

红凉伞中岩白菜素的积累动态研究

陈随清¹, 李 君¹, 陈 颖¹, 彭丽彬², 张家鸿², 米方田², 张立德^{3*}

(1 河南中医学院, 河南 郑州 450008; 2 云南热带作物职业学院, 云南 普洱 665000;

3 云南省思茅林业学校, 云南 普洱 665000)

摘要:目的 研究红凉伞中化学成分岩白菜素的积累动态。方法 采用高效液相色谱法测定红凉伞中岩白菜素的量, 色谱柱: Hypersil ODS(250 mm×4.0 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(25: 75), 体积流量: 1.0 mL/min, 检测波长: 275 nm。回归方程为 $Y = 1406.0X + 7.21961$, $r = 0.9999$, 线性范围: 1.00~12.01 μg, 平均回收率为 101.17%, RSD 1.67% ($n = 5$)。结果 红凉伞中岩白菜素的量在不同生长时期、不同部位有明显的变化规律。不同部位岩白菜素的量由高到低的顺序为: 根、叶、茎、侧枝、果丙、花、果壳、种子; 一年生长期内在 5 月份红凉伞根、茎、叶中岩白菜素的量最高, 以后逐渐下降; 不同生长年限红凉伞中岩白菜素的量存在较大的差异。结论 红凉伞中岩白菜素的积累动态将为研究红凉伞生物特性的形成及红凉伞的规范化种植提供科学依据。

关键词: 红凉伞; 岩白菜素; 积累动态

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)09-1486-03

红凉伞 *Ardisia crenata* Sims var. *bicolor* (Walker) C. Y. Wu et C. Chen 为紫金牛科植物朱砂根 *A. crenata* Sims 的变种。分布于我国华东、中南、西南等地区。朱砂根在《中国药典》2005 年版有收载, 具有清热解毒、祛风除湿、活血散瘀、消炎止痛之功效, 临床上常用于咽喉肿痛、跌打损伤、风湿痹痛等症^[1]。现代研究证明, 朱砂根的主要活性成分为岩白菜素(bergenin)^[2], 并且岩白菜素已从药用植物中提取出来应用于临床, 具有镇咳祛痰作用, 用于治疗慢性支气管炎^[1]。红凉伞作为云南地区的民族药, 分布广泛, 定量测定表明其岩白菜素的量高于朱砂根, 具有较大的开发利用价值^[3]。为此, 2004 年以来, 开展了人工栽培种植研究, 基本取得了成功。为了更好地开发利用这一药材资源, 对其中岩白菜素动态积累的规律进行了研究。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器: 紫外分光光度计(UV-2201, 日本岛津), LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津, SPD-20A 型紫外检测器, CTO-10AS vp 型柱温箱,

CBM-102 型工作站), 超声波清洗器(HS6150D 型, 天津市恒奥科技发展有限公司)。

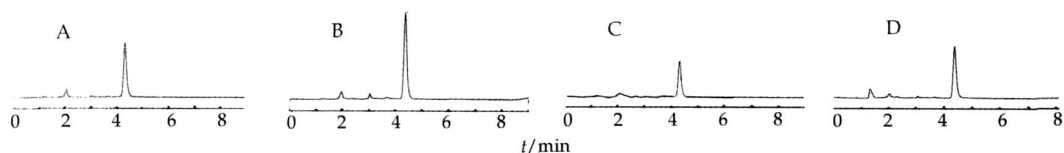
1.2 试剂: 甲醇为分析纯, 高效液相用甲醇为色谱纯, 均由天津市化学试剂三厂生产。

岩白菜素对照品(批号 742-200111, 供定量测定用, 中国药品生物制品检定所)。

1.3 实验材料: 实验所用样品红凉伞, 2006 年 2~12 月采自云南思茅等地, 由云南思茅热带作物职业技术学院彭丽彬提供, 经河南中医学院生药教研室陈随清教授鉴定为紫金牛科植物红凉伞 *Ardisia crenata* Sims var. *bicolor* (Walker) C. Y. Wu et C. Chen。

2 方法与结果

2.1 色谱分析条件: 色谱柱为 Hypersil ODS(250 mm×4.0 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(25: 75), 体积流量: 1.0 mL/min, 检测波长: 275 nm, 进样量: 5 μL, 柱温: 25℃。在上述色谱条件下, 岩白菜素与其他成分分离良好, 理论板数以岩白菜素峰计算不低于 1500; 分离度大于 1.5, 结果见图 1。



A-岩白菜素 B-红凉伞根 C-红凉伞茎 D-红凉伞叶

A-bergenin B-roots of *A. crenata* var. *bicolor* C-stems of *A. crenata* var. *bicolor* D-leaves of *A. crenata*

图 1 岩白菜素对照品和红凉伞的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of bergenin reference substance and *A. crenata* var. *bicolor*

* 收稿日期: 2008-11-09

作者简介: 陈随清(1965—), 男, 河南濮阳人, 博士, 教授, 研究方向为中药规范化种植及质量标准研究, 发表论文 40 余篇, 主持“十一五”科技支撑计划项目 1 项, 参编著作 5 部。 Tel: (0371) 65676686 E-mail: suiqingchen@sohu.com

2.2 对照品溶液的制备:精密称取岩白菜素对照品适量,加甲醇制成含岩白菜素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备:取本品细粉约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz)40 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 线性关系的考察:精密称取岩白菜素对照品适量,置于量瓶中,用甲醇溶解,加甲醇至刻度,摇匀,制成含 4.002 mg/mL 的对照品储备溶液,精密吸取储备溶液 0.5、1、2、3、4、5、6 mL 置量瓶中,加甲醇至刻度,制成质量浓度为 0.200 1、0.400 2、0.800 4、1.200 6、1.600 8、2.001 0、2.401 2 mg/mL 岩白菜素对照品溶液,分别进样 5 μL 。以岩白菜素的进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归,回归方程为: $Y = 1\,406.0\,X + 7.219\,61$, $r = 0.999\,9$,表明岩白菜素在 1.00~12.01 μg 线性关系良好。

2.5 稳定性试验:取供试品溶液,进样 7 次,时间间隔为 0、2、4、6、8、10、12 h,记录峰面积值,计算 RSD

为 0.47%,结果表明本试验条件稳定,供试液在 12 h 内稳定性良好。

2.6 精密度试验:精密吸取供试品溶液 5 μL ,连续进样 5 次,测得岩白菜素峰面积,计算 RSD 为 0.17%,表明本试验方法精密度良好。

2.7 重现性试验:取红凉伞药材粉末 5 份,各 0.5 g,精密称定,按供试液制备项制备供试液,进样,记录峰面积值,计算样品中岩白菜素的量。5 份样品岩白菜素量平均值为 3.51%,RSD 为 0.70%,表明本试验方法重现性良好。

2.8 加样回收率试验:取红凉伞粉末 6 份,各 0.2 g,精密称定,于每份样品中加入适量岩白菜素对照品按供试品溶液制备项制备供试品溶液,进行测定,计算回收率,平均回收率为 101.17%,RSD 为 1.67%。

2.9 样品测定

2.9.1 红凉伞不同部位岩白菜素的测定:取红凉伞根、茎、叶、花、果、种子等部位样品,精密测定,按供试品溶液制备项下制备样品溶液。取样品溶液和岩白菜素对照品溶液各 5 μL ,注入高效液相色谱仪,测定,计算岩白菜素的量,结果见表 1。

表 1 红凉伞不同部位样品中岩白菜素测定结果($n = 2$)

Table 1 Determination of bergenin in different parts of *A. crenata* var *bicolor* ($n = 2$)

产 地	岩白菜素/ %							
	根	茎	侧枝	叶	花	果柄	果壳	种子
景谷(野生)	4.69	2.07	2.46	4.08	—	2.04	2.67	0.31
普洱(栽培)	7.10	3.59	3.29	4.52	1.88	2.21	1.68	0.16
普洱(栽培)	7.39	3.49	3.39	4.51	1.88	2.31	1.69	0.16

2.9.2 不同生长年限红凉伞中岩白菜素的测定:取不同生长年份红凉伞根、茎、叶部位样品(样品采集时间 2007 年 6 月),精密测定,按供试品溶液制备项下制备样品溶液。取样品溶液和岩白菜素对照品溶液各 5 μL ,注入高效液相色谱仪,测定,计算岩白菜素的量,结果见表 2。

2.9.3 一年生长期红凉伞中岩白菜素的测定:取一年生长期不同月份红凉伞根、茎、叶部位样品(样品采自云南省普洱市、人工栽培),精密测定,按表 2 红凉伞不同生长年份样品中岩白菜素测定结果($n = 2$)

Table 2 Determination of bergenin in *A. crenata* var *bicolor* for different years ($n = 2$)

生长年限	岩白菜素/ %		
	根	茎	叶
一年生	4.35	3.34	4.11
二年生	6.43	4.98	5.37
三年生	7.76	5.89	6.24
多年生	6.49	5.47	5.87

供试品溶液制备项下制备样品溶液。取样品溶液和岩白菜素对照品溶液各 5 μL ,注入高效液相色谱仪,测定,计算岩白菜素的量,结果见表 3。

表 3 红凉伞一年生长期样品中岩白菜素测定结果($n = 2$)

Table 3 Determination of bergenin in *A. crenata* var *bicolor* of different months in one year ($n = 2$)

时 间	岩白菜素/ %		
	根	茎	叶
2006-02-24	5.81	3.34	4.71
2006-03-24	7.1	3.44	4.52
2006-04-24	7.39	3.44	4.51
2006-05-24	8.23	2.91	5.26
2006-06-24	5.49	2.23	4.76
2006-07-24	5.01	2.08	4.18
2006-08-24	4.99	1.53	4.11
2006-09-24	4.82	1.92	4.49
2006-10-24	4.86	2.71	4.53
2006-11-24	3.97	1.74	3.60
2006-12-24	3.29	2.34	2.57

3 结论与讨论

3.1 岩白菜素易溶甲醇,在乙醇或水中微溶。根据这一特性,在样品溶液制备中以甲醇为提取溶剂。提取方法上,以超声提取和回流提取两种方法作对比,表明用甲醇超声提取较为适宜。通过考察超声提取时间(10、20、30、40、60 min),试验结果表明超声提取 40 min 岩白菜素提取率最高,故确定提取条件为用甲醇超声提取 40 min。实验考察了 4 种不同条件的流动相:(1) 甲醇-水(20:80);(2) 甲醇-水(25:75);(3) 甲醇-水(30:70);(4) 甲醇-水(40:60),进行了系统适用性试验,试验结果表明在实验色谱条件下,以甲醇-水(25:75)为流动相,体积流量 1.0 mL/min,柱温 25 ℃,检测波长 275 nm,供试品中岩白菜素得到较好分离,理论板数达到 2 000,分离度 2.20。

3.2 检测波长的确定,对岩白菜素溶液在 190~400 nm 波长扫描,在波长为 210 和 275 nm 有最大吸收,实验表明在 275 nm 波长处岩白菜素吸收峰灵敏度高,其他色谱峰干扰较小,故选择 275 nm 作为检测波长。

3.3 分别对不同采收期、不同生长年限、不同药用部位红凉伞药材中岩白菜素的量进行了测定。结果表明,不同入药部位红凉伞药材中岩白菜素的量存在较大的差异,其中以根中主要有效成分岩白菜素的量最高,不同部位岩白菜素的量由高到低的顺序为:根、叶、茎、侧枝、果柄、花、果壳、种子,其中,侧枝与茎、果壳与果柄中岩白菜素的量没有明显差异。

一年生长期内岩白菜素在红凉伞中积累动态表明,5 月份红凉伞根、茎、叶中岩白菜素的量最高,以后逐渐下降,建议 5 月份为红凉伞药材采收期。

不同生长年限红凉伞中岩白菜素的量存在较大的差异,思茅地区的三年生红凉伞根、茎、叶中岩白菜素的量高于一年生、二年生栽培的红凉伞,但多年生栽培的根、茎、叶中岩白菜素的量较低(同一采收期)。由于样品数量有限,该问题有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005
- [2] 赵亚,刘合刚. 紫金牛属植物研究近况[J]. 中草药, 1999, 30(3): 228
- [3] 张艺,赖先荣,孟宪丽. 紫金牛属药用植物中岩白菜素的高效液相色谱法测定及资源利用[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(8): 458

(上接第 1348 页)

- [3] 曹俊岭,李祖伦,付强,等. 中药及复方整合作用的研究[J]. 中草药, 2007, 38(1): 附 2-附 4
- [4] 方艺霖,张艺,肖小河,等. 细胞膜色谱技术用于中药活性成分筛选的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(7): 附 3-附 5
- [5] 朱伟,陈可冀,徐筱杰. 计算机药物虚拟筛选技术在中医药领域中的应用前景[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 29(3): 263-266
- [6] 肖小河,金城,赵中振,等. 论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14): 1377-1381
- [7] 王伽伯,李会芳,肖小河,等. 生物检定方法控制中药质量的思考[J]. 世界科学技术—中药现代化, 2007, 9(6): 36-39
- [8] 赵艳玲,王伽伯,肖小河,等. 微量热法研究板蓝根的生物热力学特征[J]. 中草药, 2007, 38(2): 193-196
- [9] 鄢丹,周丹蕾,唐慧英,等. 角类动物药质量控制模式与方法的创新和发展[J]. 中草药, 2009, 40(5): 673-676
- [10] 李寒冰,鄢丹,金城,等. 基于化学荧光测定的板蓝根抗

病毒效价检测方法的建立[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(4): 908-910

- [11] 李寒冰,鄢丹,王伽伯,等. 基于神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质生物评价的研究[J]. 药学报, 2009, 44(2): 162-166
- [12] Yan D, Xiao X H, Jin C, et al. Microcalorimetric investigation of the effect of berberine alkaloids from *Coptis chinensis* Franch on *Staphylococcus aureus* growth[J]. *Sci China Ser B-Chem*, 2008, 51(7): 640-645
- [13] 李寒冰,鄢丹,曹俊岭,等. 中药生物效价检测用对照品的选择与标化[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(3): 363-365
- [14] Wei J K, Yan L Z, Li M S, et al. Investigation on the spectrum-effect relationships of EtOAc extract from *Radix Isatidis* based on HPLC fingerprints and microcalorimetry[J]. *J Chromatogr B*, 2008, 871: 109-114
- [15] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等. 左金丸及类方 HPLC 指纹图谱与生物热活性的“谱-效”关系研究[J]. 化学学报, 2008, 66(22): 3533-3538