

棒柄花叶中 PPG 含量的动态积累研究*

Dynamic Accumulation Study on the PPG Content of *Cleidion brevipetiolatum* Pax et Hoffm

陈小刚,覃兰芳,赖茂祥

CHEN Xiao-gang, QIN Lan-fang, LAI Mao-xiang

(广西中医药研究院,广西南宁 530022)

(Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Sciences, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:应用反相高效液相法研究不同月份中棒柄花(*Cleidion brevipetiolatum* Pax et Hoffm.)植物枝叶中反式-4-(1-丙烯基)苯酚- β -D 吡喃葡萄糖苷(PPG)含量的动态积累,确定棒柄花枝叶的最佳采收时期。结果表明,当年11月至次年2月份样品中 PPG 的含量相对较高,其中2月份的含量最高,为0.14%;当年3~10月份样品中 PPG 的含量相对较低,其中6月份含量最低,为0.0329%。当年11月至次年2月份为棒柄花枝叶的最佳采收时期。

关键词:反式-4-(1-丙烯基)苯酚- β -D 吡喃葡萄糖苷(PPG) 动态积累 枝叶 棒柄花 反相高效液相

中图分类号:O657.7,R284 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2010)02-0141-03

Abstract: The optimum harvest time of *Cleidion brevipetiolatum* Pax et Hoffm is determined through the dynamic accumulation study on the PPG content from different months of the year by the way of RP-HPLC. The result shows that the content of PPG from the samples is higher in Nov-Feb while it is lower in Feb-June. Therefore it is ascertained that Nov-Feb is the optimal harvest time to *Cleidion brevipetiolatum* Pax et Hoffm.

Key words: Trans-4-(1-propenyl)-phenol- β -D-glucopyranoside (PPG), dynamic accumulation, leaf, *Cleidion brevipetiolatum* Pax et Hoffm, RP-HPLC

棒柄花叶为大戟科植物棒柄花(*Cleidion brevipetiolatum* Pax et Hoffm.)的干燥叶,是广西常用壮药材之一,收载于广西壮族自治区《壮药质量标准》。棒柄花叶性寒,味苦,归肝胆肺经;有清热解暑,利湿退黄,通络止痛的功效;用于治疗黄疸,肋痛,咽喉肿痛,疮疖肿痛,急慢性肝炎,痢疾,热淋^[1]。现代研究表明棒柄花叶具有治疗肝炎的作用,其化学成分主要为糖苷、三甲氧基苯酚、谷甾醇、胡萝卜苷等^[2]。广西中药研究院中药化学研究所首次从棒柄花叶中分离得苯丙素酚糖苷类化合物,经鉴定为反式-4-(1-丙烯基)苯酚- β -D 吡喃葡萄糖苷 [Trans-4-(1-propenyl)-phenol- β -D-glucopyranoside] (缩写为 PPG)^[3]。该类化合物具有较强的生理活性。按照传统采药经验,叶类药材应为每年的夏季采收为宜,而在

前期工作中我们发现不同月份的棒柄花叶的大小、颜色及厚度不同,其中的 PPG 活性成份,随着采集月份的不同含量也有较大的差异。我们对同一产地不同月份的棒柄花叶子中 PPG 的含量进行动态积累跟踪研究,为确定棒柄花的最佳采收期提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器

日本岛津高效液相色谱仪(SPD-10AVP 紫外检测器,LC-10ATVP 溶剂输送泵);威玛龙色谱工作站;HH-S 数显恒温水浴锅;FA1004型电子天平;B2200S 型超声清洗器;微型植物试样粉碎机。

1.2 试药

PPG 对照品: PPG 对照品从棒柄花(*Cleidion brevipetiolatum* Pax et Hoffm.)植物中提取分离得到,经鉴定为反式-4-(1-丙烯基)苯酚- β -D 吡喃葡萄糖苷,经 HPLC 法测定其纯度为98.04%。

棒柄花叶:棒柄花叶定点定时采集于广西大新县下雷镇龙德村,每批药材均经过广西中医药研究院赖

收稿日期:2009-07-09

修回日期:2009-09-03

作者简介:陈小刚(1957-),男,教授,硕士研究生导师,主要从事中医中药科研工作。

* 广西科技攻关项目(桂科攻0322024-5A)资助。

茂祥研究员鉴定为大戟科植物棒柄花 (*Cleidion brevipetiolatum* Pax et Hoffm.) 的枝叶。

乙腈为色谱纯,水为重蒸馏水,石油醚(分析纯,沸点60~90℃)。其余试剂均为分析纯。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C18 柱 (250mm × 4.6mm, 5μm), 流动相为乙腈:水 (21:79), 检测波长 257nm, 流速 1.0ml/min, 进样量 10μl, 灵敏度 0.0100AUFS, 柱温为室温。塔板理论数以 PPG 计数不低于 5000。

1.4 对照品溶液制备

精密称取 PPG 对照品 10mg, 置于 25ml 量瓶中, 用甲醇溶解, 摇匀, 得每 1ml 含 PPG 0.4mg 的对照品储液。再精密量取 PPG 对照品储液 1ml 置于 25ml 量瓶中, 用甲醇稀释, 摇匀, 即得每 1ml 含 16μg PPG 的溶液。

1.5 供试品溶液制备

把棒柄花叶子研成细粉, 取约 0.5g, 精密称定, 先用石油醚 100ml 索氏洗提 2.5h, 挥干石油醚后, 残渣再用甲醇 100ml 索氏提取 4h, 水浴回收部分甲醇, 提取液定量转移至 50ml 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。用 0.45μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

1.6 方法学考察实验

1.6.1 提取溶剂考察实验

取棒柄花叶子 (2月份样品) 粉末 3份, 每份约 0.5g, 精密称定, 分别用甲醇、乙醇、氯仿 30ml 超声提取 2h, 放冷, 滤过。滤液定量转移至 50ml 容量瓶中, 分别加甲醇、乙醇、氯仿至刻度, 摇匀, 用 0.45μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 进样检测得 PPG 的含量依次为 0.106%、0.098%、0.030%。结果是用甲醇提取所得 PPG 含量较用乙醇和氯仿提取的高, 故选用甲醇做提取溶剂。

1.6.2 提取方法考察实验

取棒柄花叶子 (2月份样品) 粉末 3份, 每份约 0.5g, 精密称定, 各加甲醇 100ml, 分别采用超声波提取 4h、回流提取 4h、索氏提取 4h, 然后水浴回收部分甲醇, 使剩余甲醇提取液为 30ml 左右。提取液定量转移至 50ml 容量瓶中, 分别用甲醇定容, 摇匀, 用 0.45μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 进样检测得 PPG 的含量依次为 0.106%、0.117%、0.148%。结果是索氏提取含量较超声提取与回流提取高, 故选择索氏提取法。

1.6.3 提取时间考察实验

取棒柄花叶 (2月份样品) 粉末, 按供试品溶液制备方法分别考察石油醚洗提时间和石油醚洗提后甲醇提取时间。实验结果表明, 用石油醚洗提 2.5h 即可

将低极性杂质基本除尽, 所得色谱峰基线平稳, 峰形好, 能达到基线分离, 分离度大于 2.0。用石油醚洗提 2.5h 后再用甲醇提取 4h 即可把样品中的 PPG 提取完全。

1.6.4 标准曲线的绘制

分别取 PPG 对照品溶液 1ml、3ml、5ml、7ml、9ml 置于 10ml 量瓶中, 用甲醇稀释, 摇匀, 分别进样 10μl, 记录 PPG 峰面积值, 以峰面积值为纵坐标, 浓度 (μg) 为横坐标, 绘制标准曲线, 经计算得 PPG 回归方程为 $Y = 2.59 \times 10^5 X + 6.41 \times 10^4$, $r = 0.9999$, PPG 在 0.04~0.36μg 范围内线性关系良好。

1.6.5 重复性实验

精密称取同一样品 (2月份样品) 粉末 6份, 按供试品溶液制备方法进行处理, 依次测定 PPG 的含量, 六次测定 PPG 的含量依次为 0.149%、0.143%、0.145%、0.149%、0.146%、0.149% ($RSD = 1.74\%$, $n = 6$)。结果表明, 本测定方法重复性好。

1.6.6 精密度与稳定性实验

取对照品溶液, 连续进样测定 6次, 记录 PPG 峰面积值依次为 550041、551026、548983、550956、549295、545876 ($RSD = 0.35\%$, $n = 6$)。进样精密度良好, 符合 HPLC 定量分析的要求。

取同一供试品溶液 (2月份样品), 室温下放置, 在 0h、2h、4h、6h、8h, 分别依法进样测定 1次, 结果 PPG 含量依次为 0.149%、0.145%、0.146%、0.148%、0.148% ($RSD = 1.12\%$, $n = 5$)。供试品溶液在 8小时内稳定, 可以满足 HPLC 的分析要求。

1.6.7 检测限和定量限实验

实验条件下, 以 $S/N = 3:1$ 计算棒柄花中 PPG 的检测限为 0.001μg, 以 $S/N = 10:1$ 计算棒柄花的中 PPG 的定量限为 0.004μg。

1.6.8 回收率测定

取 2月份样品粉末 9份, 每份约 0.25g, 精密称定, 分别按药材中 PPG 含量的 80%、100%、120% 精密加入对照品各 3份, 按供试品配制方法制成供试品, 进样 10μl, 测定 PPG 含量, 计算 PPG 的加样回收率。9次试验结果显示 PPG 加样回收率为 92.39%~95.03%, 加样回收率平均值为 94.23%, RSD 为 1.18%。

2 样品测定

把 1~12月份棒柄花叶粉碎, 取 0.5g, 精密称定, 按供试品配制方法制备供试品样品溶液, 进样 10μl 检测, 用外标法计算不同月份棒柄花叶子中反式-4-(1-丙烯基) 苯酚-β-D 吡喃葡萄糖苷的含量, 结果如表 1 所示。

表1 不同月份棒柄花叶中 PPG 的含量

Table 1 The content of PPG in different months

采收月份 Harvest time	含量 Content (%)	采收月份 Harvest time	含量 Content (%)
1	0.117	7	0.0562
2	0.149	8	0.0687
3	0.119	9	0.0824
4	0.09	10	0.0793
5	0.0614	11	0.109
6	0.0329	12	0.1192

由表1实验结果可知,棒柄花叶中 PPG 的含量随月份变化而呈明显变化,在每年11月至次年的2月处于相对高峰期,其中2月份的含量最高,为0.149%;棒柄花叶子中 PPG 的含量在每年的3月至10月含量较低,其中6月份的含量最低,为0.0329%。因此,棒柄花叶的最佳采收期应在每年11月至次年的2月。

3 结束语

本实验在文献[4]的实验结果基础上,对供试品提取方法和提取溶剂实验进行了改进。在实验过程中我们发现,未采用石油醚洗提时,样品颜色较深,基线噪音大,分离度重现性差,考虑到实验材料是树叶,叶绿素含量较高,可能是影响样品纯度及色谱峰基线的重要因素。所以本实验采用石油醚除去样品中的脂溶

性叶绿素等成份,使样品更纯化,分离重现性好,有效保护色谱柱。

棒柄花植物每年3~10月为新枝叶萌发、开花等植物生长旺盛期,当年10月至次年年2月树木进入生长休眠期,是否是植物生长旺盛期体内养份消耗大,导致 PPG 含量相对较低,植物休眠期体内养份消耗小,导致 PPG 含量相对较高,这还有待于进一步的研究。

致谢:

广西中医药研究院化学研究所为本次实验提供 PPG 对照品,作者谨此致谢。

参考文献:

[1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准:第1卷[S]. 2008:188.
 [2] 李翠红,羊晓东,赵静峰,等. 棒柄花的化学成分研究[J]. 云南大学学报:自然科学版,2005,27(3):249-251.
 [3] 刘布鸣,卢文杰,牙启康,等. 棒柄花中反式-4-(1-丙烯基)-苯酚-β-D-吡喃葡萄糖苷的化学结构分离鉴定[J]. 广西科学,2005,12(3):214-215.
 [4] 刘布鸣,卢文杰,林霄,等. 反相高效液相色谱法测定棒柄花中反式-4-(1-丙烯基)苯酚-β-D 吡喃葡萄糖苷[J]. 分析测试学报,2006,25(3):98-99.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第140页 Coontinue from page 140)

有一些进展^[12~14],其化学成分^[15~18]也有进一步深入研究,但是鸡屎藤还处于野生状态尚未得到很好的开发利用。广西鸡屎藤资源丰富,市场潜力很大,而且鸡屎藤挥发油成分较多,活性较强,本研究通过对广西不同地区鸡屎藤挥发油成分的研究,以期对其质量标准的制定、规范生药品质等具有一定的指导意义,为进一步开发利用广西产鸡屎藤这一植物资源提供科学基础和实验依据。

参考文献:

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草:第六册[M]. 上海:上海科技出版社,1999:461.
 [2] 何开家. 广西鸡屎藤属6种药用植物的生药学研究[J]. 中国中药杂志,1999,24(6):323-327.
 [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:附录57.
 [4] 中国质谱学会有机专业委员会. 香料质谱图集[M],北京:科学出版社,1992:1-261.
 [5] Massday Y. Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry [M]. New York: John Wiley and Sons Inc,1976:1-286.
 [6] 丛浦珠. 质谱学在天然有机化学中的应用[M]. 北京:科学出版社,2003:783-921.
 [7] 马养民,毛远,傅建熙. 鸡屎藤挥发油化学成分的研究

[J]. 西北植物学报,2000,20(1):145-48.
 [8] 余爱农,龚发俊,刘定书. 鸡屎藤鲜品挥发油化学成分的研究[J]. 湖北民族学院学报,2003,21(1):41-43.
 [9] 谢惜媚,陆慧宁,任三香. 野生新鲜鸡屎藤挥发性化学成分的 GC/MS 分析[J]. 分析试验室,2003,22(1):76-77.
 [10] 刘信平,张驰,田大厅,等. 富硒野菜鸡屎藤的挥发性活性成分研究[J]. 食品科学,2007,28(10):468-469.
 [11] 韩丹,张桂林,刘维泽,等. 鸡屎藤的活性成分-二甲基二硫化物对大鼠癫痫放电影响的实验研究[J]. 湖北医科大学学报,1994,15(4):312-315.
 [12] 宋大松,孔顺贤. 鸡屎藤汤治疗溃疡性结肠炎60例[J]. 中国中医药科技,2003,10(4):247-248.
 [13] 代有礼. 鸡屎藤降脂汤治疗高脂血症57例疗效观察[J]. 云南中医中药杂志,2005,26(6):20.
 [14] 张书霞. 鸡屎藤的营养成分分析[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):150-151.
 [15] 马养民,毛远. 鸡屎藤化学成分研究进展[J]. 陕西林业科技,2002(2):73-76.
 [16] 赵宇新. 鸡屎藤中2个新的环烯醚萜苷[J]. 国外医学:中医中药分册,2004(1):53.
 [17] 邹旭,梁健,丁立生,等. 鸡屎藤化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(17):1436-1441.
 [18] 戴良富,吴娇. 黎药鸡屎藤的化学成及药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药,2009,5(2):117-119.

(责任编辑:邓大玉)