

HPLC 同时测定金粟兰植物中香豆素及倍半萜内酯类有效成分的含量

罗杠, 马兴霞, 罗永明, 尹小英*
(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 建立同时测定金粟兰属植物中香豆素类成分异嗪吡啶及倍半萜内酯类成分长尾粗木叶内酯和党参内酯 3 种成分含量的高效液相色谱方法。方法: 采用 Hypersil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 柱温 30 °C, 检测波长 230 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果: 异嗪吡啶、长尾粗木叶内酯、党参内酯线性范围分别为 2~100, 2~100, 4~200 ng, 在上述范围内 3 种成分峰面积与进样量呈良好线性关系, 相关系数 *r* 均 > 0.999, 上述 3 种成分的加样回收率分别为 96.1% (RSD 2.3%), 94.4% (RSD 2.0%), 94.2% (RSD 1.9%); 异嗪吡啶在多穗金粟兰中含量较高, 最高含量为 18 μg·g⁻¹, 长尾粗木叶内酯和党参内酯在丝穗金粟兰中含量较高, 分别为 2.4, 1.2 μg·g⁻¹。结论: 该方法简便快速, 分离效果好, 重复性好, 可为金粟兰属植物的质量控制提供重要参考。

[关键词] 金粟兰属植物; 香豆素; 倍半萜内酯; 党参内酯; 长尾粗木叶内酯; 异嗪吡啶; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)01-0047-04

[doi] 10.11653/syjf2014010047

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131017.1136.005.html>

[网络出版时间] 2013-10-17 11:36

Simultaneous Determination of Coumarin and Sesquiterpene Lactone Content of Active Ingredients in Chloranthus Species by HPLC

LUO Gang, MA Xing-xia, LUO Yong-ming, YIN Xiao-ying*
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the simultaneous determination of three constituents about isofraxidin, lasianthuslactone and codonolactone. **Method:** The separation was performed on a Hypersil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) eluted with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution as mobile phase in a linear gradient mode. The flow rate was kept at 1 mL·min⁻¹ and the column temperature was set to 30 °C, the UV detector wavelength was set at 230 nm. **Result:** The linear ranges were 2-100 ng for isofraxidin, 2-100 ng for lasianthuslactone, 4-200 ng for codonolactone, and the three components had a good linear relationship (*r* > 0.999). Result of three components recovery tests were 96.1% (RSD 2.3%), 94.4% (RSD 2.0%), 94.2% (RSD 1.9%). The content of isofraxidin is more in *Chloranthus multistachy*, it is 18 μg·g⁻¹; the codonolactone and lasianthuslactone were higher in *C. fortunei*, the content was 2.4, 1.2 μg·g⁻¹. **Conclusion:** Through the validation, the method is proved to be sensitive, accurate, repeatable, and can be used for quality control of *C.* plants.

[Key words] *Chloranthus multistachys*; coumarin; sesquiterpene lactone; codonolactone; lasianthuslactone; isofraxidin; assay

[收稿日期] 20130515(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(20962012, 81260690); 省科技支撑计划项目(20111BBG70004-2); 省教育厅科学技术研究重点项目(GJJ13618, GJJ12518); 江西省高校中青年教师发展计划访问学者项目

[第一作者] 罗杠, 硕士研究生, 从事中药活性成分分析研究, Tel: 15970686408, E-mail: 1134884005@qq.com

[通讯作者] * 尹小英, 博士, 教授, 从事中药活性成分分析研究, Tel: 0791-87118917, E-mail: neyxoy@163.com

金粟兰属植物 *Choranthus multistachys* Pei 又名四大天王、四块瓦、四叶细辛, 主要分布于长江以南各省, 尤以西南地区居多。全草入药, 性味苦辛, 微温, 有小毒, 具有活血散瘀、祛风解毒的功效, 被《本草纲目》所记载^[1], 主要含有倍半萜类、黄酮类、香豆素及有机酸类物质^[2-4]。现代药理研究表明, 倍半萜内酯成分具有抗肿瘤活性, Kang 等^[5]在研究党参内酯Ⅲ对人肺癌细胞 A549 作用时, 证实党参内酯Ⅲ诱导细胞凋亡; 香豆素类成分的异嗪皮啶具有抗菌消炎作用, 在体外活性试验中还显示出一定的肿瘤细胞抑制作用。在金粟兰属植物中, 党参内酯及长尾粗木叶内酯是其中重要的倍半萜内酯且含量相对较高, 异嗪皮啶是主要的抗炎活性成分之一, 对于金粟兰属植物中这些活性成分含量测定鲜有文献报道^[6]。本试验建立了 HPLC 同时测定异嗪皮啶、长尾粗木叶内酯和党参内酯这 3 种有效成分的含量测定方法, 并对多穗金粟兰、丝穗金粟兰、宽叶金粟兰和及己等 4 种金粟兰属植物中这 3 种成分的含量进行了测定, 为该属植物的质量标准研究及开发应用提供参考。

1 材料

多穗金粟兰药材, 分别采集于江西樟树、景德镇和赣州; 宽叶金粟兰、丝穗金粟兰和及己采集于江西樟树等地, 经江西中医药大学药学院生药教研室付小梅副教授鉴定分别为多穗金粟兰 *C. multistachy*、宽叶金粟兰 *C. henryi*、丝穗金粟兰 *C. fortunei* 及己 *Chloranthus serratus* 药材, 供试品来源见表 1。

表 1 供试品药材来源

No.	品种	来源	采样地点	采集时间
1	多穗金粟兰	野生	江西樟树市	2010-07
2	多穗金粟兰	野生	江西樟树市	2011-07
3	多穗金粟兰	野生	江西景德镇市	2010-06
4	宽叶金粟兰	野生	江西赣州市	2010-07
5	及己金粟兰	野生	江西赣州市	2011-07
6	丝穗金粟兰	野生	江西赣州市	2009-07

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦), BS 214D 型分析电子天平 (北京 sartorius 公司), EYELA OSB-2100 型旋转蒸发仪 (日本东京)。

党参内酯对照品 (上海融禾, 批号 100716), 异嗪皮啶对照品 (中国固体制剂制造技术国家工程研究中心, 批号 Y37-110616), 长尾粗木叶内酯对照品自制, HPLC 归一化结果含量 >98%, 乙腈 (HPLC, 上海星可生化试剂公司), 甲醇 (色谱纯, 上海星可生化试剂公司), 纯净水 (娃哈哈, 杭州娃哈哈集团)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水, 检测波长 230 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL, 流动相梯度洗脱程序见表 2。

表 2 HPLC 流动相梯度程序

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸水/%
0	15	85
9	24	76
16	32	68
27	50	50
34	60	40
45	66	34
51	71	29
60	75	25

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取长尾粗木叶内酯、异嗪皮啶和党参内酯对照品适量, 用甲醇溶解配制成 1 g·L⁻¹ 的贮备液, 再分别吸取上述长尾粗木叶内酯、异嗪皮啶对照品贮备液各 500 μL, 党参内酯对照品贮备液 1 mL 置于 10 mL 的量瓶中, 甲醇定容, 即得 3 种成分质量浓度分别为 50, 50, 100 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 分别精密称取过 40 目筛的 6 种金粟兰植物样品地下部分干燥粉末 2 g, 置 250 mL 的圆底烧瓶中, 加 70% 的甲醇溶液 50 mL, 加热回流提取 30 min, 重复提取 3 次, 合并滤液, 减压浓缩至无水溶液, 冷却, 分别用 50 mL 三氯甲烷萃取 3 次, 合并三氯甲烷部位溶液, 减压浓缩至浸膏, 甲醇溶解, 定容至 10 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 线性范围考察 分别精密吸取异嗪皮啶、党参内酯和长尾粗木叶内酯对照品贮备液 20, 80, 200, 500 μL 和 1 mL, 分别置于 10 mL 的量瓶中, 甲醇定容。检测波长为 230 nm, 进样 20 μL, 以峰面积对进样量进行回归, 分别得到的长尾粗木叶内酯的标准曲线的方程为 $Y = 0.3294X + 0.0013$ ($r = 0.9998$), 异嗪皮啶的标准曲线的方程为 $Y = 1.6655X + 0.8029$ ($r = 0.9999$), 党参内酯的标准曲线的方程为 $Y = 2.3801X + 2.7032$ ($r = 0.9997$)。结果表明, 异嗪皮啶和长尾粗木叶内酯进样量在 2 ~ 100 ng 线性良好, 党参内酯进样量在 4 ~ 200 ng 线性良好。

2.5 精密度试验 精密吸取异嗪皮啶、长尾粗木叶内酯和党参内酯对照品溶液, 重复进样 6 次, 测定峰面积 RSD 1.3%, 2.0%, 2.4%。

2.6 重复性试验 精密称取多穗金粟兰(No.1样品)地下部分干燥粉末约2g,共6份,按2.3项下供试品溶液的制备的方法制备,按2.1项下色谱条件测定,平行操作,分别测定异嗪吡啶、长尾粗木叶内酯和党参内酯的峰面积并计算其含量,按含量计算其RSD的平均值分别为2.8%,2.5%,2.4%。

2.7 加样回收试验 采用加样回收法,精密称取丝穗金粟兰(No.1样品)地下部分干燥粉末2g,分别加入样品实测含量的80%,100%,120%的异嗪吡啶、党参内酯和长尾粗木叶内酯对照品,按照第2.3项下供试品溶液的制备方法制备,测定这3种成分的含量,并计算其的回收率,见表3~5。

表3 异嗪吡啶的加样回收率

重量/g	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.009	8.840	7.200	15.56	93.4		
2.018	8.879	7.200	15.66	94.2		
2.021	8.892	7.200	15.89	97.2		
2.016	8.870	8.800	17.28	95.6		
2.010	8.844	8.800	17.34	96.5	96.1	2.3
2.005	8.822	8.800	17.02	93.2		
2.008	8.835	9.600	18.16	97.1		
2.011	8.848	9.600	18.30	98.5		
2.012	8.853	9.600	18.38	99.2		

表4 长尾粗木叶内酯加样回收率

重量/g	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.009	4.822	4.000	8.534	92.8		
2.018	4.843	4.000	8.571	93.2		
2.021	4.850	4.000	8.662	95.3		
2.016	4.838	4.800	9.259	92.1		
2.010	4.824	4.800	9.442	96.2	94.4	2.0
2.005	4.812	4.800	9.439	96.4		
2.008	4.819	5.600	9.994	92.4		
2.011	4.826	5.600	10.107	94.3		
2.012	4.829	5.600	10.250	96.8		

2.8 样品的测定 取6种金粟兰属样品,按2.3项下供试品溶液的制备方法制备,在2.1项下色谱条件测定3种有效成分的含量,测定结果见表6,对照品及供试品色谱见图1。

3 讨论

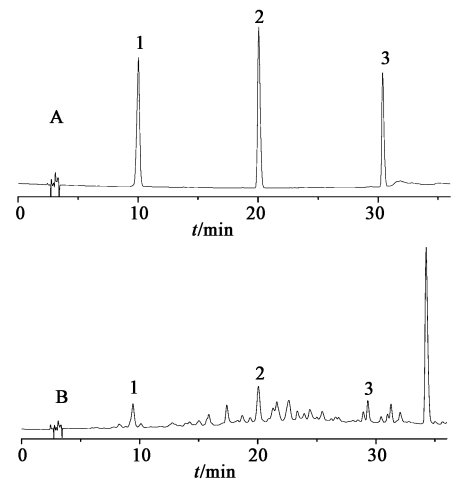
据文献报道,通常异嗪皮啶检测时采用的流动相有乙腈-水^[7]、甲醇-水^[8]和乙腈-0.1磷酸水溶

表5 党参内酯加样回收率

称样量/g	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2.009	2.411	1.800	4.097	93.7		
2.018	2.422	1.800	4.079	92.1		
2.021	2.425	1.800	4.088	92.4		
2.016	2.419	2.400	4.704	95.2		
2.010	2.412	2.400	4.673	94.2	94.2	1.9
2.005	2.406	2.400	4.712	96.1		
2.008	2.410	3.200	5.453	95.1		
2.011	2.413	3.200	5.360	92.1		
2.012	2.414	3.200	5.512	96.8		

表6 金粟兰中3种成分的含量测定

No.	样品	异嗪吡啶	长尾粗木叶内酯	党参内酯
1	多穗金粟兰	13	2.0	1.1
2	多穗金粟兰	18	-	-
3	多穗金粟兰	4.6	0.50	-
4	宽叶金粟兰	-	-	-
5	及己	-	-	-
6	丝穗金粟兰	4.4	2.4	1.2



A. 混合对照品; B. 样品

1. 异嗪吡啶; 2. 长尾粗木叶内酯; 3. 党参内酯

图1 多穗金粟兰样品 HPLC

液^[9-10]3种系统;党参内酯检测多采用乙腈-水^[11]为流动相;而相关长尾粗木叶内酯的定量分析文献鲜有报道。本实验经过反复试验,确定采用乙腈-0.1%磷酸水为流动相,梯度洗脱模式,可以将3种成分完全分离且峰形良好,保留时间适中,对于试样中的待测成分与其他杂质亦能基本分离。

对异嗪吡啶、党参内酯和长尾粗木叶内酯这3种有效成分在药材中分布部位进行了考察。比较了药材的地上部分和地下部分,依次用石油醚、三氯甲烷和乙酸乙酯的不同溶剂进行提取。经检测可知,异嗪吡啶、党参内酯和长尾粗木叶内酯3种成分主要在金粟兰属植物地下部分即根部的三氯甲烷部位。故本实验采用70%甲醇为溶剂,地下部分加热回流提取3次,合并提取液,减压浓缩至无醇水溶液,用三氯甲烷萃取3次,收集三氯甲烷溶液,浓缩至浸膏,建立了供试品的提取方法。

从表6中可以看出,在金粟兰属植物中,异嗪吡啶含量相对高些,长尾粗木叶内酯含量次之,党参内酯含量很低。如1~3号为不同时间采收且产地不同的多穗金粟兰药材,其中的异嗪吡啶含量分别为13,18,4.6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;长尾粗木叶内酯在多穗金粟兰和丝穗金粟兰中的含量分别为2.0,2.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$;而党参内酯在多穗金粟兰和丝穗金粟兰中分别为1.1,1.2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。相比产地对成分的影响,2011年7月采集于樟树多穗金粟兰中异嗪吡啶含量较高,含量为 $1.8 \times 10^{-3}\%$ 。2010年7月采集于樟树的多穗金粟兰药材中长尾粗木叶内酯和党参内酯的含量均较其他2种药材含量高,对同属不同种植物而言,多穗金粟兰中异嗪吡啶含量较高,丝穗金粟兰中长尾粗木叶内酯和党参内酯的含量较高,同属植物宽叶金粟兰和及己未检测到上述3种成分或含量极低,可见同属植物不同种植物、同种植物不同产地这3种成分含量差异很大,故不能混用。

[参考文献]

- [1] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982:820.
- [2] 曹聪梅,彭勇,肖培根,等. 金粟兰属植物的化学成分和药理作用的研究与进展[J]. 中国药科杂志, 2008, 33(13):1509.
- [3] 陈海山,程用谦. 金粟兰科的起源分化和地理分布研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1994, 2(4):31.
- [4] 夏绘晶,罗永明,曾爱华. 草珊瑚根茎叶中异秦皮啶的研究[J]. 江西中医学院学报, 2002, 14(3):9.
- [5] Kang T H, Bang J Y, Kim M H, et al. Atractylenolide III, a sesquiterpenoid, induces apoptosis in human lung carcinoma A549 cells via mitochondria-mediated death pathway[J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(2):514.
- [6] 王钢力,陈道峰,林瑞超. 肿节风的化学成分及其制剂质量控制研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(8):12.
- [7] 周国平,刘红宇,王汉章,等. 肿节风中异嗪吡啶含量的HPLC法测定[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(8):481.
- [8] 王砚,王钢力. 肿节风药材中反丁烯二酸和异嗪吡啶的含量测定[J]. 华西药学杂志, 2005, 20(1):62.
- [9] 左宏笛,王克英,茅向军. HPLC法测定跌打生骨胶囊中肿节风的异嗪吡啶含量[J]. 贵阳中医学院学报, 2007, 29(2):23.
- [10] 袁琴琴,李娜,李慧敏,等. HPLC测定多穗金粟兰不同部位的异嗪吡啶[J]. 光谱实验室, 2012, 29(4):2116.
- [11] 刘养清,赵平,巫剑锋,等. 党参饮片中党参内酯和党参炔苷的相关性研究[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(11):1841.

[责任编辑 顾雪竹]