

# 银线草不同器官异秦皮啶含量的 HPLC 测定

袁琴琴<sup>1,2</sup>, 康杰芳<sup>1,①</sup>

(1. 陕西师范大学药用资源与天然药物化学教育部重点实验室 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062;

2. 菏泽学院生命科学系, 山东 菏泽 274000)

**Determination of isofraxidin content in different organs of *Chloranthus japonicus* by HPLC** YUAN Qin<sup>1,2</sup>, KANG Jiefang<sup>1,①</sup> (1. Key Laboratory of Medicinal Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry of Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drug in Northwest of China, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. Department of Life Science, Heze University, Heze 274000, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2013, 22(3): 114-115

**Abstract:** Using Phenomenex C<sub>18</sub> column and low pressure gradient elution with mobile phase of methanol (A) -0.1% phosphoric acid water solution (B), isofraxidin content in 70% methanol extracts from root, stem and leaf of *Chloranthus japonicus* Sieb. was determined by HPLC. The results show that isofraxidin mainly exists in the chloroform partitioned extracts from 70% methanol extracts. Average content of isofraxidin in root, stem and leaf of *C. japonicus* is 0.258 5, 0.007 6 and 0.004 7 mg · g<sup>-1</sup>, respectively, in which, its content in root is the highest.

**关键词:** 银线草; 器官; 异秦皮啶含量; HPLC

**Key words:** *Chloranthus japonicus* Sieb.; organ; isofraxidin content; HPLC

中图分类号: R282.2; Q946.8 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2013)03-0114-02

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2013.03.18

银线草 (*Chloranthus japonicus* Sieb.) 为金粟兰科 (Chloranthaceae) 金粟兰属 (*Chloranthus* Swartz) 多年生草本植物, 全草或根入药, 是著名的太白七药——“四叶七”, 主治瘀血肿痛、毒蛇咬伤、疖疮肿毒和跌打损伤等, 一直作为民间中草药被广泛使用。银线草的化学成分复杂, 主要含倍半萜类、香豆素类、酰胺类、酚类、脂素类、甾体及甾体皂苷类等<sup>[1-5]</sup>; 其中香豆素类成分是金粟兰科药用植物抗菌消炎的有效成分, 体外活性实验显示还具有一定的肿瘤细胞抑制作用<sup>[6]</sup>。银线草所含的香豆素类成分异秦皮啶还是其同科药材肿节风 [原植物为草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai] 质量考察的指标之一<sup>[7]</sup>。有关银线草药材质量控制方面的研究尚未见报道。作者采用 HPLC 法测定了银线草不同器官异秦皮啶含量, 以期对银线草质量考察标准的制定及其药材资源的合理开发利用提供基础研究数据。

## 1 材料和仪器

### 1.1 材料

银线草样品于 2009 年采自陕西太白山, 经陕西师范大学生命科学学院田先华教授鉴定。选取 5 株生长年限一致的植

株, 按单株将根、茎和叶分开后烘干, 研磨成粉并过 60 目筛、备用。每一单株视为 1 份样品, 即根、茎和叶样品均为 5 份。

供试仪器和试剂: LC2010 AHT 高效液相色谱仪 (日本岛津公司), SL202N 型电子秤 (上海民桥精密科学仪器有限公司), MILLI-Q 超纯水仪 (德国 MILLIPORE 公司), RE250AA 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器公司), KQ5200 超声波清洗器 (江苏昆山超声仪器有限公司)。甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司), 磷酸 (分析纯, 天津市化学试剂三厂); 超纯水; 异秦皮啶标准品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110837-200707)。

### 1.2 方法

1.2.1 HPLC 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相 A 为甲醇、B 为体积分数 0.1% 磷酸水溶液, 低压梯度洗脱: 0 ~ 5 min, 15% ~ 25% A; 5 ~ 20 min, 25% ~ 30% A; 20 ~ 45 min, 30% ~ 40% A。柱温 25 °C, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长 323 nm, 进样量 10 μL。

1.2.2 异秦皮啶存在部位的确定 精密称取银线草全草的 70% 甲醇超声提取物浸膏 0.5 g, 加入 50 mL 水, 超声处理 (功率 220 W, 频率 50 kHz) 至浸膏完全溶解。依次用三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇各萃取 4 次, 分别收集三氯甲烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相, 旋转蒸干后各用 3 mL 甲醇溶解备用, 经

收稿日期: 2012-04-06

基金项目: 西安市科技创新支撑计划项目 [CX1018(3)]; 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (CK201002010)

作者简介: 袁琴琴 (1986—), 女, 内蒙古集宁县人, 硕士研究生, 研究方向为植物生物技术。

①通信作者 E-mail: kangjiefang@snnu.edu.cn

HPLC 检测异秦皮啶主要集中于三氯甲烷相中。

1.2.3 标准品溶液配制及标准曲线绘制 准确称取异秦皮啶标准品适量,加甲醇溶解并配制质量浓度  $0.12 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,用  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤,滤液即为异秦皮啶标准品溶液。分别精密吸取异秦皮啶标准品溶液  $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1.0$ 、 $3.0$ 、 $5.0$ 、 $10.0$  和  $15.0 \mu\text{L}$ ,按上述色谱条件进样分析。以进样量为横坐标  $X$ 、峰面积为纵坐标  $Y$ ,获得相应的回归方程  $Y = (3.46648 \times 10^5)X + (1.14350 \times 10^4)$ ,  $r = 0.9997$ ,异秦皮啶在  $0.012 \sim 1.800 \mu\text{g}$  范围内与峰面积呈良好的线性关系。

1.2.4 样品溶液制备及测定 分别准确称取银线草根、茎和叶的粉末样品  $2 \text{ g}$ ,分别精确加入体积分数  $70\%$  甲醇  $30 \text{ mL}$ ,超声(功率  $220 \text{ W}$ ,频率  $50 \text{ kHz}$ )提取  $30 \text{ min}$ ,重复提取  $2$  次;摇匀后放置  $30 \text{ min}$ ,抽滤;滤液各用  $60 \text{ mL}$  三氯甲烷分别萃取  $4$  次,合并三氯甲烷萃取液并旋转蒸干;然后分别加入  $3 \text{ mL}$  甲醇溶解,用  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤,滤液即为待测样品溶液。按照上述 HPLC 色谱分析条件进样分析。

### 1.2.5 方法学考察

1) 精密度试验 取异秦皮啶标准品溶液,按上述色谱条件连续测定  $5$  次,每次进样量  $10 \mu\text{L}$ 。异秦皮啶标准品峰面积的  $RSD$  为  $1.26\%$ ,表明仪器精密度良好。

2) 重复性试验 取银线草根 1 号样品  $5$  份,按上述样品溶液制备方法 & 色谱条件提取并进样分析,进样量  $10 \mu\text{L}$ 。异秦皮啶峰面积的  $RSD$  为  $2.30\%$ ,表明重复性良好。

3) 稳定性试验 取银线草根的 3 号样品,按上述样品溶液的制备方法提取并按上述色谱条件分别于  $0$ 、 $4$ 、 $8$ 、 $16$ 、 $24$  和  $48 \text{ h}$  依次进样分析,进样量  $10 \mu\text{L}$ 。异秦皮啶峰面积的  $RSD$  为  $2.46\%$ ,表明样品溶液在  $48 \text{ h}$  内稳定。

4) 加样回收率试验 准确称取已知含量的银线草根 5 号样品  $5$  份,每份  $2 \text{ g}$ ,准确加入异秦皮啶对照品  $0.20 \text{ mg}$ ,按上述样品溶液的制备方法 & 色谱条件提取并进样分析。异秦皮啶的加样回收率为  $98.90\%$ , $RSD$  为  $1.07\%$ 。

## 2 结果和分析

银线草不同器官中异秦皮啶的平均含量见表 1。由表 1 可见,银线草根中异秦皮啶含量最高,为  $0.2585 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,分别为其茎和叶中异秦皮啶含量的  $34$  倍和  $55$  倍,表明异秦皮啶主要存在于银线草的根中。

表 1 银线草不同器官中异秦皮啶的平均含量 ( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n=5$ )  
Table 1 Average content of isofraxidin in different organs of *Chloranthus japonicus* Sieb. ( $\bar{X} \pm SD$ ,  $n=5$ )

器官 Organ	异秦皮啶平均含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ Average content of isofraxidin
根 Root	$0.2585 \pm 0.0099$
茎 Stem	$0.0076 \pm 0.0005$
叶 Leaf	$0.0047 \pm 0.0001$

## 3 讨论

据报道,在进行异秦皮啶含量测定时可采用乙腈-水、乙腈- $0.1\%$  磷酸或甲醇-水为流动相<sup>[8-10]</sup>,作者以甲醇- $0.1\%$  磷酸水溶液为流动相进行低压梯度洗脱,测定银线草中异秦皮啶含量,其色谱峰与其他杂质峰分离良好,且峰形对称、分离效果较佳,满足了异秦皮啶含量测定的要求。

在三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇和水 4 种不同极性的萃取相中,异秦皮啶主要存在于三氯甲烷萃取相中,因而,作者在获得银线草  $70\%$  甲醇超声提取物后再用三氯甲烷萃取  $4$  次,经过旋转蒸发去除溶剂。该方法简便易行、操作误差小,适合银线草中异秦皮啶含量的提取。

夏绘晶等<sup>[11]</sup>的研究结果显示:在草珊瑚的根中异秦皮啶含量最高,茎次之,其叶中异秦皮啶含量最低。本研究结果显示:银线草根、茎和叶中异秦皮啶的平均含量分别  $0.2585$ 、 $0.0076$  和  $0.0047 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,与草珊瑚不同部位异秦皮啶含量的差异相同,且银线草根中异秦皮啶含量高于“肿节风药材中异秦皮啶含量达  $0.02\%$ ”这一质量标准<sup>[7]</sup>。表明银线草具有较高的药用开发利用价值。但银线草不同部位异秦皮啶含量有较大差异,在药理活性和临床应用方面应该予以区别。

### 参考文献:

- [1] 周浙昆. 金粟兰科的起源、演化及其分布[J]. 云南植物研究, 1993, 15(4): 321-331.
- [2] 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): 31-38.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第九卷第一分册[M]. 北京: 科学出版社, 1982: 79-80.
- [4] 张玲,初洪波,赫玉芳,等. 银线草研究进展[J]. 黑龙江医药, 2010, 25(2): 170-172.
- [5] 曹聪梅,彭勇,肖培根. 金粟兰属植物的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(13): 1509-1515.
- [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): 12-14.
- [7] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典: 2000 年版(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [8] 周国平,刘红宇,王汉章,等. 肿节风中异秦皮啶含量的 HPLC 法测定[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(8): 481-483.
- [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秦皮啶含量[J]. 贵阳中医学院学报, 2007, 29(2): 23-25.
- [10] 王砚,王钢力. 肿节风药材中反丁烯二酸和异秦皮啶的含量测定[J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(1): 62-64.
- [11] 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): 9-10.

(责任编辑: 惠红)