

不同产地牛蒡种质与药材质量的相关性评价研究

许 亮, 窦德强, 康廷国*, 吕 智, 康 凯, 刘杨楠
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘 要:目的 研究不同产地的牛蒡种质与牛蒡子药材质量的相关性。方法 采用 HPLC 法测定药材中牛蒡苷与苷元的量, 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (线性梯度洗脱: 0 min, 水 55%; 10 min, 水 46%; 20 min, 水 30%); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm。在培养箱中进行牛蒡种子发芽实验, 测定发芽势、发芽率等。并采用 SPSS 13.0 进行相关性分析。结果 牛蒡子的千粒质量、发芽势、发芽率与药材中牛蒡苷量成极显著正相关, 与牛蒡苷元的量成极显著负相关。结论 不同产地牛蒡种质与药材的质量具有显著相关性, 为牛蒡子药材的质量评价提供参考。

关键词:牛蒡子; 牛蒡苷; 牛蒡苷元; HPLC; 种质

中图分类号: R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)04-0656-03

牛蒡 *Arctium lappa* L. 为菊科药用植物, 其干燥成熟果实为牛蒡子, 是一味临床常用中药, 具有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽的功效, 用于治疗风热感冒、咳嗽痰多、麻疹、风疹、咽喉肿痛等^[1]。牛蒡子苷和苷元为主要活性成分, 其药理研究表明具有抗炎及免疫调节、抗病毒、抗肿瘤等作用^[2]。本课题组采集了全国多个产地的牛蒡种质资源及生药材^[3,4], 并对 34 个产地的样品进行了千粒质量、粒数百分比、质量百分比、发芽势、发芽率等评价指标的测定。目前, 对于不同产地牛蒡子中牛蒡苷及苷元的定量分析有少量报道^[5,6]。本实验采用 HPLC 法测定了相应来源牛蒡子药材中牛蒡苷和苷元的量, 并经 SPSS 13.0 进行相关性统计分析, 各指标之间有显著的相关关系。

1 实验材料

不同产地牛蒡均为自采, 经康廷国教授和王冰教授鉴定, 保存于辽宁中医药大学药学院药用植物教研室, 见表 1。

2 实验方法

2.1 千粒质量:千粒质量是评价种子质量的一个重要指标, 随机选取 1 000 粒种子称质量, 重复两次, 求平均质量, 见表 1。

2.2 粒数百分比:随机选取 100 粒牛蒡的种子测定饱满粒数占总粒数的百分比, 重复 2 次, 计算平均值, 结果见表 1。

2.3 质量百分比:随机选取 100 粒牛蒡的种子测定饱满种子质量占总质量的百分数, 重复 2 次, 计算

平均值, 结果见表 1。

2.4 发芽势与发芽率:选取不同产地的牛蒡种子放在经水浸湿的铺有双层滤纸的培养皿中, 用纱布覆盖, 置于培养箱中在 25℃ 下培养, 每天用已经准备好的清水早晚换水。每次培养种子 100 粒, 重复 2 次, 计算平均发芽势与发芽率, 结果见表 1。发芽势是规定第 9 天的测定值, 发芽率是不再有发芽种子出现时进行测定, 大约 15 d 左右。

发芽势 = 规定天数内发芽种子的粒数 / 供试种子数 × 100%

发芽率 = 发芽的种子数 / 供试种子数 × 100%

3 牛蒡苷和苷元的测定

3.1 仪器与试剂:Agilent 1100 高效液相色谱仪; 四元泵; 在线脱气机; 柱温箱; 牛蒡苷对照品 (批号 110819-200505) 购于中国生物制品鉴定所、牛蒡苷元对照品为实验室自制, 经过结构鉴定, 纯度符合要求。

3.2 方法与结果

3.2.1 色谱条件:色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (线性梯度洗脱: 0 min, 水 55%; 10 min, 水 46%; 20 min, 水 30%); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 25℃。理论塔板数不低于 3 000。色谱图见图 1。

3.2.2 对照品溶液的制备与纯度检查:精密称定干燥至恒重的牛蒡苷和苷元对照品, 加甲醇溶解并定

①收稿日期: 2009-07-20

基金项目: 科技部资助项目 (2005DKA21004); 国家“十一五”攻关课题 (2006BAI09B02-6)

作者简介: 许 亮 (1978—), 男, 辽宁沈阳人, 讲师, 博士研究生在读, 主要从事中药生药的教学与科研工作, 主要研究方向: 中药资源研究与新药开发。Tel: (0411) 87586004 E-mail: xul@lnutcm.edu.cn

* 通讯作者 康廷国 Tel: (0411) 87856028 E-mail: kangtg@lnutcm.edu.cn

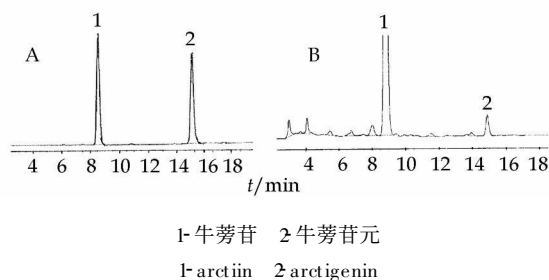


图 1 牛蒡苷与牛蒡苷元对照品 (A) 和牛蒡子样品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of arctiin, arctigenin reference substances (A), and Fructus Arctii (B)

容至刻度, 分别配成 1.149 mg/mL 的牛蒡苷对照品溶液和 0.519 mg/mL 的牛蒡苷元对照品溶液。经峰面积归一化法测定牛蒡苷的质量分数为 99.68% 和牛蒡苷元为 99.01%。

3.2.3 供试品溶液的制备: 将供试品干燥并粉碎, 过 60 目筛, 取粉末 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 45 mL, 在超声波发生器内提取 20 min (150 W, 20 kHz), 取出放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀。经微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得。

3.2.4 线性关系的考察: 精密称定干燥至恒重的牛蒡苷加甲醇溶解并定容, 配成 1.149 mg/mL 的牛蒡苷对照品溶液。精密吸取 4、6、8、10、12、14 μL 分别注入液相色谱仪, 测定牛蒡苷的色谱峰面积, 以进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 得牛蒡苷回归方程为 $Y = 540.83X - 937.02$, $r = 0.9999$, 表明牛蒡苷在 4.596~16.086 μg 线性关系良好。

精密称定干燥至恒重的牛蒡苷元加甲醇溶解并定容, 配成 0.519 mg/mL 的牛蒡苷元对照品溶液。精密吸取 2、4、6、8、10、12 μL 分别注入液相色谱仪, 测定牛蒡苷元的色谱峰面积, 以进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 得回归方程为 $Y = 38.257X - 24.926$, $r = 0.9998$ 。牛蒡苷元在 0.1038~0.6228 μg 线性关系良好。

3.2.5 精密度试验: 在上述色谱条件下对同一供试品溶液连续进样 6 次, 记录牛蒡苷和牛蒡苷元的峰面积, 牛蒡苷峰面积 RSD = 2.17% ($n = 6$); 牛蒡苷元峰面积 RSD = 1.82% ($n = 6$), 精密度良好。

3.2.6 稳定性试验: 在室温条件下, 精密吸取同一供试品溶液, 按样品测定方法在 0、2、4、6、8 h 时间间隔内分别测定牛蒡苷和苷元的峰面积, 牛蒡苷 RSD = 1.72% ($n = 5$), 牛蒡苷元 RSD = 1.70% ($n = 5$)。结果表明, 牛蒡苷和苷元在 8 h 内基本稳定, 符合有关规定。

3.2.7 重现性试验: 按样品测定方法对同一供试样品进行 5 次平行试验, 牛蒡苷质量分数的 RSD = 1.37% ($n = 5$); 牛蒡苷元质量分数的 RSD = 1.19% ($n = 5$)。结果表明, 重现性试验符合有关规定。

3.2.8 加样回收率试验: 精称 6 份已知牛蒡苷和苷元量的供试样品 0.25 g。分别加入等量的牛蒡苷和牛蒡苷元对照品。按样品测定项下方法处理, 计算回收率, 结果牛蒡苷和苷元的平均回收率分别为 97.86% 和 98.33%, RSD 分别为 1.58% 和 1.74%。

3.2.9 样品的测定: 按照供试品溶液的制备方法分别对不同产地的牛蒡子进行制备, 分别取 10 μL 进样。测定牛蒡苷和苷元的色谱峰面积, 计算牛蒡子药材中牛蒡苷和牛蒡苷元的量, RSD 小于 3%, 结果见表 1。

表 1 千粒质量、粒数百分比、质量百分比、发芽势、发芽率及牛蒡子药材中牛蒡苷和苷元的量 ($n = 2$)

Table 1 Weight of 1 000 grains, grains percentage, weight percentage, germination tendency, germination percentage, and arctiin and arctigenin contents in Fructus Arctii ($n = 2$)

	采集地点	千粒质	粒数百	质量百	发芽	发芽	牛蒡	牛蒡苷
		量/g	分比/%	分比/%	势/%	率/%	苷/%	元/%
黑龙江	佳木斯	9.59	0.76	0.82	60.33	77.33	6.99	0.13
	富锦市	8.53	0.54	0.72	66.33	84.00	5.75	0.26
	五常县	10.19	0.61	0.74	73.33	84.67	6.82	0.18
	牡丹江	9.80	0.81	0.87	91.00	92.00	6.82	0.14
	四平	9.97	0.71	0.81	82.67	88.67	7.00	0.32
吉林	梅河口	10.99	0.29	0.88	93.67	94.33	9.22	0.14
	通化	10.38	0.48	0.56	60.33	76.00	7.05	0.51
	抚松	8.47	0.23	0.33	80.00	89.00	6.30	0.38
	桦甸	10.03	0.46	0.49	92.67	95.00	7.60	0.21
	蛟河	9.92	0.29	0.36	82.33	86.67	5.62	0.35
辽宁	延吉	6.97	0.15	0.26	82.00	83.67	5.23	0.64
	本溪县	9.87	0.62	0.69	84.33	92.00	7.63	0.17
	宽甸	7.17	0.34	0.41	66.00	80.00	5.56	0.30
	岫岩	10.51	0.27	0.31	80.00	84.33	8.83	0.14
	铁岭	8.45	0.65	0.79	93.67	95.67	6.56	0.22
浙江	清源	10.62	0.63	0.76	84.67	89.67	6.73	0.25
	北宁	8.88	0.65	0.79	82.33	83.33	6.31	0.27
	建德	9.83	0.74	0.81	68.00	72.67	7.26	0.29
	徐州丰县	10.98	0.71	0.74	85.00	86.00	6.16	0.28
	临沂苍山	9.77	0.61	0.69	76.33	82.00	5.47	0.99
陕西	宝鸡太白	9.34	0.67	0.77	62.33	75.00	6.90	0.37
	安康宁陕	7.97	0.55	0.78	88.67	88.67	6.21	0.55
	定西渭源	9.74	0.79	0.90	98.67	99.00	7.59	0.08
甘肃	天水	5.80	0.16	0.29	22.67	30.00	2.54	0.64
	定西岷县	5.59	0.22	0.45	85.67	88.33	3.61	0.14
	陇南宕昌	8.23	0.52	0.58	88.33	88.67	5.01	0.17
河北	承德兴隆县	6.83	0.04	0.10	81.00	83.00	5.09	0.52
	禹州	7.36	0.25	0.33	21.67	29.00	4.69	1.02
河南	溱川	7.30	0.37	0.45	76.00	84.33	6.02	0.38
	恩施	7.63	0.54	0.62	92.33	93.00	7.70	0.27
湖北	神农架	8.27	0.33	0.35	64.67	71.00	6.51	0.55
	巴东	7.08	0.69	0.83	73.33	76.33	6.91	0.44
四川	雅安	6.40	0.24	0.27	61.00	75.67	4.71	0.26
	松潘	12.80	0.87	0.94	93.00	94.67	6.85	0.15
平均值		8.86	0.49	0.60	76.30	82.17	6.33	0.34

4 SPSS 13.0 相关分析

将以上数据输入 SPSS 13.0 进行相关分析,得到 Pearson Correlation 值见表 2。体现牛蒡种质质量的指标中千粒质量、粒数百分比、质量百分比、发芽势与发芽率与体现牛蒡子药材质量的指标牛蒡苷量、牛蒡苷元量有显著或极显著的相关性,成正相关或负相关。

表 2 各指标间的相关系数 P 值

Table 2 Correlation coefficient P value during various statistical targets

指标名称	千粒质量	粒数百分比	质量百分比	发芽势	发芽率	牛蒡苷	牛蒡苷元
千粒质量	1	.602**	.592**	.396*	.428*	.696**	-.350**
粒数百分比	.602**	1	.907**	.335	.362*	.455**	-.367*
质量百分比	.592**	.907**	1	.398*	.407*	.519**	-.405*
发芽势	.396*	.335	.398*	1	.958**	.511**	-.578**
发芽率	.428*	.362*	.407*	.958**	1	.547**	-.647**
牛蒡苷	.696**	.455**	.519**	.511**	.547**	1	-.461**
牛蒡苷元	-.350**	-.367*	-.405**	-.578**	-.647**	-.461**	1

* 显著相关

* Correlation is significant at 0.05 level (2-tailed)

** 极显著相关

** Correlation is very significant at 0.01 level (2-tailed)

5 结论与讨论

测定了 34 个不同采集地的 7 个指标,千粒质量平均值为 8.86 g,牛蒡苷量平均值为 6.33%,其中体现种质质量的指标千粒质量、粒数百分比、质量

百分比、发芽势、发芽率与牛蒡子药材的评价指标牛蒡苷的量成正相关。千粒质量、粒数百分比和质量百分比 3 者之间成极显著正相关,这 3 者指标越高说明牛蒡种子越成熟饱满、粒大,牛蒡苷是牛蒡子药材的检测评价指标,《中国药典》2005 年版规定不低于 5%,这 3 者指标越高牛蒡苷量越高,说明了牛蒡子药材的质量、成熟饱满的种子所占的数量比、质量比越高牛蒡苷的量也越高。这与传统牛蒡子药材质量评价以粒大、饱满者为佳相一致。发芽势和发芽率是评价种质质量、种子成熟饱满度、生长力的指标,与牛蒡苷量成极显著正相关。牛蒡子药材中的牛蒡苷量和苷元量成极显著负相关,说明药材中牛蒡苷的量越高牛蒡苷元的量越低,这也为牛蒡子药材的质量评价提供参考。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005
[2] 王 璐,赵 烽,刘 珂.牛蒡子苷及牛蒡子苷元的药理作用研究进展[J].中草药,2008,39(3):467-470
[3] 许 亮,吕 智,刘 森,等.中国牛蒡种质资源植物被调查与采集[J].现代中药研究与实践,2008,22(6):22-24
[4] 许 亮,窦德强,王 冰,等.中国牛蒡属染色体分析[J].中药材,2009,32(3):337-339
[5] 王 劲,沙 明,杨洪武,等.HPLC 法对不同地区商品牛蒡子中牛蒡苷元的定量分析[J].中草药,2003,34(5):467-468
[6] 张 涛.牛蒡子不同炮制品中牛蒡苷含量的 HPLC 测定[J].中草药,2004,35(4):406-407

HPLC 法测定市售胡黄连中胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II

周 菲¹,倪 健²

(1 中国医药研究开发中心有限公司,北京 102206; 2 北京中医药大学,北京 100029)

摘要:目的 建立胡黄连药材中胡黄连苷 I 和胡黄连苷 II 的 HPLC 定量测定方法。方法 采用 Dikma Diamon-sil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm),乙腈-水-冰醋酸 (20: 80: 0.5) 为流动相,体积流量:1.0 mL/min,检测波长:275 nm,柱温:25 ℃。结果 胡黄连苷 I 对照品在 0.09~1.88 μg 进样量与峰面积间呈良好的线性关系, $r=0.9998$,平均加样回收率为 99.2%,RSD 为 1.50% ($n=6$);胡黄连苷 II 对照品在 0.16~3.2 μg 进样量与峰面积间呈良好的线性关系, $r=0.9999$,平均加样回收率为 98.9%,RSD 为 1.81% ($n=6$)。结论 该方法操作简便,结果准确,重现性好,可用于胡黄连药材的定量测定。

关键词:胡黄连; 胡黄连苷 I; 胡黄连苷 II; 高效液相色谱

中图分类号:R282.6 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)04-0658-03

胡黄连味苦,性寒。归肝、胃、大肠经。有清湿热,除骨蒸,消痞热之功效,用于治疗湿热泻痢,黄

疸,痔疾,骨蒸潮热,小儿疳热。现代药理表明,胡黄连具有保肝利胆,拮抗平滑肌痉挛等作用^[1]。目前

①收稿日期: 2009-07-22

基金项目: 北京市科技计划项目 (课题编号: D07080201330705, 项目编号: D0206001000091)

作者简介: 周 菲 (1981-), 女, 江苏徐州人, 工程师, 从事中药新药研究开发工作。Tel: (010) 80717086 E-mail: niphz@126.com