

## RP-HPLC 法测定长春花细胞中吲哚生物碱含量

张向飞 王淑芳 吕宪禹

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

**摘要** 本文采用二元流动相,280nm 单波长检测的 RP-HPLC 法测定长春花(*Catharanthus roseus*)细胞中长春质碱、阿玛碱含量,方法简单,结果准确、可靠。

**关键词** RP-HPLC 法 长春花 长春质碱 阿玛碱

长春花(*Catharanthus roseus*)是夹竹桃科一种重要的药用植物,中医临床以全草入药,有镇静安神、平肝降压等作用<sup>1</sup>。长春花中所含吲哚生物碱多达 100 多种,并且多数具有生物活性,但这也给吲哚生物碱的分离和测定工作带来很大困难。目前长春花细胞中吲哚生物碱的分析方法有薄层扫描法<sup>2</sup>、放射免疫法<sup>3</sup>和高效液相色谱法<sup>4,5</sup>等。高效液相色谱法国外应用较多,但多用梯度洗脱,对设备仪器要求高。本研究在上述方法的基础上进行改进,采用二元流动相,280nm 单波长检测的反相高效液相色谱法,测定长春花细胞中长春质碱、阿玛碱的含量,方法简单,结果准确、可靠。

### 1 材料与试剂

#### 1.1 仪器

日本岛津 LC-4A 高效液相色谱仪;SPD-2AS 紫外检测仪;Anaster 色谱数据工作站。

#### 1.2 药品与试剂

长春质碱标品由上海康爱生物制品有限公司提供,阿玛碱标品为 Sigma 产品。RP-HPLC 用甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为去离子水,RP-HPLC 流动相经 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤,超声脱气后使用。

### 2 方法

#### 2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil ODS C18(250mm $\times$ 4.6mm, i. d.:7 $\mu$ );流动相:甲醇-0.005mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH7.0),V/V=70/30;流速 1.0mL/min;检测波长 280nm;柱温 28 $^\circ\text{C}$ ;进样量 5 $\mu$ L。

#### 2.2 标准储备液的配制

精密称取长春质碱、阿玛碱标品各 5.0mg,用色谱纯甲醇配制成 1mg/L 的储备液,低温避光保存。

#### 2.3 吲哚生物碱分析

按王宁宁<sup>6</sup>方法提取吲哚总碱,然后将吲哚总碱用甲醇定容至 1mL,过 0.22 $\mu$ m 滤膜,按前述(2.1)色谱条件进行分析,以峰面积外标法定量。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 标准曲线及线性关系

用标准储备液配制适当浓度的系列标准液,按上述色谱条件进样分析( $n=5$ ),以峰面积和吲哚生物碱浓度(mg/L)进行回归,得长春质碱和阿玛碱的回归方程分别为  $Y=8560X-113.78$ ,  $r=0.9992$ ;  $Y=8031X-528.2$ ,  $r=0.9993$ 。结果表明,在 0.05~15mg/L 范围内,长春质碱和阿玛碱均有良好的线性关系。

#### 3.2 精密度和稳定性试验

取标准品溶液,日内连续进样 5 次,测定相应的峰面积,计算日内 RSD 值( $n=5$ );3 天内间隔进样,计算日间 RSD 值( $n=5$ ),结果见表 1,说明样品在 3 天内基本稳定。

#### 3.3 回收率试验

取同一批样品,精确称取 5 份,每份 5.00g,其中 2 份分别加入长春质碱和阿玛碱各 0.2mg,另 3 份为对照,按前文(2.3)的方法提取和测定,计算回收率( $n=5$ )(见表 1)。

表 1 吲哚生物碱的回收率和精密度

| 吲哚生物碱 | 平均回收率/% | 回收率 RSD/% | 日内 RSD/% | 日间 RSD/% |
|-------|---------|-----------|----------|----------|
| 长春质碱  | 94.38   | 0.98      | 0.93     | 2.13     |
| 阿玛碱   | 95.14   | 0.87      | 1.32     | 2.92     |

#### 3.4 吲哚生物碱分析结果

取液体培养的长春花细胞,按 2.1 所述色谱条件及 2.3 所述方法,对其长春质碱和阿玛碱含量的动态变化进行分析(见图 1),标准品及样品的色谱图(见图 2)

\*基金项目:天津市自然科学基金资助项目(013609211)

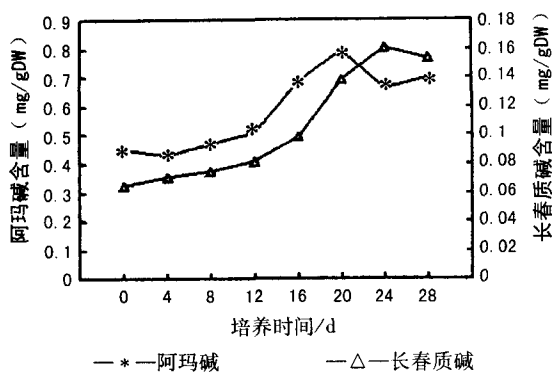


图1 长春花细胞中吲哚生物碱积累的动态变化

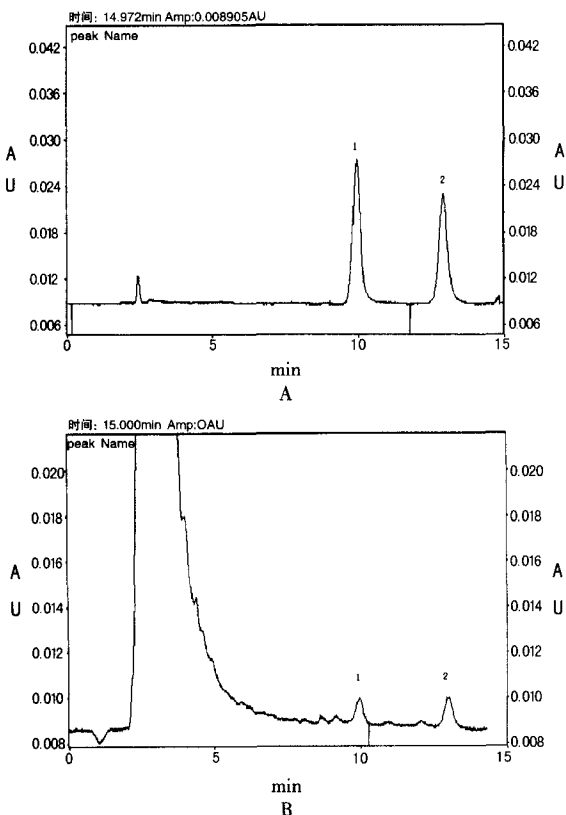


图2 吲哚生物碱标准品(A)及样品(B)的色谱图  
1号峰:长春质碱;2号峰:阿玛碱

### 3.5 讨论

在筛选流动相时试用多种溶剂系统,结果表明,采用甲醇-0.005mol/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (pH7.0), V/V = 70/30

为流动相时,长春质碱和阿玛碱的分离效果最好,保留时间也最适宜。以往的 HPLC 条件常采用 50% 左右的甲醇,分析时间较长,本实验采用 70% 的甲醇,使分析时间缩短至 10min 左右;适量磷酸盐的加入,使峰形有较好的改善。流动相的 pH 值是分离效果好坏的重要条件,实验证明,pH 值中性,分离效果最理想,pH 值偏酸会使保留时间延长,偏碱使得阿玛碱和长春质碱不能与干扰峰很好的分开。

从吲哚生物碱积累的动态变化图(见图1)可以看出:阿玛碱、长春质碱含量在培养过程中不断增加,尤其在培养的后阶段,增加显著。20 天阿玛碱含量达到最大值 0.796mg/gDW,24 天左右长春质碱也达到最大产量 0.161mg/gDW。在培养的前期阶段,吲哚生物碱含量增加缓慢,因为这段时期愈伤细胞以增殖和生长为主,次生代谢水平较低。

### 参考文献

- 1 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985
- 2 Tam MN, Nikolova Damyanora B, Pyuskyuler B. Quantitative thin layer chromatography of indole alkaloids II. catharanthine and indole [J]. Lip Chromatogr, 1995, 818 ~ 849
- 3 Arens H, Stockigt J, Weiler EW, et al. Radioimmunoassays for the determination of the indoalkaloids ajmalicine and serpentine in plants [J]. Planta Med. , 1978, 34 ~ 37
- 4 Naranlanti T, Nordstrom M, Huhtikangas A. Determination of Catharanthus alkaloids by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. Chromatogr, 1987, 410 ~ 488
- 5 Zhao J, Zhu WH, Wu YQ, et al. Determination of indole alkaloids in Catharanthus roseus tissue and cell cultures by RP-HPLC [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1999, 34 (7): 539 ~ 542
- 6 王宁宁,王淑芳,田俊英等. 土壤农杆菌转化的长春花冠瘿细胞培养[J], 生物工程学报, 1994, 10(3): 244 ~ 249

## Determination of indole alkaloids in catharanthus roseus cell by RP-HPLC

Zhang Xiangfei Wang Shufang Lv Xianyu

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract** Set up a method to determine the indole alkaloids ajmalicine and catharanthine in Catharanthus roseus by RP-HPLC with a binary solvent system. The detection wavelength is 280 nm. The method is a simple, available method with a good precision to determine the ajmalicine and catharanthine.

**Key words** RP-HPLC Catharanthus roseus Catharanthine Ajmalicine