

HPLC 法鉴别铁棍山药与太谷山药

贾永芳^{1,2}, 过治军^{1,2}, 马玉坤¹, 赵文静¹

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007;

2. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

摘要: 采用高效液相色谱(HPLC)法研究铁棍山药与太谷山药特征图谱, 通过索氏提取法、蒸馏法和超声提取法提取并比较 2 种山药间成分组成及其含量差异, 为铁棍山药的品种鉴定提供依据。使用 Agilent ODS 色谱柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), 以甲醇-水(95:5)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 215 nm, 对 2 种山药的成分进行 HPLC 分析。结果表明, 超声提取法效果较好。2 种山药图谱峰的个数和出峰时间有一定区别, 峰面积有明显差别, 可以作为指纹图谱来甄别 2 种山药, 所建立的方法可用于铁棍山药的品种鉴定。铁棍山药和太谷山药中均没有检测到皂苷元。

关键词: 高效液相色谱; 铁棍山药; 太谷山药; 成分

中图分类号: S632.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)01-0102-04

Identification of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegün and *D. opposita* Thunb. cv. Taigu by HPLC

JIA Yong-fang^{1,2}, GUO Zhi-jun^{1,2}, MA Yu-kun¹, ZHAO Wen-jing¹

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs of Henan Province University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: To evaluate the quality of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegün, HPLC method was established for the species identification by comparing the composition and content between *D. opposita* Thunb. cv. Tiegün and *D. opposita* Thunb. cv. Taigu, which was obtained respectively by Soxhlet extraction, distillation extraction, and ultrasonic extraction technology. The analysis was performed on a Agilent ODS-C18 column (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm), using methanol-water (95:5) as the mobile phase, with gradient elution, at a flow rate of 1.0 mL/min, at a column temperature of 30 $^{\circ}$ C, and the detection wavelength at 215 nm. The results showed that ultrasonic extraction technology was better than the other two extraction technology. There were some differences between *D. opposita* Thunb. cv. Tiegün and *D. opposita* Thunb. cv. Taigu in the number and time of peaks, and the area of peak in *D. opposita* Thunb. cv. Taigu was more than that in *D. opposita* Thunb. cv. Tiegün. This method could be used to identify *D. opposita* Thunb. cv. Tiegün. Sapogenin was not found in the two kinds of yams.

Key words: high performance liquid chromatography(HPLC); *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegün; *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Taigu; components

怀山药(*Dioscorea opposita* Thunb.), 为薯蓣科薯蓣属的一种多年生缠绕草质藤本植物, 是我国著名的“四大怀药”之一, 主产于河南温县等地。在

长期的种植过程中, 形成了丰富的品种资源, 如铁棍山药、太谷山药、47 号山药等^[1], 这些品种从形态到产量、从食用到药用均有很大差异。其中, 铁棍山药

收稿日期: 2012-06-29

基金项目: 河南省教育厅自然科学基金项目(2010B360002); 河南师范大学青年科学基金项目(2011QK21)

作者简介: 贾永芳(1978-), 女, 河南卫辉人, 讲师, 在读博士, 主要从事分子遗传学研究。E-mail: jyf324@126.com

(*Dioscorea opposita* Thunb. cv. Tiegun) 是我国山药种质资源中的特有种质, 含有皂苷、粘液质、胆碱等几十种营养成分, 药食兼优^[2]。由于铁棍山药产量较低, 许多药农和药商常用产量高但药用价值低或没有药用价值的山药来充当铁棍山药, 比如在河南地区以太谷山药(*Dioscorea opposita* Thunb. cv. Taigu) 冒充铁棍山药的现象普遍存在, 致使目前怀山药市场较为混乱。此外, 栽培的山药也普遍存在种源不明等问题, 因此, 建立铁棍山药的质量标准体系十分必要。现行药典仅有山药简单的性状和物理鉴别方法^[3], 没有鉴别铁棍山药与其他山药的有效方法。另外, 近些年国内外的研究多集中在怀山药活性成分方面^[4-10], 而利用高效液相色谱法鉴别铁棍山药与其他怀山药的方法, 目前尚未见报道。为了阐明铁棍山药药用成分与保健作用的物质基础, 摸索其药用成分的质量体系指标, 利用高效液相色谱法, 鉴别铁棍山药与太谷山药的成分差异, 对制定铁棍山药质量标准、规范铁棍山药市场、控制山药质量、保护铁棍山药品牌和药农利益具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 主要仪器、试剂

皂苷元标准品(纯度 95%) 购于美国 Sigma 公司; 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。高效液相色谱仪: 美国 Agilent 1200 型, UV 检测器; 铁棍山药和太谷山药由河南师范大学生命科学学院李明军教授惠赠。

1.2 材料预处理方法

将洗净的铁棍山药和太谷山药切成 2~3 mm 厚的薄片, 60 °C 干燥。粉碎机粉碎后过 380 μ m 筛备用。

1.3 样品成分的提取

1.3.1 索氏提取法 分别称取铁棍山药与太谷山药粉各 4.000 0 g, 滤纸包好后置于索氏提取仪中, 用 90% 的甲醇 150 mL, 在 92 °C 下提取 10 h, 提取液减压过滤后低温旋蒸至约 10 mL。再加入 5% HCl-甲醇(1:1) 溶液 200 mL, 83.5 °C 下回流 5 h。之后用 0.1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至 8, 将溶液分为 2 份约 100 mL, 各用 50 mL 氯仿萃取 3 次, 合并萃取液并旋蒸至干, 用甲醇定容至 10 mL, 待用。

1.3.2 回流提取法 分别称取铁棍山药与太谷山药粉各 4.000 0 g, 置于蒸馏烧瓶中, 加入 90% 的甲醇 150 mL, 92 °C 恒温水浴 10 h, 提取液减压过滤后低温旋蒸至 10 mL。其余步骤如 1.3.1 方法所示,

用甲醇定容至 10 mL, 待用。

1.3.3 超声提取法 分别称取铁棍山药与太谷山药粉各 4.000 0 g, 置于加有回流装置的蒸馏瓶中, 加入 90% 的甲醇 50 mL, 超声器中于 30 °C 下提取 2 h。取上清, 蒸馏瓶内再加入 50 mL 的甲醇, 重复提取 2 次。合并 3 次提取液, 减压过滤, 旋蒸至约 10 mL。余下步骤如 1.3.1 方法, 甲醇定容至 10 mL, 待用。

1.4 标准品溶液的制备

精密称取皂苷元标准品 43.8 mg 置 500 mL 容量瓶中, 甲醇定容, 制成质量浓度为 0.087 6 mg/mL 的对照品溶液。

1.5 色谱条件

色谱分析设定时间为 20 min, 色谱柱: Agilent ODS(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm); 甲醇-水(95:5); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 215 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μ L。

2 结果与分析

2.1 仪器精密度、标准品和样品稳定性及重复性考察结果

吸取皂苷元标准溶液 5、10、15、20 μ L 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积, 以标准溶液进样量(X) 为横坐标, 峰面积分(Y) 为纵坐标, 经计算得回归方程为 $Y = 16.137X + 2.539$, $r = 0.9995$, 皂苷元标准品在 0.438~1.752 μ g 呈现良好的线性关系。

吸取标准品溶液连续进样 5 次, 每次 20 μ L, 测定峰面积, 皂苷元峰面积的相对标准差(RSD) 为 2.03%, 表明仪器精密度良好。

吸取配制完成的标准品溶液, 于配制后 0 h 开始进样, 测定峰面积, 以后每 2 h 测定 1 次直至 10 h。皂苷元峰面积的 RSD 为 1.98%, 表明供试品溶液至少 10 h 内稳定。

取皂苷元标准溶液和样品溶液各 5 份, 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, RSD 分别为 1.67% 和 2.15%, 表明选用的方法重复性良好。

2.2 铁棍山药和太谷山药成分比较

2.2.1 不同提取方法对铁棍山药成分提取的影响

如图 1—3 和表 1 所示, 用不同方法所得到的铁棍山药提取物量有一定的差异, 所测得的有机物质的种类(峰的个数) 大部分相同, 在测得的 13 种物质中索氏提取法共测得 11 种, 缺少 2.535、8.110 min 左右的峰; 回流提取法测得 11 种, 缺少 8.110、10.018 min 的峰; 而超声提取法测得 10 种, 缺少 2.451、2.874、10.018 min 左右的峰。总峰面积以超声提取法最大, 而且在相同保留时间, 超声提取法峰面积最大。

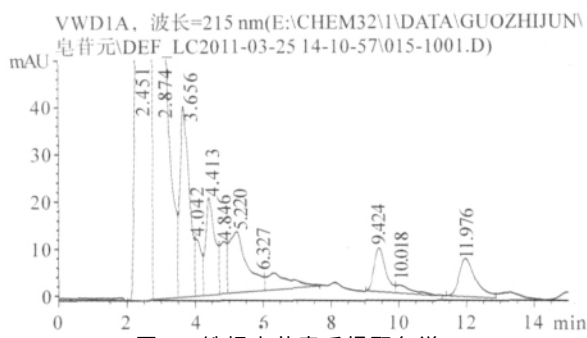


图 1 铁棍山药索氏提取色谱

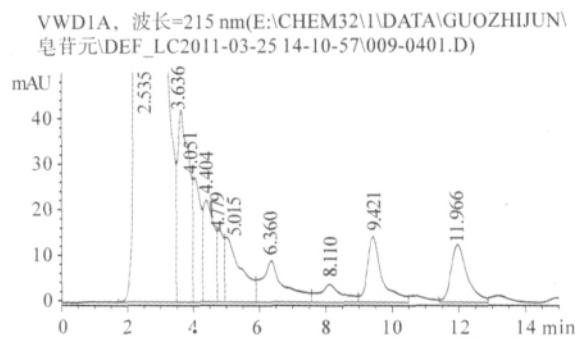


图 3 铁棍山药超声提取色谱

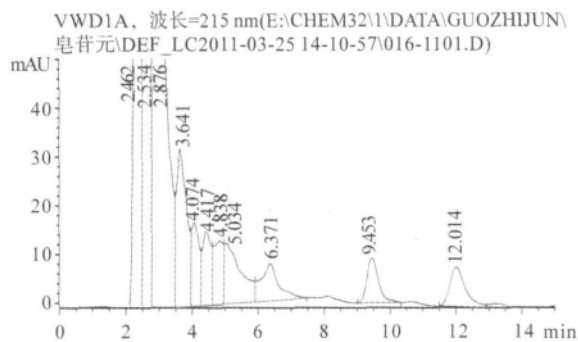


图 2 铁棍山药回流提取色谱

2.2.2 不同提取方法对太谷山药成分提取的影响

用不同提取方法共提取太谷山药 12 种成分(表 1),索氏提取法为 11 种,缺少 8.090 min 的峰;回流提取法为 9 种,缺少 2.455、2.863、8.090 min 的峰;超声提取法为 9 种,缺少 2.455、2.863、5.018 min 左右的峰。超声提取法所得总峰面积最大,且在相同(相近)出峰时间,以超声提取法所得峰面积最大(图 4—6)。

表 1 不同提取工艺下铁棍山药和太谷山药成分提取量比较

名称	索氏提取法				回流提取法				超声提取法			
	铁棍山药		太谷山药		铁棍山药		太谷山药		铁棍山药		太谷山药	
	时间/ min	峰面积/ (AU·s)	时间/ min	峰面积/ (AU·s)	时间/ min	峰面积/ (AU·s)	时间/ min	峰面积/ (AU·s)	时间/ min	峰面积/ (AU·s)	时间/ min	峰面积/ (AU·s)
1	2.451	11.457	2.455	22.069	2.462	15.069						
2			2.526	21.096	2.534	17.431	2.539	63.734	2.535	63.785	2.533	79.984
3	2.874	6.403	2.863	4.754	2.876	7.825						
4	3.656	0.778	3.644	0.871	3.641	0.703	3.615	0.600	3.636	0.970	3.632	0.915
5	4.042	0.155	4.078	0.360	4.074	0.278	4.056	0.352	4.051	0.510	4.112	0.537
6	4.413	0.398	4.441	0.302	4.417	0.276	4.407	0.356	4.404	0.510	4.452	0.450
7	4.846	0.154	4.826	0.267	4.838	0.263	4.818	0.195	4.779	0.411	4.826	0.860
8	5.220	0.483	5.018	0.458	5.034	0.431	5.038	0.434	5.015	0.350		
9	6.327	0.171	6.378	0.264	6.371	0.288	6.369	0.386	6.360	0.484	6.369	0.635
10									8.110	0.159	8.090	0.110
11	9.424	0.221	9.460	0.185	9.453	0.221	9.416	0.177	9.421	0.425	9.445	0.259
12	10.018	0.060										
13	11.976	0.276	12.023	0.237	12.014	0.262	11.964	0.237	11.966	0.401	11.987	0.316
总峰面积/ (AU·s)		20.556		50.863		43.047		66.471		68.005		84.066

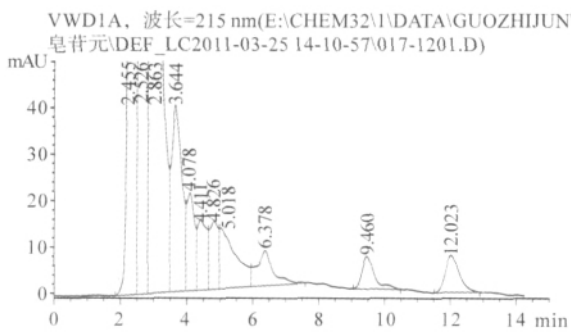


图 4 太谷山药索氏提取色谱

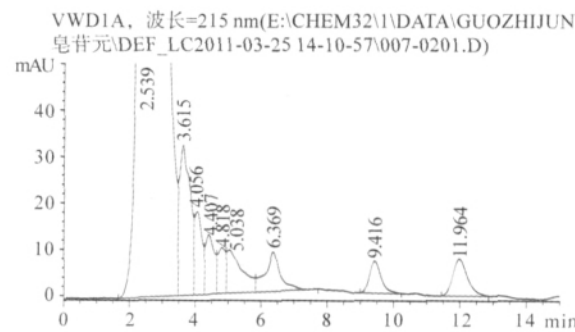


图 5 太谷山药回流提取色谱

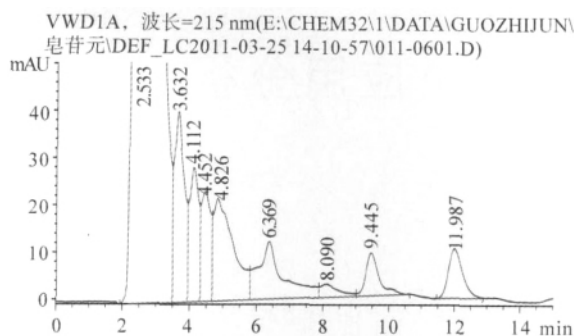


图 6 太谷山药超声提取色谱

2.2.3 铁棍山药与太谷山药谱图比较 铁棍山药与太谷山药谱图有一定区别,铁棍山药峰的个数比太谷山药多 1 个,太谷山药缺少 10.018 min 的峰;在分离较好的出峰时间 9.424、11.976 min 左右,铁棍山药的峰面积大于太谷山药的。各提取方法中太谷山药峰的总面积则大于铁棍山药的。标准品皂苷元出峰时间为 11.117 min(图 7),2 种山药采用 3 种提取方法均没有得到标准品皂苷元的峰,其他峰由于无相应的对照品暂时无法确认为何种皂苷。

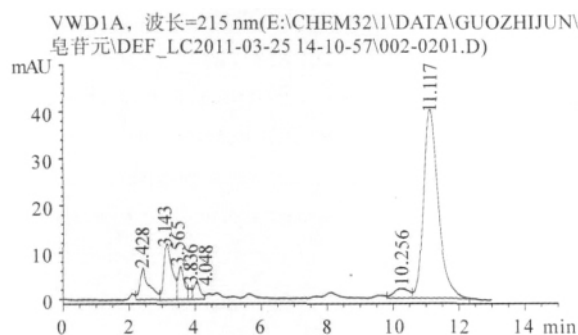


图 7 皂苷元标准品色谱

3 结论和讨论

每种山药都有其特定的成分组成^[11]。本试验结果显示,虽然在 2 种山药中没有检测到皂苷元,但是在皂苷元标准品出峰的前后各有 1 个明显的峰,铁棍山药皂苷元成分的 HPLC 检测目前暂未发现报道,很可能在 9.42 min 和 11.97 min 附近出现的

峰为与皂苷元结构相近的一种生物苷,但有待进一步验证。综合分析 2 种山药的 HPLC 色谱图发现,每种山药的成分组成及比例均有其独特性,而且采用相同提取方法的铁棍山药和太谷山药皂苷组成又有其相似性,2 种山药图谱峰的个数和出峰时间有一定区别,峰面积有明显差别,因此可以通过铁棍山药的指纹图谱(高效液相)来鉴定铁棍山药。3 种提取方法比较,以超声提取效果较好,可以为铁棍山药的品种鉴定和指纹图谱建立提供参考。

参考文献:

- [1] 韩锁义,张新友,王素霞,等. 河南省怀山药生产现状[J]. 河南农业科学,2011,40(9):109-111.
- [2] 杭悦宇,杭秉茜. 我国山药类药材对动物降血糖和降血脂的作用[J]. 植物资源与环境,1994,3(4):9.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:48-49.
- [4] 牛建平,孙瑞霞,孙剑辉. 气相色谱-质谱法分析怀山药中的有机成分[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2007,35(2):122.
- [5] 白冰,李明静,王勇,等. 怀山药化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(11):1272.
- [6] 白冰,刘绣华,王勇,等. 怀山药化学成分研究(II)[J]. 化学研究,2008,19(3):67.
- [7] Ma C, Wang W, Chen Y Y, et al. Neuroprotective and antioxidant activity of compounds from the aerial parts of *dioscorea opposita*[J]. J Nat Prod, 2005, 68:1259.
- [8] 刘晓颖,谢继锋,闫睿文,等. 电感耦合等离子体原子发射光谱法测定山药中人体必需元素含量[J]. 现代农业科技,2007(21):8.
- [9] 朱海旺,霍秀文. 长山药茎休眠期相关酶活性及内源激素含量变化[J]. 华北农学报,2011,20(2):198-202.
- [10] 张红英,王学兵,崔保安,等. 山药多糖对 PRRSV 灭活苗免疫猪抗体和 T 细胞亚群的影响[J]. 华北农学报,2010,19(2):236-238.
- [11] 陈斌,程林,蔡宝昌. 不同产地来源山药气-质联用图谱的比较研究[J]. 中国医药学刊,2006,24(5):814.