

新疆一枝蒿药材人工种植品种与野生品种的差异性分析^Δ

蔡晓翠^{1*}, 顾政一^{1#}, 贺金华¹, 张瑞萍², 毛艳¹, 康雨彤¹(1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2.天然药物活性物质与功能国家重点实验室/中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

中图分类号 R931.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2224-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.17

摘要 目的:比较新疆一枝蒿药材人工种植品种与野生品种药材之间的差异性,筛选两者之间的差异性组分。方法:采用高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)建立22批不同产地及采摘时间的新疆一枝蒿人工种植品种与野生品种药材的指纹图谱,采用Marker ViewTM软件、SIMCA-P 11.5软件进行主成分分析,分析人工种植及野生一枝蒿主成分特点,筛选差异变量,获得人工种植品种与野生品种的差异组分。结果:建立了22批一枝蒿(12批野生品种,10批人工种植品种)的指纹图谱,经主成分分析,人工种植品种与野生品种分组良好,有明显差异;不同采摘时间的人工种植品种主成分存在一定差异性,主要体现在开花前后,其中花蕾期、盛花期较集中;不同产地的野生品种植株有明显的地域差异,在组分和含量上均有一定差异性;通过正离子模式的矩阵发现了268个变量,负离子模式发现了155个变量,经差异变量提取共找出28组变量,确定出19个变量。结论:人工种植品种与野生品种一枝蒿的主成分有明显差异,主要体现在花期与采摘地等方面,可为新疆一枝蒿药材的规范化种植、原产地保护等提供理论依据。**关键词** 一枝蒿;主成分分析;人工种植;野生;差异变量;高效液相色谱-质谱联用法

Analysis of the Differences between Artificially Cultivated and Wild Xinjiang *Artemisia rupestris*

CAI Xiaocui¹, GU Zhengyi¹, HE Jinhua¹, ZHANG Ruiping², MAO Yan¹, KANG Yutong¹(1.The Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 2.State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines/Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the differences between artificially cultivated and wild Xinjiang *Artemisia rupestris*, and screen the different components. METHODS: HPLC-MS was adopted to establish the fingerprints of artificially cultivated and wild Xinjiang *A. rupestris* from different origin and harvest time. Principal component analysis was conducted by Marker ViewTM software and SIMCA-P 11.5 software, the characteristics of principal components were analyzed, difference variable was screened, and different components of artificially cultivated and wild varieties were obtained. RESULTS: Fingerprints of 22 batches of *A. rupestris* (12 batches of wild varieties, 10 batches of artificially cultivated varieties) were established. According to the principal component analysis, artificially cultivated and wild varieties were well grouped, with obvious differences; the principal components of artificially cultivated varieties with different harvest time showed certain difference, mainly before and after flowering, concentrating in to-be flowering and full flowering periods. Wild varieties from different origins had obvious regional difference, showing certain differences in composition and content. 268 variables were found in matrix of positive ion mode and 155 in negative ion mode. 28 groups of variables were extracted by difference variable, and 19 variables were determined. CONCLUSIONS: Artificially cultivated and wild varieties have obvious difference in principal component, mainly in flowering period and picking places. It can provide theoretical basis for the standardized cultivation and origin protection of Xinjiang *A. rupestris*.

KEYWORDS *Artemisia rupestris*; Principal component analysis; Artificially cultivation; Wild; Different variables; HPLC-MS

新疆一枝蒿(*Artemisia rupestris* L.)为菊科植物岩蒿(*Artemisia brachyloba* Franch)的地上部分或全草,主要分布在我国新疆,哈萨克斯坦、蒙古、俄罗斯、欧洲各国亦有分布。其维吾尔药名为“一孜乎艾曼尼”,具有清热退烧、消炎止痛、健胃消食、凉血解毒、活血化淤之功效,主治热性或胆液质性或血液质性疾疾病,如热性感冒、肝炎、胃疼、荨麻疹等,对肝炎和感冒的疗效尤为显著^[1-2]。

Δ 基金项目:国家自然科学基金新疆联合基金资助项目(No.U1303224);新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(No.KY2015123)

* 助理研究员。研究方向:民族药质量控制。电话:0991-2322941。E-mail:cxcmaro@sina.com

通信作者:研究员,硕士。研究方向:民族药研究与开发。电话:0991-2828537。E-mail:zhengyi087@126.com

文献报道新疆一枝蒿全草含有黄酮类、倍半萜类、氨基酸、挥发油等多种成分,对于一枝蒿药材的指纹图谱及化学成分研究也已有报道^[3],但人工种植品种与野生品种之间成分是否存在差异未见报道。因此,在本研究中笔者基于主成分分析法(PCA)收集了22个不同产地不同采摘时间的一枝蒿药材,运用高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)对一枝蒿药材进行多类别、多成分定性分析,确定人工种植药材与野生药材的差异性,为筛选、评价人工培育技术及工艺研究提供理论依据,为今后一枝蒿药材的规范化种植、原产地保护等提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

QTRAP型四极杆-线性离子阱串联质谱仪(美国

Sciex公司);1260系列HPLC仪,包括四元低压梯度泵、光电二极管阵列检测器、在线真空泵、柱温箱、Chemstation型色谱工作站(美国Agilent公司);BP211D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂与药材

一枝蒿酮酸对照品(中国医学科学院新疆理化研究所,批号:111833-201105,纯度:100%);绿原酸(批号:110753-20041,纯度:99.4%)、木犀草素(批号:11720-201106,纯度:99.7%)、紫花牡荆素(批号:111554-200503,纯度:98.9%)、芹菜素(批号:111901-201102,纯度:99.2%)对照品均购于中国食品药品检定研究院;甲酸和甲醇为色谱纯;水为纯化水。一枝蒿药材来源于新疆各地(人工种植的一枝蒿药材均采自新疆维吾尔自治区乌鲁木齐加斯特西部药业有限公司种植基地),由新疆药物研究所贺金华研究员鉴定为菊科蒿属植物一枝蒿(*Artemisia rupestris* L.)。一枝蒿药材来源信息见表1。

表1 一枝蒿药材来源信息

Tab 1 Source information of *A. rupestris* medicinal material

编号	产地	品种	采摘日期(人工种植品种的花期)
1	乌鲁木齐	野生	2009-09-04
2	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2010-07-05(花盛期)
3	甘沙子	野生	2010-07-10
4	伊犁	野生	2010-07-26
5	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2009-09-25(花衰期)
6	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2009-09-10(花衰期)
7	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2010-05-05(盛花期)
8	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2010-07-10(盛花期)
9	甘沙子	野生	2010-05-05
10	哈密	野生	2010-07-10
11	阜康	野生	2010-06-05
12	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2012-04-18(蕾前)
13	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2012-05-07(盛花期)
14	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2012-04-15(花前)
15	伊犁野生	野生	2012-05-15
16	昌吉	野生	2012-05-15
17	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2012-07-19(花衰期)
18	阜康	野生	2012-06-04
19	富蕴县	野生	2012-07-15
20	乌鲁木齐加斯特	人工种植	2012-05-22(盛花期)
21	哈密	野生	2012-05-04
22	吉木乃县北沙窝	野生	2012-05-09

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.2%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 92% B→70% B; 5~25 min, 70% B→40% B; 25~40 min, 40% B→20% B; 40~45 min, 20% B);流速:1.0 mL/min,柱后分流3:1;柱温:30℃;检测波长:280 nm;进样量:10 μL。

2.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源;扫描方式:多反应监测;离子源温度:400℃;雾化气压力:60.00 psi(1 psi=6.895

kPa);辅助气压力:40.00 psi;扫描方式:全扫描监测(Q1 Scan)。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品贮备液 精密称取绿原酸、木犀草素、一枝蒿酮酸、紫花牡荆素和芹菜素对照品适量,加甲醇分别制成质量浓度为2.62、0.593、5.00、1.192、1.219 mg/mL的对照品贮备液,备用。

2.3.2 供试品溶液 称取一枝蒿药材粉末约2.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入50%甲醇溶液50 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)45 min,放冷,称定质量,用50%甲醇溶液补足,摇匀,离心(离心半径为5 cm, 2 000 r/min) 5 min,取上清液,即得。

2.4 指纹图谱的建立

参考文献[4-7]的方法。称取“1.2”项下22批一枝蒿药材粉末,每份约2.5 g,精密称定,按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件及“2.2”项质谱条件下分别于正离子检测模式和负离子检测模式下进样测定,记录色谱图及各共有峰的峰面积,获得22批样品的指纹图谱,详见图1(以20号样品为例)。

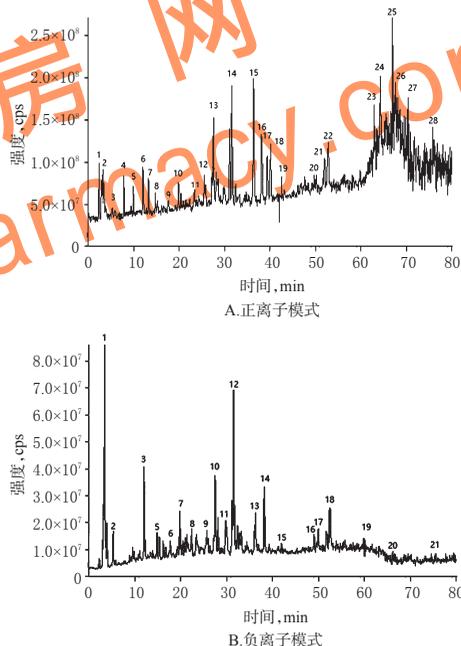


图1 一枝蒿的总离子流图

Fig 1 Total ion flow chromatogram of *A. rupestris*

2.5 主成分分析

2.5.1 人工种植与野生品种成分分析 采用HPLC-MS法分析22批一枝蒿样本,得到正、负离子检测模式的原始数据,将原始数据导入统计分析软件Marker View™中,以保留时间和质荷比(*m/z*)形成矩阵中每一列(变量)的标识,将样品编号作为矩阵的行,获得二维数据矩阵。将得到的二维数据矩阵输入SIMCA-P 11.5软件进行多变量统计分析。首先采用PCA行无监督的数据分析,观察各组数据的聚类,结果无离群样本;之后选用偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)进行有监督的数据分析,并采用置换验证

防止模型过度拟合,结果正、负离子模式下人工栽培与野生品种均分组良好、无离群样本点且存在明显差异。22批药材主成分分析结果见图2(图中t[1]、t[2]表示每个样品在主成分1、2上投影的得分值,下同)。

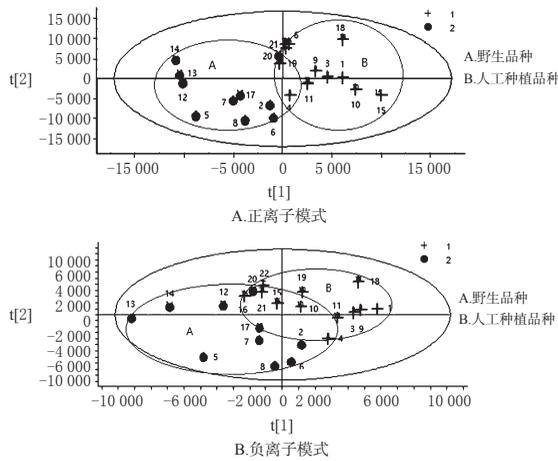


图2 22批药材主成分分析结果

Fig 2 Results of principal component analysis of 22 batches of medicinal materials

2.5.2 人工种植品种成分分析 将人工种植品种的10个样本一枝蒿药材数据标准化后进行PCA分析,所得的PCA结果见图3。

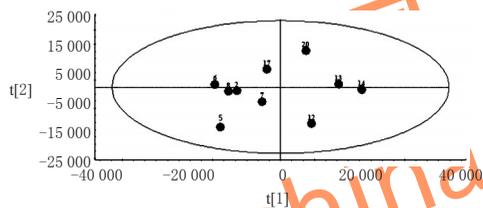


图3 10批人工种植药材主成分分析结果

Fig 3 Results of principal component analysis of 10 batches of artificially cultivated medicinal materials

从图3可以看出,不同采摘时间的人工种植新疆一枝蒿药材成分存在一定差异性,主要体现在开花前后,其中花蕾期、盛花期差异较集中,这对指导人工种植品种的种植及采摘时间有重要意义。

2.5.3 野生品种成分分析 将野生品种的12个样本一枝蒿药材数据标准化后进行PCA分析,所得的PCA结果见图4。

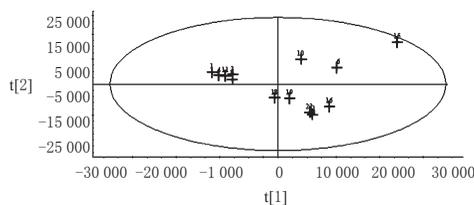


图4 12批野生品种药材主成分分析结果

Fig 4 Results of principal component analysis of 12 batches of wild medicinal materials

从图4可以看出,不同产地的野生品种植株,有5个产地植株的主成分分布比较集中,有明显的地域差异,每个样品点较为分散,说明各野生植株成分差别较大。

2.6 差异性分析

通过正交校正的OPLS-DA模型的样品分散点载荷图(S-plot)、特征值(VIP)、置信区间的载荷图与原始变量轮廓图进行筛选。首先,变量的VIP>1.0被认为该变量对模型有较大影响,为关注差异明显的变量,只选择VIP>1.0的变量;其次,通过置信区间的载荷图进行可靠性验证;此后,对筛选的变量采用原始变量轮廓图进一步确认,删除两组数据严重重叠的变量。结果,通过正离子检测模式获得的HPLC-MS谱生成的矩阵中发现了268个变量,负离子检测模式中发现了155个变量;采用Marker View™软件对差异变量行t检验,筛选出在两组间具有明显差异的变量;采用XCMS Online软件中CAMERA分析,删除加合离子、同位素离子或碎片离子,确定显著性差异组分。结果共找出28组变量,确定了19个变量,详见表2。

表2 人工种植与野生品种一枝蒿药材的变量

Tab 2 Variables of artificially cultivated and wild *A. rupestris* medicinal material

编号	质量数,amu	可能的化合物
1	316	甲基糖皮质激素
2	234	12-羟基-4,11(13)-苦碟子内酯-3-one
3	638	P-己糖-葡萄糖醛酸
4	622	金合欢素-己糖-葡萄糖醛酸
5	533	芹菜素-6,8-di-C-戊糖苷
6	522	二羟基二甲氧基黄酮-己糖
7	432	高良姜素-3-己糖
8	638	金合欢素-7-O-芸香糖苷
9	592	蒙花苷
10	285	木犀草素
11	248	一枝蒿酮酸
12	330	天师酸
13	374	紫花牡荆素
14	234	针叶春菊酸
15	314	5,7-二羟基-3,4-二甲氧基黄酮
16	214	Z/E螺缩酮烯醚多炔
17	314	二羟基二甲氧基黄酮
18	446	田蓟苷
19	356	阿魏酸-4'-O-葡萄糖苷

3 讨论

3.1 PCA法的优势

PCA法是一种应用广泛的化学计量学方法,可用于简化数据、快速实现模式化关系的可视化识别,是综合评价的主要手段之一,现已广泛应用于中药复杂体系的分析中。其利用降维思想,通过研究指标体系的内在结构关系^[8-9],在不损失或尽量少损失原有指标信息的情况下把多指标转化成少数几个互相独立而且包含原有指标大部分信息(70%~85%)的综合指标,可避免在综合评价时主观加权的弊端^[10-11]。本研究采用HPLC-MS法结合PCA分析,对不同产地及不同采摘时间的种植品种

新疆一枝蒿有效部位主要成分的制备与鉴定^Δ

戎晓娟^{1*}, 顾政一¹, 贺金华^{1#}, 杨璐²(1.新疆维吾尔自治区药物研究所药物分析室, 乌鲁木齐 830004; 2.新疆医科大学药学院药剂物化教研室, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2227-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.18

摘要 目的:建立新疆一枝蒿有效部位主要成分的快速识别和高效制备的方法,为民族药的研究提供参考。方法:采用液相-高分辨质谱(LC-HRMS/MS)法对一枝蒿有效部位的主要成分进行初步推测,利用高效液相色谱、紫外光谱和质谱法将部分化合物与相应对照品进行比对分析确定其名称;对尚未确定的化合物采用柱分离及制备液相色谱技术快速获得单体,并确定其结构。结果:从一枝蒿有效部位分离出5个化合物,鉴定出其中2个化合物为艾黄素和紫花牡荆素;获得1个单体化合物(得率为0.35 mg/g,纯度为98.5%),经结构确证为6-去甲氧基-4'-O-甲基茵陈色原酮-7-O-β-D-葡萄糖苷。结论:本试验建立的方法实现了目标成分的快速分离、鉴定、制备,可应用于民族药复杂的物质基础研究。

关键词 一枝蒿;液质联用;制备液相色谱;分离;鉴定;单体制备;结构确证

Preparation and Identification of Main Ingredients in Effective Parts of Xinjiang *Artemisia rupestris*

RONG Xiaojuan¹, GU Zhengyi¹, HE Jinhua¹, YANG Lu²(1.Dept. of Pharmaceutical Analysis, the Xinjiang Institute of Material Medica, Urumqi 830004, China; 2.Dept. of Pharmacology and Physiology, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

与野生品种的新疆一枝蒿药材成分进行了分析比较,能较全面地反映药材样本的信息。

3.2 野生品种比较

由试验结果可知,不同产地的野生品种植株,有明显的地域差异,在组分和含量上均有一定差异性(含量差异性将另文发表);采摘时记录结果显示,不同产地的植株在形态上也有很大的差异。此差异性可能与产地的地理环境、气候、光照时间、湿度、土壤酸碱度等有关。

3.3 人工种植品种不同采摘期比较

由试验结果可知,不同采摘时间的人工种植新疆一枝蒿药材存在一定差异性,不同时期的药材主要成分含量变化明显,此次实验确定人工种植品种药材的最佳采摘时间为花蕾期和花盛期。这一结果可用于指导一枝蒿药材的人工种植及采摘,从而保证药材的内在质量及临床疗效,并可替代野生药材从而保护生态资源。

3.4 人工种植品种与野生品种差异性分析

一枝蒿在主成分空间中分为2个不同的区域,通过差异变量提取共找出28组变量,确定出19个变量,基本实现了人工种植品种与野生品种的区别,为药材的规范化种植、原产地保护等提供了理论依据,为不同一枝蒿药材的质量评价及资源的合理利用提供了依据。

参考文献

^Δ 基金项目:国家自然科学基金新疆联合基金资助项目(No. U1303224)

* 助理研究员, 硕士。研究方向:药物分析。电话:0991-2326572。E-mail:109303620@qq.com

通信作者:研究员, 硕士。研究方向:药物分析。电话:0991-2326572。E-mail:hejh1216@163.com

- [1] 刘勇明,刘伟新,伊吾提·依克木,等.中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册[M].乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:9.
- [2] 唐晓义,王晓军,康喜亮,等.新疆一枝蒿的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2008,44(3):523.
- [3] 宋卫霞,吉腾飞,司伊康,等.新疆一枝蒿化学成分的研究[J].中国中药杂志,2006,31(21):1790-1792.
- [4] 热依木古丽·阿布都拉,仲婕,佐艾热·艾孜江,等.新疆一枝蒿的质量标准研究[J].医药导报,2011,30(9):1200-1202.
- [5] 杨建波,吉腾飞,宋卫霞,等.新疆一枝蒿化学成分的研究[J].中草药,2008,39(8):1125-1127.
- [6] 蔡晓翠,贺金华,顾政一,等. HPLC-MS/MS法同时测定新疆一枝蒿药材中5个成分的含量[J].药物分析杂志,2013,33(10):1672-1676.
- [7] 贺飞,侯桂萍,仲婕,等.新疆一枝蒿药材高效液相色谱指纹图谱研究[J].医药导报,2010,29(7):854-857.
- [8] 张晓瑞,张婧涵,李国信,等.主成分分析法用于射干药材评价研究[J].中国药业,2014,23(14):37-38.
- [9] 王璐璐,刘炳周,王满,等.主成分分析结合均匀设计法用于优选桂芍巴布贴制备工艺的研究[J].中草药,2016,47(10):1682-1689.
- [10] 宋延秋.主成分分析法用于黄芩饮片质量控制研究[J].中国药房,2011,22(43):4093-4095.
- [11] 唐策,苏锦松,杨娟,等. UPLC-PDA法测定藏药翼首草不同药用部位中齐墩果酸和熊果酸的含量[J].中国药房,2017,28(7):929-932.

(收稿日期:2016-07-11 修回日期:2017-03-30)
(编辑:刘明伟)