

10 种苦竹属竹叶中香豆素类化合物的比较研究

魏琦, 王进, 喻谨, 孙赟, 岳永德, 汤锋*

(国际竹藤中心竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102)

摘要 采用高效液相色谱法, 检测了 10 种苦竹属竹叶中东茛菪内酯、香豆素、补骨脂素、蛇床子素、东茛菪苷、花椒毒素、伞形酮、茵芋内酯、6,7-二甲氧基香豆素、欧前胡素、5,7-二甲氧基香豆素及茵芋苷等 12 种香豆素类化合物的含量, 10 种竹种包括苦竹、宜兴苦竹、川竹、斑苦竹、杭州苦竹、高舌苦竹、垂枝苦竹、衢县苦竹、丽水苦竹及实心苦竹。共检测出茵芋苷、东茛菪内酯、伞形酮、6,7-二甲氧基香豆素、香豆素和茵芋内酯 6 种香豆素类化合物, 其含量在 2.20 ~ 82.20 mg/kg 之间, 其中川竹叶东茛菪内酯含量最高。本研究为苦竹属竹叶中香豆素类化合物的开发利用提供了理论基础, 为竹叶资源的化学利用及香豆素类化合物的研究提供参考。

关键词 苦竹属; 竹叶; 香豆素类化合物; 含量测定

中图分类号 Q284 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)03-0297-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140308

Coumarins in bamboo leaves of 10 species of *Pleioblastus* Nakai

WEI Qi, WANG Jin, YU Jin, SUN Jia, YUE Yongde, TANG Feng*

Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China

Abstract 12 coumarins in the leaves of 10 species of *Pleioblastus* Nakai were studied by HPLC. The 12 coumarins were coumarin, skimin, scopolin, scopoletin, umbelliferone, xanthotoxin, psoralen, pimpinellin, 5,7-dimethoxycoumarin, 6,7-dimethoxycoumarin, imperatorin and osthole. The 10 bamboo species included *Pleioblastus amarus* (Keng) Keng f., *P. simonii* (Carr.) Nakai, *P. maculatus* (McClure) C. D. Chu et C. S. Chao, *P. altiligulatus* S. L. Chen et S. Y. Chen, *P. yixingensis* S. L. Chen et S. Y. Chen, *P. amarus* (Keng) Keng f. var. *pendulifolius* S. Y. Chen, *P. solidus* S. Y. Chen, *P. juxianensis* Wen, C. Y. Yao et S. Y. Chen, *P. maculosoides* Wen and *P. amarus* (Keng) Keng f. var. *hangzhouensis* S. L. Chen et S. Y. Chen. 6 coumarins including skimin, scopoletin, 6,7-dimethoxycoumarin, umbelliferone, coumarin and pimpinellin were detected, and the contents of which were among the range of 2.20-82.20 mg/kg. *P. simonii* leaves were found to have the highest content of scopoletin. The results provide a reference for the comprehensive utilization of coumarins in the leaves of *P. Nakai*. This study is useful for the research on coumarins and chemical utilization of bamboo leave resources.

Key words *Pleioblastus* Nakai; bamboo leaves; coumarins; determination

This study was supported by the National Science and Technology Support Planning Project of China (No. 2012BAD23B03) and the Basic Science Research Fund Program of the International Center for Bamboo and Rattan (No. 16320120006)

香豆素类化合物是一类重要的次生代谢产物, 广泛分布于高等植物根系、茎、叶、花、果、果皮和种子等部位及微生物代谢产物中^[1]。从天然药物中分离得到或合成的香豆素类化合物具有多种药理活性, 一直受到国内外学者的广泛关注。研究发现

香豆素类化合物具有抗肿瘤、抗病毒、抗感染、抗氧化、抗血栓生成、抗过敏及抗菌等药理活性, 具有很高的药用价值, 现已广泛应用于医药领域^[2-5]。近年来, 香豆素类化合物抗肿瘤作用已成为一个研究热点。另外, 香豆素类化合物具有芳香气味, 可作

* 收稿日期 2014-03-03 * 通信作者 Tel: 010-84789821 E-mail: fengtang@icbr.ac.cn

基金项目 “十二五” 国家科技支撑计划资助项目 (No. 2012BAD23B03); 国际竹藤中心基本科研业务重点资助项目 (No. 16320120006)

为香料、定香剂、增香剂等,应用于食品、香烟、塑料制品等产品中^[6]。

竹子是禾本科(Poaceae)竹亚科(Bambusoideae)多年生木本植物,我国竹类资源丰富。竹类植物在中国具有悠久的药用和食用历史,对竹类资源的研究、开发和利用越来越受到广泛的关注^[7]。竹类植物中含有多种活性物质,本课题组在簕竹属撑篙竹(*Bambusa pervariabilis* McClure)竹叶中发现了3种香豆素类化合物,分别为东茛菪苷、东茛菪内酯和一个新化合物^[8]。苦竹属(*Pleioblastus* Nakai)在我国分布广泛,其竹叶、笋等可入药,在中医药书籍中都有记载,是竹类植物中重要的一属。

紫外分光光度法(UV)、气相色谱-质谱联用法(GC/MS)、高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱-质谱联用法(HPLC/MS)等是测定香豆素类化合物常用的分析方法^[6,9-11]。苦竹属竹叶中香豆素类化合物的报道较少,本研究采用HPLC法^[12]对苦竹属10种竹种竹叶中12种香豆素类化合物进行了分析比较,以期对苦竹属的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 样品及来源

苦竹(*Pleioblastus amarus* (Keng) Keng f.)、杭州苦竹(*Pleioblastus amarus* (Keng) Keng f. var. *hangzhouensis* S. L. Chen et S. Y. Chen)、川竹(*Pleioblastus simonii* (Carr.) Nakai)、斑苦竹(*Pleioblastus maculatus* (McClure) C. D. Chu et C. S. Chao)、宜兴苦竹(*Pleioblastus yixingensis* S. L. Chen et S. Y. Chen)、高舌苦竹(*Pleioblastus altiligulatus* S. L. Chen et S. Y. Chen)、垂枝苦竹(*Pleioblastus amarus* (Keng) Keng f. var. *pendulifolius* S. Y. Chen)、衢县苦竹(*Pleioblastus juxianensis* Wen, C. Y. Yao et S. Y. Chen)、丽水苦竹(*Pleioblastus maculosoides* Wen)、实心苦竹(*Pleioblastus solidus* S. Y. Chen)等竹叶于2012年10月采自四川省长宁县长宁世纪竹种园,经长宁世纪竹种园李本祥工程师鉴定。

1.2 仪器

2695型高效液相色谱仪,2487双波长紫外检测器(美国Waters公司);Florisil SPE柱(美国Supelco公司)。

1.3 对照品与试剂

东茛菪内酯(98%)、香豆素(99%)购自百灵威科技有限公司;补骨脂素(98%)、蛇床子素(98%)、东茛菪苷(98%)、花椒毒素(97%)、伞形酮(98%)、茴芹内酯(93%)、6,7-二甲氧基香豆素(98%)、欧前胡素(98%)、5,7-二甲氧基香豆素(98%)、茵芋苷(99%)购自云南西力生物技术有限公司;色谱乙腈(美国Fisher公司)。

2 方法

2.1 标准溶液制备

精确称量香豆素、花椒毒素、茵芋苷、5,7-二甲氧基香豆素、欧前胡素、东茛菪苷、东茛菪内酯、6,7-二甲氧基香豆素、补骨脂素、伞形酮、茴芹内酯和蛇床子素12种标准品各5 mg,分别置于10 mL量瓶中,用甲醇溶解,定容,配制成500 mg/L的标准贮备溶液备用。用12种香豆素类化合物的标准储备溶液配制混合标准溶液,使东茛菪苷的质量浓度为37.5 mg/L,伞形酮的质量浓度为12.5 mg/L,其余10种香豆素类化合物的质量浓度为25 mg/L。根据实验需要将混合标准溶液逐级稀释成系列浓度,4℃下保存备用。

2.2 样品制备

精确称取竹叶样品1.25 g于50 mL离心管中,加入70%乙醇30 mL,超声提取30 min后离心,过滤,重复提取3次。合并滤液于浓缩瓶中,减压浓缩。将浓缩后的粗提物加甲醇10 mL溶解,转移至50 mL离心管中,4℃下放置30 min。然后离心,取出上清液于10 mL量瓶中,用甲醇定容至10 mL。吸取提取液0.2 mL,置于Florisil SPE柱中,甲醇5 mL洗脱,用5 mL量瓶接收洗脱液并定容至刻度。每种竹种设置3次重复。吸取提取液1 mL,过0.45 μm微孔滤膜待测。

2.3 HPLC检测条件

色谱柱:Waters XTerra MS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%磷酸水溶液(B),梯度洗脱:0~40 min,5% A;40~41 min,80% A;41~48 min,5% A。梯度上升弧度均为4。流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:316 nm;进样量:10 μL。

3 结果与分析

12种香豆素类化合物的高效液相色谱图见图

1,线性方程及相关系数见表 1。竹叶香豆素类化合物含量测定结果见表 2。由图 1 可看出,12 种香豆素类化合物分离良好。由表 1 看出,12 种香豆素类化合物在各线性范围内呈良好的线性关系。由表 2 可知,苦竹属 10 种竹种竹叶中共检测出 6 种香豆素类化合物,10 种竹叶中均含有东莨菪内酯。

斑苦竹叶茵芋苷含量最高且与其他竹种差异显著($P < 0.05$),为 40.66 mg/kg;杭州苦竹叶含量最低,为 2.20 mg/kg。川竹叶东莨菪内酯含量最高且与其他竹种差异显著($P < 0.05$),为 82.20 mg/kg;实心苦竹叶含量最低且与其他竹种差异显著($P < 0.05$),为 9.33 mg/kg。伞形酮只在杭州苦竹和实心苦竹叶中检测出,其含量分别为 3.01 mg/kg 和 2.34 mg/kg。川竹叶 6,7-二甲氧基香豆素含量最高且与其他竹种差异显著($P < 0.05$),为 39.68 mg/kg;斑苦竹叶含量最低,为 11.61 mg/kg。高舌苦竹叶香豆素含量最高且与其他竹种差异显著($P < 0.05$),为 15.75 mg/kg;斑苦竹叶香豆素含

量最低,为 9.67 mg/kg。茵芋内酯只在苦竹、垂枝苦竹和宜兴苦竹叶中检测出,且含量差异不显著,垂枝苦竹叶茵芋内酯含量最高,为 4.46 mg/kg。

东莨菪苷、补骨脂素、花椒毒素、5,7-二甲氧基香豆素、欧前胡素及蛇床子素在 10 种苦竹属竹叶中均未检测出。

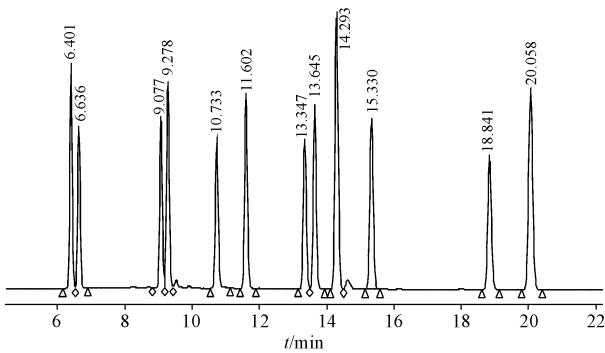


Figure 1 HPLC chromatogram of the mixed standards of 12 kinds of coumarins

Table 1 Linear relationships of 12 kinds of coumarins between peak area and concentration[$c/(mg/L)$]

Standard	t_R/min	Regression equation	R^2	Linear range/(mg/L)
Skimin	6.40	$A = 22\,373c + 123.45$	0.999 3	0.02-6.25
Scopolin	6.64	$A = 9\,787.3\,c - 178.53$	0.999 9	0.04-9.38
Scopoletin	9.08	$A = 18\,134\,c - 154.18$	0.999 8	0.02-6.25
Umbelliferone	9.28	$A = 45\,474\,c - 231.47$	0.999 8	0.01-3.13
6,7-Dimethoxycoumarin	10.73	$A = 16\,746\,c - 167.36$	0.999 9	0.02-6.25
Coumarin	11.60	$A = 21\,769\,c - 434.71$	0.999 8	0.02-6.25
Psoralen	13.35	$A = 18\,157\,c - 160.92$	0.999 9	0.02-6.25
Xanthotoxin	13.65	$A = 23\,103\,c - 174.83$	0.999 9	0.02-6.25
5,7- Dimethoxycoumarin	14.29	$A = 35\,862\,c - 134.98$	0.999 9	0.02-6.25
Pimpinellin	15.33	$A = 20\,154\,c + 349.95$	0.999 9	0.02-6.25
Imperatorin	18.84	$A = 18\,336\,c - 194.30$	0.999 9	0.02-6.25
Osthole	20.06	$A = 32\,623\,c - 447.80$	0.999 9	0.02-6.25

Table 2 Contents (mg/kg) of coumarins detected in bamboo leaves of 10 species of *Pleioblastus* Nakai ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Bamboo species	Skimin	Scopoletin	Umbelliferone	6,7-Dimethoxycoumarin	Coumarin	Pimpinellin
<i>P. amarus</i>	—	30.31 ± 3.76 ^{af}	—	—	10.80 ± 0.65 ^{ab}	3.44 ± 1.09 ^a
<i>P. simonii</i>	15.78 ± 1.04 ^a	82.20 ± 3.34 ^b	—	39.68 ± 0.81 ^a	13.15 ± 1.29 ^b	—
<i>P. maculatus</i>	40.66 ± 5.79 ^b	27.84 ± 1.25 ^{acf}	—	11.61 ± 1.06 ^b	9.67 ± 0.47 ^a	—
<i>P. maculatus</i>	7.07 ± 0.65 ^c	50.18 ± 2.42 ^d	—	30.65 ± 1.53 ^c	—	—
<i>P. amarus</i> var. <i>hangzhouensis</i>	2.20 ± 0.04 ^c	19.79 ± 2.03 ^c	3.01 ± 0.19	—	11.06 ± 0.89 ^{ab}	—
<i>P. juxianensis</i>	13.72 ± 0.75 ^a	28.29 ± 0.97 ^{af}	—	26.47 ± 2.63 ^c	—	—
<i>P. solidus</i>	5.85 ± 0.39 ^c	9.33 ± 0.28 ^g	2.34 ± 0.04	—	12.06 ± 0.08 ^{ab}	—
<i>P. amarus</i> var. <i>pendulifolius</i>	3.83 ± 0.37 ^c	22.21 ± 0.99 ^{ac}	—	—	11.07 ± 0.38 ^{ab}	4.46 ± 0.32 ^a
<i>P. yixingensis</i>	—	33.96 ± 5.06 ^f	—	14.88 ± 0.61 ^b	11.57 ± 0.87 ^{ab}	2.45 ± 0.53 ^a
<i>P. altiligulatus</i>	4.51 ± 0.18 ^c	22.96 ± 1.47 ^{ac}	—	—	15.75 ± 1.15 ^c	—

Values in a line followed by same letters are not significantly different ($P = 0.05$) according to Duncan's multiple comparison (DMRT); "—" : Not detected

4 讨论

本研究采用 HPLC 对苦竹、宜兴苦竹、川竹、斑苦竹、杭州苦竹、高舌苦竹、垂枝苦竹、衢县苦竹、丽水苦竹及实心苦竹 10 种苦竹属竹种竹叶中的香豆素类化合物进行了分析研究,共检测出茵芋苷、东茛菪内酯、伞形酮、6,7-二甲氧基香豆素、香豆素和茴芹内酯 6 种香豆素类化合物,含量在 2.20 ~ 82.20 mg/kg 之间,其中川竹叶东茛菪内酯含量最高。

香豆素类化合物是很重要的天然产物,具有多种生物活性和药理活性,在医药行业等多种领域有开发利用价值。竹叶是我国传统的中草药,竹叶中含有香豆素类化合物等多种生物活性物质,本研究结果为苦竹属竹叶药理活性物质研究提供了参考,也为苦竹属资源综合开发利用提供了理论基础。

参考文献

- [1] Wu JZ, Kong LY. *Natural Medicinal Chemistry* (天然药物化学) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2008: 269 - 278.
- [2] Zhang SY, Meng L, Gao WY, et al. Advances on biological activities of coumarins [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, **30**(6): 410 - 414.
- [3] Mitra P, Barman PC, Chang KS. Coumarin extraction from *Cuscuta reflexa* using supercritical fluid carbon dioxide and development of an artificial neural network model to predict the coumarin yield [J]. *Food Bioprocess Technol*, 2011, **4**(5): 737 - 744.
- [4] Li LH, Chen L, Xia YF. Progress in the study of coumarin derivatives as antitumor agents [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(4): 374 - 379.
- [5] Li LH, Zhang HF, Hu S, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for determination of coumarin compounds in *Radix Angelicae dahuricae* [J]. *Chromatographia*, 2012, **75**(3/4): 131 - 137.
- [6] Han Y, Zhang CM, Yu K, et al. Recent advances in analytical methods for coumarins and saftroles in food and cosmetics [J]. *Flavour Frag Cosmet* (香料香精化妆品), 2013(1): 45 - 49.
- [7] Yang KL. Development status and strategies of Chinese bamboo industry [J]. *Nonwood Forest Res* (经济林研究), 2012, **30**(2): 140 - 143.
- [8] Sun J, Yue YD, Tang F, et al. Coumarins from the leaves of *Bambusa pervariabilis* McClure [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, **12**(3): 248 - 251.
- [9] Sostaric T, Boyce MC, Spickett EE. Analysis of the volatile components in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, **48**(12): 5 802 - 5 807.
- [10] Zhu JF, Han HX, Lin CM, et al. Research on extracting process for coumarinin *Cichorium glafulosum* Boiss. et Huet [J]. *Xinjiang Agric Sci* (新疆农业科学), 2013, **50**(4): 625 - 629.
- [11] Zhao B, Yang XB, Yang XW, et al. Simultaneous determination of six major constituents in the roots of *Saposhnikovia divaricata* by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2013, **33**(3): 382 - 387.
- [12] Wang SY, Tang F, Yue YD, et al. Simultaneous determination of 12 coumarins in bamboo leaves by HPLC [J]. *J AOAC Int*, 2013, **96**(5): 942 - 946.