

RP-HPLC同时测定藏药手掌参中4种活性成分的含量及气候因子相关分析

张海先, 王爽, 王长生, 吉文, 许小冰, 曾锐*
(西南民族大学民族医药研究院, 成都 610041)

[摘要] **目的:**建立同时测定不同产地手掌参药材中多指标成分的质量控制方法,分析气候因子对手掌参分布活性成分含量的影响。**方法:**采用HPLC, Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以0.1%醋酸水溶液和甲醇为流动相梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长270 nm,柱温30 ℃。**结果:**4种有效成分的线性关系均良好,精密密度、稳定性和重复性的RSD均<2.50%,平均加样回收率为96.97%~101.55%,RSD均<1.46%;同时使用Diva-Gis提取不同产地手掌参药材的19个气候数据和3个地理数据进行聚类分析,经与样品有效成分含量测定的计量化学结果比较,表明不同产地手掌参药材各指标成分含量差异较大,通过气候因子的主成分分析和聚类分析,发现其与手掌参的活性成分的含量具有一定的相关性。**结论:**该方法准确,重复性好,可为科学、全面评价手掌参药材的品质提供参考,对进一步研究手掌参资源的可持续利用具有指导意义。

[关键词] 手掌参; 天麻素; 腺苷; 对羟基苯甲醇; 对羟基苯甲醛; 高效液相色谱; 气候因子

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0065-05

[doi] 10.11653/syjf2014040065

Simultaneous Determination of Four Active Constituents in Tibetan Medicine *Gymnadenia conopsea* by RP-HPLC and Climatic Factor Analysis

ZHANG Hai-xian, WANG Shuang, WANG Chang-sheng, JI Wen, XU Xiao-bing, ZENG Rui*
(Ethnic Medicine Institute of Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quality control method for simultaneous determination of multi-index component in *Gymnadenia conopsea* from different regions, and analyze the climatic factors on the impact of *G. conopsea*'s active ingredient content. **Method:** The separation was performed on a Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm). Methanol-0.1% H₃PO₄ was used as the mobile phase with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 270 nm and the column temperature was maintained at 30 ℃. **Result:** The linear range was precise. The stability and repeatability were less than 2.50%. The average recoveries were ranged from 96.97% to 101.55%, and the RSD was less than 1.46%. The 19 kinds of climatic factors and 3 kinds of geographic factors were used cluster analysis, *Gymnadenia conopsea* samples were analyzed by Diva-Gis. Experimental results showed that the index component content from different places of origin had remarkable differences. Meanwhile climatic factors also had relevance participate in the active ingredient content of *G. conopsea*. **Conclusion:** This method is accurate and reproducible, which presented a scientific and comprehensive evidence for controlling the quality and using the sustainable of *G. conopsea*.

[Key words] *Gymnadenia conopsea*; gastrodin; adenosine; 4-hydroxybenzyl alcohol; 4-hydroxybenzaldehyde; RP-HPLC; climatic factors

[收稿日期] 20130727(006)

[基金项目] 国家大学生创新项目(201210656022);西南民族大学中央高校基本科研业务费优秀学生培养项目(12ZYXS76)

[第一作者] 张海先, 硕士研究生, 从事民族药资源开发研究, Tel:13881922559, E-mail:511563880@qq.com

[通讯作者] *曾锐, 博士, 副教授, 从事民族药资源开发研究, Tel:18081975370, E-mail:mackzeng@gmail.com

手掌参为兰科植物手掌参的干燥块茎,性味甘平,入肺、脾和胃经,具有益气补血、生津止渴等功效^[1],主治肺虚咳喘、虚劳消瘦、神经衰弱、久泻、失血、带下、乳少、慢性肝炎等症^[1-2]。主要分布于我国西藏东部、四川西部、青海东部、云南西北部及华北、东北等区^[3]。手掌参块茎主要含有二氢茛菪类、菲类、苷类、芳香族化合物等^[2],其中天麻素是主要有效成分之一^[4-5],对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛和天麻素都具有抗惊厥、镇静、镇痛、提高记忆力等生物活性^[6-8],腺苷具有舒张血管、降低血压、减慢心律、松弛血管平滑肌等生理活性和心脏保护效应^[9]。目前已有用 HPLC 测定手掌参中天麻素^[5]含量以及 HPLC 同时测定 dactylorhin B, loroglossin, dactylorhin A 和 militarine 含量^[10]的报道,但未见对手掌参中腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇和对羟基苯甲醛同时测定的报道笔者还未见。本研究采用 HPLC 对不同产地手掌参药材中的 4 种活性成分进行测定,并以 Diva-Gis 和 SPSS 19.0 软件分析,为手掌参药材质量的科学评价提供参考。

1 材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪(包括自动进样器、柱温箱、四元梯度泵、真空脱气机、waters 2996 型 PAD 检测器、Empower 色谱工作站,均为美国 Waters 公司),METTLER AE240 型电子分析天平(中国瑞士梅特勒公司),KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

天麻素对照品(批号 QZDD-0222-201101)、对羟基苯甲醇对照品(批号 GZ-DD1087-201109)、对羟基苯甲醛对照品(批号 GZ-DD6971-201107)和腺苷对照品(GZDD-0189-201105)均购自贵州迪大生物有限公司,纯度 > 98.0%;甲醇为色谱纯,乐百氏纯净水(0.45 μm 微孔滤膜过滤),其他试剂均为分析纯。

手掌参药材购自四川荷花池药材市场以及从不同产地收集,经西南民族大学民族医药研究院刘圆教授鉴定为兰科植物手掌参 *Gymnadenia conopsea* R. Br. 的干燥块茎。

2 方法与结果

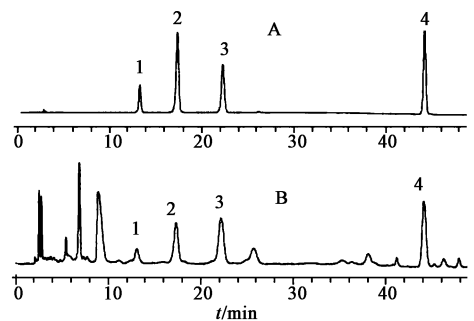
2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别精密称取天麻素对照品 7.54 mg、腺苷对照品 7.68 mg,对羟基苯甲醇对照品 2.37 mg、对羟基苯甲醛对照品 2.53 mg 至同一 10 mL 量瓶中,加 10% 甲醇适量使溶解并稀释至刻度,摇匀,得天麻素、腺苷、对羟基苯甲醇

和对羟基苯甲醛分别为 0.754, 0.768, 0.237, 0.253 g·L⁻¹ 的混合对照品储备液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取手掌参药材粉末(过 40 目筛)约 1 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 75% 乙醇 25 mL 超声(功率 200 W,频率 40 kHz)提取 1 h,放冷,再称定质量,补足减失的质量,过滤,精密量取续滤液 20 mL 浓缩后加 10% 甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,定容,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.1% 醋酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 7 min, 4% ~ 5% A; 7 ~ 15 min, 5% A; 15 ~ 30 min, 5% ~ 7% A; 30 ~ 35 min, 7% ~ 15% A; 35 ~ 40 min, 15% ~ 20% A; 40 ~ 50 min, 20% ~ 46% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 270 nm,柱温 30 °C,进样量 20 μL。色谱图见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品;

1. 天麻素; 2. 腺苷; 3. 对羟基苯甲醇; 4. 对羟基苯甲醛

图 1 手掌参供试品的 HPLC

2.3 线性关系考察 取 2.1.1 项下的混合对照品储备液适量,依次用 10% 甲醇稀释至标准曲线所需浓度,进样体积 20 μL,按 2.2 项下色谱条件进行测定。以天麻素、腺苷、对羟基苯甲醇和对羟基苯甲醛的进样量(μg)为横坐标(X),对应峰面积为纵坐标(Y),分别绘制标准曲线,得回归方程分别为 $Y = 121\ 148X - 6\ 180.9$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 3 \times 10^6 X - 21\ 833$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 272\ 816X - 4\ 514.8$ ($r = 0.999\ 5$), $Y = 5 \times 10^6 X - 20\ 598$ ($r = 0.999\ 9$),线性关系良好,线性范围分别为 0.151 ~ 15.1, 0.154 ~ 15.4, 0.047 ~ 4.74, 0.051 ~ 5.06 μg。

2.4 精密度试验 取同一混合对照品溶液,按 2.2 项下色谱条件重复测定 6 次,进样量 20 μL,测得天麻素、腺苷、对羟基苯甲醇和对羟基苯甲醛对照品含量的 RSD 分别为 1.42%, 1.20%, 1.44%, 0.58%,表明该方法精密度良好。

2.5 稳定性试验 精密称取手掌参(四川阿坝)粉

末1.0 g,按2.1.2项下方法制备,于0,3,5,8,12,24 h分别进样分析,测得4个指标成分含量的RSD分别为1.26%,1.61%,1.25%,1.43%,表明手掌参供试品溶液在24 h内具有良好的稳定性。

2.6 重复性试验 精密称取手掌参(四川阿坝)粉末1.0 g,平行6份,按2.1.2项下方法制备,进样分析,测得4个指标成分含量的RSD分别为2.10%,2.30%,2.00%,2.50%,表明手掌参含量测定方法重复性较好。

2.7 加样回收试验 精密称取已知含量的手掌参(四川阿坝)粉末0.5 g,共9份,每3份一组。每组中分别精密加入天麻素0.221 g·L⁻¹、腺苷0.302 g·L⁻¹、对羟基苯甲醇0.378 g·L⁻¹和对羟基苯甲醛0.226 g·L⁻¹的混合对照品溶液1.0,2.0,3.0 mL;按2.1.2项下方法制成高、中、低3种浓度的供试品溶液进行测定,并计算4个指标成分平均回收率和RSD,结果见表1。

表1 手掌参中4种成分加样回收试验

化合物	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
天麻素	0.436	0.221	0.651	97.29	97.39	1.32
	0.434	0.221	0.654	99.55		
	0.437	0.221	0.649	95.93		
	0.436	0.441	0.861	96.37		
	0.438	0.441	0.862	96.15		
	0.436	0.441	0.869	98.19		
	0.433	0.662	1.087	98.79		
	0.435	0.662	1.083	97.89		
	0.436	0.662	1.074	96.37		
	腺苷	0.604	0.302	0.915	102.98	101.55
	0.605	0.302	0.912	101.66		
	0.604	0.302	0.914	102.65		
	0.605	0.605	1.215	100.83		
	0.604	0.605	1.217	101.32		
	0.604	0.605	1.221	101.98		
	0.604	0.907	1.525	101.54		
	0.605	0.907	1.518	100.66		
	0.605	0.907	1.515	100.33		
对羟基苯甲醇	0.754	0.378	1.114	95.24	96.97	1.41
	0.755	0.378	1.126	98.15		
	0.754	0.378	1.116	95.77		
	0.755	0.755	1.473	95.10		

续表1

化合物	样品中含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
	0.754	0.755	1.489	97.35		
	0.754	0.755	1.483	96.56		
	0.754	1.133	1.857	97.35		
	0.755	1.133	1.873	98.68		
	0.755	1.133	1.871	98.50		
对羟基苯甲醛	0.429	0.226	0.655	100.00	98.57	1.46
	0.428	0.226	0.653	99.56		
	0.424	0.226	0.651	100.44		
	0.426	0.453	0.862	96.25		
	0.429	0.453	0.875	98.45		
	0.425	0.453	0.871	98.45		
	0.429	0.679	1.098	98.53		
	0.432	0.679	1.104	98.97		
	0.431	0.679	1.086	96.47		

2.8 样品含量测定和分析 分别精密称取14批不同产地手掌参药材粉末,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.2项下色谱条件进行分析,采用外标法计算手掌参中天麻素、腺苷、对羟基苯甲醇及对羟基苯甲醛的含量,不同产地测得结果见表2。

表2 不同产地手掌参中4种活性成分含量测定(n=3)

No.	药材产地或购买地	天麻素	腺苷	对羟基苯甲醇	对羟基苯甲醛
S1	青海玉树青果村	0.699	0.773	1.004	0.715
S2	青海布庆给	0.651	0.515	0.582	0.270
S3	四川康定塔公	1.023	0.687	0.571	0.322
S4	四川阿坝麻扎木	0.870	1.206	1.505	0.856
S5	四川甘孜九龙	0.728	1.061	1.330	0.887
S6	西藏波密沙旦村	0.894	0.743	0.599	0.389
S7	西藏那曲苏日达村	0.542	0.856	0.599	1.048
S8	西藏米林里龙	2.725	0.546	0.586	0.458
S9	云南丽江鲁拿古	0.438	0.556	0.835	0.675
S10	吉林长白山	0.593	0.789	0.089	0.117
S11	湖北神农架毛家湾	0.374	0.473	0.125	0.343
S12	四川康定大坪村	1.511	1.485	0.484	0.459
S13	西藏那曲拿姆庆	0.903	0.867	0.665	0.541
S14	湖北神农架	0.392	0.641	0.292	0.277

选取手掌参主产区药材为研究对象,测定了14批不同产地手掌参药材,各成分含量进行比较可知

4 种指标成分的含量在不同产地中相差较大,如天麻素含量在 37.36 ~ 272.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;对羟基苯甲醇的含量更从 89.15 ~ 1 505 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。天麻素的含量以西藏米林产的最高,四川康定塔公产的次之,湖北神龙架产的最低;腺苷和对羟基苯甲醇的含量均以四川阿坝产的最高,四川甘孜九龙的次之,前者以湖北神龙架的最低,后者以吉林长白山的最低;对羟基苯甲醛的含量,以西藏那曲的最高,四川甘孜九龙的次之,吉林长白山的最低,总体而言,西藏和四川产手掌参 4 种活性成分均较高,吉林长白山和湖北神龙架产手掌参 4 种活性成分较低。不同产地手掌参药材活性指标性成分含量差异可能与药材的生长年限、地理环境、采收时间等因素有关,由于药材中不同活性成分对不同疾病的贡献不同,因此有待进一步深入研究手掌参药材产地、活性成分及药效三者之间的相关性,完善手掌参药材物质基础研究。

2.9 气候因子数据获取和分析 利用 Diva-Gis 为分析平台,以全国 1 km^2 的气候栅格数据库为后台数据,依靠地理信息系统强大的图表索引功能和空间分析能力,从后台数据库中提取手掌参样本采集点的生态因子 22 个数据(19 个气候数据和海拔、经纬度)。再将 Diva-Gis 软件中输出数据,用 SPSS 19.0 软件计算其平均值和标准差,并对数据进行主成分因子分析,结果见表 3。

主成分因子分析初始解对原有变量总体的描述情况为:第一因子和第二因子方差贡献率分别为 59.54% 和 27.61%,2 个因子的总方差占原有变量总方差的 87.15%,因此其他因子可以忽略不计,第一因子在最热季节平均温度、最湿季节平均温度、年降雨量、极端最高温度、平均月温度变化范围、年均温度、海拔、最干季节降雨量、最冷季节降雨量、最干月降雨量和降雨量的季节性变化都有较高的荷载量,说明这 11 个气候参数对手掌参的分布有显著差异,同时平均月温度变化范围、海拔和降雨量的季节性变化对分布显示负影响;温度的季节变化性、纬度和年温度变化范围虽然在第一因子中因子系数较低,但是在第二因子中的因子系数较高,说明这 3 个气候参数对手掌参分布也有一定的影响;剩余 8 个气候参数在因子系数中均较低,即这几个气候参数对手掌参分布影响较小,因而不予采用。

2.10 系统聚类分析 分别以所测 14 批不同产地样品的 4 个指标成分含量数值和样品所在产地的气候参数的主成分因子为变量,采用 SPSS 19.0 软件对样品进行系统聚类分析(离差平方和法, Ward's

表 3 样品分布地点的气候参数分析

气候参数	$\bar{x} \pm s$	因子系数	是否采用
年均温度	4.3 ± 4.9	0.915a	+
平均月温度变化范围	12.9 ± 2.3	-0.918a	+
等温性(* 100)	40.2 ± 7.6	-0.588a	-
温度的季节变化性(STD * 100)	720.2 ± 207.7	0.982b	+
极端最高温度	18.8 ± 4.5	0.929a	+
极端最低温度	-13.8 ± 7.4	0.779a	-
年温度变化范围	32.6 ± 5.9	0.938b	+
最湿季节平均温度	12.6 ± 4.8	0.961a	+
最干季节平均温度	-4.7 ± 5.9	0.649a	-
最热季节平均温度	12.7 ± 5.0	0.964a	+
最冷季节平均温度	-5.0 ± 6.1	0.676a	-
年降雨量	732.4 ± 251.4	0.931a	+
最湿月降雨量	153.5 ± 44.0	0.766a	-
最干月降雨量	5.6 ± 5.7	0.866a	+
降雨量的季节性变化(CV)	96.1 ± 15.8	-0.851a	+
最湿季节降雨量	412.2 ± 114.5	0.722a	-
最干季节降雨量	21.0 ± 19.5	0.901a	+
最热季节降雨量	411.4 ± 114.0	0.710a	-
最冷季节降雨量	21.1 ± 19.4	0.899a	+
纬度	101.8 ± 9.4	0.965b	+
经度	31.4 ± 3.5	0.634a	-
海拔	3 351.6 ± 1 339.3	-0.904a	+

注: a、b 分别代表第一、二主成分因子;“+”表示可以用于进一步分析研究;“-”表示不考虑用于进一步分析研究。

Method), 样品测度为欧式距离(Euclidean Distance), 纵坐标为样品编号, 结果见图 2, 3。在含量测定中样品 3, 6, 2, 7, 13 聚为第一类, 覆盖西藏、四川、青海 3 省样品, 以西藏样品居多; 样品 8 和 12 聚为第二类, 为西藏米林和四川康定; 样品 1 和 9 聚为第三类, 产自青海玉树和云南丽江; 样品 4 和 5 聚为第四类, 产地为四川阿坝和甘孜九龙; 样品 10, 11, 14 聚为第五类, 包含所有吉林长白山和湖北神龙架产样品。结合含量测定, 发现聚类分析结果和含量测定结果一致。在气候参数主因子分析中样品 1, 2, 6, 7, 8, 13 聚为一类, 为青海和西藏样品; 样品 3, 4, 5, 9, 12 聚为第二类, 为四川和云南样品; 样品 10, 11, 14 聚为第三类, 为吉林和湖北样品, 这与含量聚类分析大体一致, 气候参数与含量、产地分类有很大的关系。

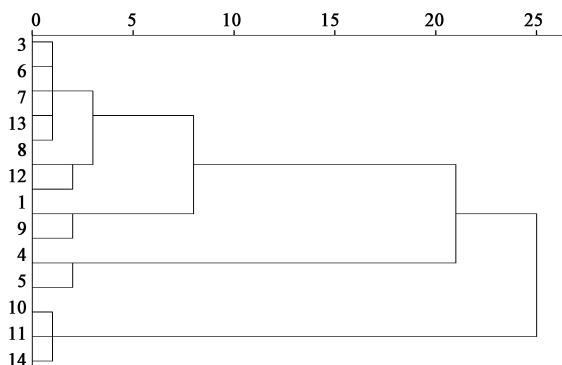


图 2 不同产地手掌参聚类分析

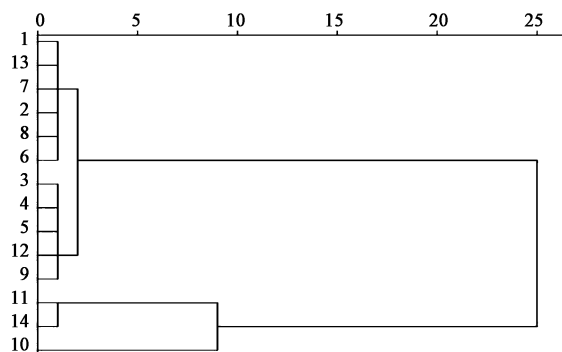


图 3 气候参数主因子聚类分析

3 讨论

分别考察甲醇-0.1% 醋酸水, 甲醇-0.5% 醋酸水, 甲醇-1% 醋酸水的不同比例和比较梯度洗脱程序, 结果表明, 以甲醇-0.1% 醋酸水为流动相梯度洗脱, 0 ~ 7 min, 4% ~ 5% A; 7 ~ 15 min, 5% A; 15 ~ 30 min, 5% ~ 7% A; 30 ~ 35 min, 7% ~ 15% A; 35 ~ 40 min, 15% ~ 20% A; 40 ~ 65 min, 20% ~ 46% A; 流速 1.0 mL·min⁻¹ 所测成分色谱峰分离度较好。采用 PAD 检测器对混合对照品溶液和供试品溶液分别

进行 200 ~ 400 nm 的全波长扫描, 对各波长下的色谱图进行分析比较, 综合考虑, 270 nm 下各成分均有较大吸收, 特征峰明显且峰形较好, 适宜多指标成分测定。此外, 分别考察了柱温 25, 30, 35 °C, 结果 30 °C 柱温色谱峰峰形较好, 分离度较高。

[参考文献]

[1] 朗楷永, 陈心启, 罗毅波, 等. 中国植物志. 第 17 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 228.

[2] 李敏, 王春兰, 郭顺星, 等. 手参属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1264.

[3] 锥成林, 刘峰林, 金建平. 藏医与中医对手参的应用探讨 [J]. 甘肃中医学院学报, 2001, 8(4): 43.

[4] 何晶. 天麻素的药理作用及临床应用 [J]. 天津药学, 2006, 18(50): 62.

[5] 薛楠, 薛敬, 林鹏程. HPLC 测定青藏高原不同地区藏药手掌参中天麻素 [J]. 中成药, 2011, 33(5): 904.

[6] 吴刚, 秦民坚, 康继川, 等. 不同产地天麻质量评价 [J]. 现代中药研究与实践, 2007, 21(1): 13.

[7] Kiyoshi O, Yohei H. Serum-free culture conditions for serial subculture of undifferentiated PC12 cells [J]. Neurosci Methods, 2006, 151: 250.

[8] 闫宝庆, 张晖芬, 逢楠楠, 等. RP-HPLC 同时测定天麻中 4 种成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2903.

[9] 赵京林, 杨跃进. 腺苷与心脏保护的研究进展 [J]. 中国心血管病研究杂志, 2004, 2(8): 658.

[10] 杨蓓蓓, 李帅, 张瑞萍, 等. HPLC 测定藏药手掌参旺拉中 4 种有效成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1819.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2014 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。1994 年创刊, 2002 年, 被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录, 成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升, 已相继被《中国科学引文数据库》、波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等知名检索系统收录。

本刊是中医药行业一本独具特色的学术期刊, 其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有: 中医动态、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、流行病学调查、临床论著、实验研究、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学、综述等。

本刊为月刊, 大 16 开国际开本, 136 页, 国内外公开发行, 每册定价 10 元, 全年 120 元。国内邮发代号: 82-670; 国外代号: M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址: 北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部, 邮编: 100700, 电话: 010-64014411-3278, E-mail: Lxx@mail.cintem.ac.cn。