

RP-HPLC 法测定丹参培养物中 两种水溶性酚酸类化合物的含量[△]

上海中医药大学中药生物工程研究室(200032) 黄炼栋* 徐寅泽** 胡之璧

摘 要 用 RP-HPLC 法对丹参培养物中迷迭香酸和紫草酸 B 进行了定量分析。在 Nova pak C₁₈ 色谱柱上,以 MeOH-MeCN-H₂O (37:1:62),甲酸调节 pH 至 2.67 为流动相,2 组分分离完全,工作曲线线性良好。迷迭香酸在 0.661~5.510 μg、紫草酸 B 在 0.601~5.010 μg 范围内均呈线性关系,回收率分别为 100.5%(RSD 2.82%)和 100.2%(RSD 2.53%)。

关键词 HPLC 丹参培养物 迷迭香酸 紫草酸 B

Determination of the Contents of Two Water Soluble Phenolic Acids in Den-shen (*Salvia miltiorrhiza*) Cultures by RP-HPLC

Huang Liandong, Xu Yanze and Hu Zhibi (Laboratory of Chinese Materia Medica & Bioengineering, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Shanghai 200032)

Abstract A RP-HPLC method was established for the simultaneous separation and determination of rosmarinic acid and lithospermic acid B in *Salvia miltiorrhiza* Bunge cultures on a Novapak C₁₈ column, employing MeOH-MeCN-H₂O (37:1:62) adjusted to pH 2.67 with formic acid as the mobile phase. The recoveries were 100.5%, RSD 2.82% for rosmarinic acid and 100.2%, RSD 2.53% for lithospermic acid B.

Key words *Salvia miltiorrhiza* culture rosmarinic acid lithospermic acid B

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 是我国重要的常用中药,其水溶性成分,如迷迭香酸、紫草酸 B 具有清热、解毒、消炎、抗脂质过氧化、抗胃溃疡、抗肝纤维化等作用^[1,2]。由于丹参野生资源日益减少,栽培品种退化严重,因此探讨丹参新资源已成为中药材生物技术的重要研究内容^[3]。作者用 HPLC 法对丹参培养物中迷迭香酸和紫草酸 B 进行定量分析,此法分离完全、测定快速、灵敏度高。

1 仪器与试剂

HPLC 仪:Waters 510 型泵,991 二极管矩阵检测器。Nova pak C₁₈(150 mm×4 mm,

4 μm)色谱柱(大连依利特科学仪器有限公司)。

甲醇为重蒸,乙腈为 HPLC 级,水为无离子水,其余试剂均为分析纯。

对照品迷迭香酸购于美国 ICN Pharmaceuticals 公司,紫草酸 B 由我校肝病研究所刘平教授赠送。

2 方法

2.1 液相色谱条件:流动相:甲醇-乙腈-水(37:1:62),甲酸调节 pH 值至 2.67。检测波长 280 nm,纸速 2.5 mm/min。在本条件下,迷迭香酸和紫草酸 B 获得较好的分离效

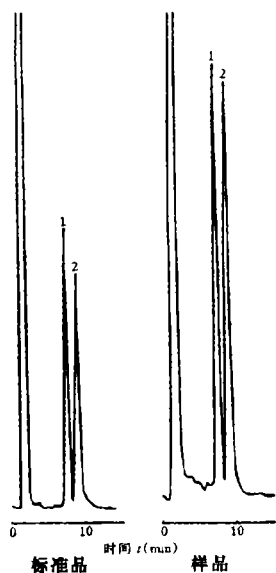
* Address: Huang Liandong, Laboratory of Chinese Materia Medica & Bioengineering, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Shanghai

黄炼栋 35 岁,副研究员。1985 年毕业于上海农学院,获农学学士学位。1991 年硕士研究生毕业于上海中医药大学,获医学硕士学位。参加和承担了多项国家级和市级重点研究课题。“紧缺药材黄连等细胞培养研究”获上海市卫生局科技进步三等奖,“丹参细胞培养生物技术及其活性产物研究”获上海市科技成果进步二等奖和上海市卫生局科技成果一等奖,“洋地黄植物细胞培养与强心苷的生物转化研究”获国家中医药管理局一等奖和国家科技进步二等奖。

** 我校应届实习生

△上海市卫生局和上海市教委资助项目

果(图 1)。



1-迷迭香酸 2-紫草酸 B

图 1 高效液相色谱图

2.2 精密度试验:①取同一丹参细胞培养物(50 mg)提取液样品进行 6 次进样,每次 20 μ L,求得迷迭香酸的变异系数 RSD 为 2.42%,紫草酸 B 为 2.53%。②取同一丹参细胞培养物(50 mg),按样品测定方法 8 次进样测定。求得迷迭香酸的 RSD 为 2.44%,紫草酸 B 为 3.34%。

2.3 标准曲线:在高精密密度(0.001 mg)天平上,分别精密称取 2 种对照品各一定量,置于 5 mL 容量瓶中,60%丙酮溶解至刻度,摇匀,即得对照品液。

用微量进样器分别吸取不同体积的对照品溶液进样。微机给出校正曲线。各标准曲线及相关系数为迷迭香酸: $Y=0.0230X+2.3102\times 10^{-4}$, $r=0.9996$,线性范围 0.6612~5.5100 μ g;紫草酸 B 为 $Y=0.0146X-3.7526\times 10^{-4}$, $r=0.9995$,线性范围 0.6010~5.0100 μ g。

2.4 提取方法:精密称取约 50 mg 冻干丹参培养物于 20 mL 磨口具塞试管中,加入 60%丙酮 10 mL,超声提取 30 min。先用定量滤纸过滤(杭州富阳特种纸厂),再用样品过滤器(孔径 0.45 μ m,天津开发富集色谱技术

发展公司)过滤,滤液作 HPLC 测定。

2.5 加样回收率试验:精密称取一定量冻干培养物,精密加入一定量标准品,按以上方法进行定量分析,将测定结果扣除各组分的平均含量,回收率为迷迭香酸 100.5%, RSD 2.82%;紫草酸 B 为 100.2%, RSD 2.53%。

2.6 样品测定:按上述提取方法和色谱方法进行测定。用所得标准曲线进行定量分析。微机给出样品浓度 M (mg/mL),按下式求得 2 种水溶性酚酸类化合物的含量($C\%$)。

$$C\% = \frac{50 M}{W} \%$$

M -微机给出的样品浓度(mg/mL),

W -培养物的准确称样量(mg)。

3 结果和讨论

3.1 各种培养物中水溶性酚酸类化合物含量测定结果:见表 1。

表 1 丹参培养物中迷迭香酸和紫草酸 B 含量($n=3$)

培养物	迷迭香酸(%干重)	紫草酸 B(%干重)
激素自养型细胞	2.8144 $\pm$ 0.3859	0
培养细胞①	5.8536 $\pm$ 0.7216	6.5449 $\pm$ 0.1412
培养细胞②	1.5190 $\pm$ 0.0934	0.2400 $\pm$ 0.0184
培养芽	1.7145 $\pm$ 0.0429	0
毛状根 15834 *	1.1228 $\pm$ 0.0786	0.9777 $\pm$ 0.0782
毛状根 9402 *	0	0

* 毛状根 15834 和毛状根 9402 分别由菌株 *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 和 ATCC 15834 感染而来。

结果表明,不同丹参培养物中水溶性酚酸类化合物的含量各不相同。在毛状根 9402 中 2 种酚酸类化合物均未检测到,但在丹参细胞培养物①中,迷迭香酸和紫草酸 B 都存在,而且含量较高,均超出了李静等^[4]报道的丹参生药中的含量[迷迭香酸 1.94%,紫草酸 B(丹酚酸 B)3.17%]。

3.2 长期放置对丹参细胞培养物中水溶性酚酸类化合物含量的影响:把冻干丹参细胞培养物分别进行立即测定和在干燥器中放置 5 个月后再测定 2 种酚酸类化合物的含量,结果表明丹参细胞培养物中迷迭香酸和紫草酸 B 含量下降,见表 2。

由于长期放置会影响酚酸类化合物的含

量,所以对丹参培养物应及时测定。

表 2 长期放置对丹参细胞物中迷迭香
酸和紫草酸 B 含量的影响 (n=3)

放置时间 (月)	迷迭香酸 (%干重)	紫草酸 B (%干重)	迷迭香酸 损失率(%)	紫草酸 B 损失率(%)
0	5.8536±0.7216	6.5449±0.1412		
5	3.1474±0.4530	5.2153±0.7460	46.23	20.31

参 考 文 献

1 张白嘉,等. 中草药,1996,27(10):634
2 刘 平,等. 中国医药学报,1993,8(增):55
3 胡之璧,等. 上海中医药大学上海中医药研究院学报,
1997,10(2)~11(1):94
4 李 静,等. 药学报,1993,28(7):543

(1999-04-06 收稿)

毛白杨叶中酚苷类成分含量测定方法的研究

中国医学科学院
药物研究所(北京 100050) 丁永胜* 何丽一
中国协和医科大学

摘 要 采用高效薄层预制板,用二次展开的方法分离测定了毛白杨叶中的特里杨苷等三种酚苷类化合物。以二氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(2:1.5:0.5:0.05)为展开剂,α萘酚-硫酸试液为显色剂,用 CS-930 薄层扫描仪,λ=520 nm 波长处线性扫描。方法简便、快速、准确。
关键词 HPTLC 毛白杨 酚苷类 含量测定

Separation and Determination of Phenolic Glycosides in Chinese White Poplar Leaves
(*Populus tomentosa*) by HPTLC

Ding Yongsheng and He Liyi (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract A double development thin layer chromatographic method was established to separate and determine the amount of tremulacin, treulodin and salicin in the leaves of *Populus tomentosa* Carr. by HPTLC plate. The plates were developed twice in a solvent system of dichloromethane-ethyl acetate-methanol-water (2:1.5:0.5:0.05) and color development with α-naphthol-sulfonic acid-ethanol solution. The detection wavelength was 520 nm. The results showed that this method was simple, rapid and accurate.

Key words *Populus tomentosa* phenolic glycoside HPTLC

毛白杨 *Populus tomentosa* Carr., 又称杨栒花,系杨柳科杨属植物,在我国主要分布于华北等地区。《本草纲目》中记载:毛白杨苦寒无毒,主治扑损瘀血,有续筋骨,止痛止痢等作用。民间用其叶煮水洗、敷,控制陈旧性软组织感染及化脓性骨髓炎疗效较好。毛白杨叶中主要含有酚苷类化学成分^[1~3]。为了充分利用这一丰富的自然资源,我们对植物

中的有效成分进行了含量测定方法的研究。

1 仪器与试药

薄层扫描仪岛津 CS-930,定量毛细管 (Drummond Sci. Co. USA), 高效硅胶薄层预制板(烟台化工研究所),双槽薄层展开槽 (CAMAG 12 cm×5 cm×12 cm),浸板槽 (自制 11 cm×1 cm×11 cm),超声波清洗器 (无锡超声电子设备厂),离心机 80-1 型(上

* Address: Ding Yongsheng, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing
丁永胜 男,29岁,1991年毕业于内蒙古医学院药学系,获学士学位;1999年毕业于中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所,获硕士学位;1991~1996年在内蒙古医药总公司乌海分公司从事药品质量检验及管理工作,现为主管药师,具有执业药师资格证书;现主要从事中草药中有效成分分析和药品的质量控制与检验工作。