

响最小,最佳提取工艺为 $A_2B_1C_3D_3$,即提取温度 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 、每次 1.5 h 、料液比 $1:9$ 、醇沉浓度 90% 。从表3方差分析结果可知,因素C(料液比)在统计学上有极显著意义($P < 0.01$),只能选择水平3。而因素A、B、D无显著性差异,综合能耗和生产实际等经济方面的考虑,确定最佳工艺条件为 $A_1B_1C_3D_1$,即在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 下用9倍的水量,回流提取 1.5 h ,醇沉浓度为 80% 。

表3 方差分析

| 方差来源 | 离差平方和 | 自由度 | 均方和 | F 值 | 显著性 |
|------|---------|-----|---------|----------|------------|
| A | 0.001 6 | 2 | 0.000 8 | 0.347 8 | $P > 0.01$ |
| B | 0.006 3 | 2 | 0.003 2 | 1.391 3 | $P > 0.01$ |
| C | 0.047 9 | 2 | 0.024 0 | 10.413 0 | $P < 0.01$ |
| D | 0.014 0 | 2 | 0.007 0 | 3.043 5 | $P > 0.01$ |
| 误差 | 0.040 8 | 18 | 0.002 3 | - | - |

$$F_{0.01(2,18)} = 6.01$$

4 验证实验

为进一步考察优选工艺的可靠性及稳定性,取3份药材,每份 50 g ,按上述最佳工艺进行验证实验,操作方法同前述,进行测定,结果见表4。验证结果与正交实验结果相近,说明该工艺基本稳定、可行。

表4 验证实验

| 水平 | 多糖量/% | 平均量/% | RSD/% |
|----|-------|-------|-------|
| 1 | 39.87 | | |
| 2 | 40.39 | | |
| 3 | 39.60 | 39.57 | 1.83% |
| 4 | 38.41 | | |
| 5 | 39.60 | | |

5 结论

多糖为刺糖的主要有效成分之一,可溶于水,故水煎煮提取工艺能有效提取该类成分,且工艺简便、经济,符合传统用药习惯。

本试验以多糖量为考察指标时,因素C(料液比)对刺糖

多糖的提取有显著影响,具有统计学意义,而因素A(提取温度)、因素B(提取时间)、因素D(醇沉浓度)对刺糖多糖的提取无显著影响。考虑到经济等方面的因素,最终得出最佳工艺为 $A_1B_1C_3D_1$ 。即在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 下用9倍的水量,回流提取 1.5 h ,醇沉浓度为 80% 。

6 讨论

刺糖作为维吾尔医治疗痢疾、腹泻、胃脘胀痛、血尿等疾病的常用药,在新疆已有悠久的历史,但均为偏方、验方,而且无明确的质控化学指标,即化学成分与功能之间缺乏相关性研究。本课题组前期研究表明刺糖中主要成分为多糖类化合物,因此,本实验主要探讨了刺糖中多糖的最佳提取工艺,为后期从刺糖中获得活性物质,进一步研究开发新药奠定基础。

参考文献:

- [1] 阿布来提·阿布都热西提. 维药刺糖中微量元素的研究[J]. 微量元素与健康研究, 2003, 20(3):15-16.
- [2] 陈璇,张翼,张剑波. 植物多糖的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(13):1000-1004.
- [3] 刘颖,金宏,程义勇. 多糖生物活性及其作用机制研究进展[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(5):627-629.
- [4] 程煜凤. 维药刺糖化学成分的基础研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2010.
- [5] 钟岩,潘浦群. 苯酚-硫酸法测定鲜人参中多糖含量[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8):1957-1958.
- [6] 张德华. 夏枯草多糖的提取、分离与纯化技术研究[J]. 生物学杂志, 2006, 23(03):39-41.
- [7] 丛媛媛,王晓文. 正交实验法优选阿里红多糖的提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10):2444-2445.
- [8] 李德华,董梅娟. 还阳参多糖提取工艺的研究[J]. 中国中医药科技, 2008, 15(5):370-371.

HPLC 测定青藏高原不同地区藏药手掌参中天麻素

薛楠, 薛敬, 林鹏程*

(青海民族大学化生院, 青海 西宁 810007)

摘要:目的 建立高效液相色谱法测定青藏高原不同地区手掌参中天麻素含量。方法 采用 Hypersil ODS-2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相为甲醇-水(含 0.04% 的磷酸) = 8:92,体积流量 1 mL/min,检测波长 222 nm,柱温 30 °C。结果 天麻素进样量在 1.400~8.400 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系, $r = 0.9999$,平均回收率为 99.14%,RSD 为 0.69% ($n = 9$)。结论 所建方法快速、简便、准确、重复性好,天麻素可作为手掌参质量控制指标。

收稿日期:2008-00-00

基金项目:青海省科技厅攻关项目(2005-N-110);中国科学院“西部之光”人才培养计划项目(2008-5-23)

作者简介:薛楠(1984—),男,硕士生,从事藏药品种质量评价及相关分析研究工作。Tel:15193105691, E-mail: xuenan910@126.com

* 通信作者:林鹏程(1966—),男,硕士生导师。Tel: (0971)8804649, E-mail: qhlpc@126.com

关键词: 高效液相色谱法; 手掌参; 天麻素

中图分类号: R283

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2011)05-0904-03

手掌参 *Gymnadenia conopsea* R. Br. 又名佛手参、手参、掌参, 是兰科 *Orchidaceae* 手参属一种多年生草本植物, 因其地下根茎形似手掌而得名, 主要生长在青藏高原海拔2 700~4 000 m 范围内无污染的灌木丛中, 为常用名贵藏药^[1-2]。手掌参味甘, 性温, 具有增力生精、温肾暖肾、大补元气、安神增智等功效。尤其对阳痿、肾寒有益, 具有很高的药用价值, 因而有“不老草”之称^[3-6]。天麻素是手掌参主要有效成分之一^[7], 现代药理研究表明, 天麻素具有镇痛、抗惊厥、抗衰老、增加心脑血管流量、改善学习记忆力等作用^[8]。为了有效控制药材的质量^[9], 本实验建立了青藏高原不同地区手掌参中天麻素含量的高效液相色谱测定方法。该方法快速、简便、准确、重复性好, 不仅适用于手掌参原药材的质量控制, 还可供手掌参制剂借鉴。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配置手动进样器, 在线脱气机, 高压二元梯度泵, 恒温柱温箱, DAD 检测器, Agilent 1100 色谱工作站); HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); FZ102 微型植物试样粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。实验用试剂甲醇为高效液相色谱专用试剂(山东禹王实业有限公司禹城化工厂); 水为自制三重蒸馏水; 磷酸为 AR 级(北京红星化工厂); 天麻素对照品由本课题组分离鉴定, 纯度大于 99%。手掌参样品系 2009 年 9 月采于青藏高原不同地区, 由青海民族大学药理学系林鹏程教授鉴定, 样品阴干后粉碎过 80 目筛, 冷藏保存。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 Hypersil ODS-2 (4.6 mm × 250 mm 5 μm) 柱; 流动相 甲醇-水(含 0.04% 的磷酸) = 8 : 92; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 222 nm; 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。该色谱条件下天麻素被洗脱且达到基线分离, 保留时间为 9.21 min (见图 1)。

2.2 溶液配制

精密称取天麻素对照品 3.50 mg 置 10 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并定容, 配制对照品溶液。精密称取手掌参样品粉末 1.0 g, 加入 50% 的甲醇 15 mL, 热回流提取 2 h, 抽滤, 滤渣重复处理 1 次, 合并滤液, 浓缩后定容至 25 mL 量瓶中, 过 0.45 μm 滤膜, 即得样品溶液。

2.3 线性关系

精密量取天麻素对照品溶液适量, 用甲醇准确稀释成下列浓度: 0.070、0.140、0.210、0.280、0.350 和 0.420 g/L 的系列对照品稀释液, 取各稀释液进样 20 μL, 记录峰面积。以峰面积(A)为纵坐标, 进样量 C(μg)为横坐标, 得天麻素的回归方程为: $A = 512.91C + 0.35$, $r = 0.9999$ 。线性范围为: 1.400 ~ 8.400 μg。当信噪比 S/N = 3 时, 天麻素的检测限为

0.32 ng。

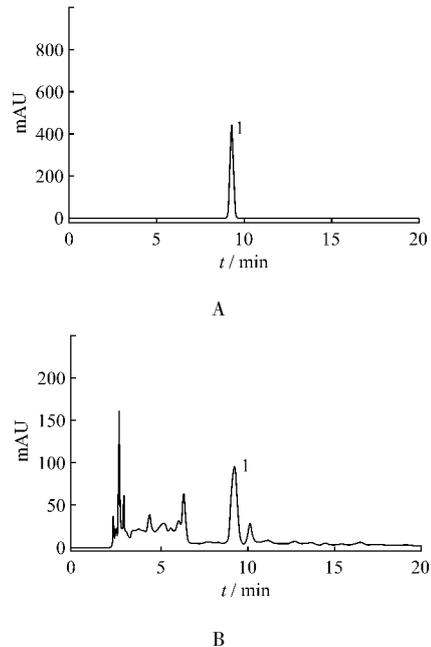


图 1 天麻素对照品(A)和手掌参样品(B)HPLC 图
1. 天麻素

2.4 精密度实验

精密吸取浓度为 0.210 g/L 的天麻素对照品稀释液 20 μL, 在 2.1 项色谱条件下重复进样 5 次, 记录峰面积, 计算 RSD 为 0.41% (n = 5), 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性实验

精密称取手掌参样品 1.0 g 共 5 份, 分别按 2.2 项下方法制备成样品溶液, 然后在 2.1 项色谱条件下测定天麻素, 计算得 RSD 为 1.4% (n = 5), 表明方法重复性良好。

2.6 稳定性实验

取新配制的样品溶液, 分别在 0、2、4、6、8 h 时进样, 测定天麻素的峰面积, 计算得 RSD 为 1.3% (n = 5), 表明样品溶液在 8 h 内稳定。

2.7 回收率实验

精密称取已测定的手掌参(3#样品)1.0 g 共 9 份, 分为 3 组, 每组 3 份, 分别添加低、中、高 3 种浓度的天麻素对照品液适量, 按 2.2 项下方法操作, 测得天麻素平均回收率 (n = 9) 为 99.14%, RSD 为 0.69%。结果见表 1。

2.8 样品测定

取 2.2 项下制备的青藏高原不同地区手掌参样品溶液按 2.1 项色谱条件进行分析, 经 DAD 检测器验证天麻素的峰纯度后, 按外标法以峰面积计算, 得青藏高原不同地区手掌参样品中天麻素的量 (n = 3)。结果见表 2。

表 1 天麻素回收率测定结果

| 原有量 /mg | 加入量 /mg | 测得量 /mg | 回收率 /% | 平均回收率 /% | RSD/% |
|------------|------------|------------|-----------|-------------|-------|
| 3.242 | 1.750 | 4.949 | 97.53 | | |
| 3.233 | 1.750 | 5.044 | 103.47 | | |
| 3.239 | 1.750 | 4.979 | 99.41 | | |
| 3.235 | 2.625 | 5.916 | 102.14 | | |
| 3.241 | 2.625 | 5.836 | 98.87 | 99.14 | 0.69 |
| 3.236 | 2.625 | 5.789 | 97.25 | | |
| 3.238 | 4.375 | 7.499 | 97.39 | | |
| 3.233 | 4.375 | 7.506 | 97.67 | | |
| 3.240 | 4.375 | 7.549 | 98.49 | | |

表 2 青藏高原不同地区手掌参中天麻素的测定

| 样品号 | 产地 | 天麻素/(mg/g) |
|-----|----------|------------|
| 1 | 玉树州巴塘草原 | 4.285 |
| 2 | 海东互助北山林场 | 2.268 |
| 3 | 海北州金银滩 | 3.242 |
| 4 | 黄南州麦秀林场 | 3.719 |
| 5 | 玉树州囊谦县 | 3.896 |
| 6 | 海南州同德县 | 9.113 |
| 7 | 玉树州贝纳沟 | 7.785 |
| 8 | 西藏波密 | 2.734 |
| 9 | 西藏林芝 | 3.024 |
| 10 | 青海果洛 | 4.309 |
| 11 | 玉树称多 | 3.103 |
| 12 | 黄南泽库 | 4.881 |

3 讨论

3.1 样品提取方法的确定^[10]

考察冷浸、超声和热回流对手掌参中天麻素的量的影响,结果热回流提取率最高。又分别以水、甲醇、乙醇为溶剂,考察不同溶剂对分析结果的影响,发现甲醇对天麻素提取率最高。利用正交试验进一步考察不同浓度甲醇、不同溶剂量、不同提取时间和提取次数对天麻素的量的影响,方差分析结果表明,天麻素提取率的影响因素依次为:甲醇浓度>提取时间>溶剂量>提取次数。考虑实际工作的方便、快捷,经进一步试验,确定最佳提取方法为甲醇浓度50%,溶剂量15 mL,提取时间2 h,提取次数2次。

3.2 流动相的选择

天麻素色谱峰易拖尾,经试验,当在水中加入0.01%~0.10%磷酸时可改善天麻素峰形。最终选择甲醇和含0.04%的磷酸水溶液(8:92)为流动相。

3.3 检测波长的确定^[11]

利用DAD检测器在200~400 nm扫描对照品溶液的吸收光谱,结果在222 nm处有最大吸收,因此选择该波长为检测波长。

3.4 测定结果分析

青藏高原不同地区藏药手掌参中天麻素测定的结果显示,手掌参中天麻素质量分数在2.268~9.113 mg/g之间,含量有较大差异,其中以同德县手掌参中天麻素中的量为最高。

参考文献:

- [1] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1995:246.
- [2] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海植物志:第4卷[M]. 西宁:青海人民出版社,1999:295-318.
- [3] 青海省药品检验所,青海省藏医药研究所. 中国藏药:一卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1996:341-344.
- [4] 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):1264-1268.
- [5] 覃筱燕,云妙英,唐 丽,等. 藏药旺拉的化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2007,16(3):229-232.
- [6] Matsuda H, Morikawa T, Xie H H, et al. Antiallergic phenanthrenes and stilbene from the tubers of *Gymnaenia conopsea* [J]. *Planta Med*, 2004, 70 (9) : 847-855.
- [7] 訾佳辰. 手参的化学成分研究[D]. 中国协和医科大学,2008.
- [8] 何 晶. 天麻素的药理作用及临床应用[J]. 天津药学,2006,18(5):62-63.
- [9] 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):1819-1822.
- [10] 林鹏程,王永菊,祝存恩,等. 青海不同地区藏药麻花苣中环烯醚萜苷类成分的含量测定与品质评价[J]. 中国药理学杂志,2006,41(10):783-785.
- [11] 伍振峰,何 伟,马建春. 天麻中天麻素含量测定方法改进的研究[J]. 中成药,2009,31(6):966-967.