

· 研究报告 ·

## 水母雪莲秋水仙碱含量测定中前处理方法研究

王莉<sup>1,2</sup>, 安黎哲<sup>1</sup>, 杨建<sup>2</sup>, 胡延萍<sup>2</sup>, 谢小龙<sup>2</sup>, 李毅<sup>2\*</sup>

(1. 中国科学院 寒区旱区环境与工程研究所, 甘肃 兰州 730000;

2. 中国科学院 西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008)

**[摘要]** 目的:筛选水母雪莲中秋水仙碱的最适提取方法。方法:采用不同浓度的 HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 预浸水母雪莲药材,再加入氯仿浸提秋水仙碱;以 HPLC 测定秋水仙碱含量。结果:测定结果显示 0.03 mol·L<sup>-1</sup> HCl 预浸处理的药材秋水仙碱的质量分数为 0.014 6%,显著高于其他处理。水母雪莲药材经不同时间(10, 20, 30, 40 min)超声波提取秋水仙碱, HPLC 测定结果差异不明显。但与氯仿浸提的结果相比较,超声波提取的供试液中秋水仙碱的含量要明显低。结论:水母雪莲药材经 0.03 mol·L<sup>-1</sup> HCl 预浸后再由氯仿浸提 12 h,可有效提取其中的秋水仙碱。

**[关键词]** 水母雪莲;秋水仙碱;HPLC;超声波提取

水母雪莲 *Saussurea medusa* Maxim. 是藏药中的名贵药材<sup>[1]</sup>。分布于西藏、云南、四川等地。其主要含有黄酮类、生物碱类、内酯类等成分<sup>[2-4]</sup>。水母雪莲中的生物碱类种类繁多,其中秋水仙碱具有多种药理作用,对癌症、原发性痛风有特异的作用<sup>[4-5]</sup>。秋水仙碱提取方法可分为水提法、稀酸提取法、有机溶剂提取法和超临界流体萃取法。在提取过程中对样品进行预处理有利于秋水仙碱的提取。王慧春等采用氨水预浸、氯仿提取的方法提取水母雪莲原植物和愈伤组织中生物碱,并检测出秋水仙碱<sup>[6]</sup>。本实验对样品进行不同预浸处理,比较不同预处理中秋水仙碱测定量的差异;研究不同提取方法对水母雪莲中秋水仙碱提取的影响,选出最适提取条件和测定条件。

### 1 材料

安捷伦 1100 型 HPLC 系统,包括:在线脱气泵,高压溶剂输送二元泵,柱温箱, DAD 检测器, Agilent 液相色谱工作站。秋水仙碱对照品(Signa 公司,批号 2005985)。HPLC 级甲醇(MERCK 公司),氯仿 AR 级、氨水 AR 级、HCl AR 级均购自天津精细化工有限公司。

水母雪莲样品:全草采自青海省祁连山。药材由中国科学院西北高原生物研究所卢学峰副研究员

鉴定,为凤毛菊属植物水母雪莲 *S. medusa* 植株。

### 2 方法与结果

**2.1 高效液相色谱条件** Zobax C8 柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。流动相甲醇(A)水(B)梯度洗脱:0~3 min, 30%~50%(A); 3~5 min, 50%~60%(A); 5~9 min, 60%~80%(A); 10 min, 80%(A); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 245 nm, 柱温 30。

**2.2 药材中秋水仙碱的提取** 称取水母雪莲药材粉末约 33.00 mg, 于 2 mL 心管中, 分别加入 100 μL 25%~28%氨水(做为对照)、不同浓度的 HCl(0.01, 0.03, 0.05, 0.08, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 mol·L<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mol·L<sup>-1</sup>)对药材预浸润,每一处理做 5 个重复。加入 900 μL 的氯仿常温下浸提 12 h,取 500 μL 提取液置于新的离心管中,40 水浴蒸干,加入 300 μL 甲醇溶解,经 0.45 μm 的滤膜过滤,取滤液用于 HPLC 检测,见表 1。

称取水母雪莲药材粉末约 33.00 mg, 于 2 mL 心管中,加入 100 μL, 0.03 mol·L<sup>-1</sup> HCl 浸润药材粉末,加入 900 μL 氯仿后分别进行浸提 12 h 和超声波(功率 70 W, 频率 40 Hz)提取,每一处理做 5 个重复。超声处理时间分别为 10, 20, 30, 40 min, 之后取 500 μL 提取液置于新的离心管中,40 水浴蒸干,加入 300 μL 甲醇溶解,经 0.45 μm 的滤膜过滤,取滤液用于 HPLC 检测见表 2。

**2.3 线性关系考察** 精密称取秋水仙碱对照品,用甲醇,配成含秋水仙碱 0.052 0 g·L<sup>-1</sup> 对照品溶液。

**[收稿日期]** 2008-11-25

**[基金项目]** 国家“十一五”科技支撑计划(2007BAD64B04)

**[通信作者]** \*李毅, Tel: (0971) 6101454, E-mail: liyi@nwjph.ac.cn

表 1 不同浓度 HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 前处理对秋水仙碱含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

浓度 / mol · L <sup>-1</sup>	样品量 / mg	秋水仙碱 / %
HC10.01	33.00	0.012 5 ± 0.001 5 <sup>ab</sup>
HC10.03	33.00	0.014 6 ± 0.001 2 <sup>a</sup>
HC10.05	31.72	0.011 5 ± 0.001 9 <sup>b</sup>
HC10.08	31.00	0.011 0 ± 0.001 6 <sup>b</sup>
HC10.10	33.00	0.008 0 ± 0.001 0 <sup>c</sup>
HC10.30	34.00	0.003 7 ± 0.001 9 <sup>d</sup>
HC10.50	32.00	0.001 6 ± 0.000 8 <sup>d</sup>
HC10.80	31.00	0.001 6 ± 0.000 4 <sup>d</sup>
HC11.00	35.33	0.002 1 ± 0.001 1 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.10	31.00	0.002 1 ± 0.001 2 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.20	32.00	0.002 5 ± 0.000 5 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.30	31.00	0.002 6 ± 0.002 1 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.40	34.33	0.001 5 ± 0.000 8 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.50	32.74	-

注:每列中不同字母代表在  $P < 0.05$  水平上差异显著。

表 2 超声波处理时间对秋水仙碱含量的影响

处理时间 / min	样品量 / mg	秋水仙碱 / %
10	32.67	0.009 0 ± 0.000 3 <sup>c</sup>
20	33.33	0.009 7 ± 0.000 6 <sup>bc</sup>
30	33.33	0.010 9 ± 0.001 6 <sup>b</sup>
40	33.67	0.010 5 ± 0.001 5 <sup>b</sup>
对照	33.33	0.014 5 ± 0.003 0 <sup>a</sup>

注:每列中不同字母代表在  $P < 0.05$  水平上差异显著;对照表示氯仿浸提 12 h。

逐级稀释成 6 个浓度梯度的对照品溶液。分别取 10 μL 进样,以进样量为横坐标,各自的峰面积为纵坐标进行线性回归,回归方程为  $Y = 150 85.688 7X + 2.227 970 1$ ,  $r = 0.999 9$ ,结果表明秋水仙碱进样在 0.005 324 8 ~ 0.52 μg 与峰面积呈良好的线性关系。

**2.4 精密度试验** 精密吸取秋水仙碱对照品溶液,按 2.1 所述色谱条件重复进样 5 次,每次进样量均为 10 μL,测定峰面积。秋水仙碱峰面积的 RSD 2.0%,表明精密度良好。

**2.5 重复性试验** 精密称取同一批样品,加入 100 μL 0.03 mol · L<sup>-1</sup> HCl 溶液浸润,再加入氯仿浸提 12 h,分别制备 5 份供试品溶液。精密吸取供试品溶液 10 μL,按照色谱条件进行分析。依据峰面积测定秋水仙碱质量分数为 0.0145%,RSD 2.4%。

**2.6 稳定性试验** 取同一份供试品溶液,分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 测定,测得的峰面积变化不明显,RSD 0.92%,表明在室温、避光条件下供试品溶液 24 h 内稳定。

**2.7 回收率试验** 精密称取已测知秋水仙碱含量的样品 5 份,分别精密加入一定量的对照品,按 2.2

所述方法加入 100 μL 0.03 mol · L<sup>-1</sup> HCl 溶液浸润,经氯仿浸提 12 h 制备供试液。按 2.1 所述色谱条件进样分析。计算回收率秋水仙碱的平均回收率为 98%,RSD 1.8%。

**2.8 不同处理中秋水仙碱含量检测** 吸取不同供试溶液 10 μL 分别进样,按 2.1 中色谱条件进行测定。根据峰面积按外标法计算含量,不同样品中秋水仙碱含量结果见表 1, 2。

### 3 讨论

水母雪莲药材经氨水和不同浓度的 HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 预浸处理,用氯仿进行萃取。提取液经 HPLC 的检测,方差分析结果显示不同处理间差异显著 ( $F = 39.273$ ,  $P < 0.05$ )。0.5 mol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 预处理的样品的提取液中未检测到秋水仙碱,而样品经 0.01 ~ 0.08 mol · L<sup>-1</sup> HCl 预浸其提取液中秋水仙碱的含量明显高于 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 处理的样品,也显著高于氨水前处理的样品中秋水仙碱的含量 (0.002 3 ± 0.001 4)%。药材经 0.03 mol · L<sup>-1</sup> HCl 预处理后,提取液中秋水仙碱含量最高为 (0.014 6 ± 0.001 2)%。在本研究中水母雪莲药材用稀盐酸 (0.03 mol · L<sup>-1</sup>) 进行前处理后,经氯仿浸提能有效提取秋水仙碱。

水母雪莲药材粉未经 0.03 mol · L<sup>-1</sup> HCl 预浸,加入氯仿进行超声波提取。超声波处理时间对提取液中秋水仙碱含量无明显影响,其中超声处理 30 min 秋水仙碱的含量相对高一些。但与对照 (氯仿浸提 12 h) 相比差异显著,超声波提取方法中提取液中秋水仙碱的含量要明显低很多。

在此试验中所采用的梯度洗脱条件,能够方便、快简的测定水母雪莲中秋水仙碱的含量。

#### 【参考文献】

- [1] 李君山,朱兆仪,蔡少青. 雪莲花类商品药材调查 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25 (8): 461.
- [2] 李菁,候苑茗,葛发欢. 水母雪莲花超临界萃取物化学成分研究 [J]. 中药材, 2002, 25 (10): 718.
- [3] Fan Chengqi, Yue Jianmin. Biologically active phenols from *Saussurea medusa* [J]. Bioorg Med Chem, 2003, 11: 703.
- [4] Duan Hongquan, Takaishi Y, Momota H, et al. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa* [J]. Phytochemistry, 2002, 59: 85.
- [5] Takasaki M, Konoshima T, Komatsu K, et al. Anti-tumor promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa* [J]. Cancer Lett, 2000, 158: 53.
- [6] 王慧春,李毅,王环,等. 光照对水母雪莲愈伤组织合成生物碱的影响 [J]. 西北植物学报, 2002, 22 (1): 69.

【责任编辑 周驰】