

# 应用分光光度法、薄层扫描及高效液相色谱法进行药根碱的定量分析

卢大炎 冯明鸿 李新明 侯嵩生

(中国科学院武汉植物研究所)

**提 要** 本工作比较考察了用分光光度法、薄层扫描和高效液相色谱定量测定药根碱 (Jatrorrhizine) 的三种分析方法。对于九连小檗 (*Berberis julianae* Schneid) 细胞培养物的抽提液, 其药根碱的含量可直接用分光光度法在波长 430nm 处进行测定, 也可经薄层层析后用 450nm 波长进行反射吸收扫描定量, 还可用高效液相色谱 ODS 反相柱经磷酸-乙腈体系洗脱, 用 346nm 波长进行检测。三种方法均可得到良好的分析结果。

**关键词** 药根碱; 分光光度法; 薄层扫描法; 高效液相色谱法; 九连小檗

在植物细胞培养与次生代谢研究中, 如何快速、准确地测定细胞培养物中化学物质的含量, 是研究工作中的一个重要部分。在原小檗类型生物碱的测定方面, 已有文献报道了对天然药物中含量较高的小檗碱的测定方法, 对含量较低的药根碱的测定仅作为属的分析对象, 诸如薄层法, <sup>[1,2,3]</sup> 高效液相色谱法<sup>[4]</sup> 均未对其单一成份的含量测定作过专一报道。我们曾报道过从九连小檗细胞培养物中提取分离和鉴定了药根碱<sup>[5]</sup>。为了对大批量样品中的药根碱进行快速分析, 随时监测培养物中药根碱含量的变化, 本工作建立了测定九连小檗植物细胞培养物中药根碱的分光光度法, 并与薄层扫描法, 高效液相色谱法的实验结果进行了分析比较, 以期根据不同的实验室条件选择相应的分析方法。

## 实 验 部 分

**1. 标准样品的制备** 精确称取重结晶的盐酸药根碱 10mg, 以甲醇溶解定容至 10ml 摇匀, 并用 Parafilm 密封存于冰箱内备用。

**2. 样品的制备** 取培养天数不同的九连小檗悬浮细胞经干燥后精确称取 50mg, 用甲醇于索氏提取器中提取, 配成 1 ml 含样品 1 mg 的待测试液。

**3. 定量波长的选择** 取两份 10mg 重结晶盐酸药根碱分别溶解在 10ml 甲醇或 10ml 含有 0.02M 磷酸的 28% 乙腈溶液中, 再以同样溶剂稀释成每 ml 含 0.01mg 盐酸药根碱的溶液。然后测定盐酸药根碱在这两种不同溶剂中的紫外—可见区域的吸收光谱以及盐酸药根碱在硅胶薄层板上的反射扫描吸收光谱, 见图 1。

用甲醇作溶剂进行分光光度法定量的波长选择在 430nm, 用 0.02M 磷酸的 28% 乙腈作流动相进行高效液相色谱法定量的波长选择在 346nm。经薄层层析后盐酸药根碱的

扫描光谱最大吸收值在 450nm。

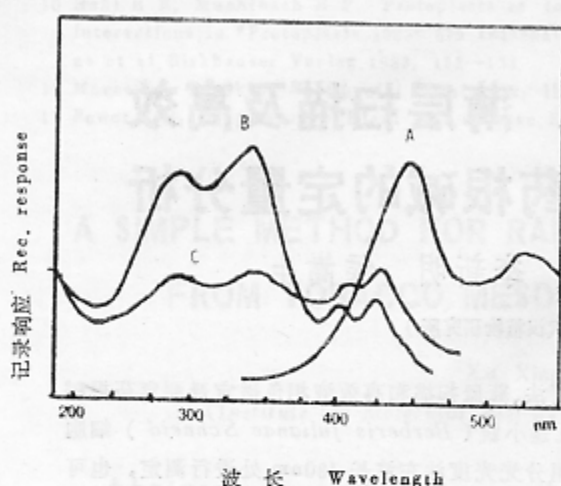


图1 盐酸药根碱在不同溶剂和背景中的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectrum of jatrorrhizine hydrochloride in different solvent and back-ground

A: 硅胶板 Silica gel plate

B: 0.02M  $H_3PO_4$  :  $CH_3CN$  (72:28)

C: MeOH

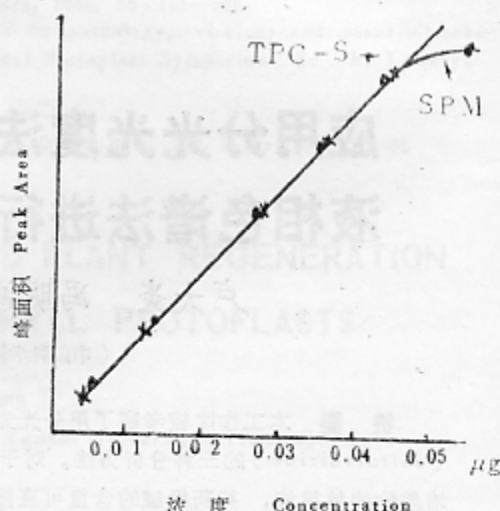


图2 盐酸药根碱的分光光度法和薄层扫描的工作曲线

Fig. 2 Jatrorrhizine hydrochloride working curves of spectrophotometry and TLC-scanning

#### 4. 仪器与条件

##### (1) 分光光度法

7520型分光光度计(上海第二分析仪器厂), 吸收池厚度1 cm, 以甲醇作为空白零点, 吸收波长为430nm, 室温。

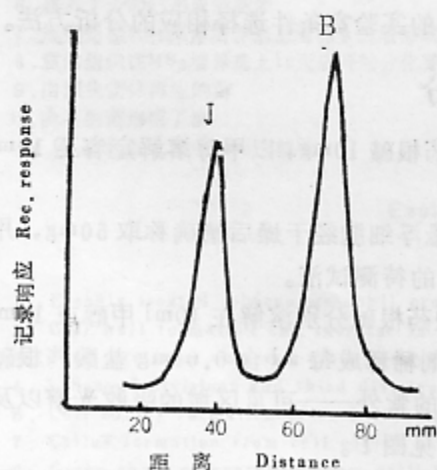


图3 薄层扫描图

Fig. 3 TLC-scanning chromatogram

J: 药根碱 Jatrorrhizine B: 小檗碱 Berberine

工作曲线的制作: 将上述标样用甲醇稀释成每毫升含盐酸药根碱0.005mg, 0.01mg, 0.015mg和0.1mg等不同浓度的溶液, 测定其吸收值, 重复三次。以标样浓度为横坐标, 吸收值为纵坐标作工作曲线。(图2)

##### (2) 薄层法

薄层板的制作: 硅胶为 Kieselgel 60G (E Merck, darmstadt 西德), 加入0.5%的CMC, 研匀后制成薄层厚度为0.25mm的20×5 cm的预制板, 室温阴干后在110℃活化1小时, 存于干燥器中备用。

标准曲线的制作: 用2µl定量毛细管(Drummond Scientific Co. 美国), 将0.01mg/ml—0.5mg/ml的标准样品按顺序点5个点,

平行三板。样品以同样方式每两点之间点一标样,然后上行展谱。展开剂用甲醇-异丙醇-甲酸乙酯-氯仿(9:4:10:5),展距10cm,室温。

薄层扫描:岛津CS-930双波长薄层扫描仪,狭缝:1×1,线性参数SX=3,灵敏度:×2,扫描宽度7mm,Y=4,用450nm波长进行反射吸收锯齿形扫描。扫描色谱图见图3,所得工作曲线见图2。

样品中药根碱的百分含量按下式计算<sup>[6]</sup>:

$$C\% = \frac{F_1 A_{\text{样}} + F_2}{W} \times 100\%$$

$$\text{式中 } F_1 = \frac{M_1 - M_2}{A_{\text{标1}} - A_{\text{标2}}}$$

$$F_2 = \frac{1}{2}(M_1 + M_2) -$$

$$\frac{1}{2}F_1(A_{\text{标1}} + A_{\text{标2}})$$

A:峰面积

M<sub>1</sub>:标样1的重量

M<sub>2</sub>:标样2的重量

W:样品重量

### (3) 高效液相色谱法

日立635A型液相色谱仪,具波长可变检测器,配日立834型数据处理机和Altex 210型定量进样阀,定量管为4.2μl。

色谱柱:Partisil PXS 10/25 ODS, 250×2.6mm。

流动相采用0.02M磷酸溶液加入28%乙腈<sup>[3]</sup>,流速为1ml/min,室温。检测波长346nm。色谱图如图4所示,采用外标法计算结果。

## 5. 回收实验

精确配制已知量的药根碱盐酸盐加入到已测定过药根碱含量的样品中,按上述拟定的分析条件各重复三次测定其回收率,结果如表1。

## 6. 样品分析

为进一步验证方法的一致性和可靠性,取不同时期的九连小檗细胞培养物,分别对其药根碱的含量进行了分光光度,薄层扫描和高效液相色谱的测定,结果见表2。

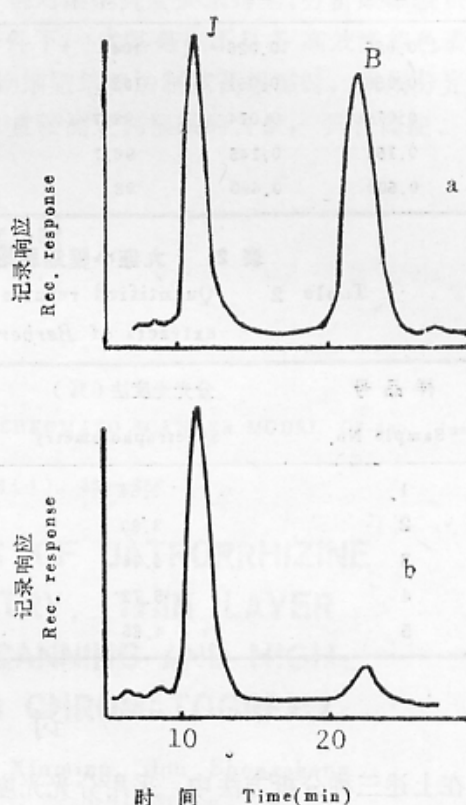


图4 高效液相色谱图

Fig. 4 HPLC chromatogram

J: 药根碱 Jatrorrhizine

B: 小檗碱 Berberine

a: 标样 standard

b: 样品 sample

表 1 三种分析方法所测得的盐酸药根碱的回收率  
Table 1 Recovery of jatrorrhizine hydrochloride determined by three analytical methods

| 加入量<br>Added amounts<br>mg | 分光光度法<br>Spectrophotometry    |                   | 薄层扫描法<br>TLC-scanning         |                   | 高效液相色谱法<br>H P L C            |                   |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
|                            | 检测量<br>Detected amounts<br>mg | 回收率<br>Recovery % | 检测量<br>Detected amounts<br>mg | 回收率<br>Recovery % | 检测量<br>Detected amounts<br>mg | 回收率<br>Recovery % |
| 0.025                      | 0.026                         | 104               | 0.024                         | 96                | 0.025                         | 100               |
| 0.050                      | 0.051                         | 102               | 0.053                         | 106               | 0.051                         | 102               |
| 0.075                      | 0.074                         | 98.7              | 0.072                         | 96                | 0.074                         | 98.7              |
| 0.150                      | 0.146                         | 96.7              | 0.147                         | 98                | 0.148                         | 98.7              |
| 0.500                      | 0.490                         | 98                | 0.492                         | 98.4              | 0.503                         | 100.6             |

表 2 九连小檗细胞培养物中药根碱的定量结果  
Table 2 Quantified results of jatrorrhizine in cell cultural extracts of *Berberis julianae* Schneid

| 样品号<br>Sample No. | 分光光度法 (%)<br>Spectrophotometry | 薄层扫描法 (%)<br>TLC-scanning | 液相色谱法 (%)<br>H P L C |
|-------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------|
| 1                 | 3.54                           | 3.04                      | 3.44                 |
| 2                 | 3.80                           | 3.87                      | 4.09                 |
| 3                 | 4.76                           | 4.69                      | 4.60                 |
| 4                 | 5.72                           | 5.86                      | 5.67                 |
| 5                 | 4.66                           | 4.63                      | 4.39                 |

## 讨 论

在上述三种分析方法中,采用分光光度法定量时,药根碱的浓度与吸收值的线性范围在  $1\mu\text{g/ml}$ — $132\mu\text{g/ml}$  之间。采用薄层扫描法,以药根碱斑点的面积分值为纵座标,并以其点样量为横座标,所得到的工作曲线的线性范围在  $0.01\mu\text{g}$ — $5\mu\text{g}$  之间。图 2 说明:当薄层层析的标样浓度在  $0.01\mu\text{g}$ — $1\mu\text{g}$  之间时,所测得的工作曲线与分光光度法所测得的工作曲线均可通过原点。经高效液相色谱所测的药根碱的线性范围在  $0.002\mu\text{g}$ — $0.5\mu\text{g}$  之间,就灵敏度而论,高效液相色谱法高于前二者的 2—10 倍。

由表 1 可以看出:三种分析方法所测不同加入量的药根碱的回收率均无较大差异,其重复性以高效液相色谱法最优。

由于九连小檗细胞培养物中含有大约占药根碱 5—10% 的小檗碱,从样品结果分析中(表 2)可以看出:分光光度法所测得的药根碱的含量多数略高于其它两种方法所测的结果。薄层扫描法与高效液相色谱法所测的结果相比也有类似倾向,但相互之间的平均误差小于 5%,在九连小檗细胞培养过程中,对于监测药根碱的含量变化并无明显影



响。

采用薄层扫描法,本展开系统溶剂毒性小,可使药根碱在10cm展距内与其它生物碱完全分离,且斑点集中,不需显色,扫描峰形对称。实验证明:当薄层的标样浓度超过1—5 $\mu\text{g}$ 时,其线性回归方程为 $y = (1.419x + 1.7) \times 10^4$ ,所以采用两点外标法定量结果更为精确。同一批制板,其板间差异较小。

较之分光光度法和薄层扫描法,采用高效液相色谱法既分离了样品中少量的小檗碱和其它杂质的干扰,同时又避免了采用薄层层析而产生的背底噪音,因而基线平稳,重复性和精确性更优于前二者,样品用量也少。但对溶剂纯度要求苛刻,分析成本较贵。

经比较不难看出,在一般实验室的分析条件下,尤其是在不具备高效液相色谱仪时,对以药根碱为主要成分的样品,或应用植物细胞培养法制取药根碱时,采用分光光度法,可不经预先纯化分离而以甲醇的抽提液直接测定药根碱的含量,具有简便、快速、节俭的优点,而且可以获得良好的重现性。

### 参 考 文 献

- 1 王慕邹等. 药物分析杂志, 1984; 4(1): 12—14
- 2 陈碧珠等. 药学通报, 1980; 15: 295—297
- 3 周元瑞等. 药物分析杂志, 1984; 4(3): 131—133
- 4 侯嵩生等. 植物学报, 1988; 8(1): 70—73
- 5 陆蕴如等. 药物分析杂志, 1985; 5(5): 290—292
- 6 SHIMADZU DUAL-WAVELENGTH THIN-LAYER CHROMATO SCANNER MODEL CS-930, instruction manual, 73
- 7 Tetsuo Misak et al. Chem Pharm Bull, 1982; 30(1): 354—357

## QUANTITATIVE ANALYSIS OF JATRORRHIZINE BY SPECTROPHOTOMETRY, THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC SCANNING AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRPHY

Lu Dayan, Feng Minghong, Li Xinming, Hou Shongsheng  
(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica)

**Abstract** In this paper, three methods for determination of jatrorrhizine are reported and compared with each other by spectrophotometry, TLC-scanning and RP-HPLC. For the *Berberis julianae* Schneid cell cultural extracts, jatrorrhizine can be determined directly by spectrophotometry at wavelength 430 nm. The sample can also be determined by reflective absorption scanning at wavelength 450nm after developed on TLC plate, or it can be injected into HPLC on ODS revers phase column and adopted phosphoric acid-acetonitrile system as mobile phase, detection at 346nm. The excellent results obtained with any one of these methods were in good accord with each other.

**Key words** Jatrorrhizine, Spectrophotometry, TLC-scanning, HPLC, *Berberis julianae* Schneid