

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2012.01.026

苦玄参苷类成分的积累动态研究

宁德生, 方宏, 梁小燕*, 陈海珊

(广西植物功能物质研究与利用重点实验室(广西植物研究所), 广西桂林 541006)

摘要: 利用高效液相色谱技术, 对不同生长期的苦玄参样品进行分析, 以揭示苦玄参苷类成分的积累动态规律。在对苦玄参植株生长情况进行观察的基础上, 收集不同生长期的苦玄参样品, 通过高效液相色谱法测定其中有效成分的含量, 并进行色谱图比较及数据分析。结果表明: 苦玄参总苷、苷 IA 和 IB 的含量随着生长周期的变化基本上呈现一致性, 苦玄参苷 IA 和 IB 的含量均在 75 d 达到整个生理期的最高峰, 随后缓慢下降, 但在果期前期(即 120 d)两者含量再次出现次高峰, 此时的生物量达到最大。由此可以确定苦玄参药材最佳采收期应在果期前期进行采收。

关键词: 苦玄参; 苦玄参苷 IA; 苦玄参苷 IB; 积累动态

中图分类号: Q946 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)01-0134-04

Study on dynamic accumulation of glycosides in *Picria felterrae*

NING De-Sheng, FANG Hong, LIANG Xiao-Yan*, CHEN Hai-Shan

(Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization,

Guangxi Institute of Botany, Guilin 541006, China)

Abstract: The content of glycosides of *P. felterrae* in different growth period were detected with HPLC to reveal its dynamic accumulation. The correlation analysis of glycosides and the growth situation was conducted through comparing the chromatograms and peak areas of different growth period. The results showed that the variation trend of content of glycosides, picfeltaarraenin IA and Ptarraenin IB was nearly consistent. The content of picfeltaarraenin IA and Ptarraenin IB both reached to the maximum when the plant grew up to 75 days, then subsequently decreased slowly, but increased again in early fruit stage (namely 120d) when the biomass reached to the maximum. Therefore, it was suggested that the best collection stage for *P. felterrae* was the early fruit stage (120 d).

Key words: *Picria felterrae*; Picfeltaicfelrraenin IA; Ptarraenin IB; dynamic accumulation

苦玄参 (*Picria felterrae*) 为玄参科 (Scrophulariaceae) 苦玄参属 (*Picria*) 干燥全草。秋节采收, 除去杂质, 晒干。别名有苦草、落地小金钱、苦胆草等等, 为一年生草本植物, 多生于低山、丘陵、疏林下或潮湿的沟谷, 主要分布于我国广西、广东和云南等地, 广西有大规模种植, 主产于苍梧、梧州、藤县、岑溪、龙州、崇左、东兰、桂林等地 (国家药典委员会, 2010; 钟补求等, 1979)。药理实验表明, 苦玄参水煎

液和醇提液对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌有抗菌作用 (黄燕等, 2008); 干浸膏有明显的抗炎、镇痛及解热作用 (周芳等, 2006; 李萍等, 2007); 苦玄参苷 IA 和 IB 具有镇痛、安定、调节补体等生理活性 (张银娣等, 1990; 广西植物研究所资源化学室等, 1978)。

苦玄参作为民间中草药, 分别于 1990 年收载于《广西中药材标准》和 2010 年收载于《中国药典》中。

收稿日期: 2011-06-16 修回日期: 2011-09-08

基金项目: 广西自然科学基金 (桂科基 0731049) [Supported by Natural Science Foundation of Guangxi (0731049)]

作者简介: 宁德生 (1982-), 男, 广西钦州人, 助理研究员, 从事天然产物开发与利用, (E-mail) ndshgxb@sina.com。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: xiaoyan113@sina.com)

目前,已研发出多种以苦玄参为主要原料的中成药,如妇炎净胶囊、万通炎康片、消炎灵胶囊等等。但近年来,苦玄参的研究主要集中在化学成分的提取分离(王力生等,2004;成桂仁等,1984;黄永林等,2010)、药材和中成药中苦玄参苷 IA 的含量测定以及药理作用等方面的研究(胡慧玲等,2007;方宏等,2008),而对于药材质量控制的报导较少(邹节明等,2005;梁小燕等,2007)。因此通过对苦玄参中苷类成分在不同生长期的研究,揭示该药材中苷类成分的积累动态规律,为苦玄参的合理采收和规范性栽培提供科学的理论依据,为合理利用资源和控制原材料质量及产品质量具有重要意义。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent1200 型高效液相色谱仪,包括 VWD 检测器、四元梯度泵、在线真空脱气机、标准自动进样器、安捷伦化学工作站(美国 Agilent 公司);超纯水仪(Millipore 公司);T6 型紫外分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司);电子天平(梅特勒 AT-200);HH-S 数显恒温水浴锅(郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 材料与试剂

选取不同生长期的苦玄参(*P. felterrae*)样品(广西植物研究所试验场地种植,采收时间见表 1),洗净晾干,于烘箱 60 °C 干燥,粉碎过 40 目筛;称取前对样品粉末进行干燥至恒重。试剂:乙腈(美国 TEDIA 公司);超纯水为自制;乙醇、香兰素、高氯酸、冰醋酸均为分析纯(西陇化工厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 phenomenex Luna C18(250 mm×4.60 mm,5 μm);柱温:30 °C;检测波长:264 nm;流动相:乙腈-5 mL/L 磷酸溶液,梯度洗脱(梯度表见表 2);流速:1 mL/min;进样量:20 μL。

2.2 样品溶液的制备(方宏等,2009)

精密称取 1.0000 g 的苦玄参样品,置于 100 mL 的锥形瓶中,加入 20 mL 积量分数 70%的乙醇溶液,于 80 °C 水浴回流提取两次,提取用时第一次 3 h,第二次 1 h,合并提取液,滤过至 50 mL 的容量

瓶,70%的乙醇溶液定量,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,滤液作为供试品溶液。

表 1 不同生长期的苦玄参样品
Table 1 *P. felterrae* in different growth stages

编号 No.	采集时间 Acquisition time	采样间隔 Sampling interval	生长状况 Growth status
s1	2008-06-05	第一份样(0 d)	幼苗期(长出 1~3 对真叶)
s2	2008-06-24	20 天(20 d)	幼苗后期(长出 5~6 对真叶)
s3	2008-07-15	20 天(40 d)	采样后开始移栽,开始分枝
s4	2008-08-04	20 天(60 d)	普遍分枝
s5	2008-08-19	15 天(75 d)	
s6	2008-09-03	15 天(90 d)	
s7	2008-09-13	10 天(100 d)	部分植株开始开花
s8	2008-09-23	10 天(110 d)	花期
s9	2008-10-03	10 天(120 d)	部分植株开始结果
s10	2008-10-13	10 天(130 d)	果期
s11	2008-10-23	10 天(140 d)	
s12	2008-11-02	10 天(150 d)	枯萎期

注:以幼苗期作为 0 天开始计算。

Note: the seedling stage calculated as 0 day.

表 2 洗脱梯度表
Table 2 Conditions of gradient elution

时间 Time (min)	乙腈(%) Acetonitrile	5 mL/L 磷酸溶液(%) Phosphoric acid solution
0	10	90
5	15	85
39	25	75
49	35	65
71	40	60
79	90	10
83	90	10

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 在“2.1”项色谱条件下,吸取苦玄参样品供试液,连续进样 5 次,测得苦玄参苷 IA 和 IB 峰面积的 RSD 分别为 0.33%和 0.32%,结果表明,仪器的性能良好。

2.3.2 重复性试验 称取苦玄参样品粉末 5 份,每份 1.0000 g,按“2.2”项的制备方法制备供试品溶液,分别进样 20 μL,测得苦玄参苷 IA 和 IB 的峰面积的 RSD 值分别为 2.91%和 1.96%。结果表明方法的重现性良好。

2.3.3 稳定性试验 在“2.1”项的色谱条件下,取苦玄参供试液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样,计算苦玄参苷 IA 和 IB 峰面积的 RSD 值分别为:0.43%和 0.33%,结果表明,样品供试液在 24 h 内稳定。

2.4 不同生长期苦玄参样品中苦玄参苷 IA 和 IB 的含量变化

在“2.1”项的色谱条件下,分别将 12 份不同生

长期苦玄参试样的制备液注入 HPLC 中进行检测, 得到 12 份供试样品的色谱(图 1)以及苦玄参苷 IA 和 IB 的峰面积。以采收时间为横坐标, 苦玄参苷 IA 和 IB 的峰面积为纵坐标, 绘制苦玄参不同采收

期苦玄参苷 IA 和 IB 的含量变化趋势图(图 2)。

2.5 不同生长期苦玄参样品中苦玄参总苷含量变化

采用比色分析方法进行苦玄参总苷含量测定(陈战国等, 1996): 分别精密吸取“2.2”项制备的 12

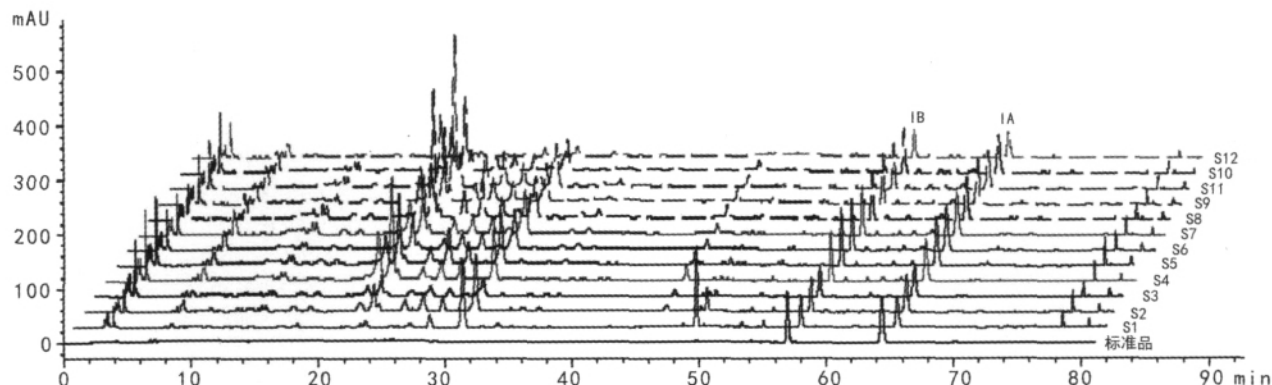


图 1 不同生长期的苦玄参试样色谱图

Fig. 1 Chromatogram of *P. felterrae* in different growth stages

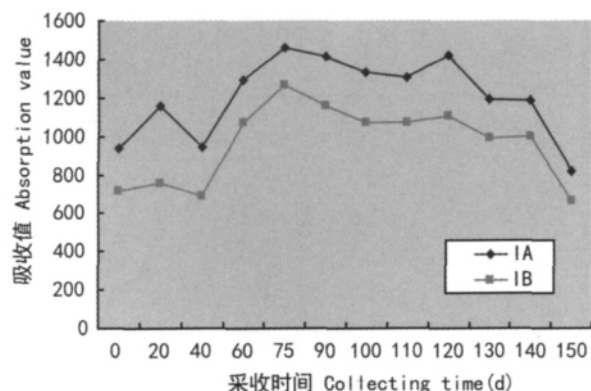


图 2 不同采收期苦玄参中苦玄参苷 IA 和 IB 的含量变化趋势图

Fig. 2 Content trend chart of picfeltaerriin IA and Ptarraenin IB in *P. felterrae* collected in different growth stages

份供试液 0.2 mL 于置塞试管中, 在水浴中蒸干, 分别加入 0.2 mL 的 5% 香兰素醋酸溶液和 0.8 mL 高氯酸, 摇匀, 在 60 °C 的水浴中保温 15 min 后迅速取出, 置于冰水中冷却, 加入 5 mL 的冰醋酸, 摇匀放置 10 min 后, 于 555 nm 检测。以采收时间为横坐标, 总苷吸收值为纵坐标, 绘制苦玄参不同采收期总苷含量变化趋势图(图 3)。

3 结果与讨论

3.1 苦玄参苷 IA 和 IB 的含量变化

由图 2 可知, 不同采收期的苦玄参苷 IA 和 IB

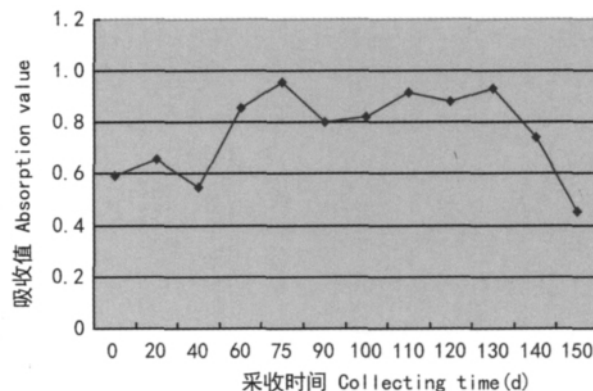


图 3 不同采收期的苦玄参总苷含量变化趋势图

Fig. 3 Content trend chart of glycosides in *P. felterrae* collected in different growth stages

的变化具有同步性。苦玄参植株从幼苗期到幼苗后期, 苦玄参苷 IA 和 IB 开始富集, 但当苦玄参植株开始分枝时, 两者的含量大幅度下降; 随后苦玄参植株不断生长, 苦玄参苷 IA 和 IB 含量不继增加, 并都在 75 d 两者含量均达到最高; 此后, 含量开始缓慢下降, 但在果期的前期(120 d)两者的含量有较大幅度的回升, 而在果期后期至枯萎之间, 两者含量出现急剧下降, 且含量达到整个生理期最低点。

3.2 苦玄参总苷的含量变化

对不同采收期苦玄参总苷含量变化趋势图(图 3)及图 1 中色谱峰的变化情况进行分析, 可以发现, 苦玄参从萌芽开始许多成分就开始合成与代谢。该植物从幼苗期到幼苗后期, 苦玄参总苷开始富集, 但

长生发育到植株开始分枝时,总苷含量大幅度下降;随后又重新富集并在 75 d 含量达到整个生理期最高峰;此后,总苷含量显波浪性变化,在花期后期(110 d)和果期后期(130 d)再次出现两次次高峰;当生长期进入枯萎期时,总苷含量急剧下降,且含量达到整个生理期最低点。

3.3 苦玄参总苷、苷 IA 和 IB 三者的一致性与差异性分析

通过对图 2 和图 3 的比较,可以发现苦玄参总苷、苷 IA 和 IB 含量随着生长周期变化趋势基本上是一致的,即在开始分枝时出现较大幅度的下降,这可能是由于在嫩芽期时,苦玄参植株中水分多,经烘干后成分被高度浓缩,而当分枝时,茎叶已纤维化造成含量下降的原故;生长至 75 d 时含量达到整个生长期中最高峰,此后开始下降;不同的是,苦玄参总苷含量在花期后期和果期后期再次出现两次次高峰,而苷 IA 和 IB 含量仅在果期的前期出现第二次次高峰,这可能与成分在植物体内分布有关。有文献报告(陈君等,2007)苦玄参苷 IA 主要分布于叶子(1.64%)、花其次(1.12%)、茎(0.11%)、根中检测不到。苦玄参在 75d 时正处于旺盛生长期,枝叶茂盛,但随后茎叶高度纤维化,可能是造成含量下降的原因;而在花期时,出现含量回升,也应是由于成分在花中大量富集的结果。

3.4 苦玄参最佳采收期的确定

苦玄参苷 IA 和 IB 是苦玄参的主要成分,其含量的高低直接影响该药材质量好坏,因此采收时间的确定极为重要。通过对不同生长期植株中苦玄参苷 IA 和 IB 含量的比较,发现两者的含量都在 75 d 达到整个生理期最高峰,但此时的植株正处于大量分枝生长的阶段,生物量也未达到最大,不易做为采收期。从图 2 中不难看出,在花期两者的含量变化比较平缓,并在果期的前期两者含量出现回升,但此后开始下降,因此把果期的前期(120 d)作为苦玄参药材的最佳采收期,既能保证药材中有效成分的质量,又能达到最大生物量。与桂南地区的采收期相比(陈勇等,2010),相对较晚,这是由于受到气候影响,种子播种到萌芽时间较长,前期的生长发育较为缓慢所致。

参考文献:

广西植物研究所资源化学室,广西医学院理学教研组. 1978.

- 苦草抗肿瘤有效成分和药理研究,广西医学院学报[J],(3):14-15
- 李萍,周芳,陈勇. 2007. 苦玄参提取物解热作用的实验研究[J]. 时珍国医国药,18(11):2 638
- 成桂仁,金静兰,文永新,等. 1984. 苦玄参苷 A 和 B 的结构(简报)[J]. 广西植物,4(1):51-53
- 张银娣,刘小浩,沈建平. 1990. 绵毛黄芪苷和苦玄参苷的中枢抑制作用[J]. 南京医学院学报,10(1):17-19
- 陈战国,耿征,刘谦光,等. 1996. 薯蓣皂甙元的分光光度法测定[J]. 24(2):227-229
- 陈勇,刘婧,李兵,等. 2010. 苦玄参药材有效成分含量积累动态的研究[J]. 时珍国医国药,21(2):371-372
- 国家药典委员会. 2010. 中国药典(2010 年版)[M]. 北京:中国医药科技出版社:186
- 周芳,李萍,陈勇,等. 2006. 苦玄参干浸膏抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,13(4):244-345
- 钟补求,谷粹芝. 1979. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社:15
- 胡慧玲,付超美,王战国. 2007. HPLC 测定妇科炎症片中苦玄参苷 IA 的含量[J]. 中成药,29(3):附 10-11
- 黄燕,肖艳芬,甄汉深,等. 2008. 苦玄参体外抗菌作用的实验研究[J]. 广西中医药,31(1):46-47
- Chen J(陈君),Zheng HS(甄汉深),Wei JH(韦建华). 2007. Identification and content assay of *Picria feltarrae* with high performance liquid chromatography(广西苦玄参不同药用部位的薄层鉴别与含量测定)[J]. *Acta Med Sin(华夏医学)*,20(6):1 179-1 181
- Fang H(方宏),Liang XY(梁小燕),Ning DS(宁德生),et al. 2008. Analysis of picfeltarraenins IA and IB in *Picria feltarrae* (苦玄参药材中苦玄参苷 IA 和 IB 的含量分析)[J]. *Guihaia(广西植物)*,28(5):708-710
- Fang H(方宏),Ning DS(宁德生),Liang XY(梁小燕). 2009. Studies on technology optimization for extracting triterpenoid saponins from *Picria feltarrae* by multi-target grading method (多指标综合评价法优选苦玄参皂苷提取工艺)[J]. *J Chin Med Mat(中药材)*,2(12):1902-1905
- Huang YL(黄永林),Chen YY(陈月圆),Wen YX(文永新),et al. 2010. Chemical constituents of *Picria feltarrae*(苦玄参的化学成分研究)[J]. *Guihaia(广西植物)*,30(6):887-890
- Liang XY(梁小燕),Fang H(方宏),Ning DS(宁德生),et al. 2007. RP-HPLC fingerprint of *Picria feltarrae* from South Guangxi(桂南地区苦玄参药材 RP-HPLC 指纹图谱研究)[J]. *Guihaia(广西植物)*,27(6):948-951
- Wang LS(王力生),Zou JM(邹节明),Guo YJ(郭亚健). 2004. Study on purification of total saponins in *Picria feltarrae* with D101 macroporous resin(D101 大孔吸附树脂纯化苦玄参总皂苷的研究)[J]. *Chin Trad Herb Drug(中草药)*,35(5):515-517
- Zou JM(邹节明),Wu MJ(吴敏菊),Wang LS(王力生). 2005. HPLC fingerprint of *Picria feltarrae*(苦玄参 HPLC 指纹图谱研究)[J]. *Chin Pharm(中国药学杂志)*,40(9):664-666