

冬凌草化学成分积累动态的研究^{*}

□陈随清^{**} 冯 卫 生 王 丽 董三丽 董诚明 (河南中医学院 郑州 450008)

摘 要:目的:分析冬凌草化学成分的积累动态。方法:采用中国药典(2005年版)的方法进行水溶性浸出物、醚溶性浸出物的测定;用高效液相色谱法测定冬凌草中冬凌草甲素、迷迭香酸的含量。结果:冬凌草中水溶性浸出物、醚溶性浸出物、冬凌草甲素、迷迭香酸的含量在不同生长时期有明显的变化规律。结论:冬凌草中化学成分动态积累的变化规律,将为研究冬凌草生物特性的形成及冬凌草的规范化种植提供科学依据。

关键词:冬凌草 化学成分 积累动态 冬凌草甲素 迷迭香酸

冬凌草(*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara)为唇形科香茶菜属植物。广泛分布于我国黄河、长江流域,主产于河南济源太行山区。味甘苦,性微寒,具清热解毒、消炎止痛及抗肿瘤之功效。冬凌草一直处于野生状态,太行山区石多土少,气候干旱,生长环境较差,因此产量很不稳定。近年来,随着冬凌草含片、冬凌草片等中成药及冬凌草茶等保健品的生产量扩大,对冬凌草野生资源的破坏越来越严重^[1]。因此,近几年我们先后承担了国家科技部“十五”攻关项目“冬凌草的规范化种植”和“冬凌草种质资源及质量评价研究”。在进行冬凌草规范化种植研究中,我们以冬凌草甲素、迷迭香酸、水溶性浸出物、醚溶性浸出物为指标,首先对冬凌草化学成分积累动态规律进行了研究,为研究冬凌草生物特性的形成及冬凌草的规范化种植提供了科学依据。现报道如下。

一、仪器、药品及试剂

1. 仪器

岛津 LC-10AT_{vp}型高效液相色谱仪, SPD-10A_{vp}可见紫外检测器及浙江大学 N-2000双通道色谱工作站。CQ-25D型超声波清洗器(上海超声波仪器厂)。

2. 药品

迷迭香酸、冬凌草甲素标准品由本校中药化学成分研究室提供(经红外、紫外、核磁鉴定,本文 HPLC 条件测定的纯度分别为 99.3%、98.9%)。

冬凌草样品:野生样品采自河南济源市五龙口镇,经陈随清鉴定为 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara; 人工栽培样品采自济源市“冬凌草规范化种植示范基地”(科技部“十五”攻关课题);采集时间 2004年 6月至 10月。

3. 试剂

HPLC流动相用甲醇为色谱纯(天津四友生物医

收稿日期:2006-08-03

修回日期:2007-06-03

^{*} 国家“十五”科技攻关项目(2004BA721A25):怀地黄及冬凌草种质资源及其评价基础,负责:冯 卫 生。

^{**} 联系人:陈随清,博士,教授,河南中医学院药学院副院长,研究方向:中药规范化种植及质量标准研究, Tel 0371-65680002 E-mail suiqingchen@sohu.com

学技术有限公司), 其它试剂均为分析纯。

二、实验方法与结果

1 冬凌草甲素、迷迭香酸的含量测定

(1)标准溶液的配制。

精密称取冬凌草甲素和迷迭香酸对照品, 分别加甲醇配制成浓度为 1.10mg/mL、1.04mg/mL 的溶液。

(2)测定条件。

流动相: 甲醇 - 0.5% 磷酸水溶液 50:50, 色谱柱: 岛津 Shimpack CLC - ODS 柱 (6.0×150mm, 5μm), 柱温 30℃, 检测波长: 335nm, 流速 0.8mL/min, 色谱图见图 1。

(3)供试品溶液的制备。

取冬凌草粉末约 1g 精密称定, 以甲醇为溶剂, 用超声波提取法进行提取, 共分两次提取, 每次 30min, 每次加甲醇 20mL, 最后合并两次的滤液, 在蒸发皿内挥干溶剂后, 再用甲醇定容在 25mL 的容量瓶中, 备用。

(4)线性关系考察。

分别精密吸取各标准品溶液 1μL、2μL、4μL、8μL、10μL 注入液相色谱仪中, 测定其峰面积, 以峰面积值 (y) 为纵坐标, 进样量 (x) 为横坐标作图, 得到一条不经过原点的直线, 计算其回归方程。

迷迭香酸: $y = 4895848.42x + 36751.57$ $r = 0.9996$ 线性范围 1.04 - 10.4μg

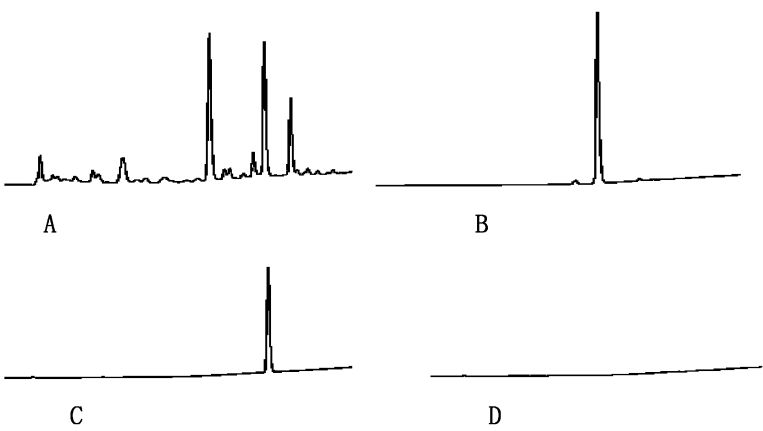


图 1 供试品及标准品 HPLC 色谱图

A. 冬凌草供试品; B. 迷迭香酸标准品; C. 冬凌草甲素标准品; D. 阴性对照

冬凌草甲素: $y = 514743592.80x + 58056.84$ $r = 0.9998$ 线性范围 1.10 - 11.0μg

(5)精密度试验。

精密吸取对照品溶液 5μL 连续测定 5 次, 测其峰面积, 计算 RSD (%) 值, 结果见表 1。

(6)稳定性试验。

取供试品溶液于 0、1、2、4、8、24 小时分别进样 5μL 测其峰面积, 计算 RSD (%) 值, 结果见表 2。结果表明供试品溶液 24 小时内稳定。

(7)重现性试验。

取供试品, 按供试品溶液的制备方法制备 5 份供试溶液, 分别进样 5μL 按样品的测定方法进行测定, 计算供试品溶液浓度及 RSD (%) 值, 结果见表 3。

表 1 精密度试验结果

实验号	1	2	3	4	5	RSD (%)
迷迭香酸	1978705	2059437	2129085	1994274	2058916	2.94
冬凌草甲素	1844902	1803991	1890434	1875971	1899981	1.27

表 2 稳定性试验结果

测定时间	0h	1h	2h 4h	8h	24h	RSD (%)
迷迭香酸	2074328	2096766	2056378	2197824	2145375	2.71
冬凌草甲素	1844902	1875971	1903991	1928905	1908117	1.92

表 3 重现性试验结果表 (μg/mL)

实验号	1	2	3	4	5	RSD (%)
迷迭香酸	0.1495	0.1578	0.1488	0.1518	0.1550	2.48
冬凌草甲素	0.1037	0.1061	0.1086	0.1009	0.1085	1.56

(8) 加样回收率试验。

精密称取已知含量的冬凌草样品 5 份, 分别加入精密称定的迷迭香酸 4mg、4mg、6mg、8mg、8mg 冬凌草甲素 3mg、3mg、6mg、8mg、8mg 按项供试品溶液的制备方法制备供试液。取 5ul 注入液相色谱仪测定, 计算加样回收率。

迷迭香酸: 97. 2%、96. 5%、102. 0%、98. 3%、98. 8%, 平均回收率 98. 56% (n= 5), RSD= 2. 16% ;

冬凌草甲素: 98. 4%、97. 9%、96. 8%、100. 2%、102. 8%, 平均回收率 99. 22% (n= 5), RSD= 2. 37% ;

(9) 含量测定。

精密称取冬凌草样品粗粉, 按项供试品溶液的制备方法制备供试液。吸取 5ul 注入液相色谱仪测定, 计算样品中迷迭香酸、冬凌草甲素的含量。结果见表 4

(10) 冬凌草不同部位中迷迭香酸、冬凌草甲素的含量测定。

分别对冬凌草叶、草质茎、草质茎叶、木质化茎中的迷迭香酸、冬凌草甲素进行含量测定。精密称取样品粗粉, 按项供试品溶液的制备方法制备供试液。吸取 5ul 注入液相色谱仪测定, 计算样品中迷迭香酸、冬凌草甲素的含量, 见表 5。

2 冬凌草药材浸出物的测定

(1) 水溶性浸出物的测定。

按照中国药典 2005 年版一部附录 X A 水溶性浸出物热浸法进行测定, 结果见表 4。

(2) 醚溶性浸出物的测定。

按照中国药典 2005 年版一部附录 X A 醚溶性浸出物测定法, 以乙醚为溶剂进行测定, 结果见表 4。

三、结果与讨论

1 冬凌草中化学成份的含量有一定的变化规律

人工栽培冬凌草在 6 月初叶片初长成, 因此, 从 6 月 1 日开始每月采一次地上草质部分作为样品。实验结果表明, 冬凌草中化学成分的含量有一定的变化规律: 6 月初植株初长成, 至 8 月初, 枝叶茂盛, 各类化学成分的含量较高; 8 月下旬冬凌草开始现蕾、至花全部开放, 各类化学成分的含量较低; 8 月底至 10 月初, 冬凌草结果、种子成熟, 有些化学成分的含量上升, 也较高。参见图 2。从冬凌草采收的实际考虑, 冬凌草为半灌木植物, 民间习惯用其草质茎叶, 或单用叶入药, 9 月底 10 月初植株的大部分木化, 药材的产量降低, 实验也表明冬凌草木质茎中迷迭香酸 (野生 0. 185%、栽培 0. 028%)、冬凌草甲素 (野生 0. 056%、栽培 0. 032%) 的含量很低。而 6、7 月冬凌草当年新生草质部分枝叶茂盛, 药材产量相对较高。因此, 综合考虑, 冬凌草 6、7 月采收较好。采收后, 冬凌草继续发芽生长, 我们对其有效成分迷迭香酸、冬凌草甲素进行了含量测定, (8 月 1 日, 0. 927%、0. 801%; 9 月 1 日, 0. 827%、1. 01%; 10 月 1 日 0. 925%、0. 748%), 结果表明 10 月份可以再采收一次。

表 4 冬凌草不同采收期化学成分含量测定结果 (%)

采收时间	迷迭香酸		冬凌草甲素		水溶性浸出物		醚溶性浸出物	
	栽培	野生	栽培	野生	栽培	野生	栽培	野生
6 月 1 日	1. 916	1. 249	1. 194	1. 475	32. 07	30. 33	3. 40	3. 47
7 月 1 日	1. 421	0. 889	1. 084	1. 594	32. 83	31. 09	5. 27	5. 30
8 月 1 日	0. 642	0. 516	1. 236	0. 661	32. 71	26. 79	4. 70	4. 70
9 月 1 日	1. 465	1. 488	0. 781	0. 946	21. 40	27. 12	2. 75	3. 57
10 月 1 日	1. 690	2. 305	0. 940	0. 474	28. 76	27. 40	4. 07	2. 83

表 5 冬凌草不同部位中迷迭香酸、冬凌草甲素的含量 (n= 3)

部位	迷迭香酸 (%)		冬凌草甲素 (%)	
	野生	人工栽培	野生	人工栽培
草质茎叶	0. 635	0. 911	0. 474	0. 679
叶	1. 636	1. 782	0. 867	1. 499
草质茎	0. 248	0. 057	0. 064	0. 012
木质化茎	0. 185	0. 028	0. 056	0. 032

2 冬凌草入药部位

冬凌草为多年生半灌木植物, 7月份以前当年生的地上茎为草质, 以后逐渐木质化, 叶也脱落。对于冬凌草的入药部位, 文献记载也不一致, 《中华人民共和国卫生部药材标准》冬凌草以“干燥叶及地上部分”入药^[2]; 其它文献记载冬凌草多以“干燥地上部分”入药^[3-5]。但在实际采收时, 常割其地上草质部分或只撷其叶(带少量幼茎)。因此, 在规范化种植研究时, 为了确定冬凌草的入药部位, 提高药材质量, 我们以迷迭香酸、冬凌草甲素为指标, 对冬凌草不同部位的含量进行了考察, 实验结果表明, 迷迭香酸、冬凌草甲素主要集中在冬凌草叶中。但冬凌草叶片较小, 只采摘叶较为困难, 所以建议在冬凌草采收时割其地上草质部分。

参考文献

1 陈随清, 董诚明, 冯卫生. 太行山区冬凌草生态环境及生物学特性研究. 中国野生植物资源. 2005, 24(4): 33~35

- 2 卫生部药典委员会编. 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药材(第一册). 1992
- 3 河南省卫生厅编. 河南省中药材标准. 郑州: 中原农民出版社, 1992 332~34
- 4 万定荣, 陈家春, 余汉华. 湖北药材志. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002, 1: 157
- 5 肖培根. 中药志(第三卷). 北京: 化学工业出版社, 2002 1: 69

Combined Dynamic State of Chemical Components in *Rabdosia rubescens*

Chen Suiqing, Feng Weisheng, Wang Li Dong Sanli Dong Chengming
(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, 450008)

In this paper the combined dynamic state of chemical components in *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara has been evaluated. In the study, the water-soluble extractives and aether-soluble extractives were determined using the process defined in the PRC Pharmacopoeia (2005 edition). Both Oridinin and Rosmarinic acid were determined by HPLC. Investigation results show that *Herba Rabdosiae Rubescens* produced in different periods present a noticeably different quantity of water-soluble extractives, aether-soluble extractives, and Oridinin and Rosmarinic acid. It is concluded that the combined dynamic state of chemical components in the fruit of *Rabdosia rubescens* provides a scientific basis for understanding the biological property of *Rabdosia rubescens*, and the proper harvesting time for the herb.

Keywords *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara; chemical components; accumulative dynamic state; Oridinin; Rosmarinic acid

(责任编辑: 王 珺, 郭 屹, 责任译审: 邹春申)

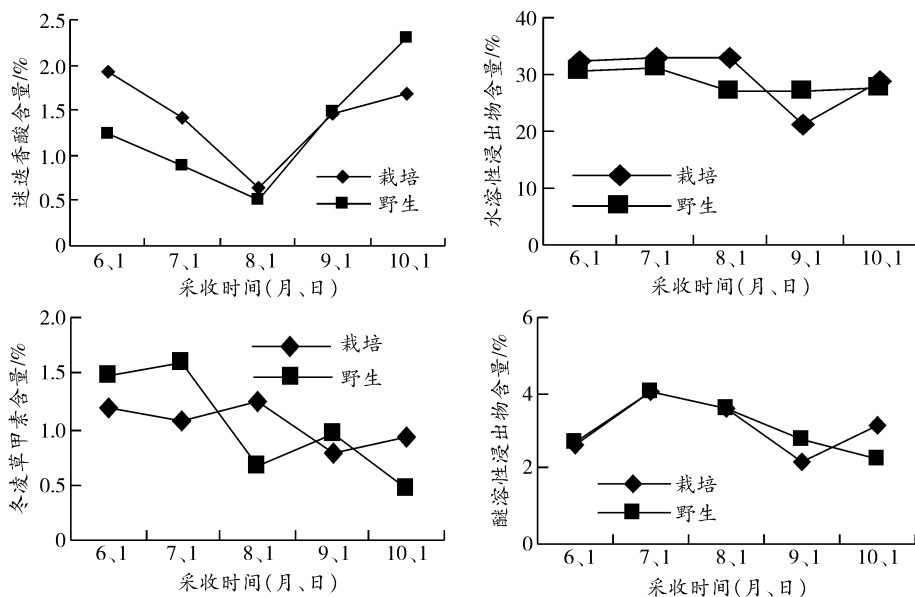


图 2 冬凌草不同采收期化学成分含量变化图