

DOI:10.11937/bfyy.201610031

HPLC 法分离测定苦豆子愈伤组织 喹诺里西啉生物碱含量及体系优化

高 媛¹, 李 鹏², 张庆宸³, 徐全智¹, 孙牧笛¹, 顾沛雯¹

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学 化工学院, 宁夏 银川 750021; 3. 山东大学 药学院, 山东 济南 250100)

摘 要:以苦豆子愈伤组织为试材,采用高效液相色谱法,分离并测定苦豆子愈伤组织中氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱,建立了这5种单碱分离、测定的色谱方法。结果表明:色谱条件为 Ultimate®AQ-C18(4.6 μm ×250 mm×5 mm);流动相为 0.01 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(K₂HPO₄=5.59 g·L⁻¹,KH₂PO₄=0.41 g·L⁻¹,pH 7.5)-甲醇(50:50,V/V);检测波长为216 nm;柱温为35℃;流速为1.0 mL·min⁻¹,检测苦豆子愈伤组织中含有5种生物单碱,其中氧化槐果碱和槐定碱在苦豆子愈伤组织继代培养第4代时含量相对较高,分别为1.205 6 mg·g⁻¹和0.116 5 mg·g⁻¹,氧化苦参碱、槐果碱、苦参碱的含量略有波动,大致呈下降趋势。

关键词:苦豆子愈伤组织;HPLC;氧化槐果碱;氧化苦参碱;槐定碱;槐果碱;苦参碱

中图分类号:Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)10-0122-05

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)属豆科槐属植物,主要分布于我国北方的荒漠、半荒漠地区。近年研

究发现,苦豆子中富含生物碱,具有清热解毒、驱风燥湿、抗菌杀虫、抗肿瘤、免疫等多种功效,且有重要的药用价值和经济价值^[1]。据报道,从苦豆子植物中分离到20多种生物碱,主要成分为槐果碱、槐定碱、苦参碱、氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐胺碱、金雀花碱等,这些成分具有抗肿瘤作用。其中苦参碱和槐定碱,氧化苦参碱和氧化槐定碱,槐果碱和苦豆碱等均分别属于同分异构体,在不同条件下各成分间可能存在生物转化,分离难度^[2]。

第一作者简介:高媛(1988-),女,山东日照人,硕士研究生,研究方向为植物保护。E-mail:elfish521@163.com.

责任作者:顾沛雯(1969-),女,宁夏银川人,博士,教授,硕士生导师,现主要从事植物保护等研究工作。E-mail:gupeiwen2013@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260452)。

收稿日期:2016-02-14

Extraction Process Optimization of Total Flavonoid From *Clerodendron trichotomum* Leaves by Microwave Technology

ZHANG Ying^{1,2}, YANG Ge³

(1. College of Biological and Chemistry Engineering, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000; 2. Key Laboratory of Dry-hot Valley Characteristic Bio-Resources Development at University of Sichuan Province, Panzhihua, Sichuan 617000; 3. Panzhihua Institution for Food and Drug Control, Panzhihua, Sichuan 617000)

Abstract: Taking *Clerodendron trichotomum* leaves as material, using microwave technology to extract total flavonoid, the flavonoid contents were evaluated by ultraviolet and visible spectrophotometer. The effect of material-liquid ratios, ethanol concentration, extraction temperatures and extraction time were investigated using the yields of total flavonoid as index. The optimum extraction process conditions of total flavonoid were studied by the orthogonal design after single factor experiments. The results showed that the optimum extraction conditions were as follows: presoaking for 2 hours, microwave power 200 W, ethanol concentration 70%, temperature 60℃, material-liquid ratio 1:35 g·mL⁻¹, extracting by 2 times, and each time for 3 minutes, the yield of total flavonoid could reach 71.15 mg·g⁻¹. Microwave technology was feasible for flavonoid extraction, and it also could lay a foundation for further utilization of *Clerodendron trichotomum*.

Keywords: *Clerodendron trichotomum*; flavonoid; orthogonal design; extraction

国内外已有大量研究,分离并检测苦豆子总碱中多种生物碱及其含量分析的报道^[3-7],但由于苦豆子中各生物碱单体的化学结构和极性较为接近,对生物碱单体的分离和含量测定仍是一个难点。田菁等^[8]利用 HPLC 法定性分析了苦豆子药材中 9 个生物碱成分,并对其中 6 个生物碱进行了定量分析;马玲等^[9]利用 HPLC 法同时测定了苦豆草中 7 种生物碱含量,为苦豆草的质量评价提供了依据;刘振龙等^[10]利用 HPLC 法同时测定苦豆子总碱中 8 种生物碱,分离良好,8 种生物碱含量大于 50%;饶品昌等^[11]首先对苦豆子愈伤组织诱导培养基及愈伤组织生物碱成分进行研究,但研究较浅且愈伤组织中槐定碱含量(0.004 5%)较低;杨春霞等^[12]分别采用紫外分光光度计法和 HPLC 测定愈伤组织中总黄酮及槐定碱的含量,槐定碱含量(0.011 2%)远远高于以往的研究。

近年来,随着生物技术的快速发展,利用植物细胞培养生产天然的植物成分并提高其含量,这一技术在苦豆子中已开始应用,并逐步成为苦豆子资源长足发展的重要途径。快速分离检测苦豆子愈伤组织细胞中的喹诺里西啶生物碱含量是这一技术得以实施的关键点之一。该试验在已有研究基础上,建立了 HPLC 高效液相色谱法,分离并测定苦豆子愈伤组织中氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱的含量,此方法专属性强、检测准确、分离快速,可用于苦豆子相关产品生物碱的质量监测。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料:采自宁夏灵武白芨滩国家自然保护区的健康苦豆子豆荚。

供试仪器:高效液相色谱(AGILENT1100)(美国安捷伦公司)。UV-2450 紫外-可见光光度计,SLC-6A 系统控制器,C-R3A 数据处理系统,SPD-M6A 光电二极管阵列检测器,以上均为日本 SHIMADZU 公司。CSF-1A 超声波发生器(上海超声波仪器厂)。Millipore 溶剂过滤系统(美国 Millipore 公司)。

供试试剂:MS 培养基、萘乙酸(NAA)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、浓硫酸、100% 无水乙醇、75%酒精、5%次氯酸钠、无菌水、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、甲醇(色谱级)、苦豆子总碱(宁夏盐池县都顺生物化工有限公司)、氧化槐果碱对照品(批号:13012907)、氧化苦参碱对照品(批号:13021902)、槐定碱对照品(批号:13032002)、槐果碱对照品(批号:130827)、苦参碱对照品(批号:1302194),对照品均购于上海融禾

医药科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 挑选饱满、无病害、无虫蛀的苦豆子种子,用 80%的硫酸浸泡 2 h,软化种皮后用无菌水浸泡 2 h,75%的酒精消毒 1 min 后无菌水冲洗 3 次,再用 5%的次氯酸钠溶液浸泡 10 min,无菌水冲洗 3 次,置于铺有无菌滤纸的培养皿中,加无菌水,放入 25 ℃培养箱中,暗培养 24 h 后,光照培养 12 h,黑暗培养 12 h,培养 3~5 d 催芽。

1.2.2 愈伤组织的诱导 将发芽的籽粒去皮并消毒(方法同 1.2.1),切取子叶并用灭菌手术刀划上几个切口,有利于愈伤组织的生长,将其接种于 MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹ 培养基上,光周期为 12 h·d⁻¹,光强度 1 000 lx,温度 25 ℃,培养至形成愈伤组织。

1.2.3 愈伤组织的继代培养 选生长状况良好的愈伤组织,切块处理后,转接至 MS+NAA 1.0 mg·L⁻¹+6-BA 4.0 mg·L⁻¹+2,4-D 1.0 mg·L⁻¹ 的继代培养基上,进行继代培养,每 25 d 转接 1 次,直至培养到第 8 代。

1.2.4 愈伤组织生物碱的提取 分别精确称取每代苦豆子愈伤组织 1 g,加入 4 mL 无水乙醇于研钵中充分研磨,将离心管置于 4 ℃冰箱冷藏溶解 24 h 后,超声震荡处理 30 min,于 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液置于新离心管并旋转蒸发至膏状,溶解于 1 mL 甲醇(色谱级),于 4 ℃冰箱中保存,即为样品制备液。

1.2.5 色谱条件 色谱柱:Ultimate® AQ-C18(4.6 μm×250 mm×5 mm);流动相:0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液-甲醇(50:50),临用前以微孔滤膜过滤并经超声脱气处理;紫外检测波长 216 nm;流速为 1.0 mL·min⁻¹;柱温为 35 ℃。

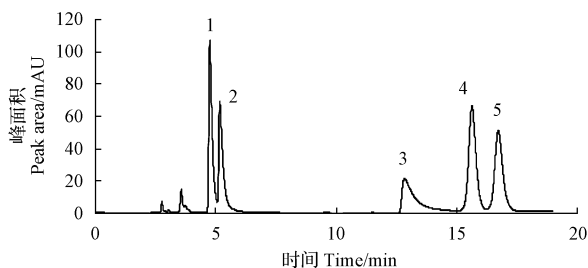
1.2.6 5 种单碱标准曲线的制备 分别配制 0.1、0.2、0.5、2.0、4.0 mg·mL⁻¹ 氧化槐果碱标准品溶液;0.002、0.100、0.200、1.000、2.000 mg·mL⁻¹ 氧化苦参碱标准品溶液;0.002、0.010、0.100、0.200、1.000、2.000 mg·mL⁻¹ 槐定碱和槐果碱标准品溶液;0.008、0.040、0.200、0.500、1.000、2.000 mg·mL⁻¹ 苦参碱标准品溶液,按上述色谱条件每次进样 10 μL,以峰面积 y 对浓度 x 进行回归。

2 结果与分析

2.1 苦豆子愈伤组织中 5 种喹诺里西啶生物碱含量测定

利用氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、苦参碱、槐果碱标准样品作为对照(图 1),经 HPLC 检测苦豆子愈伤组织中生物碱成分及含量(图 2)。苦豆子愈伤组织中

有 5 个峰的洗脱时间与标准样品一致,分别是氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱。氧化槐果碱和槐定碱在愈伤组织继代培养第 4 代时含量相对较高,分别为 $1.2056 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.1165 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,氧化苦参碱、槐果碱、苦参碱的含量略有波动,大致呈下降趋势(图 3)。



注:1. 氧化槐果碱;2. 氧化苦参碱;3. 槐定碱;4. 槐果碱;5. 苦参碱。
图 2 同。

Note: 1. Oxysophocarpine; 2. Oxymatrine; 3. Sophoridine; 4. Sophocarpine; 5. Matrine. The same as Fig. 2.

图 1 5 种生物碱标准样的
HPLC 检测色谱图

Fig. 1 The chromatogram of five kinds of alkaloids of standard sample by HPLC

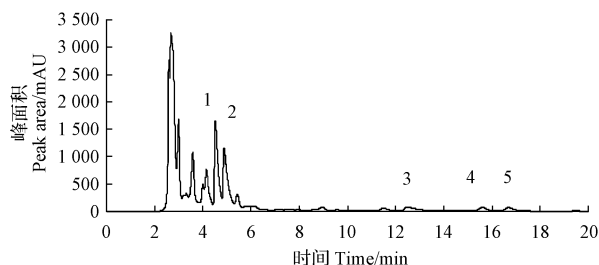


图 2 苦豆子愈伤组织中生物碱
HPLC 检测色谱图

Fig. 2 The chromatogram of alkaloids in different growth stages of the callus of *Sophora alopecuroides* by HPLC

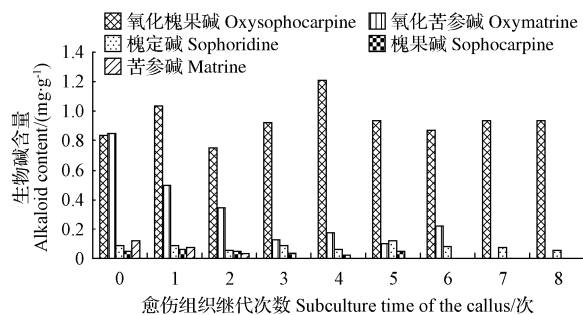


图 3 苦豆子愈伤组织喹诺里西啶生物单碱含量

Fig. 3 The content of quinolizidine alkaloids from callus of *Sophora alopecuroides* L.

2.2 线性关系考察

考察 5 种单碱标准品标准曲线的线性关系, R^2 值均在 0.999 9 及以上,表明氧化槐果碱浓度在 $0.1 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱浓度在 $0.002 \sim 2.000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,峰面积线性关系良好。

表 1 标准曲线

名称 Name	回归方程 Regression equation	相关系数 R^2 Correlation index	线性范围 Linear range /($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
氧化槐果碱 Oxysophocarpine	$y=2\,325.6x+59.677$	1.000 0	0.1~4.0
氧化苦参碱 Oxymatrine	$y=2\,006.4x+13.659$	0.999 9	0.002~2.000
槐定碱 Sophoridine	$y=1\,960.1x+12.584$	0.999 9	0.002~2.000
槐果碱 Sophocarpine	$y=3\,478.1x+20.988$	0.999 9	0.002~2.000
苦参碱 Matrine	$y=2\,920.0x+24.824$	0.999 9	0.008~2.000

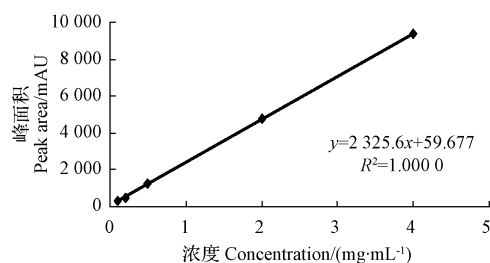


图 4 氧化槐果碱标准曲线

Fig. 4 Standard curve of the oxysophocarpine

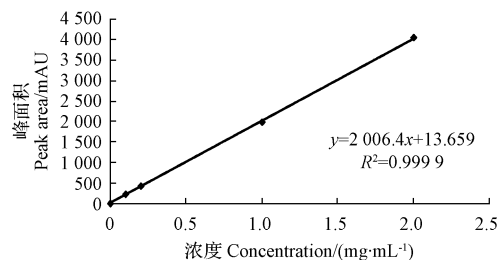


图 5 氧化苦参碱标准曲线

Fig. 5 Standard curve of the oxymatrine

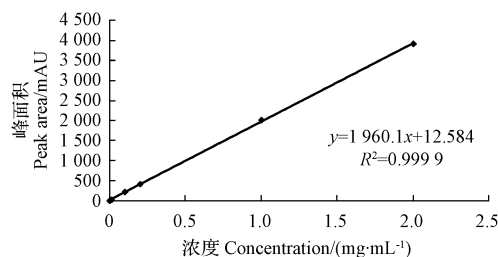


图 6 槐定碱标准曲线

Fig. 6 Standard curve of the sophoridine

2.3 精密度试验

分别精密吸取混合对照品溶液,按上述色谱条件重

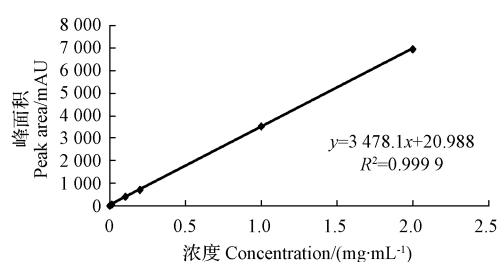


图7 槐果碱标准曲线

Fig. 7 Standard curve of the sophocarpine

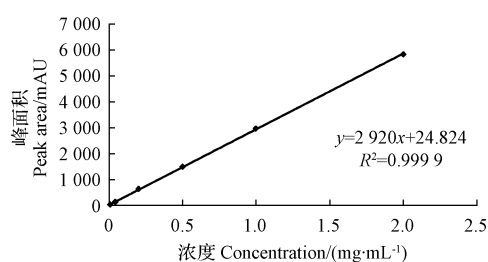


图8 苦参碱标准曲线

Fig. 8 Standard curve of the matrine

复进样6次,进样量为10 μL ,由表2可以看出,氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱峰面积积分值的RSD分别为0.79%、0.75%、1.00%、0.51%、0.97%,表明仪器精密度良好。

表2 5种生物碱标准样精密性试验

Table 2 Five kinds of alkaloids standard sample precision test

测定组分	单次测定值			平均值	相对标准偏差
Determination of composition	Single measured value			Average	RSD/%
氧化槐果碱	837.33	829.84	835.18	835.775 0	0.79
Oxysophocarpine	826.99	840.47	844.84		
氧化苦参碱	773.31	765.97	781.82		
Oxymatrine	770.01	778.69	771.36	773.526 7	0.75
槐定碱	730.88	721.19	727.87		
Sophoridine	736.98	734.77	742.09		
槐果碱	1 958.78	1 965.11	1 966.24	1 958.422 0	0.51
Sophocarpine	1 945.93	1 946.28	1 968.19		
苦参碱	1 122.33	1 123.37	1 113.87		
Matrine	1 146.50	1 128.04	1 130.25	1 127.393 0	0.97

2.4 重复性试验

精密称取苦豆子愈伤组织6份,按照1.2.4的方法制备样品溶液,进样测定,结果氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱峰面积积分值的RSD分别为1.4%、1.9%、1.8%、1.8%、1.2%。

2.5 稳定性试验

精密称取苦豆子愈伤组织1份,按照1.2.4的方法制备样品溶液,按上述色谱条件分别于0、4、8、12、16、24 h进样测定,结果氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱峰面积积分值的RSD分别为1.0%、1.1%、

1.0%、1.7%、1.5%,说明测定样品在24 h内稳定性良好。

2.6 加样回收率试验

取已知浓度的苦豆子总碱样品9份,精密称量每份30 mg,分别加入浓度为2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱对照品溶液,使对照品的加入体积分别为5、10、15 μL ,按照1.2.4的方法制备样品溶液,每组样品3份,用0.45 μm 微孔滤膜过滤,按上述色谱条件进样分析,进样量为10 μL ,测定回收率。结果氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱、槐果碱和苦参碱的平均回收率($n=9$)分别为101.28%、99.47%、97.28%、99.82%、98.85%。

2.7 分析方法的优化

2.7.1 检测波长的选择 UV-2450紫外-可见光光度计测定苦豆子总碱的最大吸收波长为216 nm,确定检测波长为216 nm时分析的灵敏度高、干扰少,经样品实际测定,谱图图形良好。

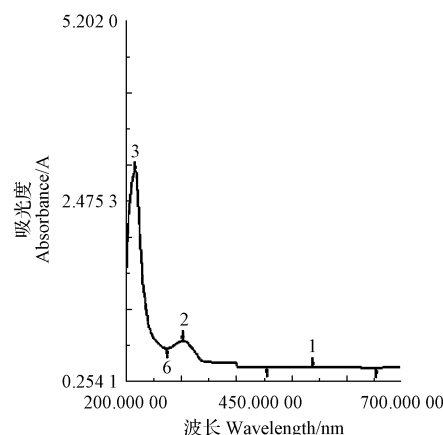


图9 苦豆子总碱吸收波长图

Fig. 9 Total alkaloid absorption wavelength of

Sophora alopecuroides L.

2.7.2 流动相选择 经样品实际分析,必须增加流动相中磷酸缓冲液的比例,以使杂质峰达到基线分离,加入微量三乙胺,可使生物碱待测峰减少拖尾、改善峰形,利于准确定量。经试验优化,得到磷酸缓冲液和甲醇体积比为50:50时分离效果最理想。

2.7.3 柱温的选择 适当的提高柱温,可适当的减小流动相粘度,降低柱压,提高柱效,改善分离的选择性,而并不影响柱寿命。该试验采用35 $^{\circ}\text{C}$ 柱温在样品实际分析中可改善分离效果,得到的色谱图分离情况良好。

3 讨论

该试验在HPLC流动相的选择过程中,采用乙腈-0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(2.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙胺)进行

梯度洗脱,出现拖尾和基线不稳定的现象;采用乙腈-磷酸盐缓冲液-无水乙醇(8:1:1,V/V)流动相,只得到洗脱溶剂峰;采用磷酸盐缓冲液-甲醇(22:78,V/V)的流动相比比例,结果不能完全将5种单碱分离,且峰高不明显,同样洗脱初期杂峰较多;经流动相比比例摸索后得到磷酸盐缓冲液-甲醇(50:50,V/V)作为流动相的洗脱效果最佳。适当提高柱温,有利于槐果碱和苦参碱的分离,故采用柱温35℃检测。比较不同波长下的吸收峰面积,216 nm下的峰面积较大且稳定,故选择216 nm作为检测波长。

试验利用HPLC测定苦豆子不同继代愈伤组织中5种生物单碱的含量,氧化槐果碱和槐定碱在愈伤组织继代培养第4代时含量相对较高,分别为 $1.2056 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.1165 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,氧化苦参碱、槐果碱、苦参碱的含量略有波动,大致呈下降趋势。因此,综合考虑愈伤组织疏松程度、生长量、稳定性及药用成分含量,可选择第4代或第5代愈伤组织作为细胞悬浮培养的接种材料,这与杨春霞等^[12]的结论一致。并且,在后续的细胞悬浮培养研究中,可采取适当的措施来增加药用成分含量,为通过细胞培养来大规模生产药用成分提供技术支撑。

参考文献

- [1] 耿革霞,孙英华,向柏,等. HPLC法同时测定苦豆子总碱中槐定碱、苦参碱和槐果碱的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(5):671-677.
- [2] 赵文昌,宋丽军. 反向高效液相色谱法测定苦豆子总碱中槐定碱含量[J]. 中国药业,2011,2(3):15-16.
- [3] 高剑峰,蒋建军,潘晓亮. 苦豆子生物碱总的成分分析及提取工艺的研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版),1997,1(2):109.
- [4] 杨文远,杨宁莲,王天勇,等. HPLC法同时测定苦豆子中苦参碱和氧化苦参碱[J]. 宁夏大学学报,1996,17(4):13.
- [5] 宋玉琴,魏玉辉,武新安,等. RP-HPLC法测定苦豆子总碱注射液中槐定碱、苦参碱和槐果碱的含量[J]. 兰州大学学报(医学版),2007,33(4):24.
- [6] 乔华,王婷,梁莉,等. 苦豆子总碱注射液中苦参碱和槐果碱的含量测定[J]. 兰州大学学报(医版),2007,33(3):59.
- [7] 宋玉琴,魏玉辉,刘文静,等. HPLC法同时测定苦豆子乳膏中槐定碱、苦参碱和槐果碱的含量[J]. 中国药房,2008,19(24):1878.
- [8] 田菁,范欣成,李晓东,等. HPLC法定性定量分析苦豆草药材中多个生物碱成分[J]. 药物分析志,2010,30(5):810-813.
- [9] 马玲,王俊卿,田杰,等. HPLC同时测定苦豆草中7种生物碱的含量[J]. 中国中药志,2011,36(11):1483-1486.
- [10] 刘振龙,张丽,魏蕾初,等. HPLC同时测定苦豆子总碱中8种生物碱含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):142-145.
- [11] 饶品昌,刘贤旺. 苦豆子组织培养及有效成分分析[J]. 江西中医学院学报,1992,4(2):33.
- [12] 杨春霞,黄丽莉,章挺,等. 苦豆子愈伤组织培养及其药用成分含量测定[J]. 中国农学通报,2011,27(18):153-157.

Separation and Determination of Quinolizidine Alkaloids in Callus of *Sophora alopecuroides* L. by HPLC and Its System Optimization

GAO Yuan¹, LI Peng², ZHANG Qingchen³, XU Quanzhi¹, SUN Mudi¹, GU Peiwen¹

(1. Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. Chemical Engineering College, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 3. Pharmacy College, Shandong University, Jinan, Shandong 250100)

Abstract: Taking the callus of *Sophora alopecuroides* L. as the experimental materials, using the method of HPLC for the separation and determination of oxysophocarpine, oxymatrine, sophoridine, sophocarpine and matrine in callus of *Sophora alopecuroides* L., a chromatographic method for the separation and determination of five kinds of alkaloids from *Sophora alopecuroides* L. was established. The results showed that, chromatographic conditions, Ultimate® AQ-C18(4.6 $\mu\text{m} \times 250 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$); mobile phase, 0.01 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ phosphate buffer($\text{K}_2\text{HPO}_4 = 5.59 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.41 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.5)-methanol(50:50, V/V); UV detection at 216 nm; column temperature, 35℃; flow rate, 1.0 mL $\cdot \text{min}^{-1}$. There were five kinds of alkaloids in the callus of *Sophora alopecuroides* L.. The ingredients and contents of oxysophocarpine and oxymatrine were higher in subculture callus which were cultivated into stage 4. They were $1.2056 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and $0.1165 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, sophoridine, sophocarpine and sophocarpidine were fluctuated slightly and downtrended more or less as the time went by.

Keywords: callus of *Sophora alopecuroides* L.; HPLC; oxysophocarpine; oxymatrine; sophoridine; sophocarpine; matrine