

RP-HPLC 法测定转基因贯叶连翘植株中褪黑素

王英娟,郝建国,贾敬芬*,岑举人,赵宇玮

(西北大学生命科学学院 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室,陕西 西安 710069)

摘要:目的 建立测定褪黑素的反相高效液相色谱紫外分析方法,分析并测定通过组培获得的贯叶连翘不同转基因株系及其亲本植株的褪黑素。方法 以 Symmetry C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) 为色谱柱;100 mmol/L 乙酸铵-甲醇 (80 : 20) 为流动相,体积流量为 0.8 mL/min;检测波长为 265.8 nm,灵敏度为 2.00 AUFS。结果 褪黑素浓度在 20~500 ng/mL 线性关系良好 ($R^2 = 0.9992$),平均加样回收率为 98.09% ($n = 6$),RSD 为 2.21%,最小检出量为 1.0 ng/mL。褪黑素峰保留时间约为 8.8 min。结论 该方法可以简便准确分析不同株系贯叶连翘中的褪黑素的量;贯叶连翘 YXu55 (含庆大霉素抗性标记和 AANAT-HIOMT 基因) 转基因株系的褪黑素的量均高于 pZP122 (仅含庆大霉素抗性标记,不含 AANAT-HIOMT 基因的空白质粒) 转基因株系和未转基因的对照植株;而 pZP122 转基因株系褪黑素的量跟未转基因的对照植株的量几乎相等。

关键词:贯叶连翘;褪黑素;转基因;RP-HPLC

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)10-1651-03

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 属藤黄科贯叶金丝桃属多年生草本植物,在我国民间已有 2400 多年的药用历史,有清心明目、调经活血、解毒消炎、解热利湿等多种功效^[1]。现代科学证明,贯叶连翘在抗艾滋病病毒、抗抑郁等方面具有较强的疗效,是近年世界最畅销草药之一,而且其自身所含的褪黑素也日益被关注^[2,3]。笔者前期为提高植物中褪黑素的量,已经利用基因工程技术获得了转褪黑素合成酶基因(AANAT 和 HIOMT 基因)的贯叶连翘。

褪黑素(melatonin)是最早发现于牛松果体的一种吲哚类激素^[4],能改善睡眠,对免疫、生殖、神经、心血管、消化系统等均有作用^[5]。1995 年首次在植物中发现褪黑素^[6],目前关于植物中褪黑素的研究与动物比较还很少,在贯叶连翘及转基因贯叶连翘中未见利用高效液相色谱法(HPLC)紫外检测的研究报道。本研究探索出一种高回收率的纯化方法和高灵敏度的检测手段,对后期植物中褪黑激素的量和功能研究十分重要。

1 材料

贯叶连翘(西北大学刘文哲教授鉴定)源于西北大学生物园,通过基因工程技术获得的转基因贯叶连翘及其亲本植株(亲本对照 CK)的组培全苗,55 °C 干燥 20 h,捣成细粉备用。

Waters 2695-2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);DHG-9123A 型电热恒温鼓风干燥

箱(上海一恒科技有限公司),Eppendorf 离心机(德国 Gene Company Limited);1.5 mL Eppendorf 管若干;微量加样器。褪黑素对照品购于 Sigma 公司(质量分数 ≥ 99.9%);甲醇为色谱纯,水为超纯水,乙酸铵、无水乙醇等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:Symmetry C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱(美国 Waters 公司);流动相为 100 mmol/L 乙酸铵-甲醇 (80 : 20),体积流量为 0.8 mL/min,柱温:常温;检测波长为 265.8 nm,灵敏度为 2.00 AUFS,进样量为 10 μL。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取褪黑素对照品 10.0 mg,用 1 mL 甲醇将其溶于 1.5 mL Eppendorf 管中,再精确量取 0.1 mL 用 0.9 mL 甲醇稀释制成 1.00 mg/mL 褪黑素对照品溶液储备液,其他不同浓度的对照品溶液由储备液精确稀释得到。

2.3 供试品溶液的制备:参考有关方法^[7]进行褪黑素的微量提取。精密称取 100 mg 干质量的贯叶连翘组织,加入甲醇 2.0 mL,称质量,超声波(80 Hz, 45 °C)提取 30 min 后,再称质量,用甲醇补足质量,13 000 r/min 离心,精密移取上清 1.0 mL,作为供试品溶液。

2.4 线性关系考察:精密移取褪黑素对照品储备液,用甲醇稀释成 20.0、50.0、100.0、150.0、200.0、300.0、500.0 ng/mL 的系列质量浓度溶液,平行测

* 收稿日期:2008-11-17

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671082);陕西省自然科学基金资助项目(2007CJ04);中国科学院西部之光基金资助项目(2008DF01);陕西省教育厅基金资助项目(09J K775)

作者简介:王英娟(1971—),女,陕西西安人,讲师,博士,研究方向为植物生物技术。Tel:13359200912 E-mail:jyxwyj@126.com

* 通讯作者 贾敬芬 E-mail:jiajf38@nwnu.edu.cn

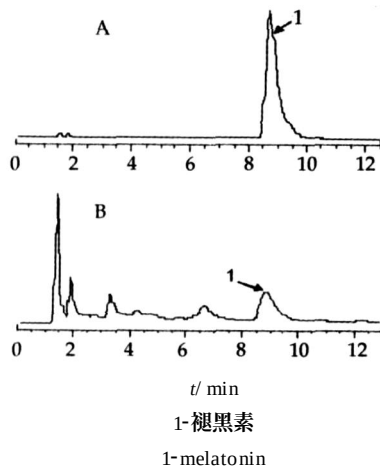


图 1 对照品(A)和样品(B) RP-HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample (B)

定 3 次。以平均峰面积 (Y) 对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得褪黑素回归方程和相关系数分别为 $Y = 10\,120 X - 52\,519$, $R^2 = 0.999\,2$ 。表明褪黑素在 $50.0 \sim 500.0 \text{ ng/mL}$ 线性关系良好。

2.5 样品最低检测量试验: 精密移取褪黑素对照品储备液, 用甲醇依次 10 倍稀释成系列质量浓度对照品溶液, 分别平行测定 3 次, 以样品峰为 3 倍于基线噪音即信噪比 3:1 为指标, 确定出该方法的样品最小检出量为 1.0 ng/mL 。

2.6 干扰性试验: 用“2.3”法制备缺贯叶连翘 HPLC 检测的阴性样品—空白样品溶液, 进样, 结果在褪黑素色谱峰出现的相应位置上, 阴性样品无其他色谱峰被检出, 说明处理中其他成分对褪黑素的测定不会产生干扰。

2.7 精密度试验: 精密吸取贯叶连翘供试品 (CK) 溶液 $10.0 \mu\text{L}$, 重复进样测定 6 次, 褪黑素峰面积积分值的 RSD 为 1.82% , 说明测定的精密度良好。

2.8 稳定性试验: 精确吸取褪黑素对照品溶液 (100 ng/mL) $10.0 \mu\text{L}$, 在 $0.2, 0.4, 0.6, 0.8 \text{ h}$ 各测定一次, 5 次褪黑素峰面积积分值的 RSD 为 1.45% , 表明供试溶液在 8 h 内稳定。

2.9 重现性试验: 精密称取同一批贯叶连翘 (CK) 干质量叶粉 100.0 mg , 6 份, 制备样品测定褪黑素的质量分数, 6 次测定结果的 RSD 为 1.49% , 表明此方法重现性良好。

2.10 加样回收率试验: 精密称量贯叶连翘叶干粉 (CK, 质量分数 $1.82 \mu\text{g/g}$) 50.0 mg , 共 6 份, 每份中分别加入褪黑素对照品 ($1 \mu\text{g/mL}$) $100 \mu\text{L}$, 混匀, 制备供试品溶液后进行测定。6 次测定平均回收率为 98.09% , RSD 为 2.21% 。

2.11 样品的测定: 制备供试品溶液, 每次进样 $10.0 \mu\text{L}$ 。分别对供试的转基因贯叶连翘不同株系及 CK 株进行测定, 以 3 次平均峰面积通过回归方程进行计算, 得到每个样品中褪黑素的量 (表 1)。结果表明贯叶连翘 YXu55 (含庆大霉素抗性标记和 AANAT-HI-OMT 基因) 转基因株系的褪黑素的量约为 pZP122 (仅含庆大霉素抗性标记, 不含 AANAT-HIOMT 基因的空白质粒) 转基因株系和未转基因的对照植株的 3~4 倍; 而 pZP122 转基因株系褪黑素的量跟未转基因的对照植株的量几乎相等。

表 1 不同贯叶连翘株系植株的褪黑素比较
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Table 1 Comparison of melatonin in different species of *H. perforatum* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

样 品	褪黑素/($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)
CK	$1\,819.800 \pm 0.872$
P1	$1\,749.717 \pm 0.705$
P2	$1\,797.003 \pm 1.136$
P3	$1\,669.767 \pm 0.561$
X4	$6\,765.354 \pm 1.054$
X5	$7\,249.792 \pm 0.953$
X6	$6\,423.468 \pm 1.207$

CK 为对照植株, P1~3 为 pZP122 转基因植株, X1~3 为 YXu55 转基因植株

CK was wild type, P1 - 3 was pZP122 transgenic plants, X1 - 3 was YXu55 transgenic plants

3 讨论

褪黑素溶于甲醇, 不溶于水, 提取较为简便, 对于与褪黑素有相似吸收的杂质只要能较好的分离就不需特殊处理^[7,8], 本研究直接以甲醇作为提取溶剂, 减少了提取过程中褪黑素量的损耗, HPLC 图杂峰较多, 但没有对褪黑素的主峰造成很大影响。该法提取便利、节约。

褪黑素的检测器现在大多应用紫外检测器, 波长采用 $222 \sim 277 \text{ nm}$ ^[5,7,9]。研究中发现对照品在 $223, 244, 265.8, 277 \text{ nm}$ 处均有吸收, 其中 $265.8, 277 \text{ nm}$ 两处峰形较尖, 吸收值大, 而采用 277 nm 作为检测波长时基线较难稳定, 对提取物样品和对照品来说, 265.8 nm 作为 HPLC 的紫外检测波长时其峰的对称性、分离度、基线稳定性均大有改善, 且检测灵敏度高, 杂质干扰少。

褪黑素的流动相大部分选用甲醇-水, 仅其比例不同, 采用磷酸盐、冰醋酸等调节 HPLC 中的容量因子 pH 值^[7,9,10]。在以甲醇-水混合液为流动相进行梯度洗脱时, 发现加入一定量的乙酸铵后, 其 pH 值对褪黑素的分离效果理想, 改善了峰的对称性和

检测信号,使得褪黑素主峰与杂质峰清晰分开。

建立 RP-HPLC 的检测方法,可以简便、准确地测定贯叶连翘的褪黑素量,该法测定的贯叶连翘 YXu55 转基因株系的褪黑素量均显著高于 pZP122 转基因株系和未转基因的 CK 植株(T-检测, * $P < 0.05$),说明外源褪黑素合成酶基因 AANAT-HI-OMT 的导入和表达,提高了转化植株内源褪黑素的量,同时也为褪黑素功能的研究工作确定了实验材料。

参考文献:

- [1] 宋立人,洪 恂,丁绪亮,等. 现代中药学大辞典 [M]. 上册. 北京:人民卫生出版社,2001.
- [2] Chatterjee S S, Bhattacharya S K, Wonnemann M, et al. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts [J]. *Life Sci*, 1998, 63(6): 499-503.
- [3] 李 宏,姜怀春,邹国林. 贯叶连翘活性成分研究新进展 [J]. 中草药, 2001, 32(7): 657-660.

- [4] Lerner A B, Takahashi Y, Lee T H, et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melatocytes [J]. *J Am Chem Soc*, 1958, 80: 2578-2579.
- [5] 程永炜. 褪黑素对手术病人免疫功能和睡眠质量的影响 [D]. 北京:中国医学科学院,2004.
- [6] Hattori A, Migita H, Ligo M, et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, 35: 627-634.
- [7] 刘伟华,张贵友,戴尧仁. HPLC 法测定黄芩叶、花、种子中褪黑素的含量 [J]. 植物学通报, 2003, 20(1): 75-79.
- [8] 郑灿辉,谢继青,袁 成,等. 褪黑素制剂含量测定方法概述 [J]. 中国生化药物杂志, 2003, 24(3): 153-155.
- [9] Jacek M, Ewa P, Marek T. On-line preconcentration techniques in determination of melatonin and its precursors/metabolites using micellar electrokinetic chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1104(1-2): 337-345.
- [10] Ayano E, Suzuki Y, Kanezawa M, et al. Analysis of melatonin using a pH- and temperature-responsive aqueous chromatography system [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1156(1-2): 213-219.

PR HPLC 法测定甘肃蚤缀中苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷

雷 宁¹,杜树山²,欧阳捷³,刘丽宏¹,王永炎^{2*}

- (1. 中国人民解放军第二炮兵总医院 药剂科,北京 100088; 2. 北京师范大学 教育部资源药物工程研究中心,北京 100088; 3. 北京师范大学 分析测试中心,北京 100875)

摘要:目的 建立 HPLC 法对甘肃蚤缀中苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷同时定量的方法。方法 采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.5%磷酸梯度洗脱;体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 30 °C;检测波长为 350 nm;进样量为 10 μL。结果 苜蓿素、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯、异牡荆素、异金雀花素和苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷 5 个化合物达到基线分离且线性关系良好,线性范围分别为 5.44~97.92 μg/mL ($r=0.9992$)、4.76~85.68 μg/mL ($r=0.9992$)、6.52~117.36 μg/mL ($r=0.9996$)、4.92~88.56 μg/mL ($r=0.9998$)、1.60~29.34 μg/mL ($r=0.9991$),平均加样回收率分别为 100.21% (RSD = 1.94%)、97.50% (RSD = 2.50%)、100.38% (RSD = 2.46%)、98.54% (RSD = 2.40%)、97.45% (RSD = 3.14%)。结论 测定了 4 种来源的甘肃蚤缀样品中 5 个化合物的量,该方法分离度好、快速、简便,重现性佳。

关键词:甘肃蚤缀;苜蓿素;苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯;异牡荆素;异金雀花素;苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)10-1653-03

甘肃蚤缀为石竹科蚤缀属植物甘肃蚤缀 *Arernaria kansuensis* Maxim. 的干燥全草,系传统藏药,其味苦、性寒,具清热利肺、退热止咳之功效。藏医常用于治疗各种肺病、淋巴结核、黄疸、风湿、肾结石以及筋骨疼痛等^[1~3]。现代药理学研究表明,甘肃蚤缀具有抗炎、免疫调节、抗缺氧和肿瘤抑制等作用^[4,5]。早年有研究从甘肃蚤缀中分离得到甾类、

生物碱类和黄酮类化合物。为了寻找其活性成分,研究者曾经对甘肃蚤缀全草 70%乙醇提取物的多孔吸附树脂 50%乙醇洗脱物进行了系统的化学成分研究,发现其含有多种黄酮类化合物,其中苜蓿素-7-O-β-D-葡萄糖苷、苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯和异牡荆素为首次从该植物中得到,且苜蓿素-4'-O-β-愈创木基甘油基酯为首次从石竹科植物中分

* 收稿日期:2008-12-14

作者简介:雷 宁(1978—),女,陕西人,博士,主要从事天然药物药效物质基础与质量控制研究工作。

Tel: (010) 66343257 E-mail: lilyzebra@163.com