

不同来源千金藤中千金藤素的 HPLC 法测定

肖 姣¹, 宋俊玉¹, 潘英妮¹, 刘丽丽², 陈 刚^{1*}, 李 宁^{1*}

1. 沈阳药科大学 中药学院 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016

2. 沈阳管城制药有限责任公司, 辽宁 沈阳 110001

摘要: 目的 建立不同来源的千金藤植物中千金藤素的 HPLC 测定方法。方法 采用 Angela C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (52:48, 含 0.5% 三乙胺、0.01% 磷酸); 检测波长: 282 nm; 柱温: 30 °C; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样体积: 20 μL。结果 千金藤素质量浓度在 9~216 μg/mL 时与峰面积值呈良好的线性关系 ($r=0.9997$), 平均回收率为 96.0%, RSD 值为 2.0% ($n=6$)。产自湖南的千金藤 (No.13)、产自广西的白药子 (No.17) 中千金藤素的量较高, 分别为 0.013 9%、0.122 1%; 同一植株的不同用药部位 (No.12~15) 中千金藤素的量也不尽相同, 湖南产千金藤中千金藤素主要分布在茎中, 其质量分数为 0.013 9%。**结论** 该方法操作简便、准确、重复性好, 可用于千金藤植物千金藤、地不容和白药子中千金藤素的测定。

关键字: 千金藤; 地不容; 白药子; 千金藤素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2016)05-0591-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.05.006

Determination of cepharanthine in plants of *Stephania* Lour. from various habitats by HPLC

XIAO Jiao¹, SONG Jun-yu¹, PAN Ying-ni¹, LIU Li-li², CHEN Gang¹, LI Ning¹

1. Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery of Ministry of Education, School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. Shenyang Guancheng Pharmaceutical Co., Ltd., Shenyang 110001, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of cepharanthine in the plants of *Stephania* Lour. from various habitats and parts. **Methods** The determination was carried out on Angela C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-water (52 : 48, 0.5% triethylamine and 0.01% phosphoric acid). The column temperature was set at 30 °C at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume was 20 μL. **Results** Cepharanthine had a good linearity in the ranges of 9 — 216 μg/mL ($r = 0.9997$). The average recovery rate was 96.0% with RSD value at 2.0%. Contents of cepharanthine in *Stephania japonica* sample (No.13) from Hunan province and *S. cepharantha* sample (No.17) from Guangxi province were the highest. Contents of cepharanthine in various plant parts of samples (No.12 — 15) were different, and that in *S. japonica* from Hunan province were generally found in the stem, which content reached to 0.013 9%. **Conclusion** The established method is simple, sensitive, and highly reproducible, which is suitable for the determination of cepharanthine in *S. japonica*, *S. epigaea*, and *S. cepharantha*.

Key words: *Stephania japonica* (Thunb.) Miers; *Stephania epigaea* Lo; *Stephania cepharantha* Hayata; cepharanthine; HPLC

千金藤 *Stephania japonica* (Thunb.) Miers 为防己科千金藤属植物。本属植物全世界有 60 余种, 我国有 39 种, 主要分布在长江流域及其以南各省区,

其中以广西、云南分布最广泛^[1]。千金藤的根和蔓茎具有清热解毒、利尿消肿、祛风止痛的功效, 为民间常用草药^[2]。千金藤素是从千金藤属植物中提

收稿日期: 2016-02-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U1403102, 81473108); 辽宁省自然科学基金资助项目 (2015020732)

作者简介: 肖 姣 (1990—), 女, 陕西人, 硕士研究生, 从事天然药物化学研究。Tel: (024)23986475 E-mail: qiusang002653@sina.com

*通信作者 李 宁 (1979—), 女, 河北人, 教授, 博士生导师, 从事天然药物化学研究。Tel: (024)23986475 E-mail: liningsypharm@163.com

陈 刚 (1980—), 男, 辽宁人, 副教授, 硕士生导师, 从事天然药物化学研究。Tel: (024)23986483 E-mail: chengang1152001@163.com

取出的一种双苄基异喹啉类生物碱^[3], 具有消炎、抑菌、调节免疫等作用^[4]。近年来, 关于千金藤素抗肿瘤活性及作用机制的研究^[5-6]也日益深入, 普遍认为其通过刺激动物网状内皮系统、活化造血组织、促进骨髓组织增生, 起到促进白细胞升高的作用, 在临床上主要用于治疗矽肺、癌症患者化疗后白细胞减少症。千金藤属植物千金藤、地不容 *S. epigaea* Lo.、白药子 *S. cepharantha* Hayata 在民间均有应用^[7-11]。为了明确千金藤与同属其他易混植物的品质差异及合理安全用药, 本实验以千金藤素为指标, 采用 HPLC 法研究不同来源植物、不同产地、不同部位千金藤中千金藤素, 为千金藤药材基源选择、质量标准建立和合理用药提供实验依据。

1 仪器与材料

Shimadzu LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); BSA124S 电子天平(德国 Sartorius 公司); DK-98-II 电热恒温水浴锅(天津斯泰特仪器有限公司); N-1100 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

95%工业酒精; 色谱纯甲醇、色谱纯乙腈(山东禹王实业有限公司); 色谱纯三乙胺、色谱纯磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司)。千金藤素对照品(规格 20 mg/支, 质量分数 98.2%, 天津一方科技有限公司)。

17 批药材采自江苏、安徽、河北、湖南、湖北等地, 均由沈阳药科大学中药分析及鉴定教研室潘英妮副教授鉴定, 见表 1。

表 1 不同产地、不同部位千金藤属各植物中千金藤素的测定结果

Table 1 Determination of cepharanthine in plants of *Stephania* Lour. from various habitats and parts

编号	原植物	部位	产地	收集地	收集时间	千金藤素/%
No. 1	千金藤	饮片	江苏	江苏	2014-10	0.002 2
No. 2	千金藤	饮片	湖北	安徽亳州	2014-11	0.000 5
No. 3	千金藤	饮片	湖北	河北安国	2014-11	0.000 3
No. 4	地不容	根饮片	云南	安徽亳州	2014-11	0.007 7
No. 5	地不容	根饮片	云南	河北安国	2014-11	0.005 6
No. 6	千金藤	根饮片	广西	广西	2015-03	0.000 1
No. 7	千金藤	茎饮片	广西	广西	2015-03	微量
No. 8	千金藤	根饮片	广西	广西	2015-03	0.003 9
No. 9	千金藤	茎饮片	广西	广西	2015-03	微量
No. 10	千金藤	根饮片	广西	广西	2015-03	0.000 2
No. 11	千金藤	茎饮片	广西	广西	2015-03	0.002 1
No. 12	千金藤	根饮片	湖南	湖南	2015-03	0.003 0
No. 13	千金藤	茎饮片	湖南	湖南	2015-03	0.013 9
No. 14	千金藤	果实	湖南	湖南	2015-03	0.000 1
No. 15	千金藤	叶	湖南	湖南	2015-03	0.001 8
No. 16	千金藤	饮片	湖北	湖北	2015-06	0.002 6
No. 17	白药子	根饮片	广西	安徽亳州	2015-09	0.122 1

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Angela C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(52:48, 含 0.5%三乙胺、0.01%磷酸); 检测波长: 282 nm; 柱温: 30 °C; 体积流量: 1.0 mL/min; 进样体积: 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取药材粗粉 1.0 g, 加 50 倍量 80%乙醇

水回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 浓缩至干, 加 52%乙腈水定容至 5 mL, 超声溶解, 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取千金藤素对照品 3.00 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 分别加 52%乙腈溶液溶解, 并稀释得到 9、18、36、54、90、144、216 μg/mL 系列质量浓度溶液, 备用。

2.4 线性关系考察

分别精密吸取系列质量浓度的千金藤素对照品溶液各 20 μL，进样分析，记录色谱峰面积值。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标进行线性回归，得方程 $Y=45\ 087 X+85\ 975$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明千金藤素质量浓度在 9~216 μg/mL 时与峰面积值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取 144 μg/mL 千金藤素对照品溶液 20 μL，连续进样 6 次，测定峰面积值，计算得千金藤素峰面积值的 RSD 值为 0.9%。

2.6 稳定性试验

精密吸取室温下放置的 No.17 白药子供试品溶液，分别在配制后 0、2、4、6、12 h 进样分析，测定峰面积值，计算得千金藤素峰面积值的 RSD 值为 0.8%，结果表明供试品溶液在室温下 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取批号 No.17 白药子粗粉 1.0 g，共 5 份，分别精密称定，制备供试品溶液，进样分析，测定峰面积值，计算得千金藤素质量分数的 RSD 值为 1.5%。

2.8 加样回收率试验

精密称取批号 No.17 白药子粗粉 0.5 g，平行 6 份，加入千金藤素对照品 0.6 mg，制备供试品溶液，进样分析，测定峰面积值，计算得千金藤素的平均回收率为 96.0%，RSD 值为 2.0%。

2.9 样品测定

取各样品，制备供试品溶液。精密吸取各供试品溶液 20 μL，进样分析，按外标法计算样品中千金藤素的质量分数，测定结果见表 1，色谱图见图 1。可见产自湖南的千金藤 (No.13)、产自广西的白药子 (No.17) 中千金藤素的量较高，分别为 0.013 9%、0.122 1%；同一植株的不同用药部位 (No.12~15) 中千金藤素的量也不尽相同，湖南产千金藤中千金藤素主要分布在茎之中，其质量分数为 0.013 9%。

3 讨论

双苄基异喹啉类生物碱大多存在于植物界中较原始的多心皮类群中，如防己科、毛茛科、小檗科，具有显著的抗疟、抗炎、抗菌活性，在心血管疾病治疗方面亦有应用。千金藤素是防己科植物千金藤属植物中的特征性双苄基异喹啉类生物碱，具有抗结核、抗菌、抗麻风、抗肿瘤等作用，在临床上作为升白药应用，有显著的疗效。因此千金藤素可作为千金藤属药用植物中的一个指标性活性成分进行

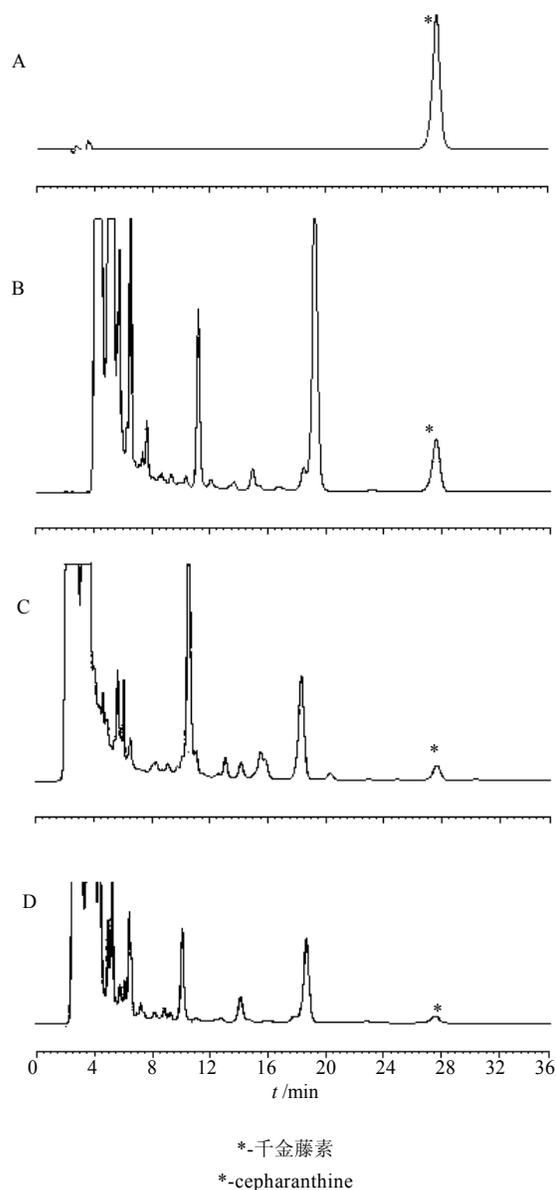


图 1 千金藤素对照品 (A)、白药子 (B)、千金藤 (C) 和地不容 (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of cepharanthine reference substance (A), *S. cepharantha* (B), *S. japonica* (C) and *S. epigaea* (D)

测定，对中药质量控制、基源植物鉴别、临床安全用药都具有一定意义。

千金藤属植物在民间应用较广泛，应用范围存在地域性差异。实验结果显示广西白药子 (No.17) 中千金藤素的量偏高，但本实验研究批次太少，不具有代表性，可否作为千金藤的代用药材还有待进一步考察。

千金藤属植物基源复杂，千金藤市售品存在严重的同名异物的现象，同一植物在不同地区命名也

存在差异。如防己科千金藤属头花千金藤的块根在浙江被称为金线吊蛤蟆，在广西则为白药子。但目前未见有关其质量评价的报道。该属植物所含的生物碱成分多具有生物活性，故选千金藤素作为指标性成分进行千金藤的质量控制。从各批千金藤药材的 HPLC 法测定结果分析可知，各批次药材中均含有千金藤素。

从同株植物不同部位中千金藤素的测定结果可见，不同的用药部位中千金藤素的量差异较大。但市售的药材中有将根、茎、叶等部位切片混合使用的，今后有必要增加药材的批次及药材质量，对各部位中有效物质的测定作进一步研究。

通过对千金藤素进行全波长紫外扫描，发现其在 282 nm 下吸收最强，比较了不同波长及 75% 甲醇水、乙腈 - 水 (52:48, 含 0.5% 三乙胺、0.01% 磷酸) 不同流动相对千金藤素分离度的影响，结果表明，在选定的色谱条件下供试品中千金藤素的分离效果最好。

考察了不同体积分数 (60%、70%、80%、95%) 乙醇、粉碎粒度 (饮片、细粉、7 目、40 目、100 目)、提取次数 (1、2、3 次)、提取时间 (1、2、3 h) 对千金藤浸出物的影响，结果表明用 80% 乙醇、提取 2 次，每次 2 h 浸出物提取率最高。

本实验建立的方法精密度良好、重现性好，试

样在 12 h 内稳定性良好，因此操作简便、精确，可作为千金藤中千金藤素的测定方法。

参考文献

- [1] 黄建明, 郭济贤. 中国千金藤属 (*Stephania*) 植物中生物碱类化学成分的研究进展 [J]. 华西药理学杂志, 1998, 13(2): 97-99.
- [2] 马养民. 千金藤属植物化学成分研究 [J]. 西北林学院学报, 2004, 19(3): 125-130.
- [3] 沈静琳, 彭红, 王路华, 等. RP-HPLC 测定千金藤素滴丸中千金藤素含量 [J]. 中成药, 2009, 31(1): 156-157.
- [4] 崔俊屹. 千金藤素的药理作用概述 [J]. 中草药, 1995, 26(9): 502-503.
- [5] 谌 璠, 丁 一, 朱丽红. 千金藤素的抗肿瘤作用研究进展 [J]. 癌症进展, 2012, 10(1): 502-503.
- [6] 王庆瑞, 江金花, 孙文欣, 等. 千金藤素抗炎镇痛活性的实验研究 [J]. 中国药理学杂志, 1999, 34 (9): 594-597.
- [7] 王宪楷, 赵同芳. 千金藤属植物中生物碱成分的分布及其生物活性 [J]. 中国药理学杂志, 1990, 25(1): 3-6.
- [8] 罗献瑞. 中国千金藤属分类梗概 [J]. 植物研究, 1982, 2(1): 33-59.
- [9] 冯毓秀, 朱兆仪, 陈 红. 防己科千金藤属药用植物的生药形态组织比较 [J]. 药学学报, 1983, 18(11): 849-856.
- [10] 李一兵, 廖永新. 白药子、粉防己的性状与显微鉴别 [J]. 赣南医学院学报, 1992, 19(4): 346-347.