

宁夏栽培秦艽与野生秦艽有效成分的比较

王霞英, 王旭鹏, 马月琴, 杨天寿, 张文懿, 张学良*

(宁夏固原市药品检验所, 宁夏固原 756000)

[摘要] **目的:**通过对宁夏栽培秦艽不同品种与野生秦艽有效成分的比较,评价宁夏栽培秦艽的质量。**方法:**采用《中国药典》2010 年版一部方法测量龙胆苦苷和马钱苷酸的含量;采用全自动氨基酸分析仪测定其氨基酸的含量;采用蒽酮-硫酸法测定其多糖的含量。**结果:**宁夏栽培的 3 种秦艽龙胆苦苷、马钱苷酸的含量都高于《中国药典》规定的限度;与野生秦艽相比,所含氨基酸的含量有显著性差异;多糖的含量无显著性差异。**结论:**宁夏栽培的 3 种秦艽品质良好,对于秦艽氨基酸和多糖的药用价值,可以进一步的研究开发和利用。

[关键词] 栽培秦艽; 野生秦艽; 有效成分; 比较研究

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)09-0100-04

[doi] 10.11653/syfy2013090100

Comparative of Effective Components from Cultivated and Wild *Gentiana macrophylla* in Ningxia Province

WANG Xia-ying, WANG Xu-peng, MA Yue-qin, YANG Tian-shou, ZHANG Wen-yi, ZHANG Xue-liang*

(Ningxia Guyuan City Institute for Drug Control, Guyuan 756000, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the quality of cultivated *Gentiana* in Ningxia Province by the comparative study of effective components in different varieties and wild *Gentiana*. **Method:** The content of gentiopicroside and loganin acid was determined according to the method listed in 2010 version of Chinese Pharmacopoeia. The amino acid content was determined by automatic amino acid analyzer, and the content of polysaccharide was determined by anthrone-sulfuric acid method. **Result:** The content of gentiopicroside and loganin acid in three varieties of *Gentiana* cultivated in Ningxia was higher than prescribed limits in Chinese Pharmacopoeia, and there were no significant differences in amino acid content, and there were significant differences in the content of polysaccharides compared with wild *Gentiana*. **Conclusion:** The quality of three kinds of *Gentiana macrophylla* cultivated in Ningxia is good. The medicinal value of amino acids and polysaccharides in *Gentiana macrophylla* can be further researched and utilized.

[Key words] planting *Gentiana*; wild *Gentiana macrophylla*; effective component; comparative study

秦艽味苦、辛、性微寒,具有祛风湿,止痹痛作

用,中医多用治痹证。研究发现,秦艽具有抗炎、镇痛、抗过敏等作用,临床常用于治疗风湿及类风湿性关节炎^[1]。主要分布于我国东北、华北、西北及西南等省^[2]。《中国药典》2010 年版收载秦艽为秦艽、麻花秦艽、粗茎秦艽和小秦艽的干燥根^[3]。宁夏六盘山区产 3 种秦艽即秦艽、麻花艽和小秦艽^[4]。野生秦艽由于过度采挖,致使临近濒危状态,被列为《国家重点保护野生药材物种名录》^[5-6]。因此,从 2000 年开始,宁夏六盘山地区开始引种栽培,变野生为家种,提供药用^[7]。

[收稿日期] 20121010(014)

[基金项目] 宁夏“十一五”科技攻关项目(宁科计字 200674 号)

[第一作者] 王霞英,副主任药师,从事药品检验及宁夏六盘山地产药材质量分析研究, Tel: 18095411382, E-mail: zhangxl2041170@163.com

[通讯作者] * 张学良,副主任药师,从事药品检验及宁夏六盘山地产药材质量分析研究, Tel: 18095411356, E-mail: zhangxl2041170@163.com

根据国内外文献报道:秦艽主要含有裂环烯醚萜苷类、生物碱、甾醇苷类、糖类等^[8-9]。目前,对于秦艽的研究主要集中在其化学成分以及化学成分的分析利用上。氨基酸和多糖类化合物是许多天然药物的有效成分,是中药发挥独特疗效的基础之一,在生物体内发挥着重要的生理生化作用,同时也是许多药药用价值的评价标准之一^[10]。为保证栽培质量及资源的开发利用,探讨秦艽的其他药用价值,本文对野生秦艽和宁夏不同品种栽培秦艽龙胆苦苷、马钱苷酸、氨基酸及糖类的含量进行分析测定,为进一步的规范化种植和该药材的深度开发及功效探讨提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 仪器 WaterS(600E)型高效液相色谱仪,二极管阵列检测器(WaterS2996型)、Empower色谱工作站;Phenomen C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);中草药粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司)。德国 SykamS-433D型氨基酸全自动分析仪, LCA K06Na 阳离子交换色谱柱(4.6 mm × 150 mm);流动相为 pH 3.45, pH 10.85 的缓冲液;检测器为集成双波长光度计(570, 440 nm);茚三酮试剂流速 0.25 mL·min⁻¹,柱温 58 ~ 74 °C,分析周期 56 min,其他条件按仪器本身设定值。

AG-135 型电子天平(梅特勒-多利多上海有限公司),TU-1901 型紫外分光光度计(北京普析通用有限责任公司),KQ-250B 型超声波清洗器(江苏金坛市宏凯仪器厂),DGX-9143B-1 型电热鼓风干燥箱(杭州汇尔仪器设备有限公司),TDL-40B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试药 龙胆苦苷对照品(批号 201013,含量 > 99%,中国药品生物制品检定所);马钱苷酸对照品(批号 22255-409,成都普斯生物科技有限公司);葡萄糖对照品(含量 > 99%,分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心),乙腈为色谱纯,乙酸、石油醚、无水乙醇、95%乙醇、蒽酮、硫酸、盐酸均为分析纯。

野生秦艽的根部于 2010 年 8 月采自宁夏固原六盘山(生长年限不详),3 年生栽培秦艽、麻花苳和小秦艽的根部于 2010 年 8 月均采自宁夏隆德沙塘种苗园。

2 方法与结果

2.1 栽培秦艽与野生秦艽中龙胆苦苷和马钱苷酸的含量测定 按照《中国药典》2010 年版秦艽的含量测定方法测定^[3]。

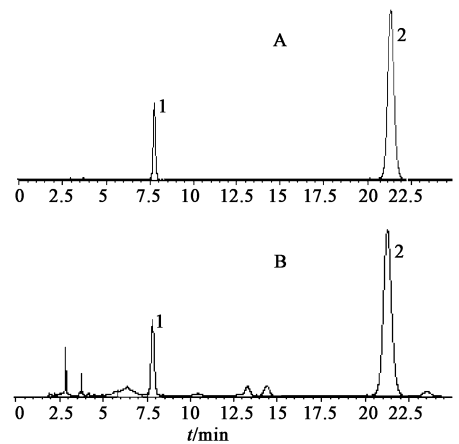
2.1.1 色谱条件 以十八烷基硅烷键合硅胶为填

充剂,以乙腈-0.1% 醋酸溶液(9:91)为流动相;检测波长 254 nm。理论板数按龙胆苦苷峰计算不低于 3 000。

2.1.2 对照品溶液的制备 取龙胆苦苷对照品、马钱苷酸对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成每 1 mL 含龙胆苦苷 0.5 mg、马钱苷酸 0.3 mg 的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末(过 3 号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz) 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 测定法 分别精密吸取两种对照品溶液与供试品溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定即得。色谱图见图 1,测定结果见表 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 马钱苷酸 2. 龙胆苦苷

图 1 秦艽 HPLC

由表 1 可以看出:宁夏栽培的 3 个品种秦艽与野生秦艽相比,麻花苳、小秦艽龙胆苦苷的含量都大于野生秦艽,秦艽稍低于野生秦艽;秦艽和小秦艽所含马钱苷酸的含量略大于野生秦艽,麻花苳中马前甘酸的含量稍低于野生秦艽。宁夏栽培的 3 个品种秦艽中所含龙胆苦苷和马钱苷酸的含量总量比《中国药典》2010 年版规定的限量(2.5%)高出 5 ~ 6 倍。

表 1 各品种秦艽中龙胆苦苷和马钱苷酸的含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	龙胆苦苷/%	马钱苷酸/%
野生秦艽	9.12 ± 0.5	4.51 ± 0.2
秦艽	8.26 ± 0.6	4.62 ± 0.4
麻花苳	9.16 ± 0.2	4.05 ± 0.8
小秦艽	10.14 ± 0.6	4.55 ± 0.3

2.2 氨基酸的测定 采用常规酸水解法测定不同品种秦艽中氨基酸的含量,在 110 ℃,浓度为 6 mol·

L⁻¹ 的盐酸作用下水解,再经离子交换色谱法分离并以茚三酮做柱后衍生测定。结果见表 2。

表 2 各品种秦艽中氨基酸的含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	野生秦艽	秦艽	麻花苻	小秦苻
精氨酸	1.504 ± 0.056	2.512 ± 0.035	1.497 ± 0.023	1.503 ± 0.062
天冬氨酸	5.212 ± 0.796	4.976 ± 0.523	4.966 ± 0.304	5.216 ± 0.256
丝氨酸	1.918 ± 0.046	1.617 ± 0.013	1.025 ± 0.051	1.102 ± 0.048
苏氨酸	0.456 ± 0.058	0.472 ± 0.012	0.505 ± 0.036	0.526 ± 0.029
谷氨酸	1.278 ± 0.078	2.342 ± 0.030	1.265 ± 0.039	1.135 ± 0.017
甘氨酸	0.532 ± 0.055	0.408 ± 0.063	0.576 ± 0.102	0.581 ± 0.056
半胱氨酸	0.217 ± 0.012	0.231 ± 0.023	0.214 ± 0.008	0.203 ± 0.031
缬氨酸	0.712 ± 0.112	0.689 ± 0.078	0.383 ± 0.021	0.719 ± 0.046
蛋氨酸	0.682 ± 0.011	0.698 ± 0.008	0.553 ± 0.023	0.684 ± 0.016
异亮氨酸	1.011 ± 0.063	1.023 ± 0.024	1.232 ± 0.036	1.214 ± 0.013
亮氨酸	0.018 ± 0.008	0.015 ± 0.003	0.026 ± 0.004	0.019 ± 0.002
四氨基丁酸	0.207 ± 0.067	0.353 ± 0.031	0.256 ± 0.024	0.587 ± 0.035
丙氨酸	0.831 ± 0.098	0.901 ± 0.065	1.102 ± 0.101	1.104 ± 0.076
脯氨酸	3.296 ± 0.136	4.105 ± 0.112	3.402 ± 0.087	3.712 ± 0.074
组氨酸	0.008 ± 0.003	0.015 ± 0.006	0.006 ± 0.002	0.009 ± 0.001
鸟氨酸	0.007 ± 0.002	0.004 ± 0.001	0.006 ± 0.004	0.003 ± 0.003
赖氨酸	0.046 ± 0.010	0.040 ± 0.023	0.055 ± 0.007	0.042 ± 0.011
酪氨酸	0.071 ± 0.018	0.091 ± 0.019	0.069 ± 0.009	0.078 ± 0.016
总氨基酸/%	18.006 ± 0.091	20.792 ± 0.059 ^{**}	17.028 ± 0.049 ^{**}	18.737 ± 0.044 [*]

注:以野生秦艽为对照, $F_{0.05}(2,4) = 6.94$; $F_{0.01}(2,4) = 18.00$; $^* P < 0.05$; $^{**} P < 0.01$ 。

由表 2 数据可以看出,从各品种中共检出 18 中氨基酸,各品种氨基酸的含量都较高,氨基酸总含量的顺序为秦艽 > 小秦苻 > 野生秦艽 > 麻花苻,其中,栽培秦艽中精氨酸、脯氨酸含量最高,麻花苻中异亮氨酸含量最高;小秦苻中天冬氨酸、四氨基丁酸、丙氨酸含量最高。方差分析结果表明,以野生秦艽为对照,各品种之间存在显著差异。

2.3 多糖含量的测定 采用硫酸-蒽酮比色法测定^[11]

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒重的葡萄糖对照品约 10 mg,加水溶解并稀释至 100 mL 量瓶内,摇匀,备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 将晾干的药材粉碎,过 40 目筛,精密称取干燥至恒重的药材粉末约 10 g 至索氏提取器中,用石油醚回流提取 6 h,弃去提取液,挥干溶媒,加入 80% 的乙醇溶液适量,密闭浸渍 24 h,超声提取 40 min,提取液用活性炭进行脱色,Sevag 法去除蛋白,离心,取上清液浓缩后以 95% 乙醇沉淀,离心取沉淀物,用无水乙醇洗涤数次,挥去

乙醇,残留物用适量水 60 ℃ 水浴溶解,离心 15 min,取上清液定容至 1 000 mL。

2.3.3 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL, 照蒽酮-硫酸法进行操作,显色 60 min 后于 620 nm 处测定吸收度 A,以 A 为纵坐标,以葡萄糖的检测浓度 C(g·L⁻¹)为横坐标,制备标准曲线,得回归方程为 $A = 0.00612C - 0.032$,结果表明,葡萄糖的检测浓度在 0 ~ 60 mg·L⁻¹ 与吸光度呈良好的线性关系。

2.3.4 精密度试验 精密吸取相同容量的供试品溶液 6 份,测定吸收度,结果 RSD 0.81%,表明精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取供试品溶液每隔 1 h,测定一次吸光度,结果在 5 h 之内。吸光度趋于稳定, RSD 0.412%,表明仪器在 5 h 内稳定。

2.3.6 重复性试验 精密称取干燥至恒重的样品共 6 份,按 2.3.2 处理样品后照蒽酮-硫酸法进行操作,测定吸光度。计算多糖的含量。结果平均含量为 2.73%, RSD 1.21%,表明方法的重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 称取已知含量的秦艽样品 2.0 g,共 6 份,精密加入定量的葡萄糖对照品,按 2.3.2 处理样品后,定容至 200 mL 量瓶中,按样品含量测定结果进行测定,计算加样回收率,结果见表 3。

表 3 秦艽样品中多糖加样回收率

样品中 含量/mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
31.32	20.02	51.56	101.1		
32.51	20.02	51.77	96.2		
29.87	20.02	49.63	98.7	98.8	1.88
31.92	20.02	51.59	98.3		
30.61	20.02	50.80	100.9		
31.02	20.02	50.62	97.9		

2.3.8 样品含量测定 精密量取供试品溶液 1 mL,照蒽酮-硫酸法操作,显色 60 min 后于 620 nm 处测定吸收度,结果见表 4。

表 4 各品种秦艽中多糖的含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	多糖/%
野生秦艽	2.93 ± 0.25
秦艽	2.85 ± 0.16
麻花苳	3.27 ± 0.18 ¹⁾
小秦艽	2.90 ± 0.31

注:以野生秦艽为对照, $F_{0.05}(2.4) = 6.94$; $F_{0.01}(2.4) = 18.00$; ¹⁾ $P < 0.05$

由表 4 结果可以看出,麻花苳多糖含量最高,秦艽最低,小秦艽多糖含量仅次于野生秦艽。方差分析结果表明, $P < 0.01$ 时,各品种之间多糖含量差异不明显。

3 讨论

采用蒽酮-硫酸法测定多糖的含量,并参考有关文献^[12-14],对多糖提取工艺做了优化,检验结果表明,该方法灵敏度高、简便、快捷、准确度高。

由结果可知,宁夏栽培的秦艽、麻花苳、小秦艽都达到了《中国药典》规定的有效成分含量,氨基酸和多糖的含量基本上都达到或超过了野生秦艽的含量,这说明宁夏栽培的秦艽品质良好。深入开展

栽培品的规范化种植研究,即可缓解对野生资源的乱采乱挖,又可促进地方经济的快速发展。另外,秦艽中氨基酸和糖类的含量都较高,开展秦艽的综合开发利用具有广阔的前景。

[参考文献]

- [1] 高慧琴, 吴国泰. 秦艽不同配伍的抗炎镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9):182.
- [2] 中科院西北植物研究所编. 秦岭植物志(第1卷). 种子植物. 第4册[M]. 北京:北京科学出版社, 1983:112.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:253.
- [4] 邢世瑞. 宁夏中药资源[M]. 银川:宁夏人民出版社, 1987:101.
- [5] 周秀佳, 徐宏发, 顺庆生. 中药资源学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 2007:397.
- [6] 吴靳荣, 赵志礼, 王妍妍, 等. 云南丽江产粗茎秦艽栽培品种的品质评价[J]. 中成药, 2010, 32(2):250.
- [7] 唐建宁, 杨云飞, 李满, 等. 六盘山区秦艽植物资源及其利用研究[J]. 农业科学研究, 2006, 27(1):60.
- [8] Sun N J, Xia C F. Study on the chemical constituents from *Gentiana rigescens*[J]. Chin Herb Bull, 1984, 9(1):33.
- [9] 近藤嘉和. 秦艽化学成分研究[J]. 生药学杂志, 1996, 46(3):342.
- [10] 孙菁, 李法强, 徐文华, 等. 传统中藏药材 20 中氨基酸的测定[J]. 天然产物的研究与开发, 2010, 22:840.
- [11] 陈占科, 王淑美, 高珊. 制何首乌多糖的脱蛋白研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4):41.
- [12] 向明, 王晓君, 王维香. 超声波提取川芎多糖的工艺优选[J]. 中成药, 2008, 30(11):1621.
- [13] 庄筱葳, 刘秀芳, 毛贵元, 等. 西藏红雪茶多糖含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4):103.
- [14] 马潇, 朱俊儒, 何禄仁, 等. 甘肃产秦艽不同部位中龙胆苦苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8):14.

[责任编辑 顾雪竹]