

· 药剂与工艺 ·

酸性染料比色法测定骆驼蓬种子总生物碱的含量

沈阳药科大学天然药物化学教研室(110015) 赵 烽* 张萌佳** 姚新生

摘 要 以溴酚蓝作为测试用酸性染料,在总生物碱与其形成稳定络合物时间范围内,利用比色法制定了骆驼蓬种子中总生物碱的含量。认为此方法快速简便、准确易行。

关键词 骆驼蓬 总生物碱 酸性染料比色法

Determination of Total Alkaloid in the Seed of *Peganum harmala* by Bromophenol Blue Colorimetry

Department of Natural Products Chemistry, Shenyang Pharmaceutical University (Shenyang 110015) Zhao Feng, Zhang Mengjia and Yao Xinsheng

Abstract The content of total alkaloid in the seed of *Peganum harmala* L. was determined by bromophenol blue colorimetry. It could be considered that this is a specific, quick and simple method for the determination of total alkaloid in the seed of *P. harmala*.

Key words *Peganum harmala* L. total alkaloid bromophenol blue colorimetry

骆驼蓬 *Peganum harmala* L. 系蒺藜科骆驼蓬属多年生草本植物,药用全草和种子,分布于地中海沿岸及我国西北部新疆、内蒙古和甘肃等省区,多生于沙漠、草滩、山坡等处,藏量丰富,其味辛苦、凉,有毒,用于宣肺止咳,祛湿解毒,新疆民间用于治疗消化道肿瘤,其种子已被收载于新疆地方标准。骆驼蓬种子主要含有 harmine 和 harmaline 等生物碱类成分^[1],此外还有甾体、黄酮、萜醌、多糖等其他化学成分。自郑特首次报道了骆驼蓬中的生物碱对消化道恶性肿瘤有疗效以来,最近 10 多年国内相继报道采用骆驼蓬种子治疗消化道肿瘤,疗效明显^[2,3]。

结合民间临床用药经验,前期实验工作者经过多年的体内、外抗肿瘤活性考察以及抗癌活性成分研究证明:骆驼蓬种子总生物碱为抗肿瘤的有效部位。鉴于以上原因,我们对骆驼蓬种子总生物碱的含量测定方法进行了进一步详细的研究,建立了利用酸性染料比色法测定总生物碱含量的方法。

1 仪器与试剂

25 型酸度计、721 分光光度计;分析纯氯仿、甲醇(沈阳化学试剂厂)

2 实验部分

2.1 骆驼蓬种子总生物碱的提取: 骆驼蓬种子购自

新疆,粉碎后采用溶剂法提取得到总生物碱,干燥、精密称定后以甲醇溶解备用。

2.2 酸性染料种类及测定波长的选择: 按药典方法配制溴甲酚绿(变色范围 pH3.6~5.2 黄→蓝)、溴酚蓝(变色范围 pH2.8~4.6 黄→蓝绿)、溴麝香草粉蓝(变色范围 pH6.0~7.6 黄→蓝)3 种酸性染料溶液,以及 pH4.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液。配制 harmine、harmaline 对照品溶液(0.468, 0.500 mg/mL)及样品溶液(0.490 mg/mL)。

在分液漏斗中加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 5.0 mL,然后分别加入 3 种酸性染料溶液各 1.0 mL,摇匀,加入 10 mL 氯仿萃取,氯仿萃取液作为 3 种酸性染料的空白溶液,分别进行紫外扫描,随行氯仿作空白,紫外扫描图谱如图 1 所示。因溴麝香草酚蓝空白溶液在 300~500 nm 范围内的吸光值较大,所以放弃不用。溴酚蓝和溴甲酚绿空白溶液的吸光值较小。

在分液漏斗中分别加入 harmine 和 harmaline 两种对照品溶液各 30 μL,挥干甲醇,然后加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 5.0 mL,再分别加入溴酚蓝、溴甲酚绿两种酸性染料溶液各 1.0 mL,摇匀,加入 10 mL 氯仿萃取,氯仿萃取液分别进行紫外扫

* Address: Zhao Feng, Department of Natural Products Chemistry, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang

赵 烽 女,现为沈阳药科大学博士生,1995 年 7 月毕业于沈阳药科大学药系,攻读该校硕士学位,1997 年 9 月提前攻读该校博士学位,一直在姚新生院士的指导下从事天然产物活性成分的研究。1998 年 1 月至 1999 年 3 月期间留学日本东京医科齿科大学进行合作项目研究。

** 本校 60 期中药系学生

描。随行氯仿作空白,紫外扫描图谱如图 2所示。因 harmine和 harmaline与这两种酸性染料形成络合物的吸光系数有所差异,因此选择两种络合物的等

吸光波长作为测定波长,即选择在 432 nm处测定与溴甲酚绿络合物的吸光值,在 406 nm处测定与溴酚蓝络合物的吸光值

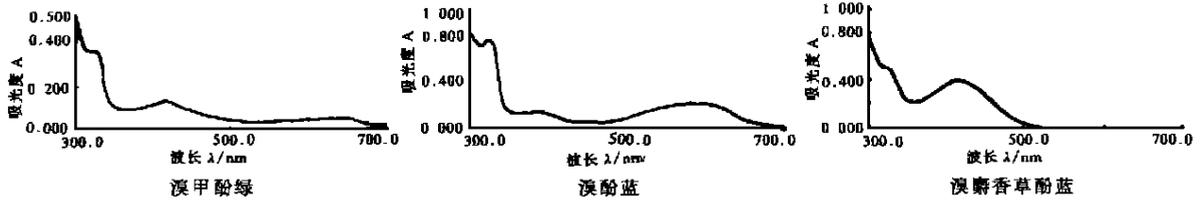


图 1 3种酸性染料的空白液紫外图

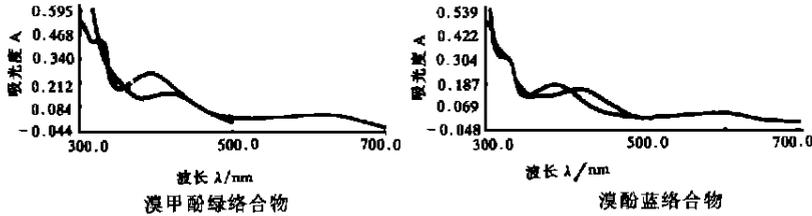


图 2 对照品与溴甲酚绿、溴酚蓝络合物紫外图

2.3 络合物稳定性考查:分别吸取 harmine对照品溶液、harmaline对照品溶液以及样品溶液各 40 μL,加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 10.0 mL,再分别加入溴酚蓝、溴甲酚绿两种酸性染料溶液各 2.0 mL,摇匀,加入 20 mL氯仿萃取,分别在不同时间测定吸光值。重复 3次,取平均值。两种标准品溶液以及样品溶液与溴酚蓝络合物的稳定性考查结果如表 1所示(测定波长为 406 nm)。

以及样品溶液与溴甲酚绿络合物的稳定性考查结果如表 2所示(测定波长为 432 nm)。由吸光值可以看出,两种对照品溶液以及样品溶液与溴甲酚绿形成的络合物基本上不太稳定,而与溴酚蓝形成的络合物在 90 min~120 min范围内比较稳定,故选择溴酚蓝作为测试用酸性染料,测定时间为 90 min,30 min内完成。

表 1 两种对照品与溴酚蓝络合物稳定性考查结果

min	0	20	40	60	90	120	150	180	210
harmine	0.080	0.090	0.102	0.118	0.097	0.100	0.129	0.119	0.075
harmaline	0.155	0.170	0.196	0.188	0.178	0.176	0.220	0.190	0.187
样品	0.111	0.116	0.101	0.096	0.124	0.120	0.156	0.140	0.109

表 2 两种对照品与溴甲酚绿络合物稳定性考查结果

min	0	20	40	60	90	120	150	180	210
harmine	0.111	0.115	0.136	0.135	0.145	0.128	0.150	0.132	0.178
harmaline	0.155	0.173	0.150	0.158	0.166	0.195	0.195	0.189	0.215
样品	0.133	0.112	0.130	0.115	0.109	0.116	0.131	0.115	0.146

法,按以下实验方案,考查了水相 pH值、缓冲溶液用量、酸性染料用量、氯仿用量对实验结果的影响。均匀设计实验如表 3所示(测定波长为 406 nm)。将

数据输入计算机均匀设计多元处理系统,进行逐步线性回归,得到多元线性方程: $Y = 1.4826 - 0.2435X_1 - 0.0313X_2$ 。对此方程进行 F检验,结果表明此线性方程具有显著性差异,方程结果表明:影响吸光值的主要因素是缓冲溶液的 pH以及缓冲溶液的用量。最佳条件:缓冲溶液 pH值为 3.44;缓冲溶液用量为 2.2 mL;溴酚蓝酸性染料用量为 0.4 mL;氯仿用量为 7.0 mL。

表 3 均匀设计实验表

实验号	pH值	缓冲溶液用量 (mL)		溴酚蓝用量 (mL)		氯仿用量 (mL)		测得吸光值	
1	1	3.4	2	3.0	3	0.8	6	12.0	0.404
2	2	3.6	4	5.0	6	1.4	5	11.0	0.520
3	3	3.8	6	7.0	2	0.6	4	10.0	0.425
4	4	4.0	1	2.0	5	1.2	3	9.0	0.239
5	5	4.2	3	4.0	1	0.4	2	8.0	0.301
6	6	4.4	5	6.0	4	1.0	1	7.0	0.280
7	7	4.6	7	8.0	7	1.6	7	13.0	0.297

2.5 线性关系考查:精密称取 harmine对照品 4.89 mg,置于 10 mL容量瓶中,加入甲醇至刻度,摇匀,分别精密吸取此对照品溶液 40, 60, 80, 100和

120 μ L置于分液漏斗中,挥干甲醇,然后按照 2.4 中最佳实验条件操作,即分别加入 pH值为 3.44的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 2.2 mL,再加入 0.4 mL溴酚蓝酸性染料溶液,摇匀,加入 7.0 mL氯仿溶液萃取,在 90 min时终止反应,将氯仿层放出,在 406 nm处测定吸光值,以对照品用量为横坐标,以吸光值为纵坐标,进行线性回归,得到以下线性方程: $Y=0.1184-8.98 \times 10^{-3}X$, $r=0.9994$ 此结果表明当标准品用量在 19.56~58.68 μ g 范围内,吸光值与对照品用量呈现良好的线性关系。

2.6 样品含量测定:精密称取待测样品 3份,每份 5 mg,置于 10 mL容量瓶中,加入甲醇定容,作为样品溶液,分别吸取 50 μ L置于分液漏斗中,挥干甲醇,然后分别按照 2.4中最佳实验条件操作,在 406 nm处测定吸光值,并依据 2.5中线性方程计算生物碱的含量。结果见表 4,骆驼蓬种子所含总生物碱约 5%。

表 4 样品含量测定结果

样品浓度 (mg/mL)	加入样品量 (μ g)	平均吸 光值	含量 (%)	折合生药含量 (%)
0.534	26.70	0.304	77.4	5.1
0.520	26.00	0.280	69.2	4.5
0.485	24.25	0.278	73.5	4.8

2.7 加样回收率实验:精密称取 harmine对照品 4.89 mg,置于 10 mL容量瓶中,加入甲醇至刻度,摇匀,作为对照品溶液。精密吸取样品溶液 (0.534 mg/mL) 3份,每份 50 μ L,置于分液漏斗中,分别加入对照品溶液 30, 40, 50 μ L,挥干甲醇,然后按照 2.4中最佳实验条件操作,在 406 nm处测定吸光值,并计算加样回收率,结果为 91.9% ($n=3$)

3 讨论

关于骆驼蓬种子总生物碱的含量测定,有双波长薄层扫描法、紫外分光光度法以及非水滴定法等多种方法,但是均不十分理想。非水滴定法测定总碱含量所需标准品量过多,且样品溶解于醋酸后颜色太深,致使结晶紫终点变化不明显;双波长薄层扫描法由于不同薄层板间差异较大,所以重现性欠佳。我们对酸性染料比色法进行了比较详细的研究,确定了最佳测试条件,建立了利用酸性染料比色法测定骆驼蓬种子总生物碱含量的方法。

参考文献

- 1 江苏新医学院编. 中药大辞典. 下册. 上海: 上海人民出版社, 1977: 1757
- 2 李春杰, 刘德玺, 马特, 等. 新疆医学院学报, 1987, 10(1): 27
- 3 杨小平, 潘启超, 李春杰, 等. 癌症, 1991, 10(6): 463

(1999-12-30收稿)

大叶钩藤中表儿茶素含量的测定 Δ

上海中医药大学中药研究所 (200032) 杨君* 宋纯清 陈明 王海燕 胡之璧

摘要 目的: 充分利用中药钩藤的植物资源, 测定并比较大叶钩藤 *Uncaria macrophylla* Wall. 的叶和钩茎中的表儿茶素含量。方法: 利用 RP-HPLC测定。结果: 钩藤钩茎中含表儿茶素 0.38%, 叶中含 0.82%。结论: 大叶钩藤中含有较多的表儿茶素, 叶中含量大于钩茎中含量。

关键词 大叶钩藤 表儿茶素 RP-HPLC

Determination of Epicatechin Content in *Uncaria macrophylla* by HPLC

Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM (Shanghai 200032) Yang Jun, Song Chunqing, Chen Ming, Wang Haiyan and Hu Zhibi

Abstract Epicatechin content in *Uncaria macrophylla* Wall. was determined by RP-HPLC. As a result, the epicatechin contents were 0.38% in the hook and stem, and 0.82% in the leaf. Thus it seemed to be more worthwhile to produce epicatechin from the leaf rather than from the hook and stem.

Key words *Uncaria macrophylla* Wall. epicatechin RP-HPLC

Address: Yang Jun, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Shanghai

杨君 1988年毕业于吉林大学物理化学专业, 获硕士学位; 1988~1998年在沈阳药科大学任教, 副教授; 1998年在沈阳药科大学天然药物化学专业获博士学位; 现在上海中医药大学做博士后, 先后从事天然药物化学、微生物学及物理化学方面的研究工作, 参加多项国家和辽宁省课题研究, 已发表 10多篇论文。

Δ “九五”国家重点科技攻关资助项目 (No. 969030203)