

龙胆药材中龙胆苦苷、马钱酸含量测定与其外观性状的相关性及质量等级标准研究^Δ

刘 战*, 侯晓琳, 宿 莹, 吴晓燕, 孙 金, 姜雨昕, 翁丽丽[#](长春中医药大学药学院, 长春 130117)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2237-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.15

摘要 目的:建立同时测定龙胆药材中龙胆苦苷、马钱酸含量的方法,并考察其含量与外观性状的相关性及进行质量等级划分。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Ascentis Express C₁₈,流动相为 0.1%磷酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为 0.4 mL/min,柱温为 30 ℃,检测波长为 240 nm,进样量为 1 μL。以药材长度、须根数及根直径为指标,考察龙胆药材的外观性状特征;采用 SPSS 21.0 软件分析药材中龙胆苦苷、马钱酸含量与其外观性状的相关性;采用 SPSS 21.0 软件进行 *k*-均值聚类分析,并建立龙胆药材的质量等级划分标准。结果:龙胆苦苷、马钱酸检测质量浓度线性范围分别为 0.5~3.0 mg/mL($r=0.999\ 9$)、0.05~0.50 mg/mL($r=0.999\ 9$);定量限分别为 0.295、0.289 μg/mL,检测限分别为 0.082、0.081 μg/mL;精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%;加样回收率分别为 97.56%~102.23%(RSD=1.56%, $n=6$)、97.58%~102.67%(RSD=1.86%, $n=6$)。相关性分析结果显示,药材中龙胆苦苷、马钱酸含量与其长度、须根数、根直径均呈正相关,且对含量的影响程度大小依次为须根数>长度>根直径。聚类分析结果显示,54 批龙胆药材可分聚为 2 类,S4~S6、S13、S17~S23、S25、S28、S31~S34 聚为一类;S1~S3、S7~S12、S14~S16、S24、S26、S27、S29、S30、S35~S54 聚为一类。质量等级划分结果显示,54 批龙胆药材可分为 2 个等级,其结果与聚类分析结果一致。结论:所建含量测定方法操作简便,稳定性较好,可用于同时测定龙胆药材中龙胆苦苷、马钱酸的含量;龙胆药材须根数越多、长度越长、根直径越粗,马钱酸和龙胆苦苷的含量越高,药材质量越好。

关键词 龙胆;龙胆苦苷;马钱酸;高效液相色谱法;外观性状;相关性;聚类分析;质量等级标准

Correlation Study of the Contents of Gentiopicrosin and Loganic Acid with Appearance Traits of *Gentiana scabra* and Its Quality Gradation Criterion

LIU Zhan, HOU Xiaolin, SU Ying, WU Xiaoyan, SUN Jin, JIANG Yuxin, WENG Lili (College of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of gentiopicrosin and loganic acid in *Gentiana scabra*, and to investigate the correlation of their contents with appearance traits and quality gradation criterion. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Ascentis Express C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% phosphoric acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was set at 240 nm. The sample size was 1 μL. Taking the length, number and diameter of fibrous roots as indexes, the appearance and morphological characteristics of *G. scabra* were studied. The relationship of gentiopicrosin and loganic acid content with the appearance property of medicinal material was analyzed by SPSS 21.0 software. *k*-mean clustering analysis was carried out by using SPSS 21.0 software, and gradation standard for *G. scabra* was established preliminarily. RESULTS: The linear range of gentiopicrosin and loganic acid were 0.5-3.0 μg/mL ($r=0.999\ 9$) and 0.05-0.50 μg/mL ($r=0.999\ 9$). The limit of quantification of gentiopicrosin and loganic acid were 0.295, 0.289 μg/mL; the detection limit were 0.082, 0.081 μg/mL; RSDs of precision, stability, repeatability tests were all lower than 2%; the recovery rates were 97.56%-102.23% (RSD=1.56%, $n=6$) and 97.58%-102.67% (RSD=1.86%, $n=6$). Correlation results showed that there was a significant positive correlation of the length of *G. scabra*, the number of roots, root diameter, with the contents of gentiopicrosin and loganic acid. The order of affecting content was the number of roots > length > root diameter. *k*-means clustering analysis showed that 54 batches of *G. scabra* was divided into two categories; S4-S6, S13, S17-S23, S25, S28, S31-S34 were clustered into a category; S1-S3, S7-S12, S14-S16, S24, S26, S27, S29, S30, S35-S54 were clustered into the other category. The results of gradation showed that 54 batches of *G. scabra* could be divided into two grades, and the results were consistent with the cluster analysis. CONCLUSIONS: Established method is simple and stable, and can be used for simultaneous determination of gentiopicrosin and loganic acid in *G. scabra*. The more fibrous roots, the longer the length, the thicker the root, the higher the content of gentiopicrosin and loganic acid, the better the quality of *G. scabra*.

* 硕士研究生。研究方向:中药品质鉴定与资源开发。E-mail: 1292027642@qq.com

[#] 通信作者:教授,硕士生导师,硕士。研究方向:中药品质鉴定与资源开发。E-mail: 735110462@qq.com

KEYWORDS *Gentiana scabra*; Gentiopicrosin; Loganic acid; HPLC; Appearance trait; Correlation; Cluster analysis; Quality gradation criterion

龙胆为龙胆科(*Gentianaceae*)植物条叶龙胆(*Gentiana manshurica* Kitag.)、龙胆(*Gentiana scabra* Bunge.)、三花龙胆(*Gentiana triflora* Pall.)或坚龙胆(*Gentiana rigescens* Franch.)的干燥根及根茎^[1]。龙胆是一种使用历史悠久的常见中药,首载于《神农本草经》,其性苦,寒,归肝、胆经,具有清热燥湿、泻肝胆火之功效^[2]。现代药学研究表明,除具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、镇痛、健胃、保护或抑制中枢神经系统等作用外,还可用于治疗心脑血管系统疾病^[3]。龙胆苦苷、马钱酸是龙胆的标志性成分,具有利胆、抗炎、健胃、降压等作用^[4],其中龙胆苦苷也是2015年版《中国药典》(一部)^[1]收录的用于评价龙胆质量的指标性成分。

龙胆主要分布于黑龙江、辽宁、吉林、内蒙古等省,具有重要的药用价值^[4]。2012年开始,吉林省开展了一项全省范围的中药资源普查,结果发现,受生态环境破坏及不合理采挖等多种因素影响,野生龙胆资源已日渐减少^[5]。目前市场上的龙胆药材大多为人工种植,但由于地理环境及种植规范程度的不同,其质量良莠不齐。此外,市场上所谓的药材质控“标准”也未在2015年版《中国药典》(一部)中收录,且大部分龙胆药材及饮片不分等级和质量全部混合统装,导致药材市场中部分药材商品品别、规格、等级混乱,难以实现优质优价^[6]。近年来,有学者对中药材的质量与其外观性状的关系进行了研究,如蔡广知等^[7]研究发现,甘草药材的质量与其直径呈正相关;张欢等^[8]研究发现,金银花药材的质量与其外观色度呈正相关。虽然《中药材商品规格等级团体标准》中规定了龙胆的等级标准^[9],但考察指标较少,也未结合有效成分进行分析,存在一定的局限性^[10]。为此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)测定龙胆药材中龙胆苦苷、马钱酸的含量,并比较了54批龙胆药材样品中上述成分含量与其外观性状的相关性,以建立龙胆药材的等级划分标准,旨在为筛选优良种质资源提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Prominence-ILC-2030型HPLC仪,包括四元泵、真空脱气机、自动进样器、紫外-可见光检测器、柱温箱、色谱工作站(日本Shimadzu公司);JA2603B型千分之一电子天平(上海天美天平仪器有限公司);FA1004B型万分之一电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司);KQ3200E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DHG-9053A型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);FST-III-20s型超纯水机(上海富诗特仪器设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

龙胆苦苷对照品(批号:110770-201716,纯度:97.6%);马钱酸对照品(批号:111865-201704,纯度:97.4%)均由中国食品药品检定研究院提供;乙腈为色谱

纯,甲醇为分析纯,水为超纯水

1.3 药材

54批龙胆药材(编号:S1~S54),经长春中医药大学中药资源与鉴定教研室翁丽丽教授鉴定为龙胆科植物龙胆(*Gentiana scabra* Bunge.)的干燥根及根茎。药材样品来源见表1。

表1 龙胆药材样品来源
Tab 1 Source of *G. scabra*

编号	产地	收集日期	药用部位
S1	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S2	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S3	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S4	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S5	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S6	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S7	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S8	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S9	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S10	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S11	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S12	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S13	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S14	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S15	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S16	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S17	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S18	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S19	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S20	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S21	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S22	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S23	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S24	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S25	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S26	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S27	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S28	黑龙江小兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S29	黑龙江小兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S30	黑龙江小兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S31	黑龙江小兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S32	黑龙江小兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S33	黑龙江小兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S34	黑龙江小兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S35	黑龙江小兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S36	黑龙江小兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S37	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S38	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S39	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S40	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S41	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S42	辽宁省清原满族自治县	2018年3月20日	根及根茎
S43	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S44	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S45	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S46	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S47	黑龙江大兴安岭	2018年3月20日	根及根茎
S48	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S49	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S50	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎

续表 1

Continued tab 1

编号	产地	收集日期	药用部位
S51	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S52	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S53	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎
S54	吉林省抚松县	2018年3月20日	根及根茎

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Ascentis Express C₁₈(50 mm×3.0 mm, 2.7 μm);流动相:0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(洗脱程序见表2);流速:0.4 mL/min;柱温:30℃;检测波长:240 nm;进样量:1 μL。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

t, min	A, %	B, %
4~8	95	5
8~12	96	4
12~18	91	9
18~25	10	90
25~35	90	10

2.1.2 混合对照品溶液的制备 取龙胆苦苷对照品、马钱酸对照品适量,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成龙胆苦苷、马钱酸质量浓度分别为1.0、0.2 mg/mL的混合对照品溶液。

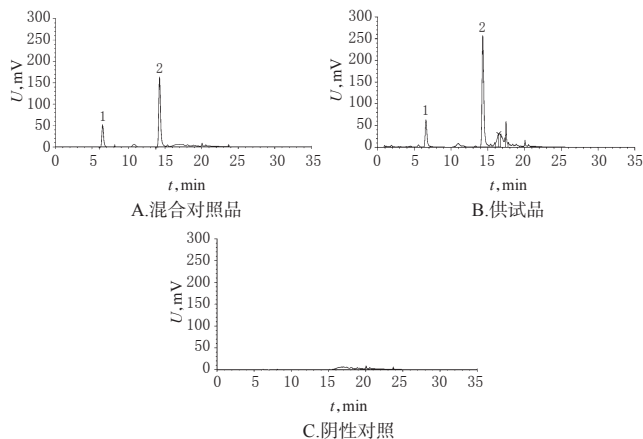
2.1.3 供试品溶液的制备 取药材样品粉末(过四号筛)约0.5 g,精密称定,置于50 mL具塞锥形瓶中,加甲醇20 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)处理30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 阴性对照溶液 以甲醇为阴性对照溶液。

2.1.5 系统适用性试验 分别取上述混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,各成分基线分离良好,分离度均大于1.5,理论板数均不低于3 000,阴性对照对测定无干扰。

2.1.6 线性关系考察 取龙胆苦苷对照品、马钱酸对照品适量,按“2.1.2”项下方法制成龙胆苦苷质量浓度分别为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/mL、马钱酸质量浓度分别为0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mg/mL的系列线性关系工作溶液,取适量按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x, mg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表3。

2.1.7 定量限与检测限考察 取“2.1.2”项下混合对照品溶液,倍比稀释,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,分别以信噪比为10:1、3:1计算定量限、检测限。结果,龙胆苦苷、马钱酸的定量限分别为0.295、0.289 μg/mL,检



注:1.马钱酸;2.龙胆苦苷

Note: 1.loganic acid; 2.gentiopiricin

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

表3 回归方程与线性范围

Tab 3 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	r	线性范围, mg/mL
龙胆苦苷	$y=710.199.242.9x+2.670.566.7$	0.999 9	0.5~3.0
马钱酸	$y=4.149.546.013.2x+893.678.6$	0.999 9	0.05~0.50

测限分别为0.082、0.081 μg/mL。

2.1.8 精密度的试验 取“2.1.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,龙胆苦苷、马钱酸峰面积的RSD分别为1.64%、1.25% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.1.9 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S35)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,龙胆苦苷、马钱酸峰面积的RSD分别为0.56%、1.04% (n=8),表明供试品溶液室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.10 重复性试验 取药材样品粉末(编号:S35)适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品中龙胆苦苷、马钱酸的含量。结果,龙胆苦苷、马钱酸的平均含量为5.23、0.88 mg/g, RSD分别为1.34%、0.99% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.1.11 加样回收率试验 取已知含量的药材样品粉末(编号:S35)适量,共6份,精密称定,加入一定量的混合对照品粉末,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

2.1.12 样品含量测定 取54批药材样品粉末适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品中龙胆苦苷、马钱酸的含量,结果见表5。

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery tests (n=6)

待测成分	已知样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
龙胆苦苣	26.35	13.31	39.55	99.17	99.92	1.56
	26.30	13.22	39.60	100.61		
	26.35	13.11	39.50	99.55		
	26.35	13.53	39.55	97.56		
	26.35	13.01	39.65	102.23		
	26.30	13.20	39.55	100.38		
马钱酸	4.25	4.71	9.01	101.02	100.42	1.86
	4.22	4.62	8.80	99.08		
	4.25	4.52	8.83	102.67		
	4.18	4.51	8.69	99.56		
	4.20	4.51	8.84	102.59		
	4.30	4.50	8.68	97.58		

表5 样品含量测定结果(n=4)

Tab 5 Results of content determination of samples (n=4)

编号	龙胆苦苣, mg/g	马钱酸, mg/g	编号	龙胆苦苣, mg/g	马钱酸, mg/g
S1	5.63	0.97	S28	6.07	1.09
S2	5.61	1.00	S29	5.26	1.07
S3	5.92	1.08	S30	5.67	1.03
S4	6.76	1.09	S31	5.58	1.02
S5	6.13	1.01	S32	6.72	1.13
S6	6.59	1.23	S33	6.11	1.24
S7	5.99	1.02	S34	6.50	1.11
S8	4.89	0.99	S35	5.27	0.87
S9	6.10	1.27	S36	3.88	0.94
S10	5.68	1.02	S37	3.03	0.60
S11	5.89	1.04	S38	4.02	0.67
S12	5.80	1.15	S39	3.33	0.64
S13	6.95	1.41	S40	3.49	0.48
S14	6.05	1.13	S41	3.34	0.67
S15	6.72	1.19	S42	3.55	1.01
S16	6.01	1.17	S43	3.48	0.64
S17	6.20	1.18	S44	3.67	0.66
S18	6.47	1.25	S45	4.09	0.82
S19	6.30	1.16	S46	3.90	0.64
S20	6.56	1.16	S47	3.70	0.61
S21	5.68	1.19	S48	3.90	0.61
S22	6.26	1.01	S49	3.72	0.87
S23	6.03	1.06	S50	3.63	0.66
S24	5.63	1.06	S51	3.56	0.58
S25	5.92	0.96	S52	3.45	0.82
S26	5.80	1.11	S53	4.29	0.78
S27	5.55	1.06	S54	3.45	0.58

2.2 龙胆药材外观性状特征

以药材长度、须根数及根直径为指标,考察龙胆药材的外观性状特征。

2.2.1 药材长度 54批药材样品每批随机选取5根完整的药材,采用游标卡尺测量根茎至根末端的长度,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果见表6。

2.2.2 须根数 54批药材样品每批随机选取5根完整的药材,数须根数,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果见表6。

2.2.3 根直径 54批药材样品每批随机选取5根完整

表6 龙胆药材样品外观特征指标测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 6 Results of appearance trait indexes of *G. scabra* ($\bar{x} \pm s, n=5$)

编号	药材长度, cm	须根数, 根	根直径, cm
S1	10.72±1.02	14±2	0.25±0.02
S2	8.27±1.46	10±3	0.19±0.04
S3	10.17±1.34	14±2	0.19±0.01
S4	12.83±0.23	19±1	0.26±0.03
S5	8.57±0.25	19±2	0.20±0.05
S6	11.86±0.86	18±1	0.26±0.02
S7	9.51±0.10	15±3	0.23±0.03
S8	7.96±1.39	10±1	0.18±0.05
S9	12.66±0.93	13±2	0.22±0.02
S10	8.01±1.02	9±2	0.18±0.06
S11	7.77±0.85	13±3	0.21±0.02
S12	7.65±1.31	15±1	0.18±0.01
S13	11.43±1.14	20±3	0.25±0.03
S14	11.16±1.62	13±2	0.21±0.04
S15	9.41±0.83	13±2	0.22±0.06
S16	7.24±0.92	16±1	0.24±0.03
S17	8.14±0.97	20±3	0.22±0.02
S18	10.68±1.02	15±2	0.21±0.01
S19	8.54±1.29	17±4	0.23±0.04
S20	11.18±1.01	20±2	0.30±0.02
S21	9.23±0.94	16±1	0.22±0.04
S22	11.53±0.83	16±2	0.22±0.03
S23	12.78±1.29	26±4	0.21±0.02
S24	8.55±0.93	14±2	0.18±0.01
S25	10.93±1.23	17±1	0.25±0.06
S26	8.01±0.99	15±2	0.23±0.03
S27	6.64±0.85	15±3	0.23±0.02
S28	10.74±1.26	17±3	0.21±0.01
S29	6.67±0.97	15±3	0.24±0.02
S30	9.62±0.85	13±1	0.24±0.05
S31	11.49±0.93	16±2	0.22±0.06
S32	11.04±1.24	17±3	0.20±0.01
S33	11.90±1.07	15±2	0.22±0.02
S34	10.09±0.94	18±3	0.25±0.05
S35	6.73±0.79	11±1	0.20±0.02
S36	7.76±0.95	12±3	0.24±0.02
S37	4.86±1.01	7±2	0.20±0.05
S38	8.46±0.99	11±1	0.16±0.01
S39	5.15±0.93	9±3	0.19±0.05
S40	4.91±1.03	6±2	0.19±0.02
S41	4.85±0.90	11±1	0.15±0.04
S42	8.59±1.14	7±3	0.25±0.05
S43	4.51±1.03	8±1	0.15±0.03
S44	5.33±1.09	8±2	0.19±0.04
S45	10.94±0.93	11±2	0.21±0.05
S46	7.20±0.86	11±2	0.18±0.02
S47	4.09±0.95	6±3	0.18±0.04
S48	6.64±1.42	11±1	0.21±0.02
S49	6.07±0.72	12±2	0.21±0.06
S50	6.03±0.85	8±3	0.20±0.01
S51	6.21±0.92	9±1	0.19±0.05
S52	7.62±0.79	9±3	0.17±0.02
S53	9.04±1.29	11±2	0.21±0.04
S54	5.61±1.07	9±1	0.18±0.02

的药材,采用游标卡尺测量根上(根茎)、中(簇生根中部)、下(簇生根尾部)3处直径,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果见表6。

2.3 药材样品有效成分含量与外观性状的相关性分析

采用SPSS 21.0软件对药材中龙胆苦苷、马钱酸含量与其长度、须根数、根直径进行相关性分析, $P < 0.05$ 表示相关性有统计学意义,结果见表7。

表7 相关性分析结果

Tab 7 Correlation analysis results

指标	长度,cm	须根数,根	根直径,cm	龙胆苦苷含量,mg/g	马钱酸含量,mg/g
长度,cm	1	0.708**	0.558**	0.762**	0.729**
须根数,根	0.708**	1	0.564**	0.809**	0.734**
根直径,cm	0.558**	0.564**	1	0.555**	0.580**
龙胆苦苷含量,mg/g	0.762**	0.809**	0.555**	1	0.898**
马钱酸含量,mg/g	0.729**	0.734**	0.580**	0.555**	1

注:指标相关性,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: indicator relationship,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

由表7可知,药材中龙胆苦苷、马钱酸含量与其长度、须根数、根直径均呈正相关,相关性具统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且影响含量的外观性状特征指标的顺序依次为须根数>长度>根直径,提示龙胆药材须根数越多、长度越长、直径越粗,则龙胆苦苷和马钱酸含量越高。

2.4 聚类分析

采用SPSS 21.0软件对龙胆苦苷、马钱酸含量、药材长度、须根数、根直径的数据进行处理,并进行k-均值聚类分析,详见图2。由图2可知,54批药材样品可聚为2类:S4~S6、S13、S17~S23、S25、S28、S31~S34聚为一类;S1~S3、S7~S12、S14~S16、S24、S26、S27、S29、S30、S35~S54聚为一类。

2.5 质量等级标准建立及划分

在参考相关标准^[9]的基础上,根据有效成分含量与药材样品外观性状的相关性及聚类分析结果建立药材质量等级标准(见表8),并对54批药材样品进行等级划分。结果显示,54批药材样品可划分为2个等级:S4~S6、S13、S17~S23、S25、S28、S31~S34为一级;S1~S3、S7~S12、S14~S16、S24、S26、S27、S29、S30、S35~S54为二级。该结果与聚类分析结果一致,其部分典型外观特征见图3(选取部分不同等级龙胆药材中较典型的外观特征图片)。

3 讨论

本研究考察了0.1%磷酸水溶液-甲醇、0.1%磷酸水溶液-乙腈等不同流动相体系的分离效果,结果表明,以0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相时的洗脱和分离效果最好,故选择0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱。同时又对供试品的提取方法进行了比较,结果发现,加热回流法与超声提取法的提取率相当,但考虑到操作的简便性,故选择提取方法为超声提取。

《本草图经》曰:龙胆“宿根黄白色,下抽根十余本”^[11]。《500味常用中药材的经验鉴别》中描述龙胆以

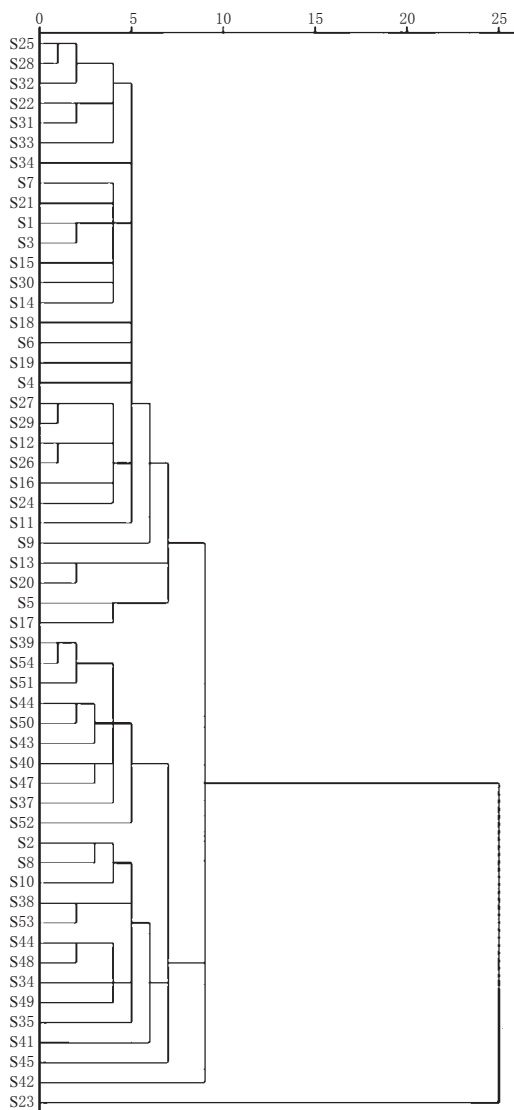


图2 聚类分析树状图

Fig 2 Cluster analysis tree diagram

“根条粗大饱满、长条顺直,根上有环纹,质柔软,色黄或黄棕,不带茎枝,味极苦者为佳”^[12]。《中华药海》中描述“以根条粗长,黄色或黄棕色、无碎断者为佳,根条细短或者根条少,色红黄者质次;龙胆根通常二十余条,三花龙胆根约十五条,条叶龙胆根通常小于十条”^[13]。《金世元中药材传统鉴别经验》中描述“以东北三省所产的三种龙胆质量为优,并以根条粗长,黄色或黄棕色者为佳”^[14]。这表明龙胆在古代作药用时须根数十余根者为佳。有研究发现,龙胆草茎色、叶色等性状与龙胆苦苷等有效成分含量具有相关性^[15];坚龙胆的根直径、根长、须根数与有效成分含量均呈正相关^[16]。本研究的相关性分析结果显示,药材中龙胆苦苷、马钱酸含量与其须根数、长度、根直径均呈正相关,且对含量的影响程度大小顺序为须根数>长度>根直径。这提示,龙胆药材的须根数越多、长度越长、根直径越粗,则龙胆苦苷和马钱酸的含量越高,药材质量越好,这也初步验证了龙胆药材的传统经验鉴别结果^[11-14]。聚类分析结果显示,54批

表8 龙胆药材质量等级划分标准

Tab 8 Quality grading standard of *G. scabra*

项目	质量等级	
	一级	二级
长度,cm	>12.66	4.09~12.66
须根数,根	>16	6~16
根直径,cm	>0.25	0.15~0.25
马钱酸含量,mg/g	>1.27	0.48~1.27
龙胆苦苷含量,mg/g	>6.72	3.03~6.72
主要外观特征	根茎较短,呈不规则块状,上端有茎痕及支根痕,下端着生较长的根,根略粗,呈圆柱形,须根较多。表面黄白色至淡黄色,质脆易折断,断面有筋脉点	根茎较短,呈不规则块状,上端有茎痕及支根痕,下端着生较短的根,根略细,呈圆柱形,须根较少。表面淡黄色至黄棕色,质脆易折断,断面有筋脉点

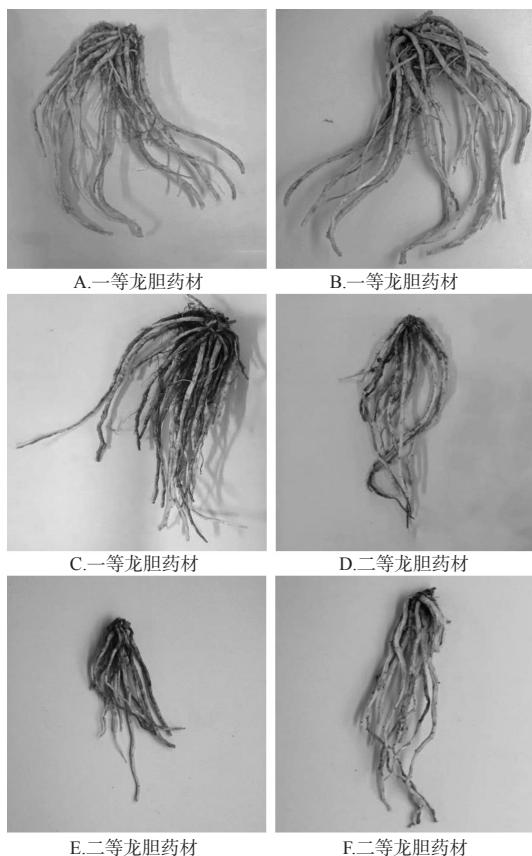


图3 龙胆药材样品典型外观特征图

Fig 3 Typical appearance trait of *G. scabra*

样品可聚为2类,S4~S6、S13、S17~S23、S25、S28、S31~S34聚为一类;S1~S3、S7~S12、S14~S16、S24、S26~S27、S29~S30、S35~S54聚为一类,该结果与等级划分结果一致。

由于种植龙胆的地区存在仪器检测不方便、含量测定的可操作性低等现象,故本研究通过龙胆药材外观性状与其有效成分含量的相关性分析及聚类分析结果,建立了

龙胆药材质量等级划分标准,旨在应用该标准直接通过龙胆药材的外观性状初步判断其质量优劣,也为其生产和商品流通过程中的初步品控提供了依据。

综上所述,所建含量测定方法操作简便,稳定性较好,可用于同时测定龙胆药材中龙胆苦苷、马钱酸的含量;龙胆药材须根数越多、长度越长、根直径越粗,则马钱酸和龙胆苦苷的含量越高、药材质量越好。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 96.
- [2] 陈学惠, 李小芳. 龙胆药性及功效的本草考证[J]. 成都中医药大学学报, 2017, 30(3): 63-64.
- [3] 孙紫薇, 翁丽丽, 张楠. 龙胆中当药苷和獐牙菜苦苷的含量测定及指纹图谱研究[J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(5): 964-967.
- [4] 沈涛, 金航, 王元忠, 等. 中药龙胆化学成分研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16868-16870.
- [5] 翁丽丽, 李波, 王哲. 基于核密度估计的吉林省龙胆分布区划研究[J]. 吉林中医药, 2017, 37(10): 1038-1040.
- [6] 陈小红, 陈康, 潘超美. 化橘红药材商品规格等级标准分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 23-28.
- [7] 蔡广知, 赵凌, 王莎莎, 等. 甘草药材等级标准分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(10): 148-153.
- [8] 张欢, 王恒, 郝江波, 等. 金银花药材等级质量标准的划分[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(5): 80-84.
- [9] 中华中医药学会. 中药材商品规格等级团体标准 T/CACM 1021.144-2018[S]. 2018.
- [10] 李波, 高文远, 李霞, 等. 根及根茎类中药材商品规格等级标准研究探讨[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(2): 6-10.
- [11] 吴立宏. 中药龙胆的品种传承[C]//中华中医药学会第十届中药鉴定学术会议暨WHO中药材鉴定方法和技术研讨会论文集. 咸阳: 中华中医药学会, 2010: 6.
- [12] 卢赣鹏. 500味常用中药材的经验鉴别[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 157.
- [13] 冉先德. 中华药海[M]. 北京: 东方出版社, 2010: 232.
- [14] 金世元. 金世元中药材传统鉴别经验[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 76.
- [15] 赵露, 孟琦, 江健梅, 等. 龙胆草有效成分与表型性状的相关性分析[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(6): 687-694.
- [16] 杨天梅, 杨美权, 杨绍兵, 等. 坚龙胆药材产品质量分级标准研究[J]. 中药材, 2018, 41(3): 648-651.

(收稿日期: 2019-01-23 修回日期: 2019-06-05)

(编辑: 陈宏)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅