

· 资源与鉴定 ·

不同产地和来源冬凌草药材的质量评价

陈随清, 崔璨, 裴莉昕, 董诚明, 冯卫生

(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:评价不同产地冬凌草药材的质量,为冬凌草的利用和开发提供科学依据。方法:采用高效液相色谱法对不同产地冬凌草中冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸的含量进行测定,按照《中国药典》2010年版附录中测定法对冬凌草中水溶性浸出物和醚溶性浸出物进行测定;综合分析评价各冬凌草样品间的差异。结果:不同产地、不同变异类型冬凌草中各种成分的含量有明显差异。冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸是造成不同地区冬凌草质量差异的主要因素,相比较而言醚溶性浸出物对冬凌草质量差异的影响要大于水溶性浸出物;而冬凌草变异类型的质量差异主要是由冬凌草甲素和乙素的含量变化造成的。结论:不同产地和不同变异类型来源的冬凌草在质量上有所不同,应用时应加以区别。

[关键词] 冬凌草; 不同产地; 变异类型; 质量评价

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0122-05

Quality Evaluation of Rabdosiae Rubescentis Herba from Different Place and Origin

CHEN Sui-qing, CUI Can, PEI Li-xin, DONG Cheng-ming, FENG Wei-sheng

(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** The quality of Rabdosiae Rubescentis Herba from different place and origin was evaluated, to provide the scientific basis for the use and development. **Method:** The oridonin, ponicedin, and rosmarinic acid were determined by HPLC, The method of determining the content of water-soluble chemical composition and ether-soluble chemical composition was in line with Pharmacopeia Edition 2010. And the data of different samples was compared and analysed. **Result:** The content of chemical compositions in Rabdosiae Rubescentis Herba from different place and different variance-types has a significant difference. The oridonin, ponicedin, and rosmarinic acid are the main factors causing differences in the quality of Rabdosiae Rubescentis Herba from different places. By comparison, the impact on the quality of Rabdosiae Rubescentis Herba, ether-soluble chemical composition is greater than the water-soluble chemical composition. The difference of variance-types is caused by the content of oridonin and ponicedin. **Conclusion:** It's necessary to distinguish the place and variance-type of Rabdosiae Rubescentis Herba before using it.

[收稿日期] 20110223(001)

[基金项目] 科技部“十一五”科技支撑计划项目(2006BA106A15-3)

[第一作者] 陈随清, 教授, 博士, 研究方向: 中药品种整理及质量标准, Tel: 0371-65676686, E-mail: suiqingchen@sohu.com

[3] Petritis K, Elfakir C, Dreux M. A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids [J]. J Chromatogr A, 2002, 961(1):9.

[4] 严铭铭, 曲晓波, 钟英杰, 等. 梅花鹿鹿茸中促进海马神经细胞增殖蛋白的分离纯化[J]. 中草药, 2007, 38(8):1163.

[5] Morton R C, Gerber G E. Amino acid analysis by dinitrophenyl-ation and reverse-phase high-pressure liquid chromatography[J]. Anal Biochem, 1988, 170:220.

[6] 毕胜男, 严铭铭, 邵帅, 等. 飞蓬中植物蛋白质的提取与分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 18(12):1168.

[责任编辑 邹晓翠]

[Key words] Rabdosiae Rubescentis Herba; places that Rabdosiae Rubescentis herba come from; variance-type; quality evaluation

冬凌草为唇形科香茶菜属植物碎米桠 *Rabdosia rubescens* [Hensl.] Hara 的干燥地上部分,分布于我国河南、山西、河北、湖南、湖北、四川、贵州、广西、云南、陕西等地,作为中药材主产于河南、山西两省,具有清热解暑、活血止痛之功效,现代研究证明具有抗肿瘤作用^[1]。冬凌草中的主要成分是贝壳杉烷二萜类化合物,目前研究最多且疗效已被公认的是冬凌草甲素和冬凌草乙素^[2]。近年来研究发现以迷迭香酸为代表的冬凌草水溶性成分也有明显的药理活性^[3-4]。冬凌草资源在我国分布广泛,该种植物种内变异比较常见,存在很多变异类型^[5-6],另外,由于受环境影响和人为破坏,各地所产冬凌草质量并不均一。为了实现对冬凌草资源的合理开发和利用,作者以冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸、水溶性浸出物和醚溶性浸出物的含量为指标,对不同产地的冬凌草药材进行了质量评价。

1 材料

表1 冬凌草药材产地及采集信息

产地	采集日期	编号	产地	采集日期	编号
山西夏县	2008-07-25	DLC-01	河南辉县	2008-07-22	DLC-12
山西闻喜县	2008-07-25	DLC-02	河南济源市	2008-07-24	DLC-13
贵州施秉县	2008-08-09	DLC-03	河南宝丰县	2008-07-26	DLC-14
山西绛县	2008-07-24	DLC-04	河南西峡县	2008-07-27	DLC-15
河南林州市	2008-09-24	DLC-05	河南淇县(白花)	2008-09-25	DLC-16
河南淇县	2008-09-25	DLC-06	河南鲁山县(红色叶)	2008-08-09	DLC-17
河南灵宝市	2008-08-19	DLC-07	河南济源市(白花)	2008-07-27	DLC-18
河南鲁山县	2008-07-15	DLC-08	河南鲁山县(全缘圆叶)	2008-08-09	DLC-19
山西阳城县	2008-07-24	DLC-09	河南济源市(全缘圆叶)	2008-07-27	DLC-20
河南栾川县	2008-07-26	DLC-10	河南济源市(紫茎紫叶)	2008-07-27	DLC-21
河南新县	2008-07-20	DLC-11	河南济源市(紫茎)	2008-07-27	DLC-22

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,冬凌草甲素检测波长 238 nm,流动相甲醇-0.5% 磷酸水溶液(49:51),流速 0.8 mL·min⁻¹。冬凌草乙素检测波长 238 nm,流动相甲醇-0.5% 磷酸水溶液(50:50),流速 0.8 mL·min⁻¹。迷迭香酸检测波长 335 nm,流动相甲醇-0.5% 磷酸水溶液(47:53),流速 0.8 mL·min⁻¹。

2.2 对照品溶液的制备 精密称定 105 °C 干燥 4 h

1.1 仪器 日本岛津 LC-20 AT 型高效液相色谱仪 (SPD-20A 型紫外检测器;CBM-102 型色谱工作站);HL 型溶剂过滤器;HP01 型无油真空泵(天津恒奥科技发展有限公司);恒温水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂)。

1.2 试剂 冬凌草甲素对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 111721-200501);冬凌草乙素对照品购自上海展舒化学科技有限公司(批号 52617-37-5,纯度 98.26%);迷迭香酸对照品购自成都曼斯特生物科技有限公司(批号 20283-93-5,纯度 98.07%)。水为双蒸水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.3 样品 采自河南太行山区、伏牛山区、大别山区以及贵州施秉县等冬凌草主要分布区,均经我校陈随清教授鉴定为唇形科香茶菜属植物碎米桠 *R. rubescens* 地上草质部分,实验样品保存于河南中医药大学生药研究室,见表 1。

的冬凌草甲素对照品 2.31 mg,冬凌草乙素对照品 2.01 mg,迷迭香酸对照品 2.22 mg,加甲醇溶解,定容至 25 mL 量瓶中,分别配制成质量浓度为 0.092 4,0.080 4,0.088 8 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 冬凌草甲素的提取:精密称取冬凌草粗粉 1 g,加乙酸乙酯 50 mL,超声提取 60 min,放置室温后补足减失的质量,过滤,滤液水浴挥干,残渣加甲醇溶解,定容至 50 mL 量瓶中

备用。

冬凌草乙素的提取:精密称取冬凌草粗粉 1 g,加丙酮 50 mL,回流提取 90 min,放置室温后补足缺失的质量,过滤,滤液水浴挥干,残渣加甲醇溶解,定容至 50 mL 量瓶中备用。

迷迭香酸的提取:精密称取冬凌草粗粉 1 g,加甲醇 50 mL,回流提取 60 min,放置室温后补足缺失的质量,过滤,滤液水浴挥干,残渣加甲醇溶解,定容至 50 mL 量瓶中备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 分别精密吸取冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸对照品溶液 2,4,6,8,10,12 μL 进样检测,以进样量为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。求得冬凌草甲素回归方程 $Y = 1\ 455\ 645.413X - 18\ 235.027 (r = 0.999\ 9)$,线性范围 0.18 ~ 1.11 μg ;冬凌草乙素回归方程 $Y = 1\ 034\ 085.016X - 12\ 707.06 (r = 0.999\ 9)$,线性范围 0.16 ~ 0.96 μg ;迷迭香酸回归方程 $Y = 2\ 490\ 956.111X + 45\ 123.629 (r = 0.999\ 9)$,线性范围 0.18 ~ 1.07 μg 。

2.4.2 精密度试验 分别精密吸取冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸对照品溶液 5 μL ,重复进样 6 次,记录峰面积,并计算 RSD,结果冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸 RSD 分别为 0.60%,0.57%,0.63%。

2.4.3 重复性试验 取同一份药材,按 2.3 项下供试品溶液制备方法平行制备 6 份,分别进样检测,计算其 RSD,结果冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸 RSD 分别 2.37%,2.57%,2.72%。

2.4.4 稳定性试验 分别取同一份药材,按 2.3 项下供试品溶液制备方法制备,分别在 0,2,4,8,12,24 h 后进样,记录峰面积,计算其 RSD,结果冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸 RSD 分别为 2.15%,2.65%,2.70%。

2.4.5 加样回收率试验 分别取已知冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸含量的冬凌草样品,精密称取该样品粉末 5 份,每份均加入等量对照品,按 2.3 项下供试品溶液制备方法制备,计算回收率 RSD,结果符合检测分析要求,见表 2。

2.5 不同产地冬凌草的含量测定 取不同产地冬凌草样品,按 2.3 项下供试品溶液制备方法制备,精密吸取 5 μL 进样检测,根据外标法计算各样品中冬

表 2 冬凌草中 3 种成分加样回收试验

名称	取样量 /g	样品量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	RSD /%
冬凌草甲素	0.499 8	7.816	7.819	15.668	98.91	1.50
	0.500 7	7.830	7.819	15.481		
	0.500 4	7.825	7.819	15.592		
	0.500 3	7.824	7.819	15.638		
	0.500 3	7.824	7.819	15.365		
冬凌草乙素	0.499 9	7.817	7.819	15.596		
	0.500 3	0.714	0.713	1.423	99.26	1.88
	0.499 9	0.713	0.713	1.428		
	0.500 1	0.713	0.713	1.440		
	0.500 8	0.714	0.713	1.410		
迷迭香酸	0.500 0	0.713	0.713	1.426		
	0.499 9	0.713	0.713	1.403		
	0.500 5	0.14	0.14	0.281	97.33	2.49
	0.500 2	0.14	0.14	0.278		
	0.500 6	0.14	0.14	0.286		
	0.500 5	0.14	0.14	0.277		
	0.499 8	0.14	0.14	0.280		
	0.500 3	0.14	0.14	0.279		

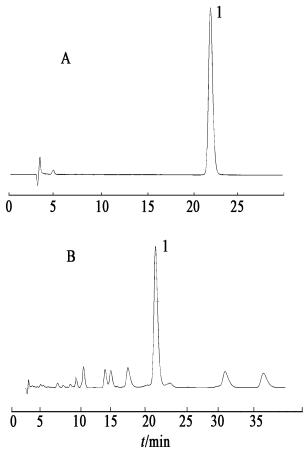
凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸的含量,结果见表 3。对照品及样品 HPLC 图谱见图 1 ~ 3。

2.6 冬凌草水溶性浸出物测定 按照《中国药典》2010 年版附录中水溶性浸出物测定法对不同产地冬凌草中水溶性浸出物含量进行测定,见表 3。

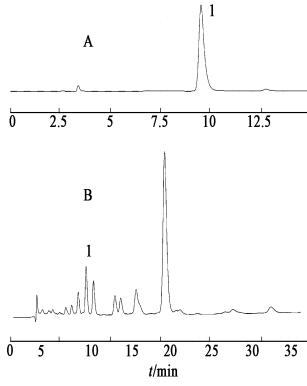
2.7 冬凌草醚溶性浸出物测定 按照《中国药典》2010 年版附录中醚溶性浸出物测定法,以乙醚为溶剂对不同产地冬凌草中醚溶性浸出物含量进行测定,见表 3。

3 结果与讨论

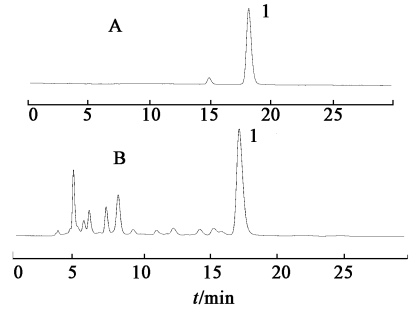
从冬凌草各种成分的含量数据可以看出不同地区冬凌草的质量存在一定差异,要科学地反映并描述这些差异,需要通过数理统计的方法进行分析。因此,借助统计软件 SPSS 13.0 将有关冬凌草质量的各项数据统一进行 Zscores 标准化处理,然后对标准化处理后的数据进行分层聚类分析。由于部分样品属于变异类型,其成分含量变化较大,为了避免对聚类结果造成影响,对冬凌草正常类型和变异类型分别进行分析。根据数据特点,在聚类分析过程中,采取了 Q 型聚类分析,通过计算向量间的欧氏距离建立样品间的相似系数矩阵,绘制聚类树状图,评价



A. 对照品;B. 冬凌草;1. 冬凌草甲素
图1 冬凌草药材(甲素)HPLC



A. 对照品;B. 冬凌草;1. 冬凌草乙素
图2 冬凌草药材(乙素)HPLC



A. 对照品;B. 冬凌草;1. 迷迭香酸
图3 冬凌草药材(迷迭香酸)HPLC

表3 不同产地、不同变异类型冬凌草含量测定

No.	I /mg·g ⁻¹	II /mg·g ⁻¹	III /mg·g ⁻¹	IV /%	V /%	No.	I /mg·g ⁻¹	II /mg·g ⁻¹	III /mg·g ⁻¹	IV /%	V /%
DLC-01	17.70	1.43	2.89	4.37	0.93	DLC-12	8.11	0.94	6.64	4.42	0.25
DLC-02	7.41	0.84	3.57	3.85	0.48	DLC-13	9.43	0.66	4.20	4.70	0.66
DLC-03	0.00	0.00	0.00	3.88	0.67	DLC-14	8.19	0.58	4.97	4.42	0.53
DLC-04	6.14	0.31	4.44	3.90	0.74	DLC-15	1.41	0.07	2.97	3.03	0.37
DLC-05	5.69	1.61	1.70	3.46	0.39	DLC-16	3.93	0.78	9.84	4.35	0.71
DLC-06	3.72	0.48	9.75	4.62	0.85	DLC-17	0.00	0.00	8.58	3.68	0.59
DLC-07	0.07	0.00	17.91	5.04	0.65	DLC-18	1.58	0.16	0.00	2.19	0.35
DLC-08	0.00	0.00	5.54	3.60	0.39	DLC-19	0.00	0.00	10.36	4.17	0.90
DLC-09	5.00	0.97	0.00	2.27	0.54	DLC-20	4.51	0.97	9.42	4.03	0.62
DLC-10	0.22	0.13	4.14	3.52	0.28	DLC-21	4.97	0.53	7.56	3.91	0.51
DLC-11	5.24	0.55	6.62	3.33	0.22	DLC-22	7.95	1.05	9.89	4.35	0.15

注: I. 冬凌草甲素; II. 冬凌草乙素; III. 迷迭香酸; IV. 水溶性浸出物; V. 醚溶性浸出物。

不同地区冬凌草质量的相似度,见图4。

向量 $x = (x_1, \dots, x_p)$ 与 $y = (y_1, \dots, y_p)$ 之间的距离或相似系数通过欧式距离计算:

$$\text{欧式距离} = \sqrt{\sum_i (x_i - y_i)^2}$$

其中 x, y 代表评价冬凌草质量的不同指标,如冬凌草甲素、乙素的含量等。

从图4可见,不同地区冬凌草在质量上大致分为:山西闻喜县、绛县与河南济源市、辉县市、宝丰县聚为一类,山西阳城县、夏县与河南林州市、灵宝市、淇县聚为一类,目前这两类分布的区域是药材冬凌草的主产区;河南西峡县、栾川县、鲁山县聚为一类,贵州施秉县冬凌草单独聚为一类。不同地区冬凌草质量有一定差异,而这种差异却没有明显的规律性,

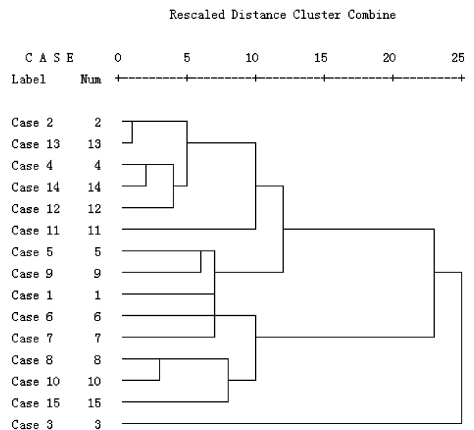


图4 不同地区冬凌草聚类树状示意
表现为不同地区冬凌草质量的聚类不具有经纬度地

带性,不同变异类型冬凌草之间的聚类也表现为相似的特点,估计冬凌草植物体内成分的代谢合成也与生长的小环境有一定关系。为找出影响冬凌草质量差异的主因,计算了不同地区冬凌草各种化学成分的变异系数。

$$CV = \sigma/\mu$$

σ 为样本的标准差, μ 为样本的均值。

通过表 4 可见,冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭

香酸的变异系数较大,表明单位均值上这 3 类物质的数据离散程度更高,即这 3 类物质是造成不同地区冬凌草质量差异的主要因素,相比较而言醚溶性浸出物对冬凌草质量差异的影响要大于水溶性浸出物。同时冬凌草变异类型质量差异主要是由冬凌草甲素和乙素的含量变化造成。这与现代研究认为冬凌草中贝壳杉烷二萜类化合物不稳定导致冬凌草不同的化学类型的结果是一致的^[2]。

表 4 不同地区、不同变异类型冬凌草化学成分的变异系数

%

样品类型	分析项目	冬凌草甲素	冬凌草乙素	迷迭香酸	水溶性浸出物	醚溶性浸出物
正常类型	标准差	4.78	0.51	4.38	0.73	0.22
	均值	5.22	0.57	5.02	3.89	0.53
	变异系数	0.92	0.89	0.87	0.19	0.42
变异类型	标准差	2.92	0.45	3.63	0.75	0.24
	均值	3.28	0.50	7.95	3.81	0.55
	变异系数	0.89	0.90	0.46	0.20	0.45

每个地区冬凌草受环境影响的程度各不相同,部分地区冬凌草生境差异十分明显。如同属太行山系,有的产区气候相对温暖、湿润,所以植被良好、植物种类繁多,而另一产地气候凉爽、干燥、风沙大,由于矿产丰富,山体破坏严重,所以植被较少,局部地区植物种类单一。因此,不同山脉、深山、浅山的地理气候又各不相同,这些都可能造成产自同一山系的冬凌草质量有所差别,而来自不同产地的冬凌草,可能由于两地生境状况相近,在质量上相差不大。受这些因素的影响,可能使得对冬凌草的聚类分析结果与纬度、地区的联系不紧密。此外,冬凌草种内的变异情况普遍存在,在样品的采集过程中我们发现,冬凌草的形态性状变异表现在叶形、叶色、茎色、花色上都有一定变化。比如在济源和淇县冬凌草都出现了白花的植株,其中济源白花冬凌草在花冠筒喉部有蓝紫色斑点,而淇县白花冬凌草则呈现纯白色,这 2 种白花冬凌草的质量又相差很大;鲁山和济源冬凌草都出现了全缘圆叶的叶形和紫色茎的植株,这 2 种外观上相近的冬凌草在化学成分的种类与含量上仍然差别很大。冬凌草外观性状和化学成分的差异,是受到环境的饰变作用影响,还是受到基因变异的影响,需要更深一步的研究。

有些产地的样品以及个别变异类型中冬凌草甲素、冬凌草乙素、迷迭香酸的含量较低,甚至检测不到,因此在确定冬凌草药材资源的时候值得重视。2010 年版《中国药典》规定冬凌草中冬凌草甲素的

含量 $\geq 0.25\%$,有些产地的样品以及个别变异类型是不合格的。另外,2010 年版《中国药典》收载冬凌草的醇(乙醇)溶性提取物的限量,本实验在设计时参考文献资料^[7],贝壳杉烷二萜类化合物脂溶性较强,易溶于醚类溶剂,故测定了醚溶性浸出物和水溶性浸出物,这样更适合冬凌草所含化学成分的实际情况。

[参考文献]

[1] 肖培根. 新编中药志. 第 3 卷[M]. 北京:化学工业出版社,2002:69.

[2] 孙汉董,韩全斌. 冬凌草的植物资源、化学和抗癌活性成分的研究[C]. 北京:中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编(1933-2003),2003.

[3] 陈随清,冯卫生,王丽. 冬凌草化学成分积累动态的研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2007,9(3):67.

[4] 宋发军,吴士筠,梁建军. 巴东冬凌草的抗菌活性研究[J]. 中南民族大学学报:自然科学版,2004,23(4):9.

[5] 中国科学院《中国植物志》编撰委员会. 中国植物志:第 66 卷[M]. 北京:科学出版社,1977:47.

[6] 苏秀红,董诚明,冯卫生,等. 冬凌草叶片形态多样性的研究[J]. 时珍国医国药,2007,18(10):2351.

[7] 孙汉董,许云龙,姜北. 香茶菜属植物二萜类化合物[M]. 北京:科学出版社,2001:20.

[责任编辑 邹晓翠]