

金钱草不同生长期主要活性成分 (槲皮素、山奈素) 含量动态变化

刘燕琴, 刘杰*, 谭秋生, 杨永东, 胡开治, 任凤鸣

重庆市药物种植研究所, 重庆 408435

摘要: 研究金钱草不同生长期主要活性成分(槲皮素、山奈素)含量变化特点, 为药材质量控制和适宜采收期研究提供一定支撑。采用 HPLC 法, 测定不同生长期(萌发、生长、蕾期、花期、平稳期、果熟期、次生长期、休眠期)槲皮素、山奈素的含量; 不同品系金钱草研究显现出共同特点: 不同生长期其活性成分含量差异明显, 但均在花蕾期、花期含量最高; 金钱草宜于蕾期、花期采收。

关键词: 金钱草; 活性成分; 含量变化

中图分类号: R917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.017

Index Ingredients Content Changing of *Lysimachia christinae* Hance in Growth Period

LIU Yan-qin, LIU Jie*, TAN Qiu-sheng, YANG Yong-dong, HU Kai-zhi, REN Feng-ming

Chongqing Research Institute of Medicinal Plants Cultivation, Chongqing 408435, China

Abstract: To study the characteristics of the main active components (quercetin and kaempferol) in different growth stages of *Lysimachia christinae* Hance, and to provide some support for the quality control and suitable harvesting period. The contents of quercetin and kaempferol in different growth stages (germination, growth, bud stage, flowering stage, stationary period, fruit ripening stage, secondary growth period and dormancy period) were determined by HPLC. The content of active ingredients in different growth stages was significantly different, but all of them were the highest in flowering stage and flowering stage. The appropriate harvest period is in the bud stage or flowering.

Key words: *Lysimachia christinae*; index ingredients content; varying pattern

金钱草始载于《本草纲目拾遗》^[1], 《中国药典》1997 年版正式将报春花科 (Primulaceae) 植物过路黄 (*Lysimachia christinae* Hance) 的干燥全草收载并定名为金钱草^[2,3], 具清利湿热、通淋消肿等功效。研究表明: 金钱草以黄酮类化合物为主要活性成分(指标成分, 槲皮素 + 山奈素 $\geq 0.10\%$), 疗效好^[4]。

金钱草为传统中药材, 影响其质量的因素较多: 金钱草不同品系、伪品对质量有明显影响^[5]; 分离提取法的影响, 研究发现大孔树脂吸附分离技术对中药有效成分高度富集、杂质少等优点, 能提高中药内在质量^[6]; 测定方法, 采用高效液相色谱法^[7,8]测定酸水解后黄酮苷元槲皮素、山奈素的含量, 该方法具有灵敏、准确、重现性好; 种植栽培对质量的影响: 研究发现金钱草栽培品与野生品性状、显微特征无

差别, 薄层色谱显示的成分也一致, 栽培品应可作药用^[9]; 同时研究还发现, 不同种植模式对金钱草质量有影响^[10]。除以上因素外, 不同采收期也会影响药材质量^[11], 金钱草药材主要为野生^[12], 药农随意采收, 也导致药材质量无法保证^[13,14]。

针对金钱草采收随意导致质量混乱的问题, 本研究对金钱草生长期主要活性成分(槲皮素、山奈素)含量变化开展研究, 探索金钱草的槲皮素、山奈素的含量变化特点, 为药材质量提高及采收期研究提供一定参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Waters 2695 型液相色谱仪、中药材粉碎机、超声波清洗器(上海冠特超声仪器有限公司)、回流冷凝管、蒸发皿、干燥箱(扬州市三发电子有限公司)、电子称(深圳市西恩威电子有限公司)、电子天平

收稿日期: 2017-04-05 接受日期: 2017-04-17

基金项目: 重庆市医药卫生项目

* 通信作者 E-mail: 369573827@qq.com

(HANGPING FA200)。

槲皮素对照品(中国药品食品检定所)、山奈素对照品(中国药品食品检定所)、甲醇(色谱纯)、磷酸溶液(分析纯)、纯净水、乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化铝等。

1.2 实验材料

来自“半旱式”种植圃,生长正常的3个种质材料(遗传距离较远),经重庆市药物种植研究所刘正宇研究员鉴定为报春花科 *Primulaceae* 珍珠菜属 *Lysimachia* 植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance, 分别是14#(原产地重庆铜梁),42#(原产地四川省内江资中县),45#(原产地四川省内江市资中渔溪镇)于2012年引种在重庆市南川区三泉镇(海拔606m),“半旱式”种植,生长良好。

材料的生长期划分,萌发期(2月)、快速生长期(3~4月)、蕾期(4~5月)、花期(5月)、生长平稳期(6~7月)、果熟期(8月)、次生长期(9~10月)、休眠期(11月到次年1月);在各生长期采样、清洗、40℃下烘干后备用。

2 方法与结果

2.1 HPLC 测定槲皮素和山奈素的含量

2.1.1 色谱条件与系统适用性

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇

-0.4%磷酸溶液(50:50)为流动相;进样体积10 μL;检测波长为360 nm;流速为1.0 mL/min;柱温30℃。

2.1.2 对照品溶液制备

取槲皮素对照品、山奈素对照品适量,精密称定,加80%甲醇制成每1 mL含槲皮素4 μg、山奈素20 μg的溶液即得,4℃冷藏保存。

2.1.3 供试溶液制备

取本品粉末(过三号筛,同一生长期的3个样品粉末进行均匀混合)约1.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇50 mL,密塞,称定重量,加热回流1 h,放冷,再称定重量,用80%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过精密量取续滤液25 mL,加入盐酸5 mL,置90℃水浴中加热水解1 h,取出,迅速冷却,转移至50 mL量瓶中,用80%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 方法学考察

依次考察线性关系、精密度、稳定性、重复性和回收率等方法^[8]。

线性关系考察:精密量取槲皮素和山奈素混合标准品溶液1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 μL,注入高效液相色谱仪中,测定峰面积,以对照品浓度(μg/mL)为横坐标,以对照品峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,获得回归方程及线性范围(表1)。

表1 各组分的回归方程和线性范围

Table 1 Regression equation and linear range of each component

回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range (μg/mL)
槲皮素(Quercetin); $Y = 13631x + 3556.1$	0.9998	5.859-112.298
山奈素(Kaempferol); $Y = 15011x + 1503.1$	0.9996	9.956-164.521

精密度试验:精密量取同一份对照品溶液,连续进样5次,测定槲皮素和山奈素混合标准品溶液的峰面积。结果其RSD值均小于2.0%,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别在配制后0、2、4、6、8、12 h时测定槲皮素和山奈素混合物峰面积。结果其RSD值均小于2.0%,表明供试品溶液在12 h内稳定。

重复性试验:分别精密称取同一批号样品5份,依试验法制备供试品溶液并平行测定,按外标法计算含量。结果RSD值均小于2.0%,表明该方法重

复性良好。

回收率试验:采用加样回收法。取同一批次样品约0.1 g精密称定,共取5份,分别精密加入对照品贮备液0.1、0.2、0.3 mL,依法制备供试品溶液,按照上述色谱条件进样测定,计算回收率。结果RSD值均小于2.0%,表明回收率试验效果良好。

2.1.5 测定结果

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,测定,对所测定结果统计如下,见表2:

表 2 不同生长期对应的槲皮素、山奈素含量

Table 2 Quercetin and kaempferol content in different growth stages

生长期(月) Growing period/M	14 号槲皮素 含量% 14# Quercetin content %	14 号山奈素 含量% 14# Sorbitan content%	14 号总 含量% 14# Total content %	42 号槲皮 素含量% 42# Quercetin content %	42 号山奈素 含量% 42# Sorbitan content%	42 号总 含量% 42# Total content %	45 号槲 皮素含量% 45# Quercetin content %	45 号山奈素 含量% 45# Sorbitan content%	45 号总 含量% 45# Total content %
2 (February)	0.044	0.003	0.047	0.0026	0.002	0.0046	0.005	0.01	0.015
3-4 (March - April)	0.198	0.06	0.264	0.046	0.003	0.049	0.021	0.014	0.038
4-5 (April - May)	0.0888	0.101	0.189	0.126	0.029	0.155	0.211	0.007	0.218
5 (May)	0.0758	0.0829	0.157	0.098	0.03	0.128	0.152	0.04	0.192
6-7 (June - July)	0.132	0.032	0.164	0.06	0.002	0.062	0.088	0.03	0.118
8 (August)	0.067	0.075	0.142	0.0998	0.0186	0.118	0.0294	0.0876	0.117
9-10 (September - October)	0.124	0.03	0.154	0.067	0.007	0.074	0.0602	0.021	0.0803
11 - 次年1 (November - January)	0.05	0.006	0.056	0.002	0.002	0.005	0.005	0.01	0.015

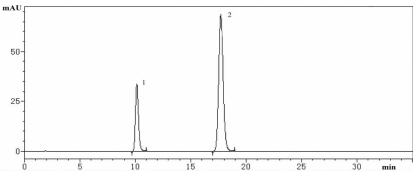


图 1 混合对照品色谱图(注:1 槲皮素 2 山奈素)

Fig.1 Mixed reference substance chromatogram (Note:1 quercetin 2 kaempferol)

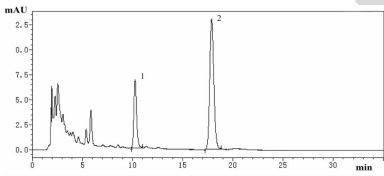


图 2 14 # (I₄) 色谱图(注:1 槲皮素 2 山奈素)

Fig.2 14 # (I₄) sample chromatogram (Note:1 quercetin 2 kaempferol)

根据表 2 绘制各品系的槲皮素、山奈素积累变化图和总量变化图,如下:

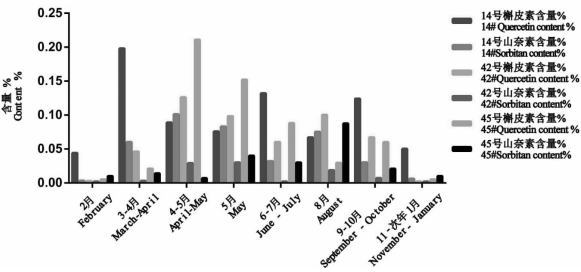


图 3 不同生长期槲皮素、山奈素的积累

Fig.3 The accumulation of quercetin and kaolin in different growth stages

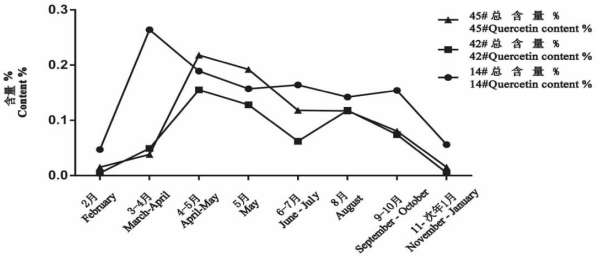


图 4 三种材料不同生长期对应的槲皮素、山奈素总量变化

Fig.4 The total amount of quercetin and kaeman corresponding to different growth stages

从图 3 可以发现,三个种植材料在整个生长期中,槲皮素含量普遍高于山奈素,山奈素在各个时期含量普遍较低;在 4~5 月(蕾期)、5 月(花期)槲皮素、山奈素处于较高水平。

从图 4 可以发现,三个遗传差异明显的金钱草种植材料,其槲皮素与山奈素总含量在整个生长周期里,整体变化趋势较为相似;但不同材料的槲皮素与山奈素总含量的最高点、最低点出现时期有差异;但均在 4~5 月、5 月时间段里,总含量较高。

3 讨论

3.1 金钱草活性成分含量在蕾期、花期含量较高可能与黄酮类成分积累特点有关:金钱草主要活性成分为槲皮素、山奈素,均为黄酮类活性物质,而研究发现其积累除与遗传、生境等因素有关外,还与其生长时期有较大关系。如普冰清等研究射干采收期发现(以黄酮类活性成分作为指标),在南京栽培的射

干以二年生采收较优,时间以花期(春季5月上、中旬)采收时间最佳^[15];又如蒙秋霞等研究发现,小叶锦鸡儿在一年的4月(花期)含量较高;而不同部位黄酮含量研究发现,花比叶子、枝等部位含量高,如以黄酮类物质的利用为目的,应重点在花期^[16];而本研究也发现,金钱草在蕾期、花期主要活性成分含量较高,而对于金钱草不同时期不同器官的活性成分含量情况还有待进一步的实验证明。

3.2 适时采收是当前提高金钱草质量的有效方法之一:

当前研究发现,金钱草不同品系质量存在一定差异^[17];同时,金钱草药材主要源于野生(药农随意采收),直接导致金钱草颗粒质量差异大,如温梅云等^[18]采用HPLC法研究了三个不同厂家生产的金钱草颗粒,每个批次槲皮素和山奈素的总含量差异大,普遍较低。

而本研究以遗传差异明显的种质材料研究发现,他们质量变化趋势相似,但不同时期的含量差异明显,可以看出金钱草采收期对质量影响明显。所以,规范其采收期是目前提高质量的有效方法之一,而加强金钱草选种及规范化种植必将成为提高金钱草质量的重要研究方向。

4 结论

金钱草在不同生长期活性成分变化明显,而在蕾期、花期,槲皮素、山奈素的总含量较高,而此时期金钱草产量较高、易于辨识(海拔200~1800 m,草本类药材金钱草),为保障金钱草药材质量,宜于蕾期、花期采收。

参考文献

- 1 The Official Committee of Hygiene Department of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China (中华人民共和国药典,2015年,一部). Beijing:China Medical Science Press,2015. 158-204.
- 2 Jiang SG(蒋书国),Chen AP(陈爱萍). The original plant of *Lysimachia christinae* Hance. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药),2004,35:828-829.
- 3 Cao Ping(曹萍),Zhu XL(褚小兰),Fan CS(范崔生). *Lysimachia christinae* of research on Chinese Herbal Medicine. *Acta Academiae Medicinae Jiangxi* (江西医学院学报),2005,45:110-114.
- 4 Huang HL(黄海兰),Xu Bo(徐波). Free radical scavenging activities and principals of *Lysimachia christinae* Hance. *Food Sci* (食品科学),2006,27(10):183-188.

- 5 Yang AR(杨安荣),Yang PJ(杨培君),Peng Q(彭强). Identification of 4 Chinese Herbal Medicine. named JinQian-Cao. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药),2005,16:835-836.
- 6 Hertong MG,Kromhout D. Flavonoid intake and longterm risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. *J Inter Med*,1995,155:381-386.
- 7 Shen LD(沈联德). Studies on chemical constituents of *Lysimachia christinae* Hance. *West China J Pharm Sci* (华西药理学杂志),1998,3(2):71.
- 8 Meng XS(孟宪生),Sha M(沙明). Determination of quercetin and kaempferol by HPLC. *Chin Tradit Patent Med*,2003,25:1004.
- 9 Zhang Q(张清),Xiong JL(熊久林),Zhang J(张捷),et al. Study on the cultivation of *Lysimachia christinae* Hance. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药),2001,12(12):1147.
- 10 Liu YQ(刘燕琴),Liu J(刘杰),Yang YD(杨永东),et al. Effects of planting patterns on index ingredients of *Lysimachia christinae* Hance. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报),2015,31:157-162.
- 11 Liu SH(刘绍欢),Yang XJ(杨贤江),Wang SQ(王世清),et al. Investigation and identification of varieties of *Lysimachia christinae* Hance in Guiyang's Medicine Market. *China Pharm* (中国药业),2011,22:3969.
- 12 Zong XR(宗秀茹),Rong Z. On the influence of harvest time on the quality of Chinese Medicinal Materials. *Heilongjiang Med J* (黑龙江医药),2001,14(4):84.
- 13 Guo L(郭磊),Zhang WD(张宛东),Feng HS(冯洪山). The characteristics of *Lysimachia christinae* Hance. and the identification of counterfeit. *Chin J Exp Clin Virol* (医学信息),2008,10(5):81.
- 14 Chen FL(陈丰连),Zhang WJ(张文进),Xu HH(徐鸿华). Study on suitable harvest time of *desmodium styracifolium*. *J Chin Med Mater* (中药材),2008,33:253-257.
- 15 Pu BQ(普冰清),Zhu Y(朱艳),Xu FY(许方云). Dynamic changes of flavonoids in different harvest time. *Pharm Clin Res* (药学与临床研究),2014,22:212-215.
- 16 Meng QX(蒙秋霞),Zhang LZ(张丽珍),Niu Y(牛宇). Total flavonoid dynamics of *caragana microphylla* Lam. *Acta Agrestia Sin* (草地学报),2011,19:943-947.
- 17 Liu J(刘隽),Zou GL(邹国林). Research progress of *Lysimachia christinae* Hance. *J Tanshan Teachers Coll* (唐山师范学院学报),2002,24(2):8-10.
- 18 Wen MY(温梅云),Zhong Q. Determination of quercetin and kaempferol in Particles of *Lysimachia christinae* Hance. *Chin J Clin Med* (中华临床医学杂志),2006,11(7):5-6.