

·中药分析·

不同组织器官中华蛇根草绿原酸含量的比较研究

石金敏¹,徐梦菲²,周 灿¹,邹青伟¹,张晓燕^{1*}

(1. 湖北医药学院附属人民医院药学部,湖北 十堰 442000;2.武汉大学第二临床学院,湖北 武汉 430000)

[摘要] 目的 比较中华蛇根草不同组织器官中绿原酸的含量。方法 选用 Inertsil C₁₈ 色谱柱,以甲醇-0.02%磷酸溶液(20:80)为流动相,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 325 nm,柱温 40 ℃。结果 绿原酸在 0.027~1.700 μg($r=0.999\ 9$)范围内线性关系良好。2月花期采收的中华蛇根草茎、叶、花中绿原酸的含量分别为 3.39、0.77、22.79 mg/g。结论 中华蛇根草不同组织器官绿原酸含量差异较大,其中花含量最高。该方法能准确、快速地进行定性定量检测,可用于中华蛇根草中绿原酸含量的测定。

[关键词] 中华蛇根草;绿原酸;高效液相色谱法

[中图分类号]R284.1

[文献标识码]B

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.04.007

Comparative Study on the Content of Chlorogenic Acid in *Ophiorrhiza chinensis* from Different Organs

SHI Jinmin¹, XU Mengfei², ZHOU Can¹, ZOU Qingwei¹, ZHANG Xiaoyan^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Renmin Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, HuBei 442000, China; 2. Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, HuBei 430000, China)

[Abstract] **Objective** To determine the content of chlorogenic acid in different organs of *Ophiorrhiza chinensis*. **Methods** The contents of chlorogenic acid was determined with chromatographic column Inertsil C₁₈. And its mobile phase was methanol: 0.02% phosphoric acid solution (20:80), the flow rate was 1.0 mL/min, detection wavelength was 325 nm and the column temperature was 40 ℃. **Results** There was a good linear relationship of chlorogenic acid between 0.027 and 1.700 μg ($r=0.999\ 9$). The content of chlorogenic acid of Japanese snakeroot which were harvested during February flowering period, in stems, leaves, flowers were 3.39, 0.77, 22.79 mg/g, respectively. **Conclusion** The contents of chlorogenic acid, which are also different in different organs of the *Ophiorrhiza chinensis*, the highest of which is the flower. The method is accurate and quick in qualitative identification and quantitative assay, which can be used for the quality control of *Ophiorrhiza Chinensis*.

[Keywords] HPLC; *Ophiorrhiza chinensis*; chlorogenic acid

中华蛇根草 *Ophiorrhiza Chinensis* LO 为茜草科蛇根草属的植物,是中国特有的物种,主产于四川、贵州、湖北、湖南、江西、安徽、福建、广东、广西等地。花冠裂片背面有翅,无角状附属体或附属体很小;蒴果较小,宽不超过 10 毫米,花冠裂片背面有阔翅,叶基部两侧对称或近对称,干后常变淡红。蛇根草属植物约 200 余种,广泛分布于亚洲的热带、亚热带,我国已知 68 种,该属植物主要含有

甙醇、喜树碱、蒽醌衍生物、胡萝卜苷和木犀草素等活性成分^[1]。湖北武当山地区地处亚热带和温带的分水岭,气候温和,中华蛇根草资源非常丰富。为了考察其药效与活性成分的关联性,试验发现其富含绿原酸^[2]。因此,本文建立了 HPLC 测定中华蛇根草中绿原酸含量,并对不同部位的绿原酸含量进行了比较,对其进行方法学验证,为有效控制药材质量及合理利用植物资源提供参考。

[收稿日期]2015-09-09

[基金项目]湖北省高等学校创新能力提升计划“武当山区道地药材产业化关键技术湖北协同创新中心”鄂教科函[2012]56号。

[作者简介]石金敏,女,硕士,药师,研究方向:天然药物化学。

[通讯作者]* 张晓燕,女,主任药师,副教授,硕士研究生导师, E-mail:coarff66@126.com。

1 材料与仪器

1.1 材料

中华蛇根草样品 2 月采于湖北十堰市牛头山森林公园,经湖北医药学院附属人民医院药学部张晓燕主任药师鉴定为茜草科蛇根草属植物中华蛇根草 *Ophiorrhiza chinensis* LO。绿原酸标准品(质量分数 $\geq 98\%$,批号:110753-200413)购自中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇为色谱纯;水为重蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

日本岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(岛津有限公司);KQ-500DV 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);FA2004 万分之一电子分析天平(上海天平仪器厂);KQY-101 型电热干燥箱(武汉市武昌实验仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 样品的采集

2014 年 2 月于牛头山森林公园老虎寨,海拔 582.10 米处采集花期全草。采集当天分别洗净,置于 50 °C 恒温箱中干燥 36 h,按全草、茎、叶、花不同部位分类,分别粉碎,过四号筛,备用。

2.2 色谱条件^[3]

色谱柱:Inertsil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相(甲醇-0.02%磷酸水溶液,20:80);流速 1.00 mL/min;检测波长 325 nm;柱温为 40 °C,理论塔板数按绿原酸峰计算均不低于 3 000。色谱图见图 1。

2.3 供试品溶液的制备

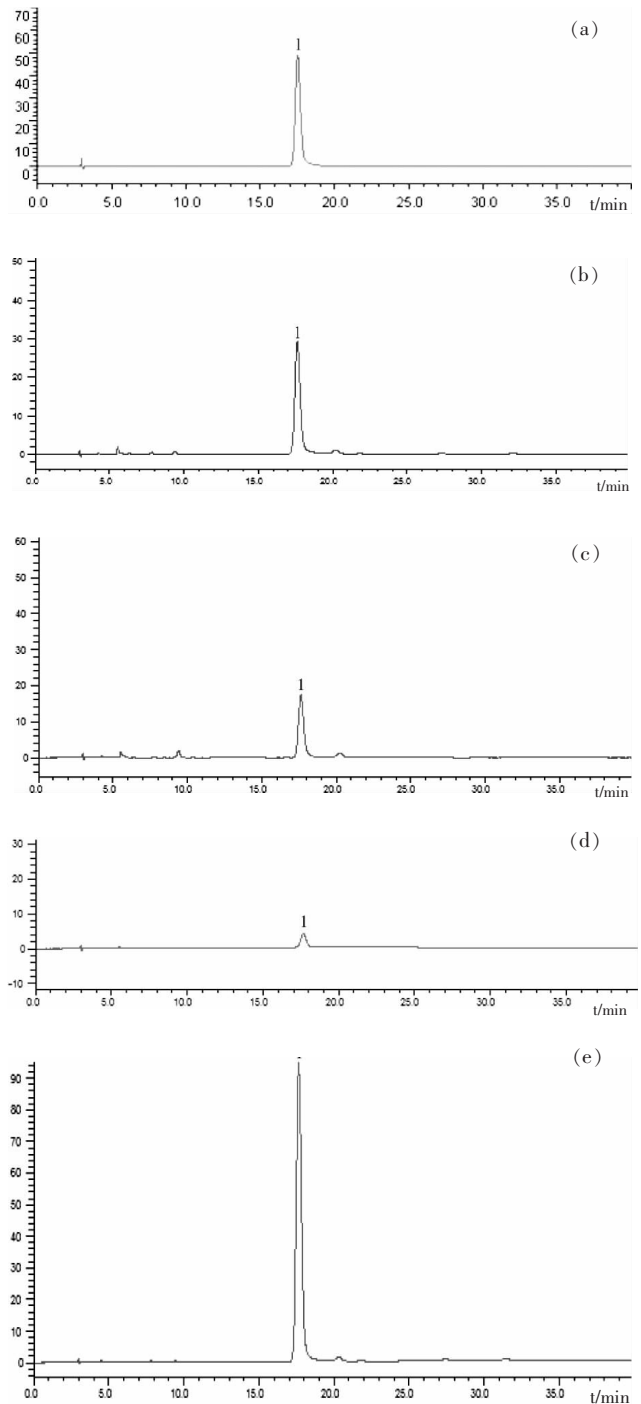
取样品粉末约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加甲醇 25 mL,称定质量,超声处理 30 min(超声功率 500W),放冷至室温,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,过滤,取续滤液,即得。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取绿原酸对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 42.5 μg 的溶液,即得绿原酸对照品溶液。

2.5 线性关系考察

分别取适量的绿原酸对照品,精密称定,加甲醇溶解并添加至刻度,摇匀,以甲醇逐级稀释,分别得到质量浓度为 170.00、85.00、42.50、21.25、10.63、5.31、2.66 μg/mL 绿原酸对照品溶液,进样 10 μL。



a.绿原酸对照品;b.中华蛇根草全株;c.茎;d.叶;e.花;1.绿原酸

图 1 中华蛇根草不同组织 HPLC 图谱

以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程为:

$$Y=1.7 \times 10^7 X - 19\ 041, r=0.999\ 9$$

绿原酸的进样量在 0.027~1.700 μg 之间呈线性关系。

2.6 精密度试验

取中华蛇根草全草,同“2.3”项下方法,制备供试品溶液,精密吸取 10 μL,连续进样 6 次,同法测

定,计算 RSD 0.35%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取中华蛇根草全草,同“2.3”项下方法制备供试品溶液,同“2.2”项法测定,分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μ L,测定峰面积,计算 RSD 0.47%,表明绿原酸在 24 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

取中华蛇根草全草 6 份,制备供试品溶液,测定,结果显示绿原酸峰面积的 RSD 0.69%,方法重复性良好。

2.9 加样回收试验

采用加样回收法,精密称取中华蛇根草全草 6 份,每份约 0.1 g,精密加入 0.90 mg 绿原酸,同“2.3”项方法制备供试品溶液,测定绿原酸的含量,结果表明该方法回收率良好,结果见表 1。

表 1 绿原酸的加样回收率实验结果 (n=6)

药材量 (g)	样品中含绿原酸量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
0.100 5	0.888 4	0.90	1.774 2	98.4	100.5	2.40
0.100 4	0.887 5	0.90	1.827 6	104.5		
0.100 2	0.885 8	0.90	1.785 4	100.0		
0.100 4	0.887 5	0.90	1.810 1	102.5		
0.100 5	0.888 4	0.90	1.776 3	98.6		
0.100 5	0.888 4	0.90	1.782 0	99.3		

2.10 样品中绿原酸的含量测定

取不同组织器官中华蛇根草样品,按照供试品溶液制备方法进行处理,分别制备供试品溶液,按上述色谱条件进样分析,结果见表 2。

表 2 2 月中华蛇根草不同组织器官绿原酸含量 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

部位	绿原酸含量 (mg/g)
茎	3.39 \pm 0.01
叶	0.77 \pm 0.01
花	22.79 \pm 0.06
全草	8.82 \pm 0.03

3 讨论

绿原酸具有清除自由基、抗菌消炎^[4]、抗病毒、降糖、降脂、保肝利胆、保肾^[5]等多种功效。近年来发现绿原酸类物质有抗癌^[6]、抗艾滋病的作用,可作为先导设计开发抗癌、抗艾滋病药物。绿原酸作为葡

萄糖-6-磷酸转移酶的抑制剂,可以启动中性粒细胞及前髓细胞 HL-60 的程序性细胞死亡,抑制人 Hep3B 肝癌细胞的金属硫蛋白(MMP)分泌,抑制神经胶质瘤的迁移。因此,绿原酸对肿瘤具有化学预防作用。有研究表明,绿原酸能通过增强 S-腺苷-L-高氨酸的合成来抑制 DNA 甲基化,从而阻止癌细胞基因启动子的转录^[7]。

由上述测定结果可知,中华蛇根草不同组织器官中绿原酸的含量依次为花>茎>叶。因此,利用中华蛇根草中绿原酸的药理作用在临床用于抗菌、消炎、解毒、清除氧自由基和抗癌的治疗时,选择花较合适。

此外,其花中绿原酸的含量为 22.79 mg/g,含量较高,由此,可以推测中华蛇根草具有清除自由基、抗菌、抗病毒、降糖、降脂或抗肿瘤等功效,但是目前未见中华蛇根草临床应用和药理药效的研究报道,其富含绿原酸是否与其药效有关联,还需相应的临床观察及药效试验来佐证,本研究为野生中华蛇根草资源的充分利用,明确其药用价值提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Wang W, Lu Y, Li L, et al. Distribution of anticancer drug in *Ophiorrhiza japonica* [J]. Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences), 2009, 38 (1):59-62.
- [2] 张婷, 美尔哈巴·热西提, 林潇, 等. HPLC-MS/MS 法测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷[J]. 中草药, 2012, 43(4):711-713.
- [3] 王华, 蔡萍, 万丹, 等. 双黄片 HPLC 指纹图谱的研究及其绿原酸和黄芩苷含量测定 [J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32 (7):41-44.
- [4] Wang LJ, Li JH, Gao JJ, et al. Inhibitory effect of chlorogenic acid on fruit russeting in 'Golden Delicious' apple [J]. Scientia Horticulturae, 2014, 178:14-22.
- [5] Robert D, Olga C, Vesna S, et al. Renoprotective mechanisms of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury [J]. Toxicology, 2014, 324:98-107.
- [6] Luciana GN, Maria V, Meritxell RF, et al. Promising antioxidant and anticancer (human breast cancer) oxidovanadium(IV) complex of chlorogenic acid. Synthesis, characterization and spectroscopic examination on the transport mechanism with bovine serum albumin [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2014, 135:86-99.
- [7] 陈绍华, 王亚琴, 罗立新. 天然产物绿原酸的研究进展 [J]. 食品科技, 2008(2):195-198.

(本文编辑 苏维)