

综合以上分析得出怀牛膝茎段诱导愈伤组织形成的优化培养基为 $1/4\text{ MS} + 6\text{-BA } 0.5\text{ mg/L} + 2,4\text{-D } 1.0\text{ mg/L}$ 。做验证试验,将该培养基与正交试验中所得结果最好的1号培养基进行平行比较试验,30 d时,对照1号培养基中愈伤组织鲜质量为 1.1305 g ,ABPS量为 81.7857 mg/g ;而优化培养基中愈伤组织鲜质量为 1.2603 g ,ABPS量为 83.9286 mg/g ,均高于对照培养基,即优化培养基中愈伤组织生长速度较快,多糖的量较高。

3 讨论

迄今为止,对影响植物细胞生长和次生代谢物量的各种化学和物理因素已有大量研究^[11]。Hayashi等^[12]研究指出,提高培养基中硝酸盐、磷酸盐及钾盐浓度有利于促进细胞生长,而降低氮源和磷酸盐浓度则能增加代谢物的量。本研究发现,培养基中大量元素的改变对怀牛膝鲜质量、多糖的量虽有一定的影响,但影响并不显著,因此从规模化生产和经济的角度,培养基中添加 $1/4\text{ MS}$ 大量元素即可。

植物生长物质对细胞的生长有很大影响,生长素能够诱导细胞分裂,促进细胞伸长,细胞分裂素主要作用是促进细胞分裂和使细胞体积加大。生长素和细胞分裂素对植物愈伤组织的生长及次生代谢产物的合成有一定的促进作用^[13]。李明军等^[14]研究发现 6-BA 对怀牛膝茎段愈伤组织中 ABPS 量的影响显著,2,4-D 达到极显著水平。本研究中发现 6-BA 各水平对怀牛膝愈伤组织的诱导虽不显著,但对多糖的量达到显著影响水平,2,4-D 对多糖的量影响不显著,与李明军的结果部分一致,其作用和调控机制值得深入研究,从而为今后规模化生产提供

技术支持。

本实验采用正交设计研究了植物生长物质4因素3水平对怀牛膝愈伤组织诱导及愈伤组织中多糖量的影响,用最少的处理组合研究较多的试验因素,通过分析试验结果不仅选择出适宜的培养基,还可以揭示各因素的影响程度,最终确定出最适宜的试验方案。既提高了工作效率,又保证了实验结果的正确性和可靠性。

参考文献:

- [1] 陆维承. 牛膝考辨 [J]. 中国药业, 2007, 16(2): 55.
- [2] 吕小兰, 赖小平, 郭惠, 等. 牛膝多糖研究进展 [J]. 实用临床医学, 2005, 6(2): 137-138.
- [3] Marcone M F, Jahaniaval F, Aliee H, et al. Chemical characterization of *Achyranthes bidentata* seed [J]. *Food Chem*, 2003 (81): 7.
- [4] Sun H X. Adjuvant effect of *Achyranthes bidentata* saponins on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice [J]. *Vaccine*, 2006, 24: 3432.
- [5] 李宗锴, 李电东. 牛膝的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(12): 756-758.
- [6] 杨胜亚, 崔援军, 刘超, 等. 怀牛膝种植与加工 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 470.
- [7] 张丽萍, 董诚明, 金盖宇. 怀牛膝组织培养及齐墩果酸定量分析的研究 [J]. 河南中医学院学报, 2003, 18(4): 32-33.
- [8] 李明军, 于相丽, 陈明霞, 等. 怀牛膝愈伤组织的诱导和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 343.
- [9] 李明军, 李萍, 洪森荣, 等. 怀牛膝愈伤组织诱导及分化的研究 [J]. 河南师范大学学报, 2005, 33(4): 118-121.
- [10] 李根林, 杜天信, 梁生旺. 怀牛膝中多糖的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(5): 6-7.
- [11] 薛建平, 司怀军, 田振东. 药用植物生物技术 [M]. 合肥: 中国科学技术大学, 2005.
- [12] Hayashi T, Yoshida K, Sano K. Formation of alkaloids in suspension-cultured *Colchicum autumnale* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27: 1371-1374.
- [13] 吕冬霞, 曲长福. 植物生长调节剂对愈伤组织培养的影响 [J]. 北方园艺, 2004(5): 68.
- [14] 李明军, 李萍, 张晓丽, 等. 培养基成分对怀牛膝愈伤组织诱导及牛膝多糖含量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(7): 745-749.

HPLC 法测定不同产地喜树果中喜树碱

黄瑞松^{1,3}, 叶云锋², 梁启成¹, 周芳礼³, 苏青¹, 付小红^{4*}, 林翠悟³

(1. 广西民族医药研究所, 广西南宁 530001; 2. 广西兽药监察所, 广西南宁 530001; 3. 广西大学化学化工学院, 广西南宁 530003; 4. 广西中医学院, 广西南宁 530001)

摘要:目的 建立喜树果药材中喜树碱定量测定的 HPLC 方法,并对不同产地喜树果药材中喜树碱的量进行比较分析。方法 用 HPLC 法测定喜树果药材中喜树碱的量,色谱条件:色谱柱为 Dikma Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水 (55:45),体积流量:0.8 mL/min,检测波长:254 nm。结果 喜树碱在 0.112 ~ 0.672 μg 与峰面积有良好的线性关系,平均回收率为 102.19%,RSD = 2.90% (n = 6)。40 批不同产地喜

树果药材中喜树碱的量为 0.031 5%~0.242 4%。结论 建立的喜树果定量测定方法准确可靠,不同产地喜树果药材中喜树碱的量有较大差异。

关键词:喜树果;喜树碱;高效液相色谱;产地

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)01-0137-04

喜树果为蓝果树科(珙桐科)植物喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 的成熟果实,为广西中药材标准(1990 年版)收载品种。喜树主要分布于我国西南各省区,特别是广西资源丰富,全区各地多有分布。喜树果有抗癌、散结、破血化瘀的功效,广西民间用于治疗各种肿瘤^[1]。广西河丰药业有限公司以该药材作为原料提取喜树碱单体,出口美国、日本等国家,产生了较好经济附加值。文献记载,喜树果主要含生物碱类成分,其中喜树碱(camptothecin)为主要活性成分,同时也是有毒成分,主要表现在消化系统、泌尿系统及造血功能的抑制^[2,3]。《广西中药材标准》该药材没有定量测定项目^[1],未能有效控制喜树果药材内在质量,以致影响生产相关产品的质量及药材临床用药的安全有效。前文报道应用 TLC 测定喜树果中喜树碱的量^[4,5],本实验则应用 HPLC 法建立喜树果药材喜树碱定量测定方法,并对不同产地喜树果药材进行定量测定,比较分析不同产地喜树果药材的质量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器:2695 型 HPLC 系统(带自动进样器),2487 紫外检测器,2996 型二极管阵列检测器,Millennium³² 数据处理系统(均为美国 Waters 公司),AE-240 型 1/10⁵ 电子天平(瑞士梅特勒公司),SB2200 超声波清洗器(上海必能信超声有限公司)。

1.2 试剂:喜树碱对照品(广西河丰药业有限公司,质量分数 > 98.0%);HPLC 流动相所用甲醇为色谱纯(天津市四友生物医学技术有限公司),水为重蒸馏水,其他化学试剂均为分析纯;喜树果分别采于广西、云南、贵州、重庆、四川和上海等 6 个省、区(市)的 40 批不同产地,其中大部分采于广西,经笔者鉴定均为喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 的果实。各样品来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 Dikma Diamonds C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:甲醇-水(55:45),体积流量:0.8 mL/min,检测波长:254 nm;柱温:室温;供试品和对照品溶液进样量均为 20 μL。

2.2 对照品溶液制备:精密称取喜树碱对照品 10.08 mg,加甲醇定容至 200 mL,摇匀。再精密吸取 1 mL,加甲醇定容至 10 mL,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液制备:取喜树果粉末(过 60 目筛)约 0.1 g,精密称定,置 25 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 10 mL,密塞,称定质量。于 60 °C 水浴温浸提取 1 h,不时轻轻振摇。取出,放凉,再称定质量,用甲醇补足减少的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 专属性试验:分别取 2.2 和 2.3 项下的对照品溶液、供试品溶液和溶剂甲醇各 20 μL,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项色谱条件试验。结果表明,供试品溶液的色谱图中均有与喜树碱保留时间相同的吸收峰,溶剂甲醇无此吸收峰。说明用本方法测定喜树碱的量无溶剂干扰,专属性强。见图 1。

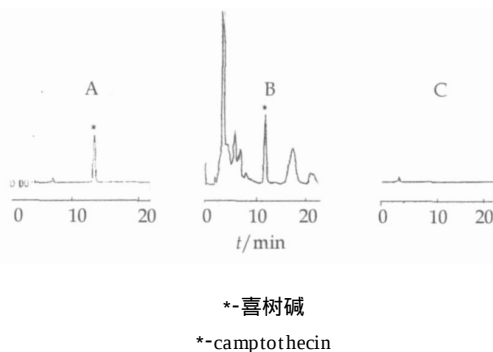


图 1 喜树碱对照品(A)、喜树果样品(B)和溶剂甲醇(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of camptothecin reference substance (A), *C. acuminata* sample (B), and methanol solvent (C)

2.5 线性关系考察:分别精密吸取喜树碱对照品溶液(50.6 μg/mL) 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 置 10 mL 量瓶中,各加甲醇至刻度,摇匀。分别进样 20 μL。以峰面积积分值为纵坐标,进样量(μg)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y = 5.305 \times 10^6 X - 88662$, $r = 0.9995$ 。喜树碱在 0.112 ~ 0.672 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.6 精密度试验:精密吸取同一供试品溶液各 20 μL,连续进样 5 次,测定峰面积,计算得喜树碱质量分数的 RSD 为 0.31%。

2.7 重现性试验:取同一批号药材粉末(过 60 目筛)6 份,每份 0.1 g,精密称定,制备供试品溶液。各精密吸取 20 μL,分别进样,测定喜树碱峰的峰面积,计算得喜树碱质量分数的 RSD 为 2.00%。

2.8 稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液 20 μL,分别于 0、2、4、6、8 和 24 h 进样测定,结果表明,24 h

内各次测得的喜树碱质量分数的 RSD 为 1.07 %。

2.9 回收率试验:采用加样回收法,分别称取同一批号药材粉末(过 60 目筛)0.05 g 共 6 份,精密称定,各加入喜树碱对照品溶液(0.005 01 mg/mL)10 mL,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液,同法测定喜树碱质量分数,计算回收率,结果平均回收率为

102.19 %,RSD 为 2.90 %。

2.10 样品测定:分别取 40 批样品粉末(过 60 目筛)各 0.1 g,按 2.2 和 2.3 方法制备对照品和供试品溶液,按 2.1 色谱条件进行喜树碱测定。结果表明,40 批样品喜树碱的量在 0.031 5 %~0.242 4 %,结果见表 1(以药材干燥品计算质量分数)。

表 1 喜树果药材不同产地和采集时间的喜树碱测定结果($n=2$)

Table 1 Determination of camptothecin in various habitats and collection periods of *C. acuminata* fruit ($n=2$)

样品 编号	产 地	采集时间	喜树碱/ %	样品 编号	产 地	采集时间	喜树碱/ %
1	广西药用植物园竹排沟边	2004-08	0.180 6	21	广西靖西县	2003-09	0.081 5
2	广西药用植物园草本区	2004-09	0.080 2	22	广西蒙山县	2005-09	0.139 1
3	广西药用植物园木本区	2005-08	0.069 8	23	广西金秀县长垌乡	2004-09	0.123 1
4	广西中医学院	2005-08	0.140 8	24	广西金秀县长垌乡六架村	2005-09	0.200 6
5	广西植物研究所	2005-09	0.159 0	25	广西龙州县	2006-08	0.161 1
6	广西兴安县氮肥厂	2004-09	0.221 5	26	贵州省(河丰药业有限公司)	2002-12	0.111 3
7	广西兴安县城公路边	2005-09	0.140 6	27	贵州省(购于玉林药市)	2004-10	0.120 5
8	广西永福县三皇乡	2005-09	0.122 5	28	贵州黎平县德风镇城关	2005-10	0.124 2
9	广西永福县城城	2005-09	0.150 1	29	贵州黎平县德风镇城南	2005-10	0.144 6
10	广西柳江县	2005-09	0.242 4	30	贵州从江县丙妹镇	2005-11	0.228 7
11	广西河池市	2002-09	0.099 6	31	贵州从江县丙妹镇沙村	2005-11	0.167 6
12	广西巴马县	2004-09	0.090 2	32	贵州瓮安县	2005-11	0.150 7
13	广西东兰县三石镇	2002-08	0.120 8	33	云南文山州	2004-10	0.120 3
14	广西东兰县四孟乡	2006-08	0.209 2	34	云南马关县	2004-11	0.131 3
15	广西百色市	2003-09	0.080 7	35	昆明植物研究所	2005-09	0.031 5
16	广西百色市那毕乡	2004-08	0.132 5	36	云南西畴县	2005-10	0.093 5
17	广西百色市永乐乡	2004-09	0.089 2	37	重庆万州区余家镇	2004-12	0.097 3
18	广西乐业县	2002-08	0.096 2	38	重庆万州区巫山县	2006-10	0.119 7
19	广西田林县	2004-09	0.101 6	39	四川都江堰	2006-10	0.229 4
20	广西那坡县	2005-09	0.093 6	40	上海杨浦区	2005-09	0.194 8

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备方法有乙醇溶液水浴温浸和超声提取^[6,7]。根据喜树碱在 70 %乙醇、乙醇、甲醇中均有一定溶解度,本实验试用上述溶剂分别采用温浸、超声方法提取喜树果。结果以 70 %乙醇、乙醇、甲醇等溶剂温浸提取的样品液,色谱主峰与杂质峰分离效果较好。为此,应用正交试验方法,采用 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交表进行水浴温浸提取条件的优选,即对提取溶剂(70 %乙醇、乙醇、甲醇)、药材破碎度(通过 20、40、60 目筛的粉末)、水浴温度(40、50、60)和温浸时间(30、60、90 min)等 4 因素 3 水平进行喜树碱得率的考察。结果优化出喜树果最佳提取条件为:以甲醇作为提取溶剂、药材破碎度为过 60 目筛的粉末、水浴温度为 60 及温浸时间为 60 min。

3.2 本试验采集的样品共涉及 6 省、区(市)的 40 批不同产地(包括部分同一产地不同区域采集的样品),样品批次多,涉及面广,具有一定的代表性。测

定结果表明,40 批喜树果药材喜树碱的质量分数为 0.031 5 %~0.242 4 %,产地不同质量分数差异较大。其中广西柳江县(10 号)量最高(0.242 4 %),云南昆明植物研究所(35 号)量最低(0.031 5 %);同一省区各地药材中喜树碱量差异亦较大,广西量最高为柳江县(0.242 4 %),最低为南宁市广西药用植物园木本区(2 号,0.069 8 %);贵州省最高为从江县丙妹镇(30 号,0.228 7 %),最低为河丰药业有限公司送检的样品(26 号,0.111 3 %);云南省最高为马关县(34 号,0.131 3 %),最低为昆明市昆明植物研究所(35 号,0.031 5 %);即使产于同一市或县,样品采集地点或区域不同,质量分数差异亦较大,如广西南宁市内采于广西药用植物园竹排沟边、草本区和木本区(1~3 号)和广西中医学院(4 号),广西东兰县三石镇(13 号)和四孟乡(14 号),贵州从江县丙妹镇(30 号)和丙妹镇沙村(31 号)等虽然为同一地区,但采集地点或区域不同,样品的量亦有所差异;甚至在同一地点不同植株的量差异也较大,如

广西药用植物园 1~3 号样均采自植物园内的不同植株,但 3 者的量差异也较大。这可能与喜树的生长环境和树龄有关。

致谢:试验所用部分样品分别由中国科学院昆明植物研究所杨世雄研究员、四川省中药研究院舒光明研究员、中国科学院广西植物研究所梁小燕副研究员、广西药用植物园药用植物保育中心等采集提供。

参考文献:

[1] 广西壮族自治区卫生厅.广西中药材标准[M]. 南宁:广西科

学技术出版社,1992.

- [2] 吴寿金,赵泰,秦永琪.现代中草药成分化学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002.
- [3] 国家医药管理局中草药情报中心站.植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1986.
- [4] 周芳礼,黄瑞松,苏青,等.薄层扫描法测定不同产地喜树果中喜树碱的含量[M]. 华西药学杂志,2008,23(5):610-612.
- [5] 蒋明廉,黄瑞松,吴毅,等.TLCS法对广西产喜树果中喜树碱含量动态积累的研究[J]. 中药材,2008,31(5):684-686.
- [6] 张丽艳,杨玉琴.反相高效液相色谱法测定喜树果实中喜树碱的含量[J]. 中国中药杂志,1997,22(4):234-235.
- [7] 张玉红,祖元刚.不同产地和生长季节喜树叶中喜树碱含量测定[J]. 植物学通报,2003,20(5):572-575.

HPLC 法测定鸭跖草中异荭草素

康明芹,赵士敏,杨卫萍,陆娟,金永日,李绪文

(吉林大学化学学院,吉林 长春 130012)

摘要:目的 建立鸭跖草中异荭草素的定量测定方法,为鸭跖草质量标准的建立提供科学依据。方法 采用反相高效液相色谱法。色谱柱:ZORBAX EXTEND C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈-0.1%磷酸(15:85),检测波长:350 nm。结果 线性良好,异荭草素平均加样回收率为 99.98%,RSD 为 1.62%。结论 本方法准确、简便,精密度和分离度良好,可用于测定鸭跖草药材中异荭草素的量。

关键词:鸭跖草;异荭草素;高效液相色谱

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)01-0140-02

鸭跖草是鸭跖草科(Commelinaceae)植物鸭跖草 *Commelina communis* L. 的干燥地上部分,具有清热解毒、利水消肿之功效,用于风热感冒、高热不退、咽喉肿痛、水肿尿少、热淋涩痛、痈肿疔毒等症^[1],华东、华北、西南均有分布。2005 年版《中国药典》载了该品种,但尚无定量测定的指标。文献报道鸭跖草中主要含有鸭跖黄酮苷、木栓酮、黑麦芽内酯、β-谷甾醇、1-carbomethoxy-carboline、花色苷、正十三烷醇、对羟基桂皮酸、胡萝卜苷、D-甘露醇及异荭草素,其中异荭草素的量较高^[2]。本实验利用 HPLC 法测定了鸭跖草中异荭草素的量,其研究结果可为鸭跖草质量标准建立提供定量测定指标。

1 仪器与试剂

仪器:Agilent 1200 series 高效液相色谱仪;G1310A 四元泵, G1322A 在线脱气机, G1316A 柱温箱, G1314B 紫外可见检测器,配备 Agilent 1200 色谱工作站。

试剂:乙腈(色谱纯,山东禹王集团),水为重蒸馏水,磷酸(色谱纯,山东禹王集团),异荭草素对照品为自制,并经 UV、IR、¹H-NMR、¹³C-NMR、MS 等光谱鉴定确认其结构,按本方法色谱条件,归一化测得其质量分数大于 99.9%。实验所用药材采自吉林省长春市郊区,系野生鸭跖草,经长春中医药大学邓明鲁教授鉴定为鸭跖草 *Commelina communis* L.。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 ZORBAX EXTEND C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈-0.1%磷酸(15:85),体积流量:1.0 mL/min;柱温:25℃;检测波长:350 nm;进样量:5 μL。在该条件下,异荭草素与其他组分色谱峰的分离度大于 1.5,色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取干燥的对照品异荭草素 20.0 mg,置于 50 mL 量瓶中,加适量甲醇溶解并定容至刻度,摇匀。精密移取上述标准溶液

收稿日期:2008-06-19

基金项目:吉林省科技厅项目(20060903)

作者简介:康明芹(1982—),女,山东滨州市人,硕士研究生,研究方向为天然产物化学成分及质量控制。

Tel:13504338478 E-mail:mqkang@yahoo.cn

*通讯作者 李绪文 Tel:(0431)85628012 E-mail:xwli@jlu.edu.cn