

- 2006, 22(3): 269-274
- [6] 董乐萌, 刘玉军, 魏建和. 柴胡皂苷合成途径中三个关键酶基因片段的克隆与序列分析[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2008, 10(5): 56-60
- [7] Ramos Valdivia A C, van der Heijden R, Verpoorte R. Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis: a review of its biochemistry and function [J]. *Nat Prod Rep*, 1997, 14: 591-603
- [8] Nakamura A, Shimada H, Masuda T, et al. Two distinct isopentenyl diphosphate isomerases in cytosol and plastid are differentially induced by environmental stresses in tobacco [J]. *FEBS Lett*, 2001, 506(1): 61-64
- [9] Okada K, Kasahara H, Yamaguchi S, et al. Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49: 604-616
- [10] Sui C, Wei J H, Chen S L, et al. Construction of a full length enriched cDNA library and an analysis of 3111 ESTs from roots of *Bupleurum chinense* DC [J]. *Bot Stud*, 2010, 51(1): 7-16
- [11] Munroe D J, Loebbert R, Bric E, et al. Systematic screening of an arrayed cDNA library by PCR [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1995, 92: 2209-2213
- [12] 胡迎春, 张开泰, 吴德昌, 等. PCR 快速筛选质粒 cDNA 文库方法的建立[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1999, 19(5): 310-312
- [13] Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, et al. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence [J]. *J Mol Biol*, 2000, 300: 1005-1016

披针叶黄华种子中金雀花碱的定性和定量分析

周军辉¹, 李 静², 李 静¹, 王答祺¹, 李思锋^{1*}

(1. 陕西省西安植物园 陕西省植物研究所, 陕西 西安 710061; 2. 陕西省生物医药重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要:目的 应用 HPLC 和 TLC 建立披针叶黄华种子中金雀花碱的定量和定性分析方法。方法 采用超声提取的方法获得样品, 分别采用 TLC 和 HPLC 对披针叶黄华种子中的金雀花碱进行定性鉴别和定量测定。结果 TLC 采用碱性硅胶为固定相, 以苯-丙酮-醋酸乙酯-甲醇(4: 2: 1: 1)为展开剂, 可清晰检出金雀花碱斑点; HPLC 分析中, 金雀花碱在 0.04~1.2 mg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。结论 本方法样品处理快速简便, 定性定量分析分离效果好, 准确、快速、干扰少, 可用于披针叶黄华种子原料和金雀花碱产品的质量控制。

关键词:披针叶黄华种子; 金雀花碱; TLC; HPLC; 超声提取

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1184-03

披针叶黄华 *Thermopsis lanceolata* R. Br. 又名牧马豆、野决明, 系豆科(Leguminosae)野决明属(*Thermopsis* R. Br.)多年生草本植物, 分布于中国东北、华北及西北等广大地区, 资源丰富。据资料记载, 本种为有毒植物, 其主要有效成分金雀花碱(cytisine)对呼吸系统的作用类似烟碱, 能反射性地兴奋呼吸, 是一种临床上用于抗心律失常的生物碱类药物。近年来, 金雀花碱作为疗效确切的戒烟制剂原料引起国际医药界的关注, 研究表明, 以金雀花碱的酒石酸盐为主要成分的戒烟制剂的一年期戒烟有效率可达 22%, 具有可观的发展前景^[1]。我国学者从 20 世纪 70 年代已开始对其化学成分进行研究^[2,3], 其定量测定有紫外吸收法^[4]、原子吸收法^[5]及酸碱滴定法^[6], 本实验采用 TLC 法和 HPLC 法进行金雀花碱的定性和定量分析, 为相关的生产及检验工作提供实验依据。

1 仪器、药材与试剂

1.1 仪器: Waters 515 高效液相色谱仪(包括 Waters 515 泵, Waters 2487 检测器等), N2000 色谱工作站; Beckman 高效液相色谱系统(125 泵, 168PDA 二极管阵列检测器, 32Karat 工作站, 美国), Beckman 508 自动进样器。天津东康 DS6150 超声波清洗机(频率为 40 kHz, 功率为 150 W)。

1.2 药材与试剂: 药材共 10 批次, 于 2007 年和 2008 年分别在宁夏盐池, 内蒙古自治区阿拉善左旗、右旗、前旗, 新疆哈密、塔城、阿勒泰, 陕西榆林, 青海门源、互助彩集成熟的披针叶黄华的种子, 由陕西省植物研究所王答祺副研究员鉴定, 样本保存于陕西省植物研究所; 所用金雀花碱对照品购自 Sigma 公司, 质量分数在 99% 以上, 药材粉碎后过 40 目筛, 60℃干燥 3 h, 密封保存, 待用。HPLC 用甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 定性鉴别: 取披针叶黄华种子药材粉末 2

* 收稿日期: 2009-12-13

基金项目: 陕西省科学院项目(2008K-13)

作者简介: 周军辉(1978-), 男, 助理研究员, 主要从事天然药物化学分离与分析研究。

Tel: (029) 85251515 E-mail: zhoujunhui@sohu.com

* 通讯作者 李思锋 Tel: (029) 85212196 E-mail: lisf60@sina.com

g, 加入甲醇 20 mL, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。另取金雀花碱对照品适量, 加甲醇制成含金雀花碱 1 mg/mL 的对照品溶液。照《中国药典》薄层色谱法试验, 吸取上述各种溶液 5 μ L 分别点于碱性硅胶 G 薄层板(普通薄层色谱用硅胶 G 以 2% NaOH 水溶液混合均匀后铺板)上, 以苯-丙酮-醋酸乙酯-甲醇(4:2:1:1)为展开剂, 展距 10 cm, 取出晾干, 以改良的碘化铋钾试剂显色。供试品色谱中, 在与对照品色谱相同位置显橘红色斑点, Rf 值在 0.5 左右, 结果见图 1。

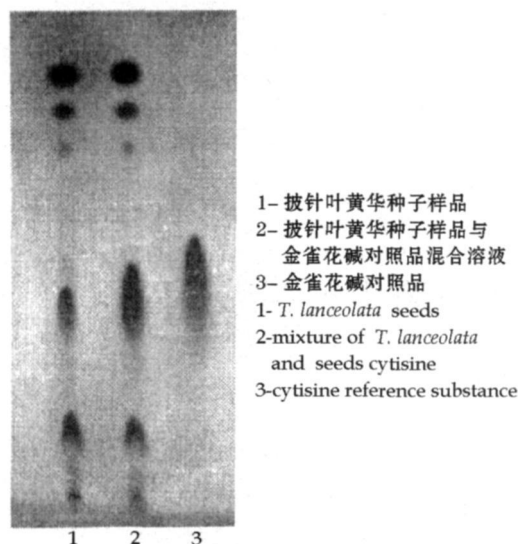


图 1 披针叶黄华种子的鉴别 TLC 图谱

Fig 1 TLC Chromatograms of *T. lanceolata* seeds

2.2 HPLC 定量测定

2.2.1 色谱条件: 色谱柱为江苏汉邦 Lichrospher C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液-甲醇-高氯酸氨(15 mL: 85 mL: 0.5 g); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 305 nm; 柱温 25 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L; 理论塔板数按金雀花碱峰计算应不低于 5 000, 色谱图见图 2。

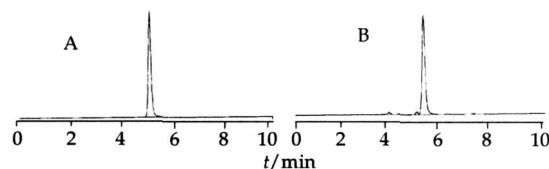


图 2 金雀花碱对照品(A)和披针叶黄华(B)的 HPLC 图谱

Fig 2 HPLC Chromatograms of cytosine reference substance (A) and *T. lanceolata* (B)

2.2.2 对照品溶液的制备: 精密称取金雀花碱对照品 10.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 供试品溶液的制备: 精密称定样品粉末

0.500 g 左右, 置具塞锥形瓶中, 加入 20 mL 的 80% 甲醇溶液, 超声 15 min 取出, 放冷至室温, 滤过, 滤液置 100 mL 量瓶中; 重复上述操作 2 次, 每次加入 20 mL 的 80% 甲醇, 最后用适量 80% 甲醇洗涤残渣, 分别滤过; 合并滤液置上述 100 mL 量瓶中, 加入去除甲醇的流动相溶液至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.4 线性关系考察: 将上述金雀花碱对照品溶液稀释成不同质量浓度的对照品溶液, 在上述色谱条件下分别进样测定, 以进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 经回归处理得回归方程 $y = 491.008x + 488.405$, $r = 0.9997$ 。金雀花碱在 0.04~1.2 mg/mL 呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验: 取同一批供试品溶液, 精密吸取 10 μ L, 按 2.1 项下色谱条件重复进样 5 次, 测定金雀花碱峰面积, 峰面积 RSD 为 0.42%。

2.2.6 重现性试验: 取同一批供试药材, 按 2.2.3 项下供试品溶液制备方法制备 5 份供试品溶液, 进样测定, 结果该批药材中金雀花碱质量分数平均为 1.73%, RSD 为 0.62%。

2.2.7 稳定性试验: 取同一批供试品溶液, 精密吸取 10 μ L, 每隔 2 h 测定 1 次金雀花碱峰面积, 共测定 5 次, 其峰面积的 RSD 为 1.12%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.2.8 回收率试验: 采用加样回收法。分别精密称取 3 个批次已测定的披针叶黄华种子药材约 0.300 g, 6 份, 分别加入含金雀花碱 0.1 mg/mL 的对照品溶液 4、6、8 mL, 按 2.2.3 项下供试品溶液制备方法制备供试品, 各进样 10 μ L, 结果加样回收率为 98.2%, RSD 为 1.22% ($n = 6$)。

2.2.9 样品测定: 取供试药材粉末 10 批, 各 3 份, 每份约 0.500 g, 按供试品溶液制备方法制备供试品, 在上述色谱条件下测定样品中金雀花碱的量, 结果见表 1。

表 1 不同批次的披针叶黄华中金雀花碱的测定结果 ($n = 3$)

Table 1 Determination of cytosine in different batches of *T. lanceolata* ($n = 3$)

批次	金雀花碱/%	批次	金雀花碱/%
070812	0.81	080911	1.32
070815	1.32	080916	1.36
070817	1.86	080825	0.89
070822	0.69	080901	1.29
080801	0.87	081015	1.59

3 讨论

3.1 金雀花碱的定量测定方法有紫外吸收法、滴定

法和原子吸收光谱法 3 种。紫外吸收法和滴定法测定结果的准确性与样品的质量分数有直接关系,对于高纯度的金雀花碱产品,本方法是适用的,但对于含杂质较多的供试品,由于杂质的干扰,测定结果并不理想;原子吸收光谱法的供试品处理方法比较繁琐,且操作方法的通用性较差,不能满足生产和日常检验的需要,因此有必要探索其他的分析方法。

3.2 实验过程中发现,2.2.3 项下供试品溶液制备过程中如果用 80% 甲醇定容,进样后色谱图的分离效果变差,色谱柱易污染。推测是由于种子类药材含脂溶性成分较多,在本实验色谱条件下不易洗脱,改用本实验所述供试品处理方法后,可明显改善分析效果、保护色谱系统。

3.3 采用本实验的色谱条件,随机测定了 10 批披针叶黄华药材中金雀花碱的量,结果令人满意,本方

法可对披针叶黄华药材以及金雀花碱产品的定量测定提供依据。

参考文献:

- [1] Coe J W, Brooks P R, Vetelino M G, *et al.* Varenicline: an $\alpha_4\beta_2$ nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation [J]. *J Med Chem*, 2005, 48(10): 3474-3477.
- [2] 畅行若,李书,王宏新,等. 国产披针叶黄华化学成分的研究 I 兴奋横纹肌成分的分离与鉴定[J]. 陕西新医药, 1978, 40(4): 55-56, 58.
- [3] 高文远,李医明,朱大元. 牧马豆生物碱成分研究[J]. 中草药, 1998, 29(12): 796-798.
- [4] 黎萍,杨敏丽. 披针叶黄华中金雀花碱类生物碱的提取工艺[J]. 华西药理学杂志, 2007, 22(1): 7-8.
- [5] 雷光继,林树昌,迟锡增. 原子吸收光谱法间接测定微量金雀花碱[J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 1991, 27(1): 65-68.
- [6] 蔡智慧,倪传根,贾瑞琴,等. 超临界二氧化碳萃取披针叶黄华总生物碱工艺的研究[J]. 林产化学与工业, 2006, 26(4): 70-72.

HPLC 法测定不同采收期栽培藏木香中内酯类成分

董琦,马世震,胡凤祖*

(中国科学院西北高原生物研究所,青海 西宁 810001)

摘要: 目的 测定不同采收期栽培藏木香中土木香内酯和异土木香内酯的量,确定最佳采收期,为提高药材质量提供依据。方法 采用 HPLC 法,色谱柱为 XDB C₁₈(150 mm × 4.5 mm, 5.0 μm),流动相为乙腈-0.01% 醋酸水溶液(55:45),检测波长 202 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 ℃。结果 栽培藏木香在不同采收期土木香内酯和异土木香内酯的总量不同,9 月份的量最高。结论 藏木香的最佳采收期为 9 月份。

关键词: 藏木香; 不同采收期; 土木香内酯; 异土木香内酯

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1186-02

藏木香为菊科植物总状土木香 *Inula racemosa* Hook. f. 的干燥根,藏语中称为“玛奴”,主要分布在四川、青海、甘肃、西藏等省,以根入药,具有行气镇痛、健脾消食、温中和胃、胸腔胀痛、食积不消、止痛安胎作用^[1-3]。土木香内酯和异土木香内酯是藏木香的主要活性成分^[4,5],其量高低直接影响药材的质量与疗效。本实验以不同采收期的栽培藏木香为对象,采用 HPLC 法对土木香内酯、异土木香内酯进行定量分析,为确定最佳采收期从而提高药材质量提供依据。

1 材料、试剂与仪器

试验材料: 栽培藏木香由本所与青海大通宝库林场合作试验基地提供,采于 2008 年 5 月至 10 月,由本所陈世龙研究员鉴定。样品经阴干,粉碎后,过

80 目筛,备用。

Agilent 1200 高效液相色谱仪(带 G1315D DAD 检测器),Chemstation 工作站,MOLEMENT 元素型超纯水机(上海摩勒生物科技有限公司)。

土木香内酯对照品(110761-200204)、异土木香内酯对照品(110760-200507),中国药品生物制品检定所。乙腈(色谱纯),甲醇(分析纯),醋酸(分析纯),水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(150 mm × 4.5 mm, 5.0 μm),流动相为乙腈-0.01% 醋酸水溶液(55:45),检测波长 202 nm,体积流量 1.0 mL/min,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。色谱图见图 1。

* 收稿日期: 2009-09-03

作者简介: 董琦(1980—),女,吉林省通化市人,工程师,硕士,从事分析化学工作。

Tel: (0971) 6132750 Fax: (0971) 6143282 E-mail: qdong@nwipb.ac.cn