

正交试验表进行试验,分别提取(提取时间为每次 1 h),提取液按含量测定方法制备样品,测定麦冬皂苷 D 的含量,结果见表 3, 4, 5

表 3 因素水平表

水平	因素		
	A加溶剂量(倍)	B药材粒度	C提取次数(次)
1	10	10~ 24目	1
2	8	5~ 10目	2
3	6	压扁整粒	3

表 4 麦冬皂苷提取正交试验表

试验号	A	B	C	D(误差)	麦冬皂苷 D ($\mu\text{g}/20\mu\text{L}$)
I	1	1	1	1	3. 803 4
2	1	2	2	2	4. 498 8
3	1	3	3	3	4. 093 9
4	2	1	2	3	3. 919 6
5	2	2	3	1	5. 169 6
6	2	3	1	2	3. 194 1
7	3	1	3	2	4. 535 8
8	3	2	1	3	3. 738 6
9	3	3	2	1	3. 101 8
I	12. 396 1	12. 258 8	10. 736 1	12. 074 8	$C T= 144. 445 1$
II	12. 283 3	13. 407 0	11. 520 2	12. 228 7	
III	11. 376 2	10. 389 8	13. 799 3	11. 752 1	
R	0. 340 0	1. 005 7	1. 021 1	0. 158 9	

表 5 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F值	显著性
A	0. 208 5	2	0. 104 3	5. 283 7	
B	1. 546 1	2	0. 773 1	39. 164 1	$P < 0. 05$
C	1. 688 1	2	0. 844 1	42. 760 9	$P < 0. 05$
D(误差)	0. 039 5	2	0. 019 7		

$F_{0.05}(2, 2) = 19$ $F_{0.01}(2, 2) = 99$

从正交试验优选结果可见:影响麦冬皂苷提取的因素为提取次数>药材粒度>所用溶媒量,其中提取次数、药材粒度对麦冬皂苷的提取有显著影响,最佳提

取条件为 $A_3B_2C_3$,即用 5~ 10目药材,加 10倍量溶媒,提取 3次,每次 1 h,基本能提尽麦冬皂苷 D

4 讨论

目前麦冬皂苷单体的含量测定方法有 HPLC-UV 法、薄层扫描法、等吸收双波长消去法等,也有水解后测定皂苷元含量的方法,但水解法操作繁琐,且无法避免因水解不完全而引入的误差。由于麦冬皂苷在紫外区的吸收弱,仅在 208 nm 处有末端吸收,用 HPLC-UV 法检测,也有一定难度。

ELSD 是一种通用型检测器,流动相雾化后在加热管中蒸发,而流动相中的被检测物形成细小的颗粒,颗粒通过一狭窄检测光束时形成散射光,由光电倍增管收集放大,转换成电信号。ELSD 对不挥发性的被检测物均产生响应,因而适用范围较广^[1,2]。本实验采用 HPLC-ELSD 法测定麦冬皂苷 D 取得了较好效果。该法对麦冬药材及制剂的含量测定有一定应用价值。

实验中 5~ 10目药材提取量比 10~ 24目药材多,原因可能是:药材粒度小,表面积大,药渣吸附量增加,此外,提取时细小的麦冬药材颗粒中有粘性物渗出,相互间易粘结,对充分提取可能有影响。验证试验证实,按以上条件提取,药材中的麦冬皂苷可被基本提取完全。

致谢:麦冬皂苷 D 对照品为日本昭和大学药学院生药及天然药化研究室伊田喜光教授提供。

参考文献:

- [1] 魏 泱,丁明玉. 蒸发光散射检测技术 [J]. 色谱, 2000, 18 (5): 398-400.
- [2] 冯埃生,邹汉法,汪海林. 影响高效液相色谱挥发激光散射检测器检测性能基本因素的考察 [J]. 药物分析杂志, 1996, 16 (6): 414-417.

HPLC法测定蛇足石杉中石杉碱甲含量

孙远明,余红英*,杨跃生**,杨金易,张 明*
(华南农业大学食品科学学院,广东 广州 510642)

摘要:目的 考察蛇足石杉不同产地、不同部位中石杉碱甲(Hup A)和总碱含量;比较不同提取方法对石杉碱甲含量的影响。方法 采用 RP-HPLC法测定 Hup A 的含量。结果 Hup A 在根、茎、叶中的含量为茎、叶>根;贵州、广东和安徽产地的 Hup A 含量分别为 0. 018%、0. 021%、0. 020%,提取方法之间差异不显著。结论 Hup A 含量在蛇足石杉中的分布为地上部分大于地下部分。不同产地 Hup A 含量有一定差异。

关键词:蛇足石杉;石杉碱甲;石杉总碱;高效液相色谱

中图分类号:R286. 02 文献标识码:B 文章编号:0253- 2670(2002)12- 1078- 03

* 收稿日期:2002-04-17

* 现在广东工业大学轻工化工学院 ** 本校生命科学学院

Determination of hupzine A in *Huperzia serrata* by HPLC

SUN Yuan-ming, YU Hong-ying, YANG Yue-sheng, YANG Jin-yi, ZHANG Ming

(College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract Object To compare the hupzine A (Hup A) in *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. obtained by different extracting methods and investigate the amount of alkaloids and the content of Hup A from different parts of the plants and from different places. **Methods** Using HPLC for the determination of Hup A. **Results** The content of Hup A in the stem and leaf is richer than that in the root. The content of Hup A from Guizhou, Guangdong and Anhui Provinces is 0.018%, 0.021% and 0.020% respectively; The difference of extract method of Hup A is no prominence. **Conclusion** The content of Hup A in the ground is richer than that of underground, and there are some difference in the content of Hup A obtained from different places.

Key words *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.; hupzine A (Hup A); total alkaloids; HPLC

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 为蕨类植物, 又名千层塔、蛇足草。《中药大辞典》记载其具有消痰、止血、清热解毒的功能。近年发现其酚性部位生物碱石杉碱甲 (Hup A) 具有很强的抗胆碱酯酶作用, 其乙酰胆碱酯酶的抑制活性为毒扁豆碱的 3 倍, 临床证实石杉碱甲片对治疗重症肌无力^[1] 和早老性痴呆病 (Arzheimer) 有显著疗效^[2], 已通过卫生部审批上市。蛇足石杉生长缓慢, 繁殖困难, 为了科学地利用蛇足石杉资源, 本实验对蛇足石杉总碱的提取工艺进行比较, 并采用 HPLC 法测定了蛇足石杉全草及其根、茎、叶中的 Hup A 含量。

1 仪器与试剂

TSP4000 系列高效液相色谱仪 (Thermoquest Co.), UV 6000 紫外检测器

甲醇、乙腈为色谱级, 水为双蒸水, 其余试剂均为分析纯。Hup A 对照品由浙江温岭制药厂提供, 贵州产蛇足石杉样品由浙江温岭制药厂提供, 广东产样品由作者于 2000 年 5 月采自广东南昆山自然保护区, 华南农业大学李秉滔教授鉴定为蛇足石杉。安徽样品由中国科技大学鲁润龙教授提供。将鲜样分成根、茎、叶部分于 50℃ 烘干粉碎后过 40 目筛备用。

2 方法及结果

2.1 色谱条件: C₁₈ 柱 (5μm, 250 mm × 4.6 mm), 流速: 1 mL/min, 进样量 10 μL, 流动相: 乙腈 - KH₂PO₄ 溶液 (12: 88), 检测波长 310 nm

2.2 线性关系考察: 精取 Hup A 对照品 10 mg, 以无水乙醇配制成 1 mg/mL 的贮备液, 再稀释成 5, 10, 15, 20, 25 μg/mL 溶液, 以进样量为横坐标, 峰高为纵坐标, 进行线性回归, 得标准曲线: $Y = 98.135.5X + 28.111.78, r = 0.9954$ 。Hup A 在 5~25 μg/mL 呈良好线性关系。

2.3 精密度考察: 精密称取 Hup A 供试溶液, 重复

进样 5 次, 峰面积的 RSD 为 0.32%。

2.4 稳定性考察: 广东样品供试品溶液放置 2, 4, 8, 16, 24 h 进样测定, 结果峰面积的 RSD = 0.8%。

2.5 回收率考察: 精密称取已知 Hup A 含量的蛇足石杉样品, 加一定浓度的对照品溶液, 按样品含量的测定方法提取, 测定, 计算回收率, 结果为 99.52%, RSD 为 1.21% (n = 5)。

2.6 样品测定

2.6.1 提取方法优选: 参照文献^[3,4]。

Soxhlet 抽提法: 精密称取样品干粉 2 g 置于纸筒, 分别用甲醇、95% 乙醇和氯仿浸泡过夜, 回流提取至 Dragendorff 反应呈阴性, 50℃ 真空浓缩, 再用 0.5 mol/L HCl 溶解, 过滤, 氯仿萃取, 取酸水层调 pH = 9~10, 氯仿萃取 (5 次), 无水 Na₂SO₄ 干燥, 回收溶剂, 得蛇足石杉总碱。

稀盐酸水浸提法: 0.5 mol/L HCl 摇床振荡浸提 48 h, 滤渣重复 2 次以上, 酸水液用氯仿萃取弃去, 同 Soxhlet 抽提法酸水层至结束。

4 种提取物用无水乙醇溶解, 定量转至 10 mL 容量瓶中定容, 以微孔滤膜过滤, 取滤液进样 10 μL, 按 HPLC 测定条件进行, 以外标法计算 Hup A 结果见表 1。

表 1 不同提取方法和溶媒的比较 (n = 3)

提取方法	溶媒	总碱 (%)	Hup A (%)
索氏抽提	甲醇	0.560	0.0166
	乙醇	0.425	0.0141
	氯仿	0.575	0.0196
酸水浸提	0.5 mol/L HCl	0.476	0.0132

注: 样品为广东样品。

2.6.2 样品测定: 取蛇足石杉样品细粉 2 g, 精密称定质量, 用 Soxhlet 抽提法提取, 氯仿做溶剂, 提取物用无水乙醇溶解, 定量转至 10 mL 容量瓶中定容, 用无水乙醇稀释至刻度。取 10 μL 进样, 测定结

果见表 2,3和图 1

表 2 不同产地蛇足石杉总碱及 Hup A的含量 (n= 3)

产地	总碱 (%)	Hup A (%)
贵州	0.418	0.018
广东	0.587	0.021
安徽	0.576	0.020

注:提取溶剂为氯仿

表 3 Hup A在蛇足石杉中的分布

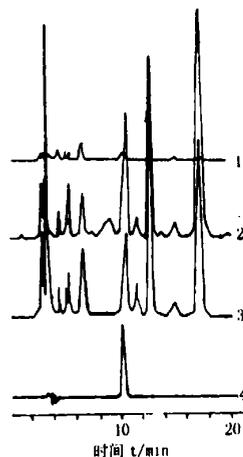
产地	部位	Hup A (%)
广东	根	0.0020
	南昆山	茎
安徽	叶	0.0129
	根	0.0035
	茎	0.0132
	叶	0.0063

3 结论与讨论

3.1 HPLC法测定石杉碱甲,方法简单,线性范围广,灵敏度高,是目前测定 Hup A药源的快速灵敏的一种有效方法。测定中比较了 3种流动相: 甲醇-水 (50: 50,含 0.01% 三乙胺)、甲醇-乙腈-水 (40: 10: 50,含 0.01% 三乙胺)、乙腈-KH₂PO₄ 溶液 (12: 88),结果乙腈-KH₂PO₄ 溶液 (12: 88)为流动相分离效果最好。其中三乙胺的浓度对出峰影响较大,浓度增大,不出峰。这与周芝芳等^[5]对 Hup A胶囊的测定结果一致。

3.2 蛇足石杉总碱的几种提取方法结果表明,各提取方法之间并无显著差异。

3.3 Hup A测定结果表明,广东南昆山样品,贵州



1根 2茎 3叶
4-Hup A对照品

图 1 蛇足石杉不同部位中 Hup A的 HPLC图

样品和安徽样品的石杉碱甲含量之间稍有差异。

3.4 Hup A在两个产地的蛇足石杉植株中的含量分布为地上部分大于地下部分。但 Hup A在茎和叶中的分布差别较大,对此只有通过不同产地蛇足石杉植株不同部位 Hup A含量的进一步调查才能解决。同时也说明 Hup A可能在蛇足石杉的叶中合成,而后通过茎向地下部根中运输。

3.5 蛇足石杉广布于全国各地,目前药源产地主要为云南、四川、贵州,作者将进一步开展对不同产地药源含量的测定工作。

参考文献:

- [1] 程源深,吕传真,应智林,等. 石杉碱甲治疗重症肌无力症 128例 [J]. 新药与临床, 1986, 5(4): 197-199.
- [2] 徐嗣荪,高之旭,翁正,等. 石杉碱甲片对阿耳茨海默病记忆、认知和行为的疗效 [J]. 中国药理学报, 1995, 16(5): 391-395.
- [3] 程丹华,戴克敏. 千层塔的生药学鉴定 [J]. 基层中药杂志, 1992, 6(4): 7-9.
- [4] 肖崇厚. 中药化学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [5] 周芝芳,林志红. 高效液相色谱法测定石杉碱甲胶囊的含量 [J]. 药物分析杂志, 1998, 18(2): 104-106.

苦豆子种子生物碱离子交换分离的因素研究

王洪新,王健*

(江南大学食品学院 天然资源研究室,江苏 无锡 214036)

苦豆子 *Sophora alopecuroides* L.又名苦甘草、嘎顺一包日其格(蒙药名),是豆科槐属植物,在我国主要分布于西北沙漠地带,其种子、根茎及全草都是我国西北地区常用的中药材,有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀虫等作用^[1]。研究发现苦豆子富含生物碱,特别是苦豆子种子中的生物碱含量高达 8.11%。苦豆子种子中生物碱以氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱、槐定碱、槐果碱等喹诺里西定 (quino-

lizidine)型生物碱为主^[2]。由于该类生物碱的极性较大,因此在水中的溶解性较好^[3]。因此可以利用离子交换树脂法,经过酸水提取、离子交换与碱化洗脱三步处理得到纯度较高的总生物碱,成本低、操作简便,适于工业生产。本研究利用静态法和动态法进行了离子交换树脂的筛选,并利用加助溶剂的方法改善了苦豆子生物碱的分离效果。并利用液质联用 (HPLC-MS)仪分析了离子交换洗脱液的成分。

* 收稿日期: 2002-07-19

作者简介: 王洪新 (1964-),男,1991年于无锡轻工业大学获食品工程博士学位,研究方向为天然资源,主持省部级项目 4项,发表科技论文 20余篇。 Tel (0510) 5887517