, 滕红梅, 岳明, 郑晓晖, 赵桂仿*

(西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要:目的 建立远志药材质量控制和资源评价方法。方法 以 18 个不同产地、5 个栽培主产区远志药材及不同商品等级和部位的远志药材为研究对象, 50% 甲醇超声提取, HPLC 梯度检测, 建立远志对照指纹图谱, 峰面积-保留时间曲线分析色谱峰与质量等级之间的关系。并采用欧氏距离法进行峰面积聚类。结果 18 个产地野生远志具有 24 个共有色谱峰, 相似度大于 0.75; 5 个栽培主产区相似度大于 0.95; 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯的量从大到小依次为一级筒、二级筒、三级筒、远志棍、芦头、地上和木心。结论 野生远志受生态环境影响表现出一定差异, 而栽培远志质量比较均一; 远志质量与 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯的量呈良好的正相关, 该成分可作为远志质量评价的指标成分之一。本研究可为远志药材的质量控制和新药源的开发提供参考。

关键词: 远志; 质量控制; 资源评价; 指纹图谱; 指标成分

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)04-0644-05

远志为大宗常用药材, 以野生的或栽培的远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 为主, 分布于西北、华北和东北等地^[1], 已成为国内外中药市场上的热点品种。已有文献报道以远志总皂苷、皂苷元或多糖的量评价远志质量^[2-4], 但皂苷或多糖与远志质量等级的关系并不明确, 也不能解释远志多成分联合起效的特点^[5], 色谱指纹图谱技术为解决上述问题提供了思路^[6]。本研究以 18 个不同产地、5 个栽培主产区远志药材和不同商品等级部位药材为研究对象, 建立远志指标成分与指纹图谱相结合的质量评价模式, 为远志的质量控制和资源评价提供了思路。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10AT. vp 高效液相色谱仪, SPD-10A vp 紫外检测器, Shimadzu CBM-102 色谱工作站; FA2004 万分之一电子天平。

远志对照药材购自中国药品生物制品检定所 (批号: 111572-200301); 本实验所用样品均为实地调查采集或购买, 其中野生样品见表 1; 栽培样品见表 2; 不同等级及部位购于山西平遥县朱坑乡北旺湛村。由西北大学生命科学学院王玛丽副教授鉴定, 远志为远志科植物远志 *P. tenuifolia* Willd. 的干燥根。乙腈为色谱纯, 水为重蒸水。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱 Shimadzu VP-ODS C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈 (A)-0.05 %

磷酸 (B) 梯度洗脱, B 相 0 ~ 10 min 85 %, 10.01 ~ 20 min 80 %, 20.01 ~ 52 min 77 %, 52.01 ~ 57 min 73 %, 57.01 ~ 65 min 68 %, 65.01 ~ 85 min 65 %, 85.01 ~ 120 min 60 %。检测波长: 310 nm。柱温: 25 °C, 体积流量: 1 mL/min。此条件下, 远志对照药材 50 % 甲醇溶液的液相色谱图见图 1。

质谱条件: Waters Quattro Micro API 质谱仪 (美国); 电喷雾离子源 (ESI), 扫描范围: m/z 100 ~ 1 000 amu, 毛细管电压: 3 kV, 锥孔电压: 40 V, 离子源温度: 110 °C, 脱溶剂温度: 350 °C, 脱溶剂气体: 5 000 L/h, 锥孔气: 50 L/h, 自动进样器直接进样, 正离子检测。此条件下, 参比峰的准分子离子峰 m/z : 753.1 $[M + H]^+$, 774.9 $[M + Na]^+$, 参考文献^[7], 推测为 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯。

2.2 供试品溶液的制备: 精密称取已恒重的远志对

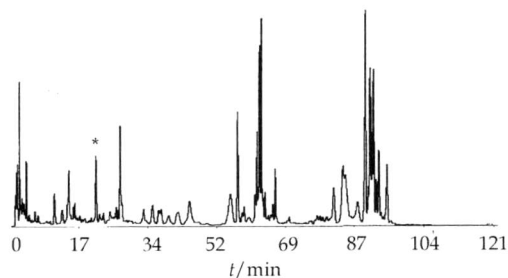


图 1 远志对照药材 HPLC 色谱图 (*: 参比峰, 下同)

Fig. 1 HPLC Chromatogram of Cortex et Radix Polygalae reference substance (*: reference chromatographic peak, followings are same)

* 收稿日期: 2008-06-19

基金项目: 陕西省重大科技专项 (2006ZK10-G3); 陕西省教育厅产业化培育项目 (07JC17)

作者简介: 房敏峰 (1967—), 女, 陕西商州人, 硕士, 副教授, 从事中药炮制与资源研究。Tel: (029) 88302686 E-mail: fff885@126.com

* 通讯作者 赵桂仿 Tel: (029) 88305207 E-mail: gzhao@nwu.edu.cn

照药材及远志药材粉末 (20 目) 约 1.000 0 g, 加 50 % 甲醇 25 mL, 超声 30 min, 滤过, 滤液用 50 % 甲醇定容至 25 mL 量瓶中, 备用。

2.3 测定方法: 分别精密吸取对照药材溶液和 18 批野生远志药材的供试品溶液各 20 μ L, 注入液相色谱仪, 记录 120 min 内的色谱图。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验: 取陕西合阳远志药材 (S1) 粉末, 按 2.2 项方法制备供试液, 分别于 0、2、4、6、8、12 h 检测指纹图谱。结果表明各主要色谱峰的保留时间和峰面积无明显变化, 其 RSD 分别为 0.12 % ~ 2.73 % 和 0.32 % ~ 2.19 %, 符合指纹图谱要求, 样品稳定性良好。

2.4.2 精密度试验: 取陕西合阳远志药材 (S1) 粉末, 按 2.2 项方法制备供试液, 重复进样 5 次, 记录指纹图谱。结果表明各主要色谱峰的保留时间和峰面积无明显变化, 其 RSD 分别为 0.02 % ~ 2.49 %

和 0.24 % ~ 2.05 %, 符合指纹图谱要求, 仪器精密度良好。

2.4.3 重现性试验: 取陕西合阳远志药材 (S1) 粉末 5 份, 按 2.2 项方法制备供试液, 记录指纹图谱。结果表明各主要色谱峰的保留时间和峰面积无明显变化, 其 RSD 分别为 0.40 % ~ 2.49 % 和 0.84 % ~ 2.21 %, 符合指纹图谱要求, 方法重现性良好。

2.5 指纹图谱分析

2.5.1 不同产地野生远志药材的指纹图谱分析: 远志为多年生草本植物, 耐旱、耐寒, 喜生于干燥向阳砂质土壤的田野、路旁及山坡, 分布于东北、华北、西北等地。以陕西、山西、河北、辽宁和山东收购量较大。笔者据此调查了分布区内 10 个省 (自治区) 和 18 个县 (市) 的野生远志资源状况, 采挖全株, 剪取根部, 干燥。样品见表 1。检测结果见图 2-A。采用多点校正法得对照指纹图谱, 见图 2-B。

根据药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相

表 1 野生远志药材样品来源一览表

Table 1 Wild Cortex et Radix Polygalae samples from eighteen habitats

样品	产地	经度/纬度	海拔/m	生态环境	采集时间
S1	陕西 合阳	110 17.459 / 35 07.984 '	575.3 $\pm$ 10.4	田边或荒地草丛	2007-08-23
S2	商州	109 46.536 / 33 53.526 '	836.8 $\pm$ 10.4	田边或荒地草丛	2007-07-22
S3	长安	108 59.401 / 34 01.255 '	705.6 $\pm$ 9.2	灌木林下沙地	2007-08-22
S4	山西 平遥	112 16.035 / 37 12.459 '	826.2 $\pm$ 14.1	田边或荒地草丛	2007-08-20
S5	平顺	113 26.067 / 36 11.514 '	1 134.0 $\pm$ 10.6	田边或荒地草丛	2007-08-25
S6	永济	110 34.000 / 34 50.747 '	604.7 $\pm$ 48.1	枣树林下沙地	2007-08-26
S7	河北 涞源	114 34.693 / 39 20.187 '	957.2 $\pm$ 5.7	向阳荒地草丛	2007-07-26
S8	围场	117 46.497 / 41 56.976 '	1 004.0 $\pm$ 8.3	杏树林下沙地	2007-08-08
S9	河南 卢氏	111 04.241 / 34 05.068 '	674.5 $\pm$ 4.5	向阳荒地草丛	2007-08-28
S10	辉县	113 48.555 / 35 27.277 '	100.0 $\pm$ 5.7	向阳荒地草丛	2007-08-25
S11	内蒙古 呼市	122 09.281 / 41 38.217 '	1 734.0 $\pm$ 9.4	向阳荒地草丛	2007-08-10
S12	包头	110 20.832 / 40 38.704 '	1 452.0 $\pm$ 7.2	阳坡灌木林下	2007-08-15
S13	山东 费县	117 52.764 / 35 10.121 '	248.9 $\pm$ 5.1	向阳土石山	2007-07-23
S14	辽宁 锦州	121 05.704 / 41 12.024 '	108.0 $\pm$ 14.0	向阳荒地草丛	2007-08-11
S15	北票	121 00.068 / 41 37.174 '	166.6 $\pm$ 4.3	田边灌木林下	2007-08-13
S16	黑龙江 肇东	125 45.164 / 46 10.310 '	143.6 $\pm$ 4.7	草甸中呈岛状	2007-07-21
S17	四川 茂县	103 50.101 / 31 41.087 '	1 568.0 $\pm$ 5.3	向阳荒地草丛	2007-07-23
S18	安徽 萧县	116 56.134 / 34 12.236 '	74.5 $\pm$ 4.1	田边或荒地草丛	2007-08-17

似度评价系统 2004A 版”, 通过多点校正法, 计算远志不同产地与共有模式共有色谱峰的相似度, 结果分别为 (S1 ~ S18): 0.807, 0.942, 0.967, 0.860, 0.850, 0.808, 0.796, 0.792, 0.763, 0.884, 0.93, 0.888, 0.906, 0.800, 0.860, 0.832, 0.781, 0.93。相似度数据提示, 各产地共有成分相似度较高; 相邻产区之间共有成分相似度比较接近。

2.5.2 栽培主产区远志药材的指纹图谱分析: 市场上远志药材基本来源于山西、陕西和河北。陕西合阳和山西新绛是国家级远志种植基地, 主要供应远

志肉和远志棍, 二年半或三年生。本研究选择远志主产区用自产种子连续栽培 6 年以上 (含间歇轮作) 的种植点, 采集两年生全株 30 株, 剪取根部, 干燥。样品见表 2, 检测结果见图 3-A, 经多点校正法生成的对照指纹图谱见图 3-B。

采用中位数法, 计算远志不同栽培产区与共有模式的相似度分别为: 陕西合阳 0.985, 山西运城 0.991, 河北安国 0.988, 山西平遥 0.978, 山西新绛 0.985。

2.5.3 远志不同商品等级和部位的指纹图谱分析:

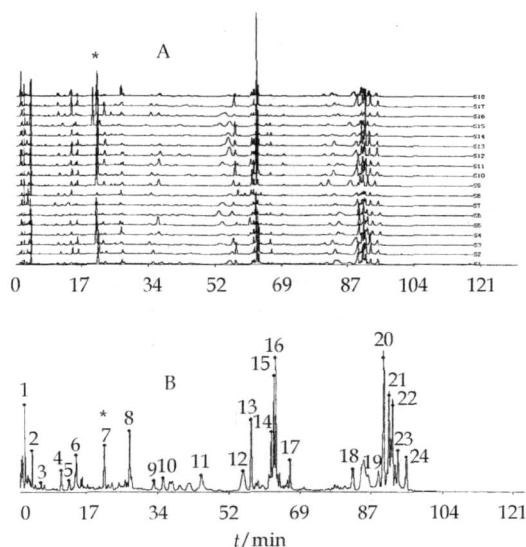


图 2 野生远志药材 HPLC 图 (A) 及对照指纹图谱 (B)

Fig. 2 HPLC Chromatogram of wild Cortex et Radix Polygalae samples (A) and reference fingerprint (B)

将栽培三年生远志挖出后,首先分成地上部分和根(含芦头)两部分,分别干燥。根部阴到半干时,剪取芦头,或抽取芦头和木心,得到芦头、木心、远志棍和远志筒,分别干燥。远志筒按大小分出一级筒($\varnothing \geq 4.5$ cm)、二级筒($\varnothing \geq 3.0$ cm)和三级筒($\varnothing < 3.0$ cm)。检测结果见图 4 A,对照指纹图谱见图 4 B。

采用多点校正法,计算得远志不同等级部位与共有模式的相似度分别为:一级筒 0.887,二级筒 0.841,三级筒 0.819,远志棍 0.800,芦头 0.761,地上 0.212,木心 0.111。远志筒和远志棍作为传统商品规格其相似度较高,而非药用部位木心及地上部分的相似度很低。由于远志市场需求量大,货源不足,芦头作为低档远志已成为远志商品的一部分,从相似度结果来看,是可以接受的。

将所得样品色谱图中峰面积小于 10 000 的色谱峰剔除,按保留时间标准化,以峰面积对保留时间作图,见图 5。

表 2 栽培主产区远志药材样品

Table 2 Cortex et Radix Polygalae samples from main cultivation area

样品	产地	经度/纬度	海拔/m	地貌	轮作作物	采集时间
S1	陕西合阳	110°09.069' / 35°13.008'	698.2 ± 10.4	平原	玉米和大豆	2007-08-24
S2	山西运城	110°55.316' / 35°16.088'	559.3 ± 9.1	平原	玉米和大豆	2007-08-29
S3	山西新绛	111°04.000' / 35°29.157'	564.8 ± 10.4	高原	玉米和大豆	2007-08-26
S4	山西平遥	112°16.035' / 37°12.459'	826.2 ± 14.1	高原	玉米和大豆	2007-08-20
S5	河北安国	115°15.374' / 38°31.866'	33.6 ± 10.4	平原	玉米和大豆	2007-08-18

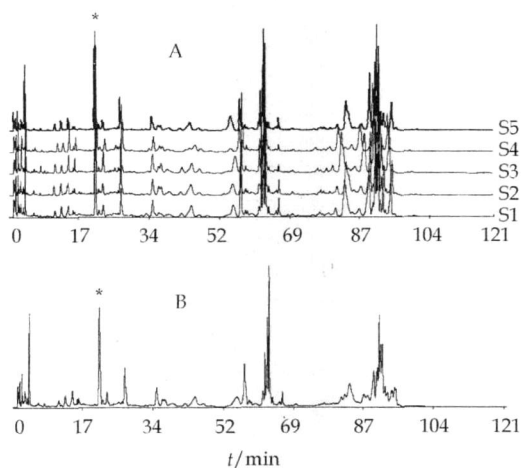
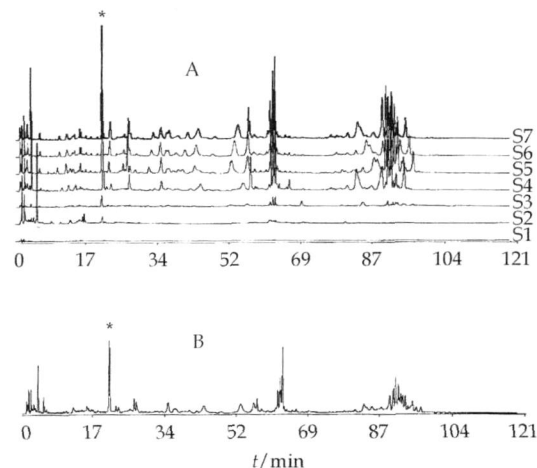


图 3 栽培主产区远志药材 HPLC 图 (A) 及对照指纹图谱 (B)

Fig. 3 HPLC Chromatogram of Cortex et Radix Polygalae samples from main cultivation place (A) and reference fingerprint (B)

图 5 显示,远志筒和远志棍在 0~70 min 比较一致,而在 80~100 min 变化较大。保留时间为 21.473 min 的色谱峰,即 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯的峰面积与质量呈良好的正相关,峰面积从大到小



S1-木心 S2-地上 S3-芦头 S4-远志棍
S5-三级筒 S6-二级筒 S7-一级筒
S1-xylem S2-aerial parts S3-residual part of stem
S4-wand S5-third class S6-second class S7-first class
图 4 远志不同商品等级和部位的 HPLC 色谱图 (A) 及对照指纹图谱 (B)

Fig. 4 HPLC Chromatogram of different parts and commercial grades of Cortex et Radix Polygalae samples (A) and reference fingerprint (B)

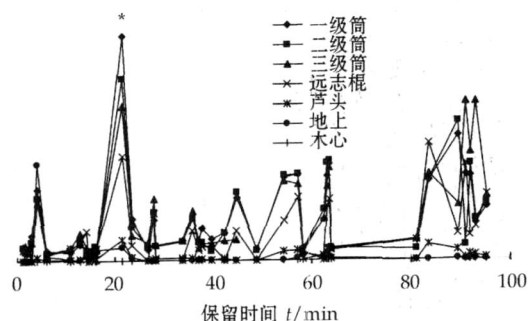


图 5 远志不同部位和商品等级色谱图峰面积对保留时间曲线

Fig. 5 Time curve of different parts and commercial grades of Cortex et Radix Polygalae samples

依次为一级筒、二级筒、三级筒、远志棍、芦头、地上和木心;保留时间为 4.086 min 处,地上部分峰面积明显高于根部;保留时间为 89.596 min 处,色谱峰面积呈现远志棍 > 远志筒 > 芦头,远志筒的 3 个等级几无差异。

2.6 聚类分析

2.6.1 野生远志药材的聚类分析:采用欧氏距离法对野生远志进行峰面积聚类,结果见图 6。18 个产地被聚为两大类,山东费县自成一类,与其他 17 个产地距离较远。在 17 个产地中,陕西、山西、河北和河南 4 个传统道地产区聚为一类,而东北、内蒙及四川等分布区聚为一类。该结果与远志道地产区的起源、迁移及分布现状吻合^[8]。

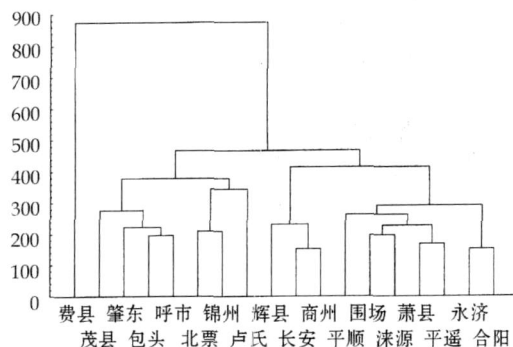


图 6 野生远志聚类图

Fig. 6 Clustering analysis of wild Cortex et Radix Polygalae samples

2.6.2 栽培主产区远志药材的聚类分析结果:远志 5 个栽培主产区的聚类结果见图 7,处于黄土高原的山西新绛和平遥被聚为一类,处于渭北平原和华北平原的陕西合阳、山西运城和河北安国被聚为一类。

2.6.3 远志不同部位及等级的聚类分析结果:对远志不同部位和商品等级进行聚类,结果见图 8。7 类样品被聚为二类,一类为远志筒和远志棍,另一类为

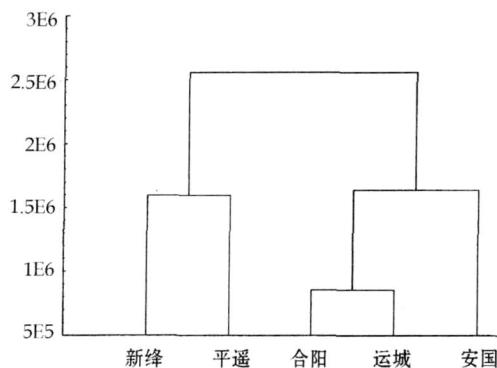


图 7 主产区栽培远志药材的聚类图

Fig. 7 Clustering analysis of Cotex et Radix Polygalae samples from main cultivation area

芦头、地上部分和木心,该结果与传统使用的药用部位一致。

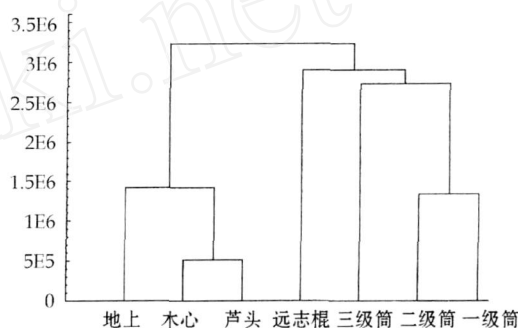


图 8 远志不同部位和商品等级的聚类图

Fig. 8 Clustering analysis of different parts and commercial grades of Cortex et Radix Polygalae

3 讨论

3.1 野生远志药材 18 个产地共有 24 个色谱峰,根据色谱图全貌可划分为 5 个特征指纹区,即 A 区: 0 ~ 10 min; B: 10 ~ 30 min; C: 30 ~ 50 min; D: 50 ~ 80 min; E: 80 ~ 120 min,野生远志的指纹图谱和栽培品特征基本一致。5 个栽培主产区的远志样品共有峰相似度大于 0.95,而野生远志各产地之间相似度相对较低,说明在人工栽培条件下,远志化学成分群的差异较小,质量趋于均一。

3.2 远志不同商品等级和部位色谱图分析结果显示,远志筒和远志棍在糖酯和吡酮成分区 (0 ~ 70 min) 比较一致,而在皂苷类成分区 (80 ~ 120 min) 的变化较大,说明远志质量与皂苷类成分关系密切。这与皂苷是远志的主要活性成分相一致。3,6-二芥子酰基蔗糖酯 ($t_R = 21.473$ min) 的量与远志质量呈良好的正相关,峰面积从大到小依次为一级筒、二级筒、三级筒、远志棍、芦头、地上和木心,该成分为远志不同等级、部位共有峰,量高,易分离和鉴定,适宜作为单指标成分用于评价远志质量。

3.3 芦头目前已作为低档远志被普通使用。聚类分析结果提示,芦头与传统远志商品药材有一定差异,这种差异主要是由于成分量低引起的,而主要成分分析(另文发表)和相似度计算结果则提示芦头可以作为远志使用,但质量较差。

3.4 色谱指纹图谱是目前能够为国内外广泛接受的一种中药质量评价模式。色谱图中所显示的峰数及峰高或峰面积,代表了中药所含主要化学成分的种类及量。通过指纹图谱的特征性,能有效鉴别真伪或产地,通过指纹图谱主要特征峰的面积或比例,能有效控制质量^[9]。在远志有效成分及作用机制尚不明确时,制定指纹图谱用于控制质量,具有重要意义。

参考文献:

[1] 中国药材公司,中国测绘科学研究院编. 中国药材资源地图

集[M]. 北京:科学出版社,1995.

- [2] 李 军,董晓兵,姜 勇,等. HPLC 法测定远志中总皂苷的含量[J]. 药物分析杂志,2007,27(9):1329-1333.
- [3] 杨国红,孙晓飞. 反相高效液相色谱法测定远志中远志皂苷元的含量[J]. 药物分析杂志,2001,21(4):260-263.
- [4] 赵云生,严铸云,李占林,等. 晋产远志品种资源多糖含量测定[J]. 时珍国医国药,2005,16(9):867-868.
- [5] 赵云生,严铸云,李占林,等. 远志属药用植物有效物质群结构特点及其生理活性[J]. 中医药学刊,2005,23(8):1420-1424.
- [6] 范丽芳,张兰桐,景秀娟,等. 河北道地药材远志 HPLC-UV 指纹图谱研究[J]. 中草药,2008,39(4):595-598.
- [7] 姜 勇,张 娜,崔 振,等. 远志药材的 HPLC 指纹图谱[J]. 药学报,2006,41(2):179-183.
- [8] 陈 承,裴宗元,陈师文. 增广太平惠民和剂局方[M]. 海口:海南出版社,2002.
- [9] 蔡宝昌,刘训红. 常用中药材 HPLC 指纹图谱测定技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005.

五柱绞股蓝总皂苷和总黄酮的季节性变化

刘世彪,严四华,鲁 云,郭家平*

(吉首大学 植物保护与利用湖南省高校重点实验室,湖南 吉首 416000)

摘 要:目的 测定五柱绞股蓝茎和叶中的总皂苷和总黄酮的量,并揭示其在不同季节内的动态变化规律。方法以绞股蓝皂苷和芦丁为对照品,采用紫外可见光分光光度计在 550 nm 处测定皂苷吸光度,在 510 nm 处测定黄酮吸光度。结果 五柱绞股蓝茎、叶中的总皂苷和总黄酮的量在 5 月至 11 月的生长发育季节内,均表现为先上升后下降的变化规律,以 9 月的量最高,且叶中的量高于茎中的量。结论 五柱绞股蓝采收可安排在 8~9 月的花果期进行。

关键词:五柱绞股蓝;总皂苷;总黄酮;季节变化

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)04-0648-04

五柱绞股蓝 *Gynostemma pentagynum* Z. P. Wang 是葫芦科绞股蓝属的多年生草质藤本植物,主要分布在我国的湖南、贵州、湖北和重庆交界的武陵山区。五柱绞股蓝在该区表现为常绿习性,与绞股蓝一样,含有绞股蓝总皂苷成分^[1]。绞股蓝总皂苷对人体具有多种生理活性及广泛的临床应用^[2]。黄酮类化合物是绞股蓝含有的又一类药用活性成分,绞股蓝总黄酮对动物心血管系统具有保护作用^[3]。虽然目前有关绞股蓝总黄酮的定量测定已涉及 9 种植物^[4,5],但尚未见关于五柱绞股蓝总黄酮的报道。因此,本实验对五柱绞股蓝茎和叶中的总皂苷和总黄酮的量及其在不同生长发育季节中的动态变化进行了检测,以期为该种植物的基础研究和综

合开发利用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 材料:五柱绞股蓝采自吉首大学生物园,由吉首大学植物教研室陈功锡教授鉴定为五柱绞股蓝 *G. pentagynum* Z. P. Wang。分别于 2007 年 5 月至 11 月的每月中旬采集生长良好的植株地上部分,将茎和叶分开,置于 60 ℃ 烘箱内烘干 24 h 至恒重,粉碎过 10 目筛,保存在封口袋中。

1.2 仪器与试剂:FA—2004 电子分析天平(上海天平仪器厂),KQ—250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),LD25—Z 低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂),752C 型紫外可见光分光光度计,NJL07—S 微波提取仪(上海亚荣生化仪器

* 收稿日期:2008-06-19

基金项目:湖南省教育厅自然科学基金资助项目(08C709);吉首大学博士基金资助项目

作者简介:刘世彪(1965—),男,土家族,湖南保靖县人,副教授,博士,主要从事结构植物学和植物资源学研究。

Tel: 13707430753 E-mail: liushibiao_1@163.com