

HPLC法测定 6种石杉科植物中石杉碱甲的含量

王 峻, 吴 伟, 潘胜利*
(复旦大学药学院, 上海 200032)

摘要:目的 测定 6种石杉科植物中石杉碱甲的含量。方法 用 2% 酒石酸溶液提取总碱, HPLC法测定, 外标法定量。结果 石杉碱甲在所测定的 5种石杉科植物蛇足石杉、皱边石杉、四川石杉、金丝条马尾杉、柳杉叶马尾杉中均有较高分布, 分别达到 0.048%, 0.0579%, 0.0706%, 0.0345%, 0.196%, 在闽浙马尾杉中含量较少, 仅为 0.006%。结论 方法简便、准确, 可用于石杉碱甲资源的寻找。

关键词: 石杉属; 马尾杉属; 石杉碱甲; 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(2003)07-0607-02

Determination of huperzine A in six plants of Huperziaceae

WANG Jun, WU Wei, PAN Sheng-li

(College of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Key words *Huperzia* Bernh.; *Phlegmariurus* Holub; huperzine A; HPLC

石杉碱甲(huperzine A)系从石杉科石杉属植物蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 中分离得到的生物碱, 是一种强效的可逆性胆碱酯酶抑制剂, 主要用于治疗重症肌无力^[1], 能改善老年性记忆功能减退, 可显著提高阿耳茨海默症患者的记忆、认知和行为功能, 无明显不良反应, 是治疗阿耳茨海默症的一个有前景的药物^[2]。石杉碱甲在多种石杉科植物中有分布, 蛇足石杉中含量较高, 目前石杉碱甲制剂所需原料均是从蛇足石杉中提取而得。随着蛇足石杉植物资源日益匮乏, 在国际市场上石杉碱甲的价格在攀升, 寻找新的石杉碱甲植物资源, 加以开发和利用, 具有重要意义。本实验采用 HPLC 法直接测定了包括蛇足石杉在内的 6种石杉科植物中石杉碱甲的含量, 发现石杉碱甲在这几种植物中均有较高的分布。

1 仪器与材料

LC-10ATvp 高效液相色谱仪 (Shimadzu), SPD-10Avp 紫外检测器 (Shimadzu), HS2000(通用版)色谱工作站 (杭州英谱科技发展有限公司), Milli-Q 超纯水发生器 (Millipore), MP-220 型 pH 计 (Mettler Toledo)。

石杉碱甲 (复旦大学附属红旗制药厂提供, 纯度为 99.8%); 酒石酸、醋酸铵、冰醋酸及其他试剂均为分析纯 (上海化学试剂公司); 甲醇 (HPLC 级, Merk); 水为超纯水。

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev. 于 2001 年 11 月采自福建省福州市北峰森林公园。皱边石杉 *H. crispata* (Ching ex H. S. Kung) Ching 于 2001 年 11 月采自福建省长汀县。四川石杉 *H. sutchueniana* (Herter) Ching 于 2001 年 11 月采自福建省连城县。金丝条马尾杉 *Phlegmariurus far-gesii* (Herter) Ching 于 2001 年 9 月采自广西壮族自治区大瑶山瑶族自治县。闽浙马尾杉 *P. mindhegensis* Ching 于 2001 年 11 月采自福建省长汀县。柳杉叶马尾杉 *P. cryptomerianus* (Maxim.) Ching comb. nov. 于 2001 年 11 月采自福建省连城县。以上材料均经本院潘胜利教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 不锈钢柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m) (Dikma); 流动相: 甲醇-0.08 mol/L 醋酸铵溶液 (32:68, 用冰醋酸调 pH 至 6.0); 流速: 1 mL/min; 检测波长: 308 nm; 柱温: 室温 (22 $^{\circ}$ C); 进样量: 20 μ L。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取 12.48 mg 石杉碱甲对照品, 置 25 mL 量瓶中加入流动相使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液 (含石杉碱甲 0.499 mg/mL)。

2.3 样品溶液的制备: 按生物碱提取的常规方法进行。分别取 6 种药材粉碎, 过 20 目筛, 精密称取一定量, 加入 2% 酒石酸 25 mL, 超声提取 2 h, 定性滤纸

* 收稿日期: 2002-09-11

作者简介: 王 峻, 男, 1995 年毕业于第二军医大学, 现为复旦大学药学院生药学专业博士研究生。

过滤,续滤液用 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取滤液 0.5 mL ,用 0.5 mL 2% 酒石酸溶液稀释, $4\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,取上清液即得。

2.4 线性关系考察: 精密吸取石杉碱甲贮备液 (0.499 mg/mL) $0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0\text{ mL}$ 置 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,分别进样 $20\mu\text{L}$ 。以峰面积与对应浓度绘制标准曲线,得回归方程: $A = 9\,217.82 + 38\,848.59C$, $r = 0.9997$ 。结果表明:石杉碱甲浓度在 $5\sim 50\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好线性关系。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验: 取 $0.499\mu\text{g/mL}$ 的石杉碱甲对照品溶液,重复进样 5 次,测得石杉碱甲峰面积的 RSD 为 0.92% 。

2.5.2 稳定性试验: 取同一份样品溶液 $20\mu\text{L}$,分别于制备后 $1, 2, 4, 6, 8, 10\text{ h}$ 依法测定。样品在 10 h 内稳定,四川石杉、蛇足石杉、闽浙马尾杉、柳杉叶马尾杉、皱边石杉、金丝条马尾杉样品溶液中石杉碱甲峰面积的 RSD 分别为 $0.78\%, 0.94\%, 0.75\%, 0.86\%, 0.82\%, 0.79\%$ ($n = 6$)。

2.5.3 重现性试验: 取闽浙马尾杉粉末按 2.3 项下方法提取、测定,重复 5 次,结果石杉碱甲峰面积的 RSD 为 1.28% 。

2.5.4 回收率试验: 石杉碱甲对照品溶液用 2% 酒石酸稀释至一定浓度,取 0.5 mL 加入 0.5 mL 的样品提取液中,按 2.3 项下方法过滤,离心,取上清液 $20\mu\text{L}$ 进样,测定石杉碱甲的含量,计算加样回收率。结果石杉碱甲在四川石杉、蛇足石杉、闽浙马尾杉、柳杉叶马尾杉、皱边石杉、金丝条马尾杉中的加样回收率分别为 $99.88\%, 100.38\%, 98.53\%, 99.03\%, 98.92\%, 98.81\%$, RSD 分别为 $1.76\%, 2.39\%, 1.99\%, 2.07\%, 2.24\%, 1.90\%$ ($n = 9$)。

2.6 样品测定结果: 取样品溶液 $20\mu\text{L}$,注入液相色谱仪测定,采用外标法定量,色谱图见图 1,石杉碱甲在 6 种植物中的含量见表 1。

3 讨论

HPLC 法测定 6 种石杉科植物中石杉碱甲的含量,可将石杉碱甲与其他成分很好地分离,峰型对称,以石杉碱甲计柱效大于 $5\,000$ 。

结果表明石杉碱甲在所测定的 6 种植物中均有分布,其中在柳杉叶马尾杉中含量最高,接近 0.2% ,蛇足石杉中约为 0.05% ,金丝条马尾杉中含量略低于蛇足石杉,而闽浙马尾杉中石杉碱甲的含量比柳杉叶马尾杉小数十倍。储滨孟^[3]等采用高效

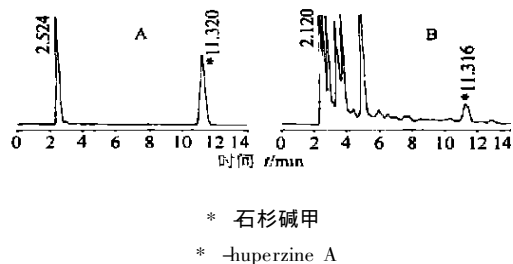


图 1 石杉碱甲对照品 (A) 和闽浙马尾杉供试品 (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of huperzine A (A) and sample of *P. minchegensis* (B)

薄层扫描法测定了 14 种石松植物中福定碱 (fordine, 与石杉碱甲 huperzine A 为同一物) 的含量,其中包括本实验所测定的四川石杉、闽浙马尾杉、蛇足石杉。本实验测定结果与其有较大差别,比较结果见表 1。

表 1 高效薄层扫描法与 HPLC 法测定 6 种石杉科植物中石杉碱甲含量比较 ($n = 9$)

Table 1 Comparison of huperzine A determined by HP TLC and HPLC respectively in six plants of Huperziaceae ($n = 9$)

名称	高效薄层扫描法 %	HPLC 法 %
闽浙马尾杉	0.030 4	0.006 1
蛇足石杉	0.006 6	0.048 1
四川石杉	0.005 6	0.070 6
皱边石杉		0.057 9
柳杉叶马尾杉		0.196 1
金丝条马尾杉		0.034 5

由 HPLC 色谱图可以看出,在与石杉碱甲对照品的峰位相同处,闽浙马尾杉有较小的峰,通过加样法,改变色谱条件,峰未分离,表明为石杉碱甲的色谱峰。

所采用的 HPLC 法可以将石杉碱甲与其他成分较好地分离,但在不同的色谱柱进行分析时,分离度及石杉碱甲的保留时间可在一定范围内发生变化。由于石杉碱甲为碱性物质,对流动相的 pH 较为敏感,可采用适当调节 pH 值的方法调节石杉碱甲与其他成分的分离度,使测定更为准确。

References

- [1] Wang Y E, Yue D X, Tang X C. Anti-cholinesterase activity of huperzine A [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1986, 7(2): 110-113.
- [2] Cheng Y S, Liu C Z, Ying Z L, et al. 128 case of myasthenia gravis treated with huperzine A [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (新药与临床), 1986, 5(4): 197-199.
- [3] Chu B M, Li J. Determination of fordine in 14 plants of *Lycopodium* L. by high performance TLC scanning [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 17(3): 13-14.