

而逐渐产生了一定的变异。综上所述,笔者认为 RAPD 聚类结果与不同产地秦艽的实际亲缘关系是比较吻合的。

3.3 秦艽药材质量变异与遗传多样性和产地的关系:目前对药材质量的评价一般是在对其有效成分或指标成分进行分析的基础上做出的。此类成分基本上都是药用植物的次生代谢产物。它们的合成与积累不仅与遗传有关,而且与环境有关,这是由于调控次生代谢的基因在表达时要受到环境的影响。本实验中陕西不同产区秦艽药材质量的变异情况与其遗传变异之间未显示出比较明显的关联,而与产地有较强的相关性。在几个产区中,环境条件差异较大,药材之间质量差异也较大,环境条件差异较小则质量比较接近。这些反映出与秦艽药材质量相关的基因在表达时可能受到不同产地环境的影响。在对道地药材质量形成机制的研究中,有学者认为主要的机制有:种质主导型、生境主导型、技术主导型、传媒主导型和多因子关联决定型^[9]。从本实验的研究

结果看,陕西产秦艽药材的质量影响因素中,环境条件应当是一个重要的因素,提示陕西产道地秦艽质量的形成机制可能属于生境主导型。

参考文献:

- [1] 权宜淑. 秦艽的本草学研究[J]. 西北药学杂志, 1997, 12(3): 113-115
- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535
- [3] 石张燕, 蒙世杰, 丁长青. 随机扩增多态性 DNA 技术的原理与应用[J]. 西北大学学报, 2003, 33(专辑): 102-105
- [4] 南晓洁, 郝媛媛, 赵良贵, 等. 柴胡药材干根 DNA 提取及 RAPD 分析[J]. 中草药, 2009, 40(3): 447-451
- [5] 丁平, 刘瑾, 仰铁锤, 等. 巴戟天遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1869-1872
- [6] 唐学芳, 蒋舜媛, 孙辉, 等. 川产羌活种质遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1387-1392
- [7] 陈千良, 孙文基. 不同产地秦艽中龙胆苦甙含量的初步考察[J]. 西北大学学报, 2002, 32(专辑): 219-221
- [8] 曹雅男, 李庆章, 孙岳, 等. 正品龙胆遗传多样性的 RAPD 及 ISSR 分析[J]. 中草药, 2005, 36(1): 100-103
- [9] 肖小河, 夏文娟, 陈善壖. 中国道地药材研究概论[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(6): 323-326

黄芪皂苷成分与环境因子的灰色关联度分析

王宗权, 贾继明*, 宋剑

(河北以岭医药研究院, 河北 石家庄 050035)

摘要:目的 通过灰色关联度分析方法系统研究了黄芪皂苷成分与环境因子之间的关系。方法 采用 HPLC-ELSD 测定了黄芪药材中的黄芪甲苷、黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II, 应用灰色关联度公式进行数据分析。结果 灰色关联度分析表明影响黄芪甲苷的主导环境因子是年平均气温, 而影响黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II 的主导环境因子是年平均无霜期。结论 为道地药材黄芪引种提供科学依据。

关键词:黄芪; 皂苷; 环境因子; 灰色关联度分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1709-04

Analysis of grey correlation between saponins and environmental factors in *Astragali Radix*

WANG Zongquan, JIA Jiming, SONG Jian

(Hebei Yiling Medicine Institute, Shijiazhuang 050035, China)

Abstract: **Objective** To analyze the relationship between saponins of *Astragali Radix* and environmental factors by using grey correlation analysis. **Methods** To establish an HPLC-ELSD method for the determination of the astragaloside IV, astragaloside I, and astragaloside II in *Astragali Radix* from various habitats, the data were analyzed by using grey correlation. **Results** Grey correlation analysis showed the annual average temperature was the dominant climatic factor on the content of astragaloside IV. Annual

①收稿日期: 2010-03-03

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAI08B04-09); 国际科技合作计划项目(2008DFA30810); “重大新药创新”科技重大专项(2009ZX09102-140)

作者简介:王宗权(1977-), 男, 黑龙江省双城市人, 工程师, 硕士, 长期从事中药创新药物开发工作。

Tel: (0311)85901304 E-mail: wzq03yjs@163.com

* 通讯作者 贾继明 Tel: (0311)85901304 E-mail: jjm_0451@163.com

average frost-free period was the dominant climatic factor on the content of astragaloside I and astragaloside II. **Conclusion** It is to provide a scientific basis for the plant introduction of *Astragali Radix*.

Key words: *Astragali Radix*; saponins; environmental factors; grey correlation analysis

药用植物的有效成分是植物在长期进化中与环境相互作用的结果,其产生和变化比糖、氨基酸等初生代谢产物与环境有着更强的相关性和对应性。关于药用植物的有效成分与环境关系的探索和阐明,既有利于提高资源植物生物工程的效率和质量,也有助于传统中药药源植物的标准化和目标化种植。

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效^[1]。黄芪在我国分布广泛,主要分布于黑龙江、吉林、内蒙古、河北、山西和甘肃等地。多年的研究表明,黄芪主要含有黄酮和皂苷类化合物,在抗氧化^[2]、调节免疫功能^[3]、抗炎^[4]、抗病毒^[5]和心肌保护^[6]等多方面具有显著作用。皂苷类成分是其主要的有效成分,前人对其化学成分和药理作用研究的较多^[7-9]。然而,由于不同地区的气候生态因

子和土壤因子存在明显的差别,使得同一药材有效成分随着产地的变化而变化。目前已有对西洋参^[10]、泽泻^[11]、毛脉酸模等^[12-13]的有效成分与环境因子进行了研究。本实验是利用各主产地黄芪有效成分与各产地的生态因子资料,探讨黄芪的有效成分对产地中的土壤、气候等生态条件的要求,为道地药材黄芪引种提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料:在黄芪药材的分布区内蒙古锡林郭勒盟、山西(五寨、浑源)、山东文登、甘肃陇西、承德丰宁、河北安国和吉林通化选择了 8 个样点,各样点的环境条件见表 1。于春季进行采收。经黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge, 60 °C 烘干,粉碎后过 4 号筛,备用。

1.2 仪器与试药: Waters 2695 高效液相色谱仪,

表 1 样地环境条件概况

Table 1 Environmental survey of sample plot

序号	产地	经度	纬度	年平均气温/°C	年平均降水量/mm	平均海拔/m	土壤 pH 值	年平均日照时数/h	年平均无霜期/d
1	内蒙古锡林郭勒盟	115°13' ~ 117°06'	43°02' ~ 44°52'	1.5	295	1 000	9	3 000	105
2	山西五寨	111°49' 12"	38°55' 48"	4.9	478.5	1 839.5	8.4	2 872	120
3	山西浑源	113°43' 30"	39°40' 11"	6.2	429.4	1 691.5	6.25	2 696.3	140
4	山东文登	121°43' ~ 122°19'	36°52' ~ 37°23'	11.5	762.2	461.5	6	2 390.2	194
5	甘肃陇西	104°36' 36"	34°58' 48"	7.7	445.8	2 195	6.95	2 292	146
6	承德丰宁	40°54' ~ 42°01'	115°55' ~ 117°23'	6.1	503	800	7	2 825.7	75
7	河北安国	115°10' ~ 115°29'	38°15' ~ 38°35'	11.6	606	24	7	2 766	191
8	吉林通化	125°17' ~ 126°25'	41°19' ~ 42°07'	5	879.7	403	6.5	2 514.2	130

2420 蒸发光散射检测器(Waters 公司), Empower 2 色谱工作站(Waters 公司), Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

液相所用的乙腈为色谱纯,其余的为分析纯。黄芪甲苷(批号 110781-200613,供测定用)购自中国药品生物制品检定所,黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II 购于上海海灿生物科技有限公司(利用 NMR 等波谱技术鉴定了化学结构,经 HPLC 面积归一化法检测,质量分数均大于 98%)。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件:色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A 相为乙腈, B 相为水,梯度洗脱, 5% A(0~10 min), 5%~24% A

(0~40 min), 24%~34% A(40~70 min), 34% A(70~80 min), 34%~60% A(80~95 min), 60%~100% A(95~100 min), 100% A(110~115 min); 体积流量 1 mL/min; 柱温 35 °C; 蒸发光散射检测器, 喷雾器温度 39 °C, 漂移管温度 55 °C, 载气压力 174.6 kPa, 增益值为 200; 进样体积为 10 或 20 μL。

1.3.2 样品的测定: 取本品中粉约 4 g, 精密称定, 置索氏提取器中, 加甲醇适量, 冷浸过夜, 加甲醇至 70 mL, 加热回流 4 h, 提取液回收溶剂至干, 残渣加 70% 甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 备用。取续滤液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液进行 HPLC-ELSD 分析。见图 1。

1.4 数据处理: 基于灰色系统理论的关联度分析是

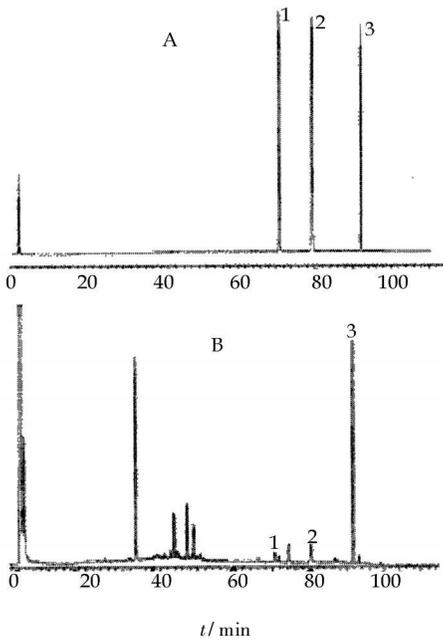


图 1 对照品(A)和黄芪药材样品(B)HPLC ELSD 色谱图
 1 黄芪甲苷 2 黄芪皂苷 I 3 黄芪皂苷 II
 1 astragaloside IV 2 astragaloside I 3 astragaloside II

Fig 1 HPLC ELSD Chromatograms of reference substances (A) and *Astragali Radix* (B)

对一个动态变化系统进行发展态势的量化比较,其基本思想是根据曲线几何形状的相似程度来判断两因素之间的关联程度。本实验以 X_i 作为母因子集、 Y_i 为子因子集,先对原始数据进行标准化^[14-16],再据下述公式计算关联系数:

$$\zeta_{ij} = \frac{\min_i \min_k \Delta_i(k) + \rho \max_i \max_k \Delta_i(k)}{\Delta_i(k) + \rho \max_i \max_k \Delta_i(k)} \quad (1)$$

其中分辨系数 ρ 取 0.50,再根据公式:

$$Y_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \zeta_{ij}(k) \quad (2)$$

计算关联度 Y_{ij} 。

2 结果与分析

分别以 8 个产地黄芪的黄芪甲苷、黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II 的量的数据作为母因素 $X_i (i=1, 2, 3)$, 以 8 个产地的环境因子为子因素 $Y_i (i=1, 2, 3, 4, 5, 6)$ 首先对原始数据作标准化处理,再根据公式(1)、(2) 求出环境因子与黄芪甲苷、黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II 的灰关联度(Y_{ij}) (表 2)。可见,影响黄芪甲苷的环境因子是:年平均气温($Y_1=0.703$) > 年平均降水量($Y_2=0.696$) > 年平均日照时数($Y_5=0.682$) > 平均海拔($Y_3=0.665$) > 年平均无霜期($Y_6=0.660$) > 土壤 pH 值($Y_4=0.637$)。众多的环境因子中年平均气温对黄芪甲苷的影响最大,而土壤 pH 值影响最小。表明年平均气温是黄芪甲苷成

表 2 黄芪皂苷成分与环境因子之间的灰色关联度(Y_{ij})

Table 2 Grey correlation between saponins and environmental factors in *Astragali Radix* (Y_{ij})

X	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
X ₁	0.703	0.696	0.665	0.637	0.682	0.660
X ₂	0.715	0.715	0.596	0.587	0.585	0.746
X ₃	0.678	0.712	0.565	0.577	0.566	0.769

分积累过程中的关键因素。

而影响黄芪皂苷 I 的环境因子中年平均无霜期($Y_6=0.746$) > 年平均气温($Y_1=0.715$) = 年平均降水量($Y_2=0.715$) > 平均海拔($Y_3=0.596$) > 土壤 pH 值($Y_4=0.587$) > 年平均日照时数($Y_5=0.585$)。从关联度数值可以看出,年平均无霜期对黄芪皂苷 I 的影响最大,而年平均日照时数影响最小。表明年平均无霜期是黄芪皂苷 I 成分积累过程中的关键因素。

影响黄芪皂苷 II 的环境因子大小次序为年平均无霜期($Y_6=0.769$) > 年平均降水量($Y_2=0.712$) > 年平均气温($Y_1=0.678$) > 土壤 pH 值($Y_4=0.577$) > 年平均日照时数($Y_5=0.566$) > 平均海拔($Y_3=0.565$)。在众多的环境因子中年平均无霜期对黄芪皂苷 II 的影响最大,而平均海拔影响最小。表明年平均无霜期是黄芪皂苷 II 成分积累过程中的关键因素。

因此,影响黄芪甲苷的主要环境因子是年平均气温,而影响黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II 的主要环境因子是年平均无霜期。

3 讨论

灰色关联度是指事物的不确定关联,是根据因素之间发展趋势的相似或相异程度,是衡量因素间关联程度的一种方法。灰色关联分析的基本任务是基于因子间的影响程度或因子序列的微观或宏观几何接近来分析并确定因子间的影响程度或因子对主行为的贡献程度。该方法简单易行,准确有效,可以克服相关性、回归分析法的不足和局限性,因而被广泛应用于生态环境、中药质量、临床诊断及药物疗效指标的优劣评价。由于中药质量与各生态因子间的关系属不确定关联,本实验采用了灰色关联分析方法,把黄芪药材中有效成分的量视为母因素,将环境因子作为子因素,从中筛选对黄芪有效成分影响最大的生态因子,以期探明黄芪生长发育对土壤、气候等生态条件的要求,为道地药材黄芪引种提供科学依据。

三萜皂苷的生物合成途径一般分为三个阶段:
 1) 活性异戊二烯单位 Δ^3 -异戊烯焦磷酸酯(IPP) 和

γ, γ-二甲基烯丙焦磷酸酯(DMAPP)的生物合成; 2) 三萜环碳环系统的生物合成; 3) 环上复杂的官能化反应过程, 最终形成完整的三萜皂苷分子^[17]。黄芪甲苷、黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II 的化学结构母核都是环阿屯烷型的三萜皂苷, 只是后两者在糖上进行了乙酰基取代, 在碱性条件下可以转化为黄芪甲苷。从表 2 中可以看出, 年平均气温可能是影响环阿屯烷型皂苷母核生物合成的关键酶的因素, 而年平均无霜期则是影响母核乙酰化酶的关键因素。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005
 [2] 凌洪锋, 苏丹, 曹洋. 黄芪多糖抗氧化作用研究[J]. 医学理论与实践, 2005, 18(8): 872-874
 [3] Wei X, Zhang J. Astragalus mongholicus and polygonum multiflorum protective function against cyclophosphamide inhibitory effect on thymus[J]. Am J Chin Med, 2004, 32(5): 669-680
 [4] 杨沁, 陈敏珠. 黄芪总苷的抗炎与镇痛作用及其作用机制[J]. 安徽医科大学学报, 2000, 35(5): 376
 [5] 赵文, 任永凤, 樊建航. 新疆黄芪抗病毒作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(1): 23-25
 [6] 崔伊梅, 高卫真, 刘艳霞. 黄芪及其有效成分黄芪苷 IV 在心血管药理作用的研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2005(4): 656-659
 [7] 关凤英, 杨世杰. 黄芪甲苷预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤

伤后细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1146-1150
 [8] Wang W T, Zhao Z Y, Han Y M, et al. Effects of Astragaloside IV derivative on heart failure in rats[J]. Chin Herb Med, 2010, 2(1): 48-53
 [9] 张琦, 彭洋, 宋春秋, 等. 黄芪苷 IV 通过 PI3/Akt 信号通路抗 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤[J]. 中草药, 2010, 41(6): 955-959
 [10] 吴庆生, 朱仁斌, 宛志沪, 等. 西洋参有效成分与气候生态因子的关系[J]. 生态学报, 2002, 22(5): 779-782
 [11] 褚必海, 毛善国, 丁小余, 等. 泽泻有效成分与生态因子的关系[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2007, 30(2): 98-103
 [12] 王振月, 王宗权, 左月明, 等. 毛脉酸模次生代谢产物动态特征及其与环境因子的相关性分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(9): 773-776
 [13] 曹海禄, 曹国番, 魏建和, 等. 遗传和环境因子对药用植物品质的影响[J]. 中草药, 2007, 38(5): 785-788
 [14] 徐莉, 王丽, 赵桂仿, 等. 新疆阜康荒漠红砂种群构件结构与环境因子的灰色关联度分析[J]. 植物生态学报, 2003, 27(6): 742-748
 [15] 王建林, 常天军, 成海宏, 等. 西藏野生芥菜型油菜种群构件结构与环境因素的灰色关联度分析[J]. 生态科学, 2006, 25(6): 507-511
 [16] 成海宏, 王建林, 常天军, 等. 西藏栽培白菜型油菜种群构件与环境因子的灰色关联度分析[J]. 生态科学, 2007, 26(6): 495-500
 [17] 陈莉, 吴耀生. 三萜皂苷生物合成途径及相关酶[J]. 国外医药: 植物药分册, 2004, 19(4): 156-161

泽泻的双波长 HPLC 指纹图谱研究

谢 普, 毕开顺, 俞 悦, 苏 丹, 张天虹, 陈晓辉*

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 采用双波长 HPLC 法建立泽泻指纹图谱, 为科学评价和控制泽泻的质量提供依据。方法 色谱柱为 Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水; 检测波长: 254 nm(0~13.00 min), 210 nm(13.01~60.00 min); 体积流量: 1.0 mL/min。结果 采用双波长对福建和四川两个产地 20 批泽泻进行指纹图谱研究, 分别确定了 18 和 23 个共有峰, 并指认其中 3 个色谱峰。结论 建立的双波长 HPLC 法色谱指纹图谱可以为泽泻药材的鉴别和质量评价提供依据。

关键词: 泽泻; 双波长; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1712-04

HPLC Dual-wavelength fingerprint of *Alisma orientalis*

XIE Pu, BI Kai-shun, YU Yue, SU Dan, ZHANG Tian-hong, CHEN Xiao-hui

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective The HPLC dual-wavelength chromatographic fingerprint was established for evaluating and controlling the quality of *Alisma orientalis*. **Methods** Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water gradient elution, at flow rate of 1.0 mL/min. The detection wave

①收稿日期: 2010-03-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20875064)

作者简介: 谢 普(1985-), 男, 湖南省常德市人, 硕士研究生。 Tel: (024)23986296 E-mail: xiepu@yahoo.cn

* 通讯作者 陈晓辉 Tel: (024)23986259 E-mail: cxh_syphu@yahoo.com.cn