

不同栽培品种山茱萸药材的化学质量评价*

□陈随清** 王利丽 扬 晋 冀春茹 (河南中医学院 郑州 450008)

摘 要:目的:以化学成分为指标评价山茱萸不同栽培品种药材的质量。方法:测定山茱萸不同栽培品种药材中的熊果酸、马钱苷、总多糖、总鞣质、水溶性浸出物、醇溶性浸出物的含量,采用灰色模式识别法对山茱萸的不同栽培品种药材进行综合质量评价。结果:评价了山茱萸不同栽培品种药材质量的优劣。结论:初步建立了山茱萸不同栽培品种药材化学质量评价的新方法。

关键词:山茱萸 栽培品种 化学质量评价 灰色模式识别法

山茱萸为常用中药材,是山茱萸科植物山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb et Zucc)的干燥成熟果肉。山茱萸在长期的应用和栽培过程中,种内产生很大变异,出现较多的变异类型。这些品种的果实从形状、大小、颜色、重量到出皮率以及浸出物含量等具有较大的差异,即它们的药材质量及经济价值是明显不同的。国内外学者对山茱萸种内变异进行了初步筛选和评价,但对变异品种所产生的药材质量差异没有深入研究和分析,不利于山茱萸种质资源的保护和开发利用。本文通过测定山茱萸不同栽培品种中的熊果酸(Ursolic acid)、马钱苷(Loganin)、总多糖、总鞣质、水溶性浸出物、醇溶性浸出物的含量,采用灰色模式识别法对山茱萸的不同栽培品种进行综合评价,建立山茱萸质量评价的灰色模式识别法,为山茱萸优良品种的筛选提供了科学依据。

一、仪器、试剂及材料

1. 仪器

UV-2000 分光光度计(日本岛津)。

CS-9310PC 薄层扫描仪(日本岛津);点样用定量毛细管(Drummond scientific co. USA);PBQ-I 型薄层自动铺板器(重庆南岸新力实验电器厂)。

SHIMADZU SPD-10A 高效液相色谱仪,包括 UV-Vis 检测器,LC-10A 输液泵,CTO-10A 柱温箱,SHIMADZU C-R7Ae plus 积分仪。TP-600 型超声清洗器(天鹏电子新仪器有限责任公司)。

2. 试剂

葡萄糖(分析纯,上海化学试剂站分装厂出品,批号:93-60-23);熊果酸对照品(含量测定用,中国药品生物制品检定所,编号:0742-9909);马钱苷对照品由本实验室提取,经 NMR 和 HPLC 测定纯度在 98%以上。

收稿日期:2005-10-20

修回日期:2005-12-17

* 河南省杰出青年基金项目(0412000700);山茱萸种质资源的分子生物学研究,负责人:陈随清;河南省高校杰出科研人才创新工程基金项目(2004KYCX007);山茱萸种质资源的分子生物学研究,负责人:陈随清。

** 联系人:陈随清,博士,教授,主要从事中药规范化种植及中药质量标准的研究,Tel:(0371)65680002, Fax:(0371)65962546, E-mail:suiqingchen@sohu.com。

68 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

甲醇(色谱纯,分析纯),所有色谱用试剂均经0.45 μm 微孔滤膜过滤。硅胶G(薄层色谱用,青岛海洋化工厂);其它试剂均为分析纯。

3. 材料

实验用样品分别于2002年9月、10月采集于河南省的西峡县、内乡县、栾川县,陕西省的周至县、浙江省的临安市、淳安市,经作者鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb.et.Zucc.的果实。

二、方法与结果

1. 山茱萸水溶性浸出物和醇溶性浸出物的测定

山茱萸水溶性浸出物和醇(95%乙醇)溶性浸出物按照文献^[1]附录中浸出物含量测定方法项下的热溶法测定。结果见表5。

2. 总鞣质的含量测定

按照文献^[1]附录中总鞣质含量测定方法测定。结果见表5。

3. 山茱萸中总多糖的测定

总多糖的含量按照文献^[2]报道的硫酸-苯酚法测定,测定波长486nm,回归方程 $Y=1.9189+162.5429X$, $r=0.9998$;平均回收率99.68%,RSD=2.21%。结果见表5。

4. 山茱萸中熊果酸薄层扫描法含量测定

按照文献^[3]山茱萸项下的方法进行测定。结果见表5。

5. 山茱萸中马钱苷含量测定

(1)色谱条件:色谱柱:Hypersil C18柱(4.5mm \times 200mm,5 μm);保护柱(长1cm);流动相:甲醇-水(30:70),柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;流速:1mL/min;检测波长:231nm。理论塔板数按马钱苷峰计算不低于2500。

(2)检测波长的选择:根据马钱苷的最大紫外吸收,选择231nm为检测波长(UV谱见图1)。

(3)流动相的选择:现有文献报道的流动相多为甲醇-水(30:70),我们也重复了该流动相,结果理想(对照品和样品色谱图见图2)。

(4)线性范围:准确称取马钱苷对照品

1.56mg,以无水乙醇定溶于5mL量瓶中,制成对照品溶液。依次以0.5、1、2、3、4、5 μL 进样,作HPLC分析。以峰面积(X)为横坐标,马钱苷对照品含量(Y)为纵坐标,得回归方程为: $Y=1.01\times 10^{-6}X-0.03$, $r=0.9996$,说明马钱苷在0.156~1.560 μg 范围内线性良好(回归曲线见图3)。

(5)供试品溶液的制备:取山茱萸干燥果肉粗粉1g,精密称定,置三角瓶中,加入30%甲醇10mL,超声

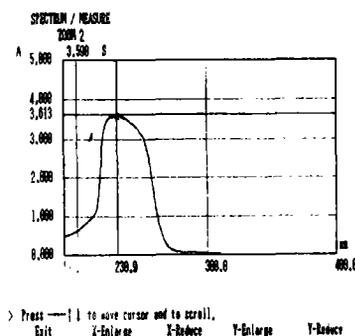


图1 马钱苷紫外吸收光谱图

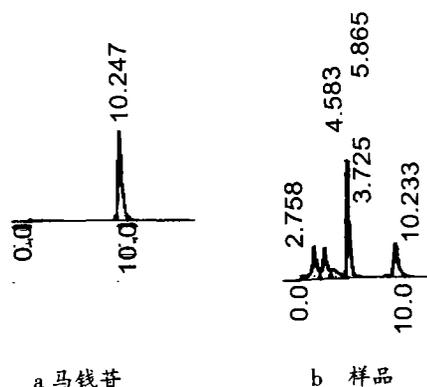


图2 HPLC 色谱图

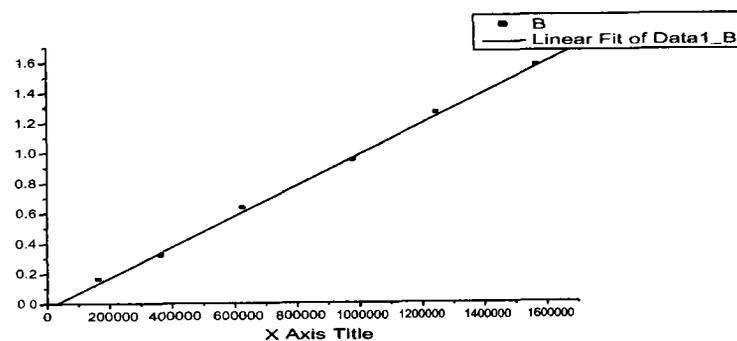


图3 马钱苷标准曲线

震荡 15min, 过滤, 滤液置 50mL 量瓶中, 重复上述操作 4 次, 滤液合并; 用适量 30% 甲醇清洗残渣, 并入量瓶, 稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

(6) 精密度试验: 取供试品溶液, 连续进样 5 次, 根据峰面积计算 RSD 值, 结果见表 1。

(7) 稳定性实验: 取同一样品液分别在 0、0.5、1、2、4、8h 测定, 根据峰面积计算 RSD 值, 结果见表 2。结果表明该实验方法在 8 小时内结果稳定。

(8) 重现性实验: 平行称取山茱萸干燥果肉粗粉 5 份, 按(5)项下方法制备样品液, 取供试品 2uL 注入 HPLC 色谱仪进行测定, 计算 RSD 值, 结果见表 3。结果表明该实验方法重现性良好。

(9) 加样回收率实验: 精密称取山茱萸干燥果肉粗粉 5 份, 加入一定量的马钱苷对照品, 按(5)项下方法制备样品液, 取供试品 2uL 注入 HPLC 色谱仪进行测定, 计算加样回收率, 结果见表 4。

(10) 样品含量测定: 精密称取山茱萸不同栽培品种干燥果肉粗粉, 按(5)项下方法制备样品液, 吸取 2uL 注入 HPLC 色谱仪进行测定, 计算样品中马钱苷的含量, 结果见表 5。

三、山茱萸不同栽培品种的综合评价 ——灰色模式识别法

以定义的相对关联度为测度, 构建了评价其化学质量的模式识别模型。

1. 选择参考序列

设有 n 个样品, 每个样品有 m 项评价指标, 这样组成了评价单元序列 $[X_{ij}]$ ($i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, m$), 见表 6。用灰度关联法作为评价测度, 首先要选择参考序列。设最优参考序列和最差参考序列分别为 $[X_{sj}]$ 和 $[X_{tj}]$, 最优参考序列的各项指标是 n 个样

表 1 精密度试验结果

实验编号	1	2	3	4	5	X	RSD(%)
积分面积	153055	152545	156659	154559	156005	154565	1.15

表 2 稳定性试验结果

时间	0	0.5	1	2	4	8	X	RSD(%)
积分面积	154559	157593	160021	159987	157453	155298	157485	1.45

表 3 重现性试验结果

实验编号	1	2	3	4	5	X	RSD(%)
积分面积	157481	156014	155016	154565	156659	155947	1.15

表 4 加样回收率试验 ($n=2$)

样品含量 (mg)	加入对照品量 (mg)	测得量 (mg)	加样回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
3.35	3.63	7.0549	101.07		
3.35	2.60	6.1214	102.88		
3.35	2.68	6.0204	99.84	100.42	1.58
3.35	6.13	9.4184	99.35		
3.35	2.29	5.5826	98.98		

品对应指标的最大值, 最差参考序列的各项指标是 n 个样品对应指标的最小值。

2. 原始数据规格化处理

评价指标间通常存在测度不统一的问题, 因此需对原始数据进行规格化: $Y_{ij} = x_{ij} / \bar{x}_j$, 其中 Y_{ij} 为规格化处理后的数据, x_{ij} 为原始数据, \bar{x}_j 为 n 个样品第 j 个指标的均值。

3. 计算关联系数

相对于最优参考序列, 关联系数:

$$\xi_{j(i)}^i = \frac{\Delta_{\min} + \rho \Delta_{\max}}{|Y_{ij} - Y_{sj}| + \rho \Delta_{\max}}$$

其中, $\Delta_{\min} = \min |Y_{ij} - Y_{sj}|$, $\Delta_{\max} = \max |Y_{ij} - Y_{sj}|$, ($i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, m$), ρ 为分辨系数, 取值为 0.5。

相对于最差参考序列, 关联系数:

$$\xi_{j(i)}^i = \frac{\Delta_{\min} + \rho \Delta_{\max}}{|Y_{ij} - Y_{tj}| + \rho \Delta_{\max}}$$

其中, $\min = \min |Y_{ij} - Y_{tj}|$, $\max = \max |Y_{ij} - Y_{tj}|$, ($i=1, 2, \dots, n; j=1, 2, \dots, m$), ρ 为分辨系数, 取值为 0.5。

4. 计算关联度

相对于最优参考序列,关联度:

$$Ri(s) = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \xi_{j(s)}^i$$

相对于最差参考序列,关联度:

$$Ri(t) = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \xi_{j(t)}^i$$

5. 定义并计算相对关联度

Ri(s)越大,表明评价单元序列与最优参考序列的关联度越大,评价单元越佳;反之,Ri(t)越小,评价

表5 山茱萸不同栽培品种药材中多糖、鞣质、浸出物、熊果酸、马钱苷的含量(%)

品种(果型)	样品编号	I	X _I	II	X _{II}	III	X _{III}	IV	X _{IV}	V	X _V	VI	X _{VI}
椭圆形	02101921	8.93		4.14		60.82		44.03		0.392		0.980	
	02101922	9.76		3.68		64.35		42.73		0.208		0.613	
	02101923	7.55	8.75	3.98	3.91	64.29	64.32	46.51	44.42	0.356	0.295	0.652	0.757
	02101924	8.68		3.79		66.32		41.98		0.200		0.803	
	02101925	8.83		3.96		65.82		46.85		0.317		0.739	
圆柱形	02101951	11.24		10.39		65.63		45.51		0.228		0.670	
	02101952	10.18		8.35		66.88		45.15		0.222		0.699	
	02101953	9.29	9.89	8.97	9.37	62.31	63.31	40.45	40.89	0.145	0.247	0.933	0.838
	02101954	8.83		10.06		58.41		33.45		0.406		0.683	
	02101955	9.91		9.08		63.32		40.89		0.232		1.205	
长圆柱形	02101911	8.46		5.01		59.63		30.68		0.179		1.248	
	02101912	10.14		5.27		65.98		48.37		0.211		0.901	
	02101913	10.86	9.42	4.68	4.78	59.82	62.00	39.13	40.27	0.274	0.288	1.144	1.049
	02101914	7.82		4.59		65.69		45.38		0.431		0.783	
	02101915	9.82		4.36		58.90		37.81		0.347		1.171	
短圆柱形	02101941	11.18		5.76		62.89		39.61		0.170		1.013	
	02101942	9.55		3.75		68.09		33.07		0.414		0.653	
	02101943	10.23	10.32	4.71	4.76	63.93	64.97	43.83	38.84	0.242	0.233	0.743	0.751
	02101944	9.99		4.68		64.00		37.44		0.137		0.613	
	02101945	10.65		4.90		65.94		40.25		0.202		0.734	
长梨形	02101961	9.79		8.04		59.60		37.74		0.320		0.622	
	02101962	11.52		9.29		60.56		30.54		0.437		0.556	
	02101963	10.24	10.66	7.91	8.18	61.34	60.08	32.91	34.14	0.297	0.340	0.885	0.904
	02101964	10.47		7.98		59.01		34.17		0.358		1.247	
	02101965	11.28		7.68		58.89		35.34		0.286		1.208	
短梨形	020904034	6.77		10.01		69.71		44.26		0.173		1.221	
	020905061	7.10	6.34	8.98	9.50	63.63	66.67	33.43	38.85	0.242		1.250	
	021006031	5.63		8.91		66.04		39.12		0.539	0.336	1.019	1.127
	021013032	5.86		10.10		67.30		38.59		0.390		1.019	
纺锤形	020904025	11.91		5.25		65.26		43.92		0.237		0.905	
	020904027	10.14	11.06	5.93	5.09	63.37	64.17	43.52	44.38	0.228		1.360	
	02101971	10.18		4.78		63.68		46.13		0.444	0.343	1.144	1.149
	021013081	12.01		4.40		64.37		43.95		0.461		1.187	

注: I 多糖, II 鞣质, III 水溶性浸出物, IV 醇溶性浸出物, V 熊果酸, VI 马钱苷。

单元越好。理想的最佳评价单元应该是该评价单元与最优参考序列的关联程度最大而同时与最差参考序列的关联程度最小,故定义评价单元序列 $\{X_{ij}\}$ 同时相对于最优参考序列 $\{X_{is}\}$ 和最差参考序列 $\{X_{it}\}$ 的相对关联度为:

$$R_i = \frac{ri(s)}{Ri(s)+Ri(t)}, (i=1, 2, \dots, n)$$

显然, R_i 越大,评价单元的化学质量越佳。对于山茱萸不同变异类型有效成分含量数据进行关联度分析,结果见表7。

四、讨论

1. 实验结果

以山茱萸药材中的熊果酸、马钱苷、总多糖、总鞣质、水溶性浸出物、醇溶性浸出物的含量为指标,通过灰色模式识别分析,山茱萸不同栽培品种优劣顺序为:纺锤形果型、短梨型果型、长梨形果型、圆柱

表6 山茱萸不同栽培品种药材中的指标性成分含量

品种(果型)	评价单元序列					
	I	II	III	IV	V	VI
椭圆形	8.75	3.91	64.32	44.42	0.295	0.757
圆柱形	9.89	9.37	63.31	40.89	0.247	0.838
长圆柱形	9.42	4.78	62.00	40.27	0.288	1.049
短圆柱形	10.32	4.76	64.97	38.84	0.233	0.751
长梨形	10.66	8.18	60.08	34.14	0.340	0.904
短梨形	6.34	9.50	66.67	38.85	0.336	1.127
纺锤形	11.06	5.09	64.17	44.38	0.343	1.149

注: I 多糖(%); II 鞣质(%); III 水溶性浸出物(%); IV 醇溶性浸出物(%); V 熊果酸(%); VI 马钱苷(%).

表7 关联度与质量排序

	Ri(s)	Ri(t)	Ri	质量排序
椭圆形	0.549	0.581	0.486	6
圆柱形	0.578	0.485	0.544	4
长圆柱形	0.516	0.486	0.515	5
短圆柱形	0.489	0.625	0.439	7
长梨形	0.600	0.488	0.551	3
短梨形	0.766	0.428	0.642	2
纺锤形	0.824	0.377	0.686	1

形果型、长圆柱形果型、椭圆形果型、短圆柱形果型。

2. 中药的质量评价一直是中药研究以及应用的重要问题,也是难点问题

随着中药来源、化学成分、药理药效及临床应用研究的不断深入,中药的临床功效是“多成份多靶点综合作用”的结果已成为共识,人们已认识到以往对中药“有效成分”的定量分析并不能完全表现出中药的内在质量。因此宏观地从整体上综合分析中药的质量已成为必然的发展趋势。事实上,在人类进入信息科学和系统科学时代以后,人们的科学认识观念正在更新,综合分析和整体分析正成为现代科学发展的必然趋势。在寻求综合评价中药质量的过程中,模式识别是近几年发展起来的一门新的技术,在中药质量评价中具有广阔的发展前景^[3-4]。

中药质量的模式识别,既体现了中药成分复杂、多成份多靶点综合作用的机理,又具有较强的科学性和实践性。但从本实验研究中我们也认识到还有一些困难和问题。首先,对于中药而言不容易采用适当的方法将样品的特征信息完全表现出来,以进行识别分析。在不能全面了解化学成分与药理药效、临床功效之间关系的情况下,对化学成分特征的提取存在困难。如,虽然对山茱萸的化学成分熊果酸、马钱苷、水溶性浸出物、醇溶性浸出物、总多糖、总鞣质等的药理药效进行了一些研究^[5-6],但对它们的量效关系还缺乏研究;有些成分或化学部位存在双向调节作用,如山茱萸中马钱苷小剂量增强免疫,大剂量抑制免疫,而总环烯醚萜苷抑制免疫^[5-6],等等。这在灰色模式识别中给界定最优、最差序列带来困难。因此作者曾把化学成分质量分析和药理药效评价进行对比,结果证明两种结果并不一致^[7]。所以山茱萸各化学成分的药理药效及它们的量效关系有待进一步研究。其次,对于某一中药而言,样品的代表性也是一个影响因素。影响中药成分和药理作用的因素很多,收集到有代表性、足够数量的样品是正确评价中药质量的基础。

3. 以化学成分为指标评价药材质量的结果,不能作为中药优良品种筛选的唯一标准

在中药栽培品种的评价筛选中,除考虑中药的

化学质量外,不同栽培品种的经济指标也应重视。如山茱萸,椭圆形果型、圆柱形果型、长梨形果型树种属丰产型,树长势好,抗性强,挂果较多,果大,是山茱萸主产区河南、浙江、陕西等地的主流品种,同时这些果型具有较好的遗传稳定性。长圆柱形果型,也属丰产型,但调查中发现该类型内还有变异;短圆柱形果型,果小,产量低;短梨形果型,树的长势,抗性 & 产量属中间类型,且分布少,河南、浙江产区少见,陕西产区有分布;纺锤形果型树种属低产类型,长势差,抗性低,挂果少^[18]。因此,在中药栽培品种的评价筛选中,应把中药的化学质量,与药理药效研究结果及不同栽培品种的经济效益指标综合分析。

参考文献

- 1 中华人民共和国国家药典委员会.中华人民共和国药典(2000年版一部).北京:化学工业出版社,2000:22~23.
- 2 王东,林力,袁昌鲁,等.车前子多糖含量的分析.中草药,2002,33(10):896.
- 3 赵宇新,李曼玲.模式识别在中药质量评价中的应用进展.中国中药杂志,2002,27(11):808~810.
- 4 阎平凡,欧阳楷.神经网络研究与模式识别.国外医学.生物医学工程分册,2000,23(1):35~38.
- 5 赵武述,张玉琴,李洁,等.山茱萸成分的免疫活性研究.中草药,1990,21(3):17~20.
- 6 赵武述,张玉琴,赵世萍,等.山茱萸的免疫药理研究(II):总甙部分抑制免疫反应的体外效应.中日友好医院学报,1991,5(2):71.
- 7 赵世萍,陈玉武,郭景珍,等.山茱萸总甙的抗炎免疫抑制作用.中日友好医院学报,1996,10(4):295~298.
- 8 李建民,周勇,张丽,等.山茱萸总甙对 HCV EC 表达 ILAM-1, CD44 的影响.中国免疫学杂志,2000,16(11):604~606.
- 9 Johji Yamahara, Hiroyuki Mibu, Tokunosuke Sawada, et al. Biologically active principles of crude drugs. Antidiabetic principles of corni fructus in experimental diabetes induced by streptozotocin. 药学杂志(日), 1981, 101(1):86~90.
- 10 姚晓渝,杨勇,董福云.山茱萸不同工艺提取物的降血糖作用试验研究.北京中医,1997,(5):53~54.
- 11 刘保林,宋丹妮,禹志领,等.山茱萸醇提物对实验动物血糖、血脂和血小板聚集的影响.中国药科大学学报,1992,23(1):19~21.
- 12 钱东生,罗琳,何敏,等.山茱萸乙醇提取物对 II 型糖尿病大鼠的治疗效应.南通医学院学报,2000,20(4):337~339.
- 13 钱东生,朱毅芳,朱清.山茱萸乙醇提取物对 NIDDM 大鼠骨骼肌 GLUT4 表达影响的实验研究.中国中药杂志,2001,26(12):859~861.
- 14 周京华,李春生,李电东.山茱萸水溶物对老年小鼠 NK 细胞活性、IL-2 活性及 IL-2mRNA 表达的影响.中国药理学杂志,2000,35(9):618.
- 15 张鹏霞,胡逸群,李晶,等.不同制剂的山茱萸对 D-半乳糖致衰大鼠的心肌组织 SOD 活性的影响.黑龙江医药科学,1999,22(1):10.
- 16 张兰桐,任雷鸣,温进坤.山茱萸提取液抗心律失常有效部位的研究.中草药,2001,32(11):1004~1007.
- 17 陈随清.山茱萸种质资源研究及优良品种的筛选.北京中医药大学博士研究生学位论文.2003:54.
- 18 陈随清,董诚明,章运典,等.山茱萸栽培品种调查.中药材,2002,25(5):305~306.

Assessment of chemical Quality of Different Cultivated Varieties of *Cornus officinalis*

Chen Suiqing, Wang Lili, Yang Jin and Ji Chunru

(Henan institute of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 45008, Henan Province, China)

Objective To assess the quality of different cultivated varieties of the chinese medicinal plant *Cornus officinalis* according to the indexes of their chemical components. **Method** To determine the content of Ursolic acid, loganin, total polysaccharides, total tannin and water and ethanol-soluble extracts and comprehensively assess the quality of different cultivated varieties of *Cornus officinalis* by the method of grey pattern recognition. **Result** The quality grade of the said different varieties of *Cornus officinalis* is made **Conclusion** A new method for the assessment of the chemical quality of the above-mentioned different varieties is preliminarily set up.

Key Words: *Cornus officinalis*, cultivated variety, assessment of chemical quality, method of grey pattern recognition

(责任编辑:周立东, 责任编审:陈士林, 责任译审:秦光道)

{World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica} 73