

31 3 芦头目前已作为低档远志被普通使用。聚类分析结果提示,芦头与传统远志商品药材有一定差异,这种差异主要是由于分量低引起的,而主要成分分析(另文发表)和相似度计算结果则提示芦头可以作为远志使用,但质量较差。

31 4 色谱指纹图谱是目前能够为国内外广泛接受的一种中药质量评价模式。色谱图中所显示的峰数及峰高或峰面积,代表了中药所含主要化学成分的种类及量。通过指纹图谱的特征性,能有效鉴别真伪或产地,通过指纹图谱主要特征峰的面积或比例,能有效控制质量^[9]。在远志有效成分及作用机制尚不明确时,制定指纹图谱用于控制质量,具有重要意义。

参考文献:

[1] 中国药材公司, 中国测绘科学研究院编 1 中国药材资源地图

集[M]1 北京: 科学出版社, 1995

- [2] 李 军, 董晓兵, 姜 勇, 等 1 HPLC 法测定远志中总皂苷的含量[J]1 药物分析杂志, 2007, 27(9): 13221333
- [3] 杨国红, 孙晓飞 1 反相高效液相色谱法测定远志中远志皂苷元的含量[J]1 药物分析杂志, 2001, 21(4): 2602263
- [4] 赵云生, 严铸云, 李占林, 等 1 晋产远志品种资源多糖含量测定[J]1 时珍国医国药, 2005, 16(9): 862868
- [5] 赵云生, 严铸云, 李占林, 等 1 远志属药用植物有效物质群结构特点及其生理活性[J]1 中医药学刊, 2005, 23(8): 14221424
- [6] 范丽芳, 张兰桐, 景秀娟, 等 1 河北道地药材远志 HPLC2 UV 指纹图谱研究[J]1 中草药, 2008, 39(4): 5952598
- [7] 姜 勇, 张 娜, 崔 振, 等 1 远志药材的 HPLC 指纹图谱[J]1 药学报, 2006, 41(2): 172183
- [8] 陈 承, 裴宗元, 陈师文 1 增广太平惠民和剂局方[M]1 海口: 海南出版社, 2002
- [9] 蔡宝昌, 刘训红 1 常用中药材 HPLC 指纹图谱测定技术[M]1 北京: 化学工业出版社, 2005

五柱绞股蓝总皂苷和总黄酮的季节性变化

刘世彪, 严四华, 鲁 云, 郭家平*

(吉首大学 植物保护与利用湖南省高校重点实验室, 湖南 吉首 416000)

摘 要: 目的 测定五柱绞股蓝茎和叶中的总皂苷和总黄酮的量, 并揭示其在不同季节内的动态变化规律。方法以绞股蓝皂苷和芦丁为对照品, 采用紫外可见光分光光度计在 550 nm 处测定皂苷吸光度, 在 510 nm 处测定黄酮吸光度。结果 五柱绞股蓝茎、叶中的总皂苷和总黄酮的量在 5 月至 11 月的生长发育季节内, 均表现为先上升后下降的变化规律, 以 9 月的量最高, 且叶中的量高于茎中的量。结论 五柱绞股蓝采收可安排在 8~9 月的花果期进行。

关键词: 五柱绞股蓝; 总皂苷; 总黄酮; 季节变化

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)04-0648-04

五柱绞股蓝 *Gynostemma pentagynum* Z. P. Wang 是葫芦科绞股蓝属的多年生草质藤本植物, 主要分布在我国的湖南、贵州、湖北和重庆交界的武陵山区。五柱绞股蓝在该区表现为常绿习性, 与绞股蓝一样, 含有绞股蓝总皂苷成分^[1]。绞股蓝总皂苷对人体具有多种生理活性及广泛的临床应用^[2]。黄酮类化合物是绞股蓝含有的又一类药用活性成分, 绞股蓝总黄酮对动物心血管系统具有保护作用^[3]。虽然目前有关绞股蓝总黄酮的定量测定已涉及 9 种植物^[4,5], 但尚未见关于五柱绞股蓝总黄酮的报道。因此, 本实验对五柱绞股蓝茎和叶中的总皂苷和总黄酮的量及其在不同生长发育季节中的动态变化进行了检测, 以期为该种植物的基础研究和综

合开发利用提供科学依据。

1 材料与仪器

11 1 材料: 五柱绞股蓝采自吉首大学生物园, 由吉首大学植物教研室陈功锡教授鉴定为五柱绞股蓝 *G. pentagynum* Z. P. Wang。分别于 2007 年 5 月至 11 月的每月中旬采集生长良好的植株地上部分, 将茎和叶分开, 置于 60℃ 烘箱内烘干 24 h 至恒重, 粉碎过 10 目筛, 保存在封口袋中。

11 2 仪器与试剂: FA 2004 电子分析天平(上海天平仪器厂), KQ 250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), LD25 低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂), 752C 型紫外可见光分光光度计, NJL07) S 微波提取仪(上海亚荣生化仪器

* 收稿日期: 2008-06-19

基金项目: 湖南省教育厅自然科学基金资助项目(08C709); 吉首大学博士基金资助项目

作者简介: 刘世彪(1965), 男, 土家族, 湖南保靖县人, 副教授, 博士, 主要从事结构植物学和植物资源学研究。

Tel: 13707430753 E-mail: liushibiao_1@163.com

厂), FW100 型高速万能粉碎机 (天津泰斯特仪器有限公司), RE252 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂)。绞股蓝皂苷对照品购于中国药品生物制品检定所, 绞股蓝总黄酮以芦丁为对照品 (质量分数 > 99%), 购于成都思科华生物技术有限公司。试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

2.1.1 总皂苷对照品溶液制备: 准确称取 105 e 干燥至恒重的绞股蓝皂苷对照品 10 mg, 加甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀, 配成质量浓度为 1 mg/mL 的绞股蓝皂苷对照品溶液。

2.1.2 总黄酮对照品溶液制备: 准确称取 105 e 干燥至恒重的芦丁对照品 71.5 mg, 用乙醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中, 配成质量浓度为 150 Lg/mL 的芦丁对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 总皂苷溶液的制备: 精密称取五柱绞股蓝茎或叶粉末 11.0 g, 放入具塞锥形瓶中。用 75% 乙醇 10 mL 浸泡 14 h, 于 60 e 水浴中超声提取 40 min。收集提取液, 残渣 2 次换加 75% 乙醇 10 mL, 每次超声提取 20 min。合并 3 次提取液, 5 000 r/min 离心 5 min。上清液减压回收乙醇, 至溶液仍含有 15%~20% 的乙醇, 于 4 e 冰箱中静置 36 h。5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液减压回收乙醇至溶液无醇味。样品液用水饱和的正丁醇萃取 4 次至正丁醇无色。弃去水层, 合并萃取液, 减压回收正丁醇。加入 5 mL 甲醇溶解提取物, 5 000 r/min 离心 5 min。上清液加入 5 倍量的乙醚, 静置 24 h, 5 000 r/min 离心 5 min。弃去上层含有叶绿素的乙醚液, 下层沉淀于 60 e 烘干, 即得五柱绞股蓝的粗总皂苷。以甲醇溶解并定容至 50 mL, 作供试样品溶液。

2.2.2 总黄酮溶液的制备: 精密称取五柱绞股蓝粉末 0.5 g 于圆底烧瓶中, 加入 75% 乙醇 60 mL, 将烧瓶放入微波提取仪腔内, 在圆底烧瓶口连接蛇形冷凝管, 通入冷凝水, 调整微波提取仪功率为 560、500、400、350 W, 反应时间各 15 min。将提取液冷却后减压抽滤, 并用少量 25% 乙醇溶液洗涤滤渣, 合并滤液, 减压浓缩至无醇味, 倒出烧瓶内溶液, 并用 30 mL 热水分 3 次洗涤烧瓶。抽滤后将滤液倒入分液漏斗, 用 75 mL 氯仿分 3 次萃取脱脂 (除去叶绿素、胡萝卜素等脂溶性大分子), 待完全分层后, 弃去氯仿, 收集水层, 蒸干水液, 残渣用 95% 乙醇溶解, 滤过, 定容至 100 mL 作供试样品溶液。

2.3 标准曲线绘制

2.3.1 绞股蓝皂苷的标准曲线: 精密吸取绞股蓝皂苷对照品溶液 0、20、40、60、80、100、120 LL, 分别加入 10 mL 具塞试管中, 热风吹干, 各自加入 5% 的香草醛冰醋酸液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL, 混合均匀, 密塞, 置于 60 e 恒温水浴锅中加热 15 min, 冷却至室温后加入冰醋酸 5 mL。以 0 LL 管为空白对照, 摇匀后用紫外可见光分光光度计在 550 nm 处测其吸光度 (A)。以 A 为纵坐标, 质量浓度 (C) 为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程 $A = 0.168 C - 0.2259$, $r = 0.994$, 皂苷在 20~120 Lg 存在良好的线性关系。

2.3.2 绞股蓝黄酮的标准曲线: 精密吸取芦丁对照品溶液 0、1、2、3、4、5 mL, 分别移入 10 mL 量瓶中, 各加乙醇稀释至 5 mL, 再加入 5% 亚硝酸钠溶液 0.3 mL, 震荡后放置 5 min, 加 10% 硝酸铝溶液 0.3 mL, 摇匀后放置 6 min, 再加 11.0 mol/mL 氢氧化钠 2 mL, 用 30% 乙醇定容至刻度。以 0 mL 管为空白对照, 摇匀后在 510 nm 处测定 A 值, 以 A 为纵坐标, 质量浓度 (C) 为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程 $A = 0.1359 C - 0.1285$, $r = 0.993$, 芦丁在 150~750 Lg 存在良好的线性关系。

2.4 精密度试验: 精密吸取总皂苷对照品溶液 100 Lg, 按 2.3.1 项下自/热风吹干0起操作, 测定 A 值, 连续测定 6 次, 结果表明总皂苷 A 值的 RSD 为 11.18%。精密吸取总黄酮对照品溶液 21.0 mL, 按 2.3.2 项下自/各加乙醇稀释至 5 mL0起操作, 测定 A 值, 连续测定 6 次, 结果表明总黄酮 A 值的 RSD 为 0.86%。

2.5 重现性试验: 称取 7 月的绞股蓝叶粉末 11.0 g, 依法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 100 LL, 按 2.3.1 项下自/热风吹干0起操作, 测定 A 值, 总皂苷质量分数的 RSD 为 11.08% ($n = 6$)。称取 7 月的绞股蓝叶粉末 0.5 g, 依法制备供试品溶液。精密吸取供试品溶液 21.0 mL, 按 2.3.2 项下自/各加乙醇稀释至 5 mL0起操作, 测定 A 值, 总黄酮质量分数的 RSD 为 11.76% ($n = 6$)。

2.6 稳定性试验: 精密吸取 7 月的绞股蓝叶总皂苷供试品溶液 100 LL, 按 2.3.1 项下自/热风吹干0起操作, 每隔 30 min 测定其 A 值, 结果表明在 3 h 内总皂苷 A 值的 RSD 为 11.52%。精密吸取 7 月的绞股蓝叶总黄酮供试品溶液 21.0 mL, 按 2.3.2 项下自/各加乙醇稀释至 5 mL0起操作, 每隔 30 min 测定其 A 值, 结果表明在 3 h 内总黄酮 A 值的 RSD

为 11.28%。

2.1.7 加样回收率试验: 精密吸取 7 月的绞股蓝叶总皂苷供试品溶液 50 LL, 准确加入等量的皂苷对照品溶液, 得供试品溶液 100 LL, 按 2.1.3.1 项下自/ 热风吹干 0 起操作, 测定 A 值, 计算得总皂苷质量分数, 结果平均回收率为 102.33%, RSD 平均为 11.85% (n=6)。精密吸取 7 月的绞股蓝叶总黄酮供试品溶液 1 mL, 准确加入等量的芦丁对照品溶液, 得供试品溶液 2 mL, 按 2.1.3.2 项下自/ 各加乙醇稀释至 5 mL 0 起操作, 测定 A 值, 计算得总黄酮质量分数, 结果平均回收率为 100.68%, RSD 为 11.78% (n=6)。

2.1.8 样品测定: 精密吸取各样品总皂苷供试品溶液 100 LL, 按 2.1.3.1 项下自/ 热风吹干 0 起操作, 测定 A 值。按照线性回归方程, 计算样品中的总皂苷质量分数见图 1。精密吸取各样品总黄酮供试品溶液 2.0 mL, 按 2.1.3.2 项下自/ 各加乙醇稀释至 5 mL 0 起操作, 测定 A 值, 按照线性回归方程, 计算样品中的总黄酮质量分数见图 2。

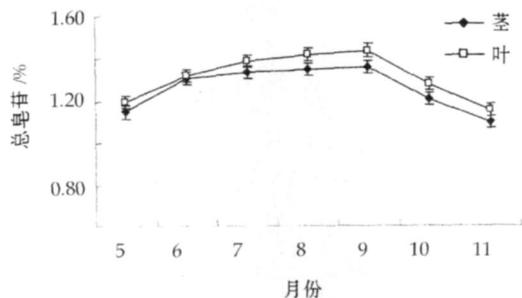


图 1 不同季节五柱绞股蓝茎和叶中的总皂苷

Fig. 1 Total gypenosides in stems and leaves of *G. pentagynum* in different seasons

图 1 显示, 在 5~11 月的生长发育过程中, 五柱绞股蓝茎、叶中的总皂苷质量分数变化呈先升高后降低的单峰曲线, 以 9 月份最高, 茎为 11.36%, 叶为 11.39%。在 5~7 月的营养生长期, 茎中的总皂苷质量分数从 11.15% 上升到 11.34%, 叶中从 11.20% 上升到 11.39%。在 8~9 月的花果期, 茎的皂苷继续从 11.35% 上升到 11.36%, 叶的皂苷从 11.42% 上升到 11.44%。而在 10~11 月的果后期, 总皂苷量逐渐下降, 茎从 11.21% 下降至 11.11%, 叶从 11.28% 下降至 11.16%。整个生长过程中, 叶中的总皂苷量都要比茎中的总皂苷量高, 平均高出 4.42%。

图 2 显示, 不同季节的五柱绞股蓝茎、叶中的总黄酮质量分数也呈单峰型变化曲线, 以 9 月份最高, 茎为 0.111%, 叶为 0.141%。在 5~7 月的营养生

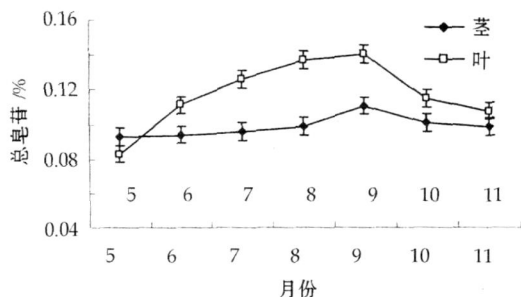


图 2 不同季节五柱绞股蓝茎和叶中的总黄酮

Fig. 2 Total flavonoids in stems and leaves of *G. pentagynum* in different seasons

长期, 茎中的总黄酮从 0.093% 上升到 0.096%, 叶中从 0.083% 上升到 0.126%。在 8~9 月的花果期, 茎的黄酮继续从 0.099% 上升到 0.111%, 叶的黄酮从 0.137% 上升到 0.141%。而在 10~11 月的果后期, 总黄酮量逐渐下降, 茎从 0.101% 下降至 0.099%, 叶从 0.114% 下降至 0.108%。整个生长发育过程中, 叶中的总黄酮量也比茎中的总黄酮量要高, 平均高出 18.47%。

3 讨论

本实验表明, 五柱绞股蓝的总皂苷量具有季节性变化规律。在 4~7 月的营养生长期其量逐渐增加, 8~9 月的花果期量较高, 随着冬季来临, 皂苷量降低。这种季节性变化与绞股蓝营养器官中的总皂苷量季节性变化相似, 但绞股蓝以 10 月的果熟期量最高^[6], 这种差异可能与五柱绞股蓝的开花结果时间较早有关。五柱绞股蓝叶中的总皂苷量高于茎中的总皂苷量, 这与绞股蓝的总皂苷积累现象是相似的。与已报道的其他种类绞股蓝的皂苷量相比^[7], 本实验测得的五柱绞股蓝的总皂苷量较低, 可能与武陵山地区日照少、湿度高的特殊生境有关, 也可能与物种的遗传性有关。

五柱绞股蓝叶中的总黄酮量高于茎, 茎、叶均以 4 月份最低, 4~9 月上升到最高峰, 9 月以后有所下降。但各地报道的绞股蓝总黄酮季节性积累规律并不一致, 河北引种的绞股蓝总黄酮量在茎以 8 月最高, 在叶则以 10 月最高^[8], 杭州产的绞股蓝和喙果绞股蓝的总黄酮量则在 7 月最低, 11 月最高^[9], 而浙江所产 4 种绞股蓝的总黄酮量在 5~6 月最高^[5], 造成这种季节性差异的原因还有待于进一步调查和检测。五柱绞股蓝的总黄酮量平均为 0.108%, 低于广西产 6 种绞股蓝^[4]和浙江产 4 种绞股蓝^[5], 但稍高于杭州产的两种植种绞股蓝^[9]。生产上从收获总皂苷和总黄酮的角度出发, 可将五柱绞股蓝采收的最适时间安排在 8~9 月, 这样既可以保证获得最大生

物产量,又能获得最高的总皂苷和总黄酮产量。

参考文献:

[1] 刘世彪,林如,胡正海1 绞股蓝属 5 种植物的茎叶结构和总皂苷含量差异 [J]1 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(5): 49524991
[2] 巫世红,胡丰,杨晨,等1 绞股蓝的药理作用研究近况 [J]1 广西中医学院学报, 2008, 11(1): 862881
[3] 李乐,孙晓东,高小利,等1 绞股蓝总黄酮对犬急性缺血心肌的保护作用 [J]1 中国病理生理杂志, 2008, 24(2): 38823891
[4] 蒋伟哲,周燕文,李锦葵1 六种广西产绞股蓝中总黄酮的含

量测定 [J]1 中国药房, 2006, 1(17): 242281
[5] 王临润,黄明珠1 中国东南部 4 种绞股蓝中黄酮成分的分析 [J]1 中草药, 2007, 38(4): 61826191
[6] 刘世彪,林如,胡正海1 绞股蓝人参皂苷的组织化学定位及其含量的变化 [J]1 实验生物学报, 2005, 38(1): 542601
[7] 丁树利,朱兆仪,李勇1 绞股蓝及同属植物的生药学研究 [J]1 中国药学杂志, 1994, 29(2): 792831
[8] 李兰芳,陈玲燕1 河北引种绞股蓝中总皂苷、总黄酮、多糖及氨基酸的分析 [J]1 时珍国药研究, 1997, 8(2): 15121521
[9] 王志芬,孙红祥,孙国梅1 两种绞股蓝植物茎不同时期黄酮类成分 [J]1 科技通报, 1994, 10(6): 39223931

HPLC 法测定不同生长年限杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷

王丽楠,杨美华*

(中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所,北京 100193)

摘要:目的 采用 HPLC 法测定不同生长年限杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷的量。方法 色谱柱为 Agilent Zorb2 ax Eclipse XD18C₁₈(250 mm@4.6 mm, 5 Lm),流动相为甲醇水(25B 75),检测波长为 277 nm,体积流量 1 mL/min,柱温 25 e。结果 13、22 年生杜仲皮松脂醇二葡萄糖苷量相对较高;13 年生杜仲皮松脂醇二葡萄糖苷量出现最低点。从杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷总量考虑,22 年为最佳采收期。结论 本实验建立的杜仲皮松脂醇二葡萄糖苷测定方法,重现性好,结果准确可靠,为杜仲皮质量控制提供了参考。通过对不同生长年限杜仲皮松脂醇二葡萄糖苷量的研究,为杜仲的合理采收提供了科学依据。

关键词:杜仲;生长年限;松脂醇二葡萄糖苷;高效液相色谱法

中图分类号:R282.6 文献标识码:A 文章编号:025322670(2009)040651203

杜仲为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliver 的干燥树皮,别名思仲,丝连木。杜仲是第四纪冰川侵袭后残留下来的子遗古老树种,其近缘种类都已绝灭^[1]。我国是现存杜仲资源的唯一保存地,至今在世界各地尚未发现其近缘植物,故有“活化石植物”的美称,被列为国家二类重点保护树种^[2]。我国第一部药物学专著《神农本草经》就记载了杜仲皮的神奇药效,称“杜仲味辛平”,主治“腰膝痛、补中、益精气、坚筋骨、强志。除阴下痒湿,小便馀沥,久服轻身耐老”,并把杜仲列为中药上品。

杜仲的生长期较长,一般 10 年以上才能开始剥皮。杜仲传统采剥方法采收期为 15~ 20 年,嫩树剥皮易死,且皮不易再生^[3]。《中国药典》2005 年版(一部)规定杜仲的初加工方法为刮去粗皮,堆置/发汗至内皮呈紫褐色,晒干即可^[4]。由于杜仲独特的药用价值和潜在的经济价值,国内外学者对其进行大量的研究。现已明确松脂醇二葡萄糖苷(pi2

noresinol diglucoside, PDG) 有明确的降压作用,是杜仲主要活性成分^[5]。《中国药典》2005 年版一部杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷的定量测定采用高效液相色谱法^[4]。本实验以《中国药典》方法为基础,并做出改进,首次考察了不同生长年限杜仲皮中松脂醇二葡萄糖苷,为杜仲的合理采收提供科学依据。

1 仪器与试剂

Waters 2695) 2996 高效液相自动进样色谱仪。

松脂醇二葡萄糖苷对照品(批号:1115372 200502) 购于中国药品生物制品检定所;甲醇为色谱纯(Fisher 公司生产);蒸馏水为娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯。

样品于 2007 年 5 月采自中国药材集团都江堰华泰川芎药业有限责任公司三大药材基地杜仲种植区。采收方法:在离地 1 m 处环割,以此为起点向上取一定高度,割第二道切口,在两切口间纵割一切口,用竹片沿切口将整张树皮剥下。共采集杜仲

* 收稿日期:200807202
基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAI09B05)
作者简介:王丽楠,女,在读博士,研究方向为中药质量分析及新药研究开发。E2 mail: wln246@hotmail.com
* 通讯作者 杨美华 E2 mail: yangmeihua15@hotmail.com Tel: (010) 62899730 13041071999