

冬凌草二萜类成分的化学指纹图谱研究及评价

陈随清, 宋君, 崔璨

(河南中医学院, 郑州 450008)

摘要: 为了建立冬凌草(*Rabdosia rubescens*)二萜类成分的 HPLC 指纹图谱,并通过指纹图谱对来自不同产地和不同类型的冬凌草进行评价,本研究以 10 批太行山产冬凌草 HPLC 色谱图为参照,建立了冬凌草二萜类成分的指纹图谱,色谱条件为,色谱柱: phenomasil C18(250 × 4.6 mm, 5 μm)柱;流动相: 甲醇: 0.5% 磷酸水溶液梯度洗脱;柱温: 30℃;检测波长: 238 nm;流速: 0.8 mL/min。通过化学成分指纹图谱相似度分析以及主成分分析方法,综合评价不同产地冬凌草样品质量的差异。结果表明冬凌草种质资源出现多种分化,不同地区冬凌草二萜类成分差异明显;不同变异类型冬凌草二萜类成分也发生了变化,但没有明显规律性。

关键词: 冬凌草; 种质资源; 二萜类成分; 高效液相色谱; 化学指纹图谱; 相似度分析; 主成分分析

中图分类号: Q949.95

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2012)05-0519-09

Research and Evaluation on Chemical Fingerprints of Diterpenoids from *Rabdosia rubescens*

CHEN Sui-Qing, SONG Jun, CUI Can

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

Abstract: In this paper, chemical fingerprints were established by referring to the HPLC chromatography of ten batch samples from the Taihang Mountains. Phenomasil C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm) columns were used and methanol-water (0.5% phosphoric acid.) was chosen as the mobile phase. The column temperature was 30℃ and the fingerprints were detected at 238 nm. The flow rate was 0.8 mL/min. The quality of *Rabdosia rubescens* herba from different places was evaluated by similarity analysis and principal component analysis of chemical fingerprints. The results showed that *R. rubescens* had multiple germplasm, the diterpenoids from *R. rubescens* in different areas had significant differences, and the diterpenoids of different mutation types were changed, but showed no obvious trend. The results of this article provide a scientific basis for the protection and development of *R. rubescens* germplasm.

Key words: *Rabdosia rubescens* (Henrsl.) Hara; Germplasm; Diterpenoids; HPLC; Chemical fingerprints; Similarity analysis; Principal component analysis

中药冬凌草来源于唇形科植物碎米桠(*Rabdosia rubescens* [Henrsl.] Hara)的地上草质部分,因富含四环贝壳杉烷类二萜成分,具有一定的抗肿瘤活性,一直受到国内外学者的关注。有研究发现,冬凌草中的主要有效成分冬凌草甲素、冬凌草乙素

有多种生理活性,具有抗菌消炎、细胞毒、抗突变、受体拮抗、抗氧化等作用;冬凌草中的其他二萜类成分由于都含有抗菌抗肿瘤活性成分 α-亚甲基环戊酮,也表现出一定的抗菌、抗癌活性^[1,2]。由于冬凌草中二萜类物质生理活性强,对多种疾病的治疗作用

收稿日期: 2012-03-26, 修回日期: 2012-10-08。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173486); 河南中医学院科技创新人才项目资助(2011XCXRC02)。

作者简介: 陈随清(1965-),男,河南省濮阳县人,教授,博士。研究方向为中药品种整理及质量标准研究,发表论文 50 余篇,主持“十二五”科技支撑计划项目 1 项,参编著作 5 部。通信地址: 河南中医学院药学院办公室,邮编 450008(电话: 0371- 65676686, E-mail: suiqingchen@sohu.com)。

明显,且毒副作用较小,所以二萜类物质的种类、含量成为临床、生产和科学研究中评价冬凌草质量优劣或差异的标准。

有研究发现,不同产地冬凌草中二萜类成分存在明显差异,冬凌草主要有效成分冬凌草甲素、冬凌草乙素在太行山所产冬凌草中含量较高,而其他地区的冬凌草还具有其特有的二萜类化合物^[3-6];另外,冬凌草种质资源具有丰富的多样性^[7]。碎米桠为亚灌木类植物,上部草质茎四棱形,绿色;叶对生,卵形或菱状卵形,边缘具粗锯齿,上面绿色,下面淡绿色;聚伞花序在茎顶排列成狭圆锥花序;花冠二唇形,白色或粉红色,具紫色斑点^[8]。但在许多地区,冬凌草在叶缘类型、叶的颜色、草质茎颜色、花的颜色等外观性状上都发生了变异,我们也采集到了不同变异类型的植株样品。为了探索冬凌草二萜类成分差异的规律,我们对不同产地以及不同变异类型的冬凌草样品的二萜类成分进行了提取、分离,建立了冬凌草二萜类成分的高效液相(HPLC)指纹图谱,通过比较不同样品指纹图谱的相似度来评价冬凌草二萜类成分的差异。现报道如下。

1 仪器、试剂与材料

1.1 实验仪器

高效液相色谱仪(LC-20 AT,日本岛津),紫外检测器(SPD-20A), CBM-102 型色谱工作站, Waters2695 高效液相色谱仪,二极管阵列检测器(waters 2996),超声波清洗器(CQ-25 D,上海超声波仪器厂),溶剂过滤器(HL,天津恒奥科技发展有限公司),无油真空泵(HP01,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 实验试剂

HPLC 流动相用水为双蒸水,甲醇为色谱纯(天津四友化学试剂厂),其它试剂均为分析纯。

1.3 实验材料

冬凌草甲素对照品购自中国药品生物制品检定所;冬凌草乙素对照品购自上海展舒化学科技有限公司,纯度 98.26%。冬凌草药材的植物样品于 2008 年 7 月至 8 月采自河南太行山区、伏牛山区、大别山区,以及贵州施秉县等冬凌草主要分布区,所有药材的植物样品(见表 1)经陈随清鉴定为唇形科

表 1 冬凌草样品信息
Table 1 Sample information of *Rabdosia rubescens*

不同产地样品 Different origin		不同变异类型样品 Different variation type		
样品编号 No.	材料来源 Source of material	样品编号 No.	材料来源 Source of material	变异类型 Type
DLC-1	山西夏县	DLC-17	河南鲁山县	叶:卵圆形,全缘
DLC-2	山西闻喜县	DLC-18	河南济源市	叶:卵圆形,全缘
DLC-3	河南鲁山县	DLC-19	河南淇县	花:白色,无紫色斑点
DLC-4	山西绛县	DLC-20	河南济源市	茎:淡紫色;叶淡紫色
DLC-5	河南卢氏县	DLC-21	河南济源市	花:白色,无紫色斑点
DLC-6	河南林州市	DLC-22	河南鲁山县	叶:淡紫色
DLC-7	河南淇县	DLC-23	河南济源市	茎:淡紫色
DLC-8	河南灵宝市			
DLC-9	贵州施秉县			
DLC-10	山西阳城县			
DLC-11	河南栾川县			
DLC-12	河南辉县			
DLC-13	河南西峡县			
DLC-14	河南济源市			
DLC-15	河南宝丰县			
DLC-16	河南新县			

香茶菜属植物碎米桠(*Rabdosia rubescens* (Henrsl.)Hara),其标本保存于河南中医学院生药研究室。

2 实验方法

2.1 供试品溶液的制备

精密称取冬凌草粉末2 g,置具塞锥形瓶中,加入100 mL 70%丙酮超声提取1 h,补足减失的重量,过滤;取滤液50 mL,回收溶剂至无酮味,得稠膏及少量水液,将其转移至分液漏斗,加2~3倍体积氯仿萃取4次,萃取液回收溶剂,残渣加甲醇溶解,定容至25 mL容量瓶。检测前用0.45 μm微孔滤膜过滤。

2.2 对照品的选择及对照品溶液的制备

2.2.1 对照品的选择

由于冬凌草甲素及冬凌草乙素为中药材冬凌草中主要二萜类成分,故选取冬凌草甲素、冬凌草乙素作为对照品。

2.2.2 对照品溶液的制备

精密称定105℃干燥4 h的冬凌草甲素对照品1 mg,冬凌草乙对照品0.5 mg,加甲醇溶解,定容至10 mL容量瓶中,分别配制成浓度为0.1 mg/mL、0.05 mg/mL的对照品溶液。

2.3 色谱条件的确定

冬凌草二萜类成分指纹图谱的色谱条件为,色谱柱:phenomasil C18(250×4.6 mm,5 μm)柱;检测波长:238 nm;流动相:甲醇:0.5%磷酸水溶液梯度洗脱(见表2);流速:0.8 mL/min;柱温:30℃。

表2 梯度洗脱程序
Table 2 Gradient elution program

时间(min) Time	甲醇比例(%) Methanol	0.5%磷酸水比例(%) 0.5% Phosphoric acid
0	45	55
25	50	50
25.01	52	48
60	52	48

2.4 方法学考察

为了考察分析方法的可靠性,以1号样品为例,对仪器的精密度、稳定性、重复性作相应考察。

2.4.1 精密度实验

取1号样品,按2.1项下供试品溶液制备方法和2.3项下的色谱条件,制备供试品溶液并进行检

测,连续进样5次,以6号峰(冬凌草甲素)为参照,计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,RSD值均小于3.0%,仪器的精密度良好。

2.4.2 重现性实验

取1号样品5份,按2.1项下供试品溶液制备方法和2.3项下的色谱条件,制备供试品溶液并进行检测,5份供试品中各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%,表明其重现性良好。

2.4.3 稳定性实验

取1号样品供试品溶液,分别在0、2、4、8、12、24 h不同时间进样检测,计算出各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,并计算其RSD值。冬凌草样品在24 h内通过HPLC分析结果稳定,RSD均小于3.0%。

2.5 数据处理

采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件对采自太行山系的10批供试品HPLC图谱的相关参数进行处理,得到冬凌草二萜类化合物模式指纹图谱,计算不同产地冬凌草指纹的相似性系数,对其进行相似度评价。同时对不同产地的16批样品的共有峰通过主成分分析的方法,用SPSS软件进行数据处理,对其进行综合评价分析。

3 实验结果

3.1 冬凌草二萜类成分指纹图谱的建立

参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》(暂行),采用中国药典委员会推荐的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统A版》软件对采自太行山系的10批供试品HPLC图谱的相关参数进行处理,得到冬凌草二萜类化合物模式指纹图谱(见图1、图2),图谱中9个色谱峰为共有指纹峰,共有峰面积占总峰面积的95%。其中6号峰为冬凌草甲素,即为对照峰,1号峰为冬凌草乙素,指认依据参见图3;其它峰相对保留时间Rt、相对峰面积Ra分别为,1号峰:Rt 0.47、Ra 0.039,2号峰:Rt 0.53、Ra 0.184,3号峰:Rt 0.68、Ra 0.077,4号峰:Rt 0.72、Ra 0.077,5号峰:Rt 0.88、Ra 0.062,7号峰:Rt 1.06、Ra 0.041,8号峰:Rt 1.33、Ra 0.091,9号峰:Rt 1.47、Ra 0.099。

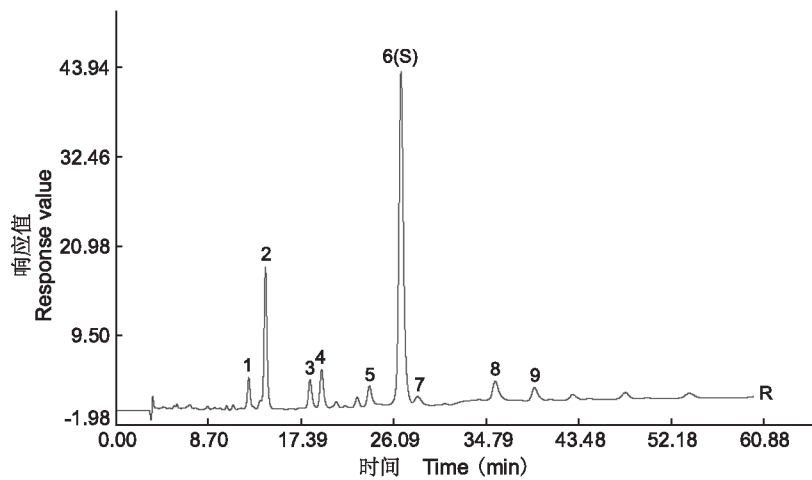


图 1 冬凌草二萜类成分模式指纹图谱[1-冬凌草乙素, 6-冬凌草甲素(S)]
Fig. 1 Reference fingerprint of diterpenoids from *Radosia rubescens* (1-ponicidin, 6-oridonin(S))

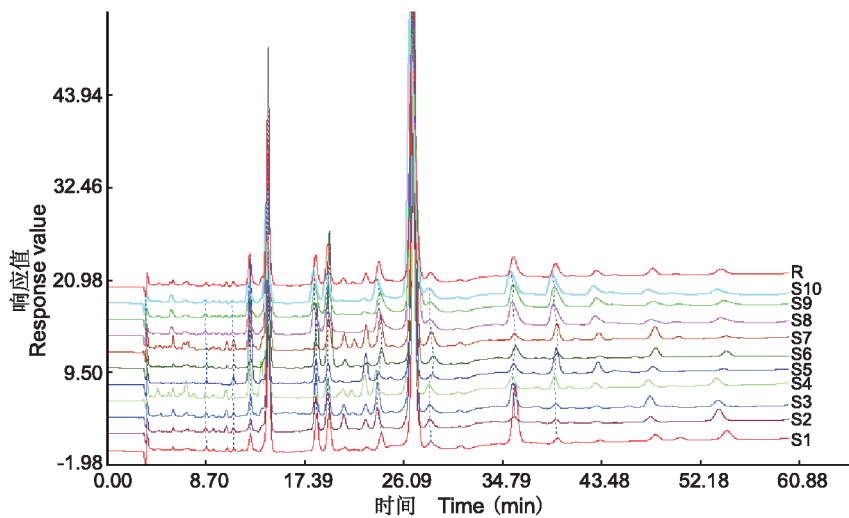


图 2 太行山系 10 批冬凌草样品指纹图谱叠加图
Fig. 2 Stacking chart of HPLC fingerprint of ten *Radosia rubescens* specimens from the Taihang Mountains

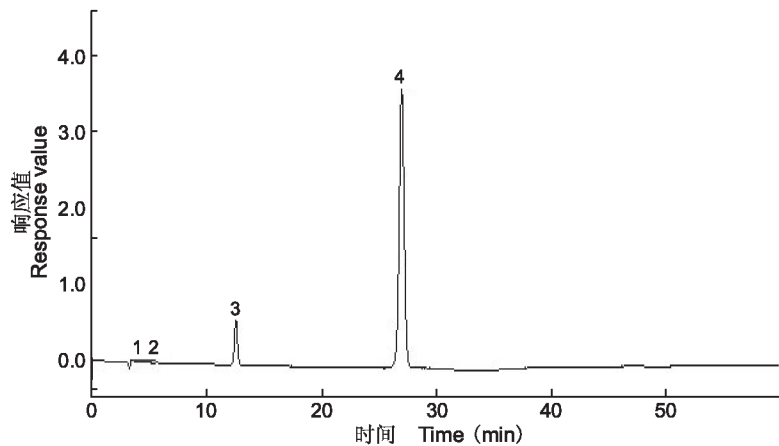


图 3 冬凌草甲素、乙素混合标准品
Fig. 3 Mixed standard substance of ponicidin and oridonin

3.2 冬凌草二萜类成分指纹图谱相似度评价

3.2.1 不同产地冬凌草二萜类成分指纹图谱相似度评价

分别将不同产地冬凌草二萜类成分指纹图谱与冬凌草模式指纹图谱相比较,计算不同产地冬凌草指纹图谱的相似性系数,评价不同产地冬凌草二萜类成分的相似度,结果见表 3。

表 3 不同产地冬凌草二萜类成分指纹图谱相似度评价结果
Table 3 Results of the similarity degree evaluation of diterpenoids fingerprints of *Rabdosia rubescens* from different areas

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
R	1	DLC-9	0.045
DLC-1	0.982	DLC-10	0.968
DLC-2	0.993	DLC-11	0.023
DLC-3	0.036	DLC-12	0.995
DLC-4	0.995	DLC-13	0.987
DLC-5	0.100	DLC-14	0.989
DLC-6	0.968	DLC-15	0.994
DLC-7	0.940	DLC-16	0.525
DLC-8	0.068		

注：植物样本产地见表 1。下同。
Note: The plant sample origin are listed in Table 1. The same below.

通过对不同产地冬凌草二萜类成分指纹图谱的相似度比较可以发现,不同产地冬凌草二萜类成分在种类和含量上有明显差异,这种差异性具有一定的地域性规律(见图 4),河南与山西交界一带的太行山冬凌草的二萜类成分比较相近,相似性系数在

0.9 以上;而大别山区的新县,秦岭南部伏牛山区的灵宝市、卢氏县、鲁山县,横断山脉地区的贵州施秉县所产冬凌草与太行山区差别较大。实验结果与有关文献对冬凌草种质资源与质量评价研究的报道基本是一致的^[2,9]。

3.2.2 不同类型冬凌草二萜类成分指纹图谱相似度评价

比较不同类型冬凌草二萜类成分指纹图谱及冬凌草模式指纹图谱,计算不同类型冬凌草指纹图谱的相似性系数,评价他们的相似度,结果见表 4。

据调查,冬凌草植物形态的变异主要表现为叶形、叶色、草质茎部分的颜色,以及花的颜色。从图 5 可以看出,不同类型冬凌草按照二萜类成分的相似度主要划为两类:济源全缘圆叶、紫茎紫叶、白花和淇县白花为一类;鲁山全缘圆叶、紫色叶和济源紫色茎为一类。从结果看二萜类成分的指纹图谱与冬凌草变异类型之间没有显著的规律性。调查中发现冬凌草植物形态的变异没有明显的遗传稳定性,受环境因素的影响较大,这与本二萜类成分指纹图谱的研究结果也是一致的。

3.3 不同产地冬凌草二萜类成分主成分分析

由于不同产地冬凌草表现出了明显的地域性,差异较大,我们以 16 个不同产地冬凌草指纹图谱中 9 个共有峰的峰面积为原始数值做主成分分析,以评价其质量。为了消除原始数据之间量纲不同的影响,对原始数据进行了标准化处理,使标准化后的

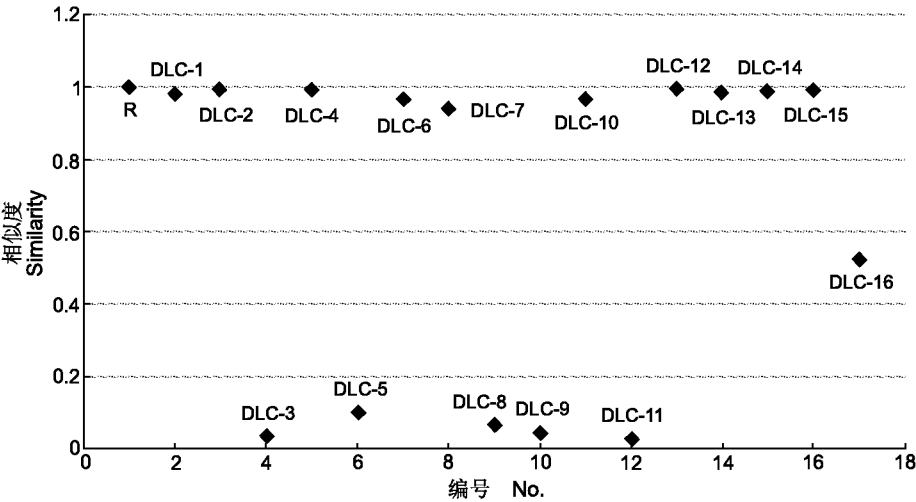


图 4 不同产地冬凌草二萜类成分指纹图谱相似度系数散点图
Fig. 4 Scatter diagram of diterpenoids fingerprints of *Rabdosia rubescens* from different areas

表 4 不同类型冬凌草二萜类成分指纹图谱相似度评价结果
Table 4 Results of the similarity degree evaluation of diterpenoids fingerprints of *Rabdosia rubescens* from different types

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
R	1	DLC-20	0.986
DLC-17	0.038	DLC-21	0.881
DLC-18	0.960	DLC-22	0.084
DLC-19	0.748	DLC-23	0.070

注：植物样本变异类型见表 1。下同。
Note: The plant sample variation types are listed in Table 1.
The same below.

数据具有可比性,得相关数据矩阵(见表 5),用 Spss 软件对标准化数据进行主成分分析,其结果为前 4 个特征值累计贡献率已达到 81.961% (见表 6),说明前 4 个主成分基本包含了主要的指标信息。这也可从表 7 的分析结果得到证明,第一主成分与 2 号峰、3 号峰、4 号峰、5 号峰和 6 号峰系数的绝对值较大,关系较密切;第二主成分主要反映 1 号峰的信息;主成分 3 主要反应 9 号峰的信息;主成分 4 主要反应 7 号峰的信息。

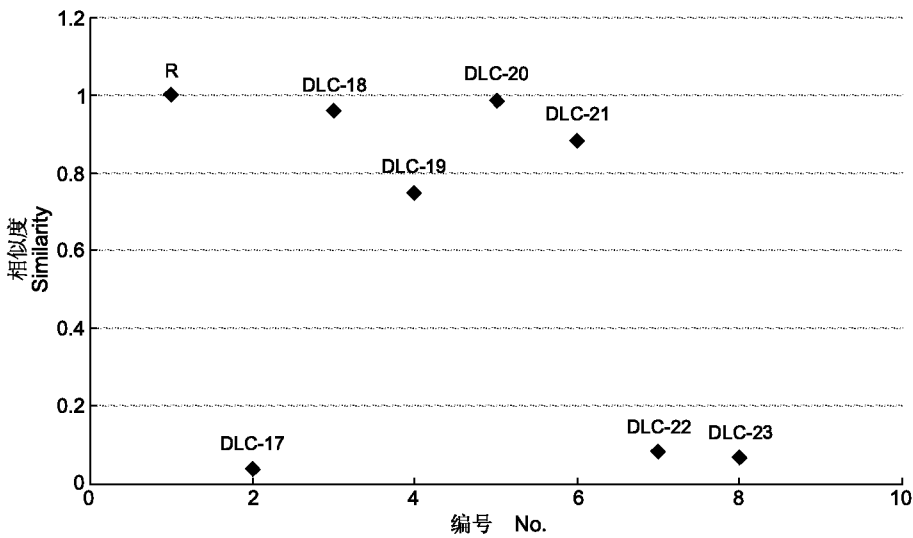


图 5 不同类型冬凌草二萜类成分指纹图谱相似度系数散点图
Fig. 5 Scatter diagram of diterpenoids fingerprints of *Rabdosia rubescens* from different types

表 5 标准化值
Table 5 Standardized values

编号 No.	1 号峰 Peak one	2 号峰 Peak two	3 号峰 Peak three	4 号峰 Peak four	5 号峰 Peak five	6 号峰 Peak six	7 号峰 Peak seven	8 号峰 Peak eight	9 号峰 Peak nine
DLC-1	0.13008	0.68485	0.21776	-0.43245	0.56096	-0.23594	3.28459	-0.44159	-0.44159
DLC-2	0.69476	0.32018	0.16319	-1.0128	0.46945	-0.2068	-0.43432	-0.50871	-0.50871
DLC-3	-0.95491	-1.04238	-0.95218	-1.16724	-1.46276	-0.35001	-0.62483	2.91071	2.91071
DLC-4	0.60225	0.57864	0.15567	0.87337	0.8095	-0.2124	0.89178	-0.47798	-0.47798
DLC-5	1.16632	-0.95062	-0.38465	0.15878	0.61587	-0.18445	0.07199	-0.20796	-0.20796
DLC-6	-0.754	-0.14023	-0.37384	-1.15076	0.15082	-0.28028	-0.19538	0.26955	0.26955
DLC-7	-0.46013	1.68905	3.13591	-0.43235	0.02361	-0.19831	0.10549	-0.45657	-0.45657
DLC-8	-1.0902	-0.85943	-0.21296	-0.19762	-1.44622	-0.35001	-0.49578	-0.62508	-0.62508
DLC-9	-1.37422	-1.04238	-0.95218	-0.81445	-1.45345	-0.35001	-0.73913	-0.62508	-0.62508
DLC-10	1.95953	-0.84219	0.01632	1.12393	0.44217	-0.08088	-0.33655	-0.0392	-0.03920
DLC-11	-0.88142	-1.01017	-0.92236	-1.17725	-1.40569	3.73636	-0.64496	-0.53273	-0.53273
DLC-12	-0.21392	0.10898	0.03405	-0.13384	0.37151	-0.11358	-0.14355	0.12079	0.12079
DLC-13	1.59753	0.8658	-0.24655	1.69878	1.41325	-0.23284	0.56325	-0.28495	-0.28495
DLC-14	0.45856	2.07803	1.16396	1.85119	1.35081	-0.24081	-0.73913	-0.42271	-0.42271
DLC-15	-0.12703	0.28106	-0.80777	0.64423	0.42629	-0.35001	-0.73913	-0.62508	-0.62508
DLC-16	-0.7532	-0.7192	-0.03439	0.16846	-0.86611	-0.35001	0.17566	1.94658	1.94658

用表 7 中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根便得到两个主成分中每个指标所对应的特征向量。将得到的特征向量与标准化数据相乘，可以得出主成分表达式，即公式 F1~F4。以每个主成分所对应的特征值占所提取主成分总的特征值之和的比例作为权重计算主成分综合模型，即公式 F，将 F 值进行排序，即得各地区综合评价比较，结果见表 8。

表 6 方差分解主成分提取分析
Table 6 Total variance explained

主成分排序 Sequencing of principal component	初始特征值 Initial eigenvalues			提取平方和载入 Extraction sums of squared loadings		
	合计 Total	方差的 % % of variance	累积 % Cumulative %	合计 Total	方差的 % % of variance	累积 % Cumulative %
1	3.707	41.187	41.187	3.707	41.187	41.187
2	1.311	14.571	55.758	1.311	14.571	55.758
3	1.206	13.398	69.156	1.206	13.398	69.156
4	1.152	12.805	81.961	1.152	12.805	81.961
5	0.893	9.924	91.885			
6	0.343	3.808	95.692			
7	0.302	3.360	99.052			
8	0.062	0.689	99.741			
9	0.023	0.259	100.000			

表 7 初始因子载荷矩阵
Table 7 Component matrixa

编号 No.	主成分排序 Sequencing of principal component				编号 No.	主成分排序 Sequencing of principal component			
	1	2	3	4		1	2	3	4
Zscore(1 号峰)	-0.544	0.629	-0.306	-0.393	Zscore(6 号峰)	0.947	-0.108	-0.137	-0.022
Zscore(2 号峰)	0.765	-0.369	-0.394	-0.046	Zscore(7 号峰)	-0.332	-0.117	-0.246	0.873
Zscore(3 号峰)	0.808	0.356	0.289	0.122	Zscore(8 号峰)	0.406	-0.066	0.335	0.117
Zscore(4 号峰)	0.578	0.459	0.497	0.133	Zscore(9 号峰)	-0.361	-0.635	0.537	-0.326
Zscore(5 号峰)	0.733	-0.093	-0.382	-0.283					

注：提取方法为主成分分析法。
Note: Extraction method: principal component analysis.

表 8 综合得分排序
Table 8 Comprehensive score sort

编号 No.	F1 值 F1 value	F2 值 F2 value	F3 值 F3 value	F4 值 F4 value	F 值 F value	排序 Sequencing
DLC-1	1.9937	-0.2456	2.185	1.714	11.6781	3
DLC-2	0.5412	0.2759	-0.0045	0.6452	3.1057	6
DLC-3	-3.4071	-1.9365	2.5532	-1.5596	-13.8864	16
DLC-4	2.0702	-0.4833	-0.2687	0.1824	6.9265	4
DLC-5	0.582	-1.5978	-1.5329	-0.7008	-2.5933	11
DLC-6	-1.0025	0.2482	0.9668	0.1065	-2.1764	10
DLC-7	2.0258	3.1678	3.378	2.441	18.5484	1
DLC-8	-2.4618	2.5661	-0.9054	-1.1962	-8.2314	13
DLC-9	-3.6616	3.0107	-1.5262	-1.776	-13.513	15
DLC-10	1.2652	-1.9301	-2.3213	-1.261	-2.1487	9
DLC-11	-3.4772	-0.775	-1.6207	3.8285	-11.4498	14
DLC-12	0.1852	-0.1534	0.3892	0.1129	1.0847	7
DLC-13	3.0045	-1.5429	-1.6615	-0.8052	6.1836	5
DLC-14	3.2417	0.9299	-0.376	-0.0639	12.7089	2
DLC-15	0.4613	0.123	-1.2665	-0.5639	-0.6282	8
DLC-16	-1.3406	-1.368	2.0114	-1.1038	-5.6089	12

注：F 值为综合指数，可笼统代表样品质量。
Note: F value is composite index, representing sample quality.

公式 F1、F2、F3、F4、F 如下:

$$F1 = -0.3831 \times X1 + 0.4543 \times X2 + 0.4669 \times X3 + 0.3949 \times X4 + 0.4447 \times X5 + 0.5054 \times X6 - 0.2993 \times X7 + 0.3309 \times X8 - 0.3121 \times X9$$

$$F2 = 0.6927 \times X1 - 0.5305 \times X2 + 0.5211 \times X3 + 0.5917 \times X4 - 0.2663 \times X5 - 0.287 \times X6 - 0.2987 \times X7 - 0.2244 \times X8 - 0.696 \times X9$$

$$F3 = -0.5037 \times X1 - 0.5716 \times X2 + 0.4895 \times X3 + 0.642 \times X4 - 0.5628 \times X5 - 0.337 \times X6 - 0.4516 \times X7 + 0.527 \times X8 + 0.6673 \times X9$$

$$F4 = -0.5841 \times X1 - 0.1998 \times X2 + 0.3254 \times X3 + 0.3998 \times X4 - 0.4956 \times X5 - 0.1382 \times X6 + 0.8705 \times X7 + 0.3187 \times X8 - 0.532 \times X9$$

$$F = 3.707 \times F1 + 1.311 \times F2 + 1.206 \times F3 + 1.152 \times F4$$

从表8所列结果来看,综合得分前10名中有8个样品的产地基本都在河南与山西交界的太行山区南部,包括河南淇县、济源、辉县和山西的夏县、闻喜、绛县、阳城等地,表明这些地区的冬凌草质量比较均一,品质较优,可为冬凌草的道地性提供依据。排序靠后的样品产地主要在伏牛山区、横断山脉,包括河南新县、灵宝市,贵州施秉县等,这些地区冬凌草药材的质量有明显差异。分析结果与不同地区冬凌草二萜类成分指纹图谱相似度评价的结果相符,佐证了冬凌草药材质量的变化具有明显的地域性。

4 讨论

(1)本实验在考察样品前处理方法时,分别比较了70%丙酮、丙酮、乙醚对药材的提取效果。从冬凌草不同溶剂提取物的HPLC图谱可以看出,乙醚提取物中化学成分的种类较少,每种成分的峰面积值较小,且基线不平稳;丙酮提取物中化学成分

种类稍多;70%丙酮提取物中化学成分的种类最多,每种成分的峰面积值最大,且基线平稳。所以选取70%丙酮作为冬凌草二萜类成分的提取溶剂。

(2)由于70%丙酮总提物中所含杂质仍然较多,所以冬凌草二萜类成分必须进行萃取。据文献报道,冬凌草二萜类成分大多通过乙酸乙酯或氯仿萃取得到^[1,2],所以我们对乙酸乙酯和氯仿的萃取效果进行了比较。乙酸乙酯萃取物含杂质较多,而冬凌草甲素、乙素的含量则相对较少。为了进一步评价不同溶剂对冬凌草二萜类成分的萃取效果,我们采用高效液相色谱法(二极管阵列检测器)对冬凌草乙酸乙酯萃取物、氯仿萃取物进行了检测,发现氯仿萃取物在240 nm左右有强吸收,与二萜类物质在紫外光谱区的最大吸收波长相符^[10];而乙酸乙酯萃取物在240 nm及300 nm左右都有较强吸收,表明乙酸乙酯萃取物中含有大量其他成分。故确定氯仿为冬凌草二萜类部位的萃取溶剂。

(3)在冬凌草二萜类成分HPLC指纹图谱研究中,我们对流动相的成分及配比进行了考察:选取甲醇-水,甲醇-0.5%磷酸水两种流动相进行比较,以甲醇-水为流动相进行梯度洗脱时,色谱峰分离度稍差,色谱图基线略有漂移,而以甲醇-0.5%磷酸水作为流动相时,色谱图基线平稳,色谱峰分离度好,故选择甲醇-0.5%磷酸水为流动相梯度洗脱。

(4)冬凌草来源植物碎米桠是一种变异分化程度比较大的植物^[11],在我国分布于太行山区、大别山区、秦岭南部、贵州和云南的横断山脉等区域。现代研究结果证明,不同的生态环境中碎米桠的植物形态有变异,同时所含的化学成分(主要是二萜类成分)也有变化,目前测定的主要是冬凌草甲素和冬凌草乙素的含量高低差别较大;有学者也从不同产地的碎米桠植物中分离出不同结构的二萜类成分^[2]。但是,碎米桠地上草质部分作为冬凌草入药,药材主要产自太行山南部地区。因此本研究设计的采样地点为,太行山区南部的河南济源市、林州市、淇县、辉县,山西夏县、闻喜县、绛县、阳城县,大别山区的新县,秦岭南部伏牛山区的灵宝市、卢氏县、鲁山县、西峡县,横断山脉地区的贵州施秉县。冬凌草二萜类成分的HPLC指纹图谱研究的样品均来自冬凌草药材主产区太行山南部地区,并通过

建立的标准指纹图谱对不同产地和变异类型的冬凌草样品进行了评价分析。本文的研究结果为冬凌草资源的保护及研究开发提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 刘晨江,赵志鸿.冬凌草的研究进展[J].中国药学杂志,1998,33(10):577-581.
- [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]//中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编(1933-2003).北京:高等教育出版社,2003.
- [3] 李继成,刘晨江,孙汉董.鲁山冬凌草乙素和丙素的结构研究[J].云南植物研究,1986,8(1):93-97.
- [4] 潘炉台,姚娉,陈德媛.施秉冬凌草化学成分的研究[J].中国中药杂志,1994,19(2):102-103.
- [5] 刘延泽,侯建军,吴养洁.冬凌草中一新的二萜成分——冬凌草辛素[J].天然产物研究与开发,1999,12:4-7.
- [6] 韩全斌,梅双喜,姜北.冬凌草中的新对映——贝壳杉烷二萜化合物[J].有机化学,2003,23(3):270-273.
- [7] 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):2351-2353.
- [8] 丁宝章,王遂义.河南植物志:第3册[M].郑州:河南科学技术出版社,1997:391.
- [9] 陈随清,崔璨,裴莉昕,等.不同产地和来源冬凌草药材的质量评价[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(17):122-126.
- [10] 郑尚珍,沈序维,马金台.四环二萜类化合物的光谱特性[J].天水师专学报,1988(2):107-118.
- [11] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第66卷[M].北京:科学出版社,1977:47.

(责任编辑:王豫鄂)