

太子参商品药材及其四倍体植株块根 的高效液相指纹图谱

李胜南, 高山林^①, 蒋桃

(中国药科大学, 江苏南京 210038)

摘要: 对不同产地太子参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax] 商品药材及其四倍体植株的块根进行了高效液相指纹图谱分析。结果表明, 10 个批次的不同产地太子参商品药材与经选育获得的 6 个株系太子参同源四倍体植株块根的 HPLC-UV 指纹图谱相似度较高, 均在 0.9 以上。选取 15 个特征峰并大致判断其峰位和比例关系, 构成太子参特有的 HPLC 色谱指纹图谱, 为太子参药材鉴别、品质评价及优良品种的选育提供可靠依据。

关键词: 太子参; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 同源四倍体

中图分类号: R282.5; S567.23+.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2007)02-0036-04

HPLC fingerprints of crude drug of *Pseudostellaria heterophylla* and root tuber of its autotetraploid plant LI Sheng-nan, GAO Shan-lin^①, JIANG Tao (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(2): 36-39

Abstract: HPLC fingerprints of commercial crude drug and the root tuber of autotetraploid of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax were analyzed. The results showed that HPLC-UV fingerprints of ten batches of commercial crude drugs from different origins and root tubers of six autotetraploids had great similarities, their similarity degrees were up to 0.9. Fifteen peaks were chosen to form the unique HPLC fingerprint of *P. heterophylla*, which can be used for their identification, quality evaluation and breeding.

Key words: *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax; fingerprint; HPLC; autotetraploid

太子参为石竹科植物孩儿参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax] 的干燥块根, 具有益气健脾、生津润肺之功效, 常用于治疗脾虚体倦、食欲不振、病后虚弱、气阴不足、自汗口渴及肺燥干咳等症^[1]。现代药理学研究表明, 太子参含有皂苷、多糖、氨基酸及微量元素等多种化学成分^[2-4], 具有抗疲劳、抗应激、促进免疫和延长寿命之功效^[5,6]。野生太子参分布广泛, 商品药材则主产于江苏、山东、安徽及福建四省。

目前, 太子参药材的鉴别仍采用传统的性状和薄层色谱法^[7]。作者参照有关文献的方法^[8], 采用 HPLC 技术对不同产地太子参商品药材及本实验室诱导选育的太子参优良四倍体株系的块根进行研究, 建立了太子参 HPLC 指纹图谱, 以期为太子参药材质量评价标准的制定及太子参优良品种的选育提供可靠的科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的 10 个批次太子参 [*Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax] 商品药材于 2006 年 2 月至 5 月分别收集于江苏句容、江苏溧阳、江苏南京、山东临沂、山东莒南(2 个)、安徽巢湖、安徽宣城、福建福鼎和福建柘荣, 经鉴定均为孩儿参的干燥块根; 供试的 6 个太子参四倍体植株的块根于 2006 年 7 月采自中国药科大学试验田, 均为优选的太子参四倍体株系(C1-16、D1-11、D2-1、D2-5、F2-2 和 F2-4)^[9]。所有样品 60 °C 干燥后, 粉碎备用。

收稿日期: 2006-10-12

作者简介: 李胜南(1982-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事中药生物技术研究。

^① 通讯作者 E-mail: shlingao@163.com

1.2 仪器和试剂

所用仪器为 Agilent 1100 LC 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,包括 1100 泵、柱温箱、紫外检测器及 Agilent 化学工作站)。

所用试剂有乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司)、甲醇(色谱纯,淮阴汉邦科技有限公司)及纯净水(广州乐百氏食品饮料公司),其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 样品溶液的制备 精密称取干燥样品粉末(过 40 目筛)2 g,置于索氏提取器中,于 40 ℃ 水浴中用乙醚脱脂 2 h 后取出,待乙醚挥干后再放入索氏提取器中,于 80 ℃ 水浴中用甲醇提取 4 h。甲醇提取液减压蒸干后,用适量蒸馏水溶解残渣,溶液用 60 mL 水饱和正丁醇分 3 次萃取,萃取液再用以正丁醇饱和的蒸馏水洗 1 次,减压蒸干正丁醇,用甲醇溶解残渣并定容至 10 mL,微孔滤膜(孔径为 0.45 μm)过滤,滤液即为供试品溶液。

1.3.2 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。流动相为乙腈(A)和水(B)混合溶剂,采用梯度洗脱,洗脱程序为:A 2% ~ 5%, 0 ~ 5 min; A 5% ~ 15%, 5 ~ 10 min; A 15% ~ 40%, 10 ~ 30 min; A 40% ~ 50%, 30 ~ 35 min; A 50% ~ 65%, 35 ~ 40 min; A 65% ~ 90%, 40 ~ 55 min; A 90%, 55 ~ 65 min。柱温为 25 ℃,流速 1.00 mL · min⁻¹,检测波长 202 nm,进样量 20 μL,分析时间 65 min。

1.4 方法学考察

1.4.1 精密度实验 取产自江苏南京的太子参样品溶液连续进样 5 次,考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%,相对峰面积的 RSD 均小于 2.0%,表明仪器精密度良好。

1.4.2 稳定性实验 取产自江苏南京的太子参样品溶液分别在 0、2、6、12、24、36 和 48 h 进行检测,考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 2.0%,相对峰面积的 RSD 均小于 3.0%,表明样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

1.4.3 重现性实验 取产自江苏南京的太子参样品平行提取 5 次,分别进样,考察色谱峰相对保留时间和相对峰面积的一致性。各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%,相对峰面积的 RSD 均小

于 3.0%,表明此实验方法的重现性良好。

1.5 数据处理

根据“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”^[10]对 16 个太子参样品的 HPLC 色谱图进行比较,并计算相似度。

2 结果和分析

2.1 特征峰的确定

通过对 16 个太子参样品溶液的 HPLC 图谱分析和比较,可以确定其中 15 个峰为太子参指纹图谱的特征峰。选用色谱图中峰面积相对较大且稳定的共有峰(9 号峰,保留时间 31.61 min)作为参照峰,将其保留时间和峰面积积分值设为 1,计算其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表 1。

表 1 太子参 HPLC-UV 图谱 15 个特征峰的相对保留时间和相对峰面积

Table 1 Relative retention time and relative peak area of fifteen feature peaks of HPLC-UV spectrum of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax

峰号 No. of peak	相对保留时间 Relative retention time	相对峰面积 Relative peak area
1	0.092 9 ± 0.000 2	0.814 5 ± 0.243 5
2	0.122 9 ± 0.000 5	0.133 2 ± 0.056 9
3	0.352 1 ± 0.001 1	0.408 1 ± 0.292 2
4	0.499 2 ± 0.000 4	0.323 7 ± 0.107 9
5	0.535 1 ± 0.000 5	0.206 5 ± 0.090 4
6	0.589 3 ± 0.001 4	0.287 6 ± 0.100 7
7	0.718 0 ± 0.001 0	0.081 1 ± 0.015 2
8	0.919 7 ± 0.000 9	0.312 7 ± 0.169 5
9	1.000 0(S)	1.000 0(S)
10	1.069 2 ± 0.002 1	0.096 6 ± 0.048 0
11	1.125 3 ± 0.002 0	0.179 8 ± 0.063 4
12	1.163 0 ± 0.000 9	0.145 5 ± 0.072 7
13	1.216 9 ± 0.001 0	0.041 5 ± 0.014 8
14	1.574 6 ± 0.001 2	0.116 4 ± 0.047 9
15	1.765 9 ± 0.000 7	0.047 7 ± 0.019 0

研究发现,各色谱峰的保留时间匹配较好,相对保留时间的 RSD 均小于 3.0%。由于样品的个体差异,导致部分特征峰的相对含量差异较大,该差异可以通过各特征峰的表现丰度表达。

2.2 相似度评价及指纹图谱的建立

根据 16 个太子参样品溶液的 HPLC 色谱图 15 个特征峰的峰面积(表 2)建立的太子参 HPLC-UV 指纹图谱共有模式见图 1;各样品的相似度值见表 3。结果表明,不同产地太子参商品药材和优良四倍

体株系块根间的相似度为 0.917 ~ 0.992, 15 个特征峰在各样品中稳定出现, 相互间吻合较好, 因此, 该图谱可作为太子参的特征指纹图谱。

表 2 16 个太子参样品的 HPLC-UV 图谱中 15 个特征峰的峰面积

Table 2 Peak areas of fifteen feature peaks of HPLC-UV fingerprints of sixteen samples of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.)

样号 ¹⁾ No. of sample ¹⁾	15 个特征峰的峰面积/mAU · min ⁻¹ Peak area of fifteen feature peaks														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	2 845	543	1 543	965	867	733	280	384	2 960	322	541	424	122	396	225
2	2 966	309	1 322	643	628	526	195	512	225 9	415	542	478	139	389	327
3	3 043	296	937	809	533	409	233	395	2 273	409	369	453	87	427	139
4	2 764	278	897	857	426	535	178	616	2 606	473	507	520	108	280	196
5	2 638	320	1 682	625	689	644	209	925	3 066	510	532	509	152	457	144
6	2 745	249	1 250	656	604	568	211	653	2 756	236	421	396	114	525	153
7	2 219	175	1 325	709	432	730	205	567	2 377	297	493	445	96	309	173
8	1 465	224	945	643	543	425	185	590	2 285	305	522	629	115	327	97
9	2 672	305	1 520	421	469	506	193	723	2 497	314	469	354	65	285	108
10	2 214	348	845	697	560	533	162	699	2 122	279	597	603	123	204	80
11	2 908	339	1 796	844	921	976	197	856	3 159	307	642	526	182	310	196
12	2 745	356	1 808	976	864	833	252	975	3 015	382	698	610	293	331	109
13	2 967	377	1 605	1 030	720	945	211	1 024	2 866	216	581	571	170	508	154
14	2 880	342	1 722	945	6 909	896	236	1 037	2 975	320	525	504	195	385	121
15	3 018	489	1 926	996	849	772	209	826	3 260	280	561	590	230	319	173
16	3 541	422	848	927	775	820	198	908	3 375	335	589	563	245	347	205

1) 1-10. 太子参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax: 1. 江苏句容 Jurong of Jiangsu; 2. 江苏溧阳 Liyang of Jiangsu; 3. 江苏南京 Nanjing of Jiangsu; 4. 山东临沂 Linyi of Shandong; 5. 山东莒南 Ju'nan of Shandong; 6. 山东莒南 Ju'nan of Shandong; 7. 安徽巢湖 Chaohu of Anhui; 8. 安徽宣城 Xuancheng of Anhui; 9. 福建福鼎 Fuding of Fujian; 10. 福建柘荣 Zherong of Fujian. 11-16. 太子参四倍体株系 C1-16、D1-11、D2-1、D2-5、F2-2 和 F2-4 Autotetraploid lines of *P. heterophylla* C1-16, D1-11, D2-1, D2-5, F2-2 and F2-4.

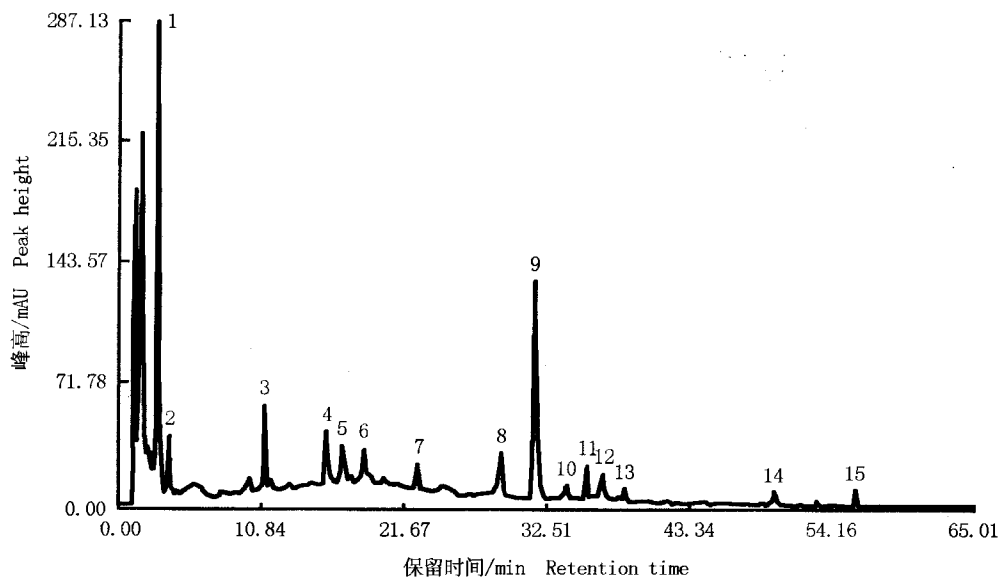


图 1 太子参样品 HPLC-UV 指纹图谱共有模式

Fig. 1 The mutual model of HPLC-UV fingerprint of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax

表3 16个太子参样品的相似度

Table 3 The similarity degrees of sixteen samples of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax

样号 ¹⁾ No. of sample ¹⁾	相似度 Similarity degree	样号 ¹⁾ No. of sample ¹⁾	相似度 Similarity degree
1	0.983	9	0.934
2	0.978	10	0.917
3	0.992	11	0.940
4	0.984	12	0.935
5	0.957	13	0.913
6	0.966	14	0.942
7	0.952	15	0.929
8	0.975	16	0.927

¹⁾ 1-10. 太子参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax: 1. 江苏句容 Jurong of Jiangsu; 2. 江苏溧阳 Liyang of Jiangsu; 3. 江苏南京 Nanjing of Jiangsu; 4. 山东临沂 Linyi of Shandong; 5. 山东莒南 Ju'nan of Shandong; 6. 山东莒南 Ju'nan of Shandong; 7. 安徽巢湖 Chaohu of Anhui; 8. 安徽宣城 Xuancheng of Anhui; 9. 福建福鼎 Fuding of Fujian; 10. 福建柘荣 Zherong of Fujian. 11-16. 太子参四倍体株系 C1-16、D1-11、D2-1、D2-5、F2-2 和 F2-4 Autotetraploid lines of *P. heterophylla* C1-16, D1-11, D2-1, D2-5, F2-2 and F2-4.

3 讨 论

太子参的化学成分复杂,其功效与化学成分间的关系尚不明确。目前对于太子参的质量控制没有确定的指标性化学成分,在制定指纹图谱时,没有适宜的对照品或内标物作为参照物,因此,笔者选取了太子参 HPLC-UV 指纹图谱中色谱峰面积相对较大、较稳定的共有峰(9号峰,保留时间 31.61 min)作为参照峰以计算其他共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积。

通过对太子参不同样品的 HPLC-UV 图谱对照比较,发现 10 个太子参药材样品的 HPLC-UV 指纹图谱相似度较好,均在 0.9 以上,其中除产地为福建的 2 个批次样品外,其他 8 个批次样品的相似度均高于 0.95,这可能是由于福建省的地理位置和气候条件与江苏、浙江和山东三省有一定差异。总体来看,不同产地太子参商品药材和同源四倍体株系块根的 HPLC-UV 指纹图谱的一致性均较好。

生物技术已广泛用于药用植物优良品种的选育工作中,组织培养条件下的多倍体育种更是 1 种简便、成熟且行之有效的育种方法,可获得产量高、有效化学成分含量高且抗逆性好的优良药材品种。江苏省是太子参的道地产区,本研究中所用的 C1-

16、D1-11、D2-1、D2-5、F2-2 和 F2-4 等 6 个太子参四倍体株系就是本实验室的研究人员以江苏产正品太子参为材料、经化学诱导和鉴定并经过多项指标测定筛选出的太子参优良同源四倍体株系,经过进一步的选育和试验,这些优良株系有望培育成高产优质的太子参品种。

将 6 个同源四倍体优良株系与 10 个不同产地的太子参商品药材的 HPLC-UV 指纹图谱进行综合比较和评价,发现 16 个样品的特征峰基本一致,但个别样品不同成分的相对含量存在较大差异,其中同源四倍体块根指纹图谱的 3 号、6 号和 8 号峰的相对峰面积普遍高于太子参药材样品。此研究结果为太子参同源四倍体株系的品质和安全性评价提供了依据。

在建立太子参药材 HPLC-UV 指纹图谱的基础上,选取 15 个特征峰并大致判断其峰位和比例关系,构成太子参药材特有的色谱指纹图谱全貌,为太子参药材质量的分析及控制提供了可靠依据。

参考文献:

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 精选本(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998. 390-391.
- [2] 刘训红, 阙毓铭, 王玉玺, 等. 江苏地产太子参中多糖、游离糖及氨基酸的含量分析[J]. 南京中医学院学报, 1993, 9(3): 42.
- [3] 米田该典, 小宫祥子, 那须正夫, 等. 太子参的生药学的研究(I)アミノ酸組成と構成糖について[J]. 生药学杂志(日), 1984, 38(1): 7-11.
- [4] 秦民坚, 余永邦, 黄文哲, 等. 不同产地太子参的品质分析[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(5): 29-32.
- [5] 龚祝南, 戴岳, 马辉, 等. 8 个不同产地太子参对脾虚及免疫功能的影响[J]. 中药材, 2001, 24(4): 281-282.
- [6] 王家葵, 郑军, 沈映君, 等. 太子参总提取物对环磷酸腺苷处理动物免疫功能和胸腺、脾脏核酸含量的影响[J]. 中药药理与临床, 1996, 12(6): 16-18.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 年版(一部)[M]. 北京:化学工业出版社, 2005. 46.
- [8] 唐宝莲, 辛绍祺, 蔡宝昌, 等. 太子参 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(3): 171-172.
- [9] 谢燕, 高山林, 曾杨, 等. 太子参快繁技术的优化及同源四倍体的诱导与鉴定[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(2): 50-54.
- [10] 国家药典委员会. 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004(A)[CP]. 北京:国家药典委员会, 2004.