

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.03.021

杜次,彭清忠,田向荣,等. 湘西蛇足石杉中石杉碱甲、乙和丙含量的测定[J]. 广西植物, 2013, 33(3):406—409

Du C, Peng QZ, Tian XR, et al. Determination of huperzine A, B and C in *Huperzia serrata* from western Hunan by HPLC[J]. Guihaia, 2013, 33(3):406—409

湘西蛇足石杉中石杉碱甲、乙和丙含量的测定

杜次^{1,2}, 彭清忠^{1,2}, 田向荣^{1,2}, 朱越^{1,2}, 李菁^{1,2}(1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000; 2. 植物资源保护与利用
湖南省高校重点实验室, 湖南 吉首 416000)

摘要: 采用超声萃取法提取湘西蛇足石杉总生物碱,用高效液相色谱法同时测定其石杉碱甲、乙和丙含量,并分析其在植株不同部位的分布。结果表明:湘西4个样地蛇足石杉中石杉碱甲、乙和丙含量基本一致,分别达到0.5‰、0.3‰和0.04‰;但植株不同部位三种石杉碱含量差异显著,其中石杉碱甲和乙的分布均为叶>茎>根,石杉碱丙则是根大于叶和茎。由此可知,湘西蛇足石杉具有资源优势,石杉碱在植株的分布具有明显的部位选择性;采用HPLC可同时检测石杉碱甲、乙和丙,方法简单快速、准确可靠。

关键词: 蛇足石杉; 石杉碱甲; 石杉碱乙; 石杉碱丙; 高效液相色谱法

中图分类号: Q946.88 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013)03-0406-04

Determination of huperzine A, B and C in *Huperzia serrata* from western Hunan by HPLC

DU Ci^{1,2}, PENG Qing-Zhong^{1,2}, TIAN Xiang-Rong^{1,2}, ZHU Yue^{1,2}, LI Jing^{1,2*}

(1. College of Biology and Environmental Sciences Jishou University, Jishou 416000, China; 2. Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Utilization, Colleges and Universities of Hunan Province, Jishou 416000, China)

Abstract: For determining the contents of huperzine A, B and C in the whole herb and different parts of *Huperzia serrata* from western Hunan, total alkaloids of samples were extracted by ultrasound with 2% tartaric acid and then analyzed by HPLC, in which chromatographic column was Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), mobile phase was methanol-0.08 mol/L CH₃COONH₄, flow speed 1 mL/min, column temperature 25 °C and detection wavelength 308 nm. The results showed that the contents of huperzine A, huperzine B and huperzine C in *H. serrata* from 4 sample plots were similar, and up to 0.5‰, 0.3‰ and 0.04‰ respectively. The contents of huperzine A, B and C in the different parts of *H. serrata* had significant differences, in which the distribution of huperzine A and B was root<stem<leaf, but huperzine C was root>stem and leaf. In conclusion, there are superior resources of *H. serrata* for huperzine production in western Hunan, the distribution of huperzine in different parts of *H. serrata* had high selectivity, and the HPLC method to measure three kinds of huperzine simultaneously was simple, accurate and reliable.

Key words: *Huperzia serrata*; huperzine A; huperzine B; huperzine C; HPLC

蛇足石杉(*Huperzia serrata*)是石松类石松科石松属植物,作为传统中草药在我国民间已有上千年的用药历史,其所含石杉碱次生代谢物是一类高

效、可逆且具有选择性的乙酰胆碱酯酶(AchE)抑制剂(Ma et al., 2005, 2006)。临床实验证实石杉碱甲治疗重症肌无力和早老年性痴呆症疗效显著(Liu

收稿日期: 2012-12-09 修回日期: 2013-02-10

基金项目: 国家自然科学基金(31260081); 吉首大学研究生科研创新项目(Jdy12037)

作者简介: 杜次(1987-), 男, 湖南岳阳人, 硕士研究生, 主要从事植物生态学研究, (E-mail)dc2006sg@163.com。

*通讯作者: 李菁, 教授, 主要从事植物生理生态学研究, (E-mail)lkq@jsu.edu.cn。

et al., 1986; Ma *et al.*, 2007); 石杉碱乙抑制 AchE 活性为石杉碱甲的 1/10, 但其具有更长的活性持续时间, 因此能表现出更高的治疗指数(刘静等, 1999); 石杉碱丙作为一种新的 lycodine 型生物碱, 其 AchE 活性抑制能力接近石杉碱甲(Liu *et al.*, 1994)。近些年, 由于提取石杉碱甲高额利润的驱使, 对蛇足石杉地毯式采收使得该类植物锐减, 除了寻找生产石杉碱甲的新途径外, 充分利用蛇足石杉资源、挖掘与石杉碱甲等效的石松生物碱, 以及建立科学、快速的检测方法对该类资源进行质量评价势在必行。目前, 有关石杉碱甲的测定研究较多, 袁经权等(2012)也曾同时测定石杉碱甲和乙的含量, 但尚没有石杉碱丙测定方法的研究, 也没有同时测定石杉碱甲、乙和丙含量的文献报道。因此, 本研究尝试建立了高效液相色谱法同时测定湘西蛇足石杉中石杉碱甲、乙和丙含量的方法, 并分析其植株不同部位三种石杉碱分布差异, 为合理保护和充分利用蛇足石杉资源, 评价该类资源品质和最佳提取部位提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器: 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, 包括 LC-20AT 型高压双泵、SPD-M20A 型紫外检测器、CTO-20A 柱温箱、进样器、色谱数据处理系统(LC-solution 软件)。岛津 AU120 型电子天平, 德国 BINDER 电热烘箱, Millipore 超纯水处理系统, KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

试剂: 石杉碱甲、乙、丙标准品(Sigma 公司); 甲醇为色谱纯, 醋酸铵、冰醋酸、酒石酸及其它试剂均为分析纯。

样品: 实验材料采自湖南永顺县杉木河、古丈县高望界、保靖县白云山和凤凰县两头羊, 经吉首大学张代贵高级实验师鉴定为蛇足石杉。

1.2 方法

1.2.1 对照品溶液的制备 精密称取石杉碱甲、乙和丙标准品 10 mg, 分别置于 100 mL 容量瓶中, 用色谱级甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 质量浓度分别为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。精密吸取上述标准品母液, 分别稀释成 6 组浓度梯度的石杉碱甲、乙和丙混合溶液($\mu\text{g/mL}$): a(0.5、0.2、0.2)、b(2.0、1.0、1.0)、c(4.0、2.0、2.0)、d(6.0、4.0、3.0)、e(8.0、6.0、4.0)和 f(10.0、8.0、

5.0)。4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存备用。

1.2.2 供试品溶液的制备 将采自 4 个样地的蛇足石杉样品清洗干净, 各选取 10 棵具有 2 个二叉分支的完整植株(20~25 cm), 每个样地的材料等分成 3 份, 各组间植株大小相近; 同样选择 15 棵植株, 分别收集根、茎、叶; 选好的材料置于烘箱中 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘干, 然后用研钵充分研碎, 再次置于烘箱中 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘至恒重。精密称取 0.2 g 粉末置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 2% 的酒石酸 20 mL, 称定, 超声萃取 1 h, 再称重, 用 2% 酒石酸补足失重。经 0.45 μm 滤膜过滤, 即得供试样品溶液。

1.2.3 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.08 mol/L 醋酸铵溶液(32:68, V/V; 冰醋酸调 pH 至 5.8); 流速 1 mL/min; 检测波长 308 nm; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

1.2.4 样品分析 取样品溶液和标准品混合液, 按“1.2.3”色谱条件进行测定, 利用峰面积外标法计算石杉碱甲、乙和丙含量。

2 结果与分析

2.1 色谱分离

在本色谱条件下, 石杉碱甲、乙和丙各组分分离良好, 峰型对称, 无拖尾现象, 不受样品中其它成分干扰, 理论塔板数按石杉碱甲计不低于 6 000。对照品混合物和供试样品中石杉碱甲、乙和丙的保留时间分别为 11.76、6.79 min 和 7.93 min(图 1), 整个分离过程仅需 13 min。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系的测定 精密吸取上述 6 组对照品混合液各 20 μL 进样, 分别记录 3 种石杉碱的峰面积积分值。以峰面积积分值 A 为纵坐标, 质量浓度 ρ ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标绘制标准曲线, 线性回归方程: $A_{\text{甲}} = 38426\rho + 3555.20$, $R^2 = 0.9990$; $A_{\text{乙}} = 25878\rho - 16.10$, $R^2 = 0.9981$; $A_{\text{丙}} = 37305\rho - 2852.10$, $R^2 = 0.9992$ 。结果石杉碱甲、乙和丙分别在 0.5~10.0、0.2~8.0、0.2~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.2.2 精密度试验 取 f 组对照品混合溶液 20 μL , 按 1.2.3 项色谱条件重复进样 6 次, 测定峰面积。结果显示石杉碱甲、石杉碱乙及石杉碱丙的峰面积 RSD 分别为 0.45%、1.17% 和 0.54%, 表明测定方法精密度良好。

2.2.3 重复性试验 精确称取蛇足石杉全草(杉木河

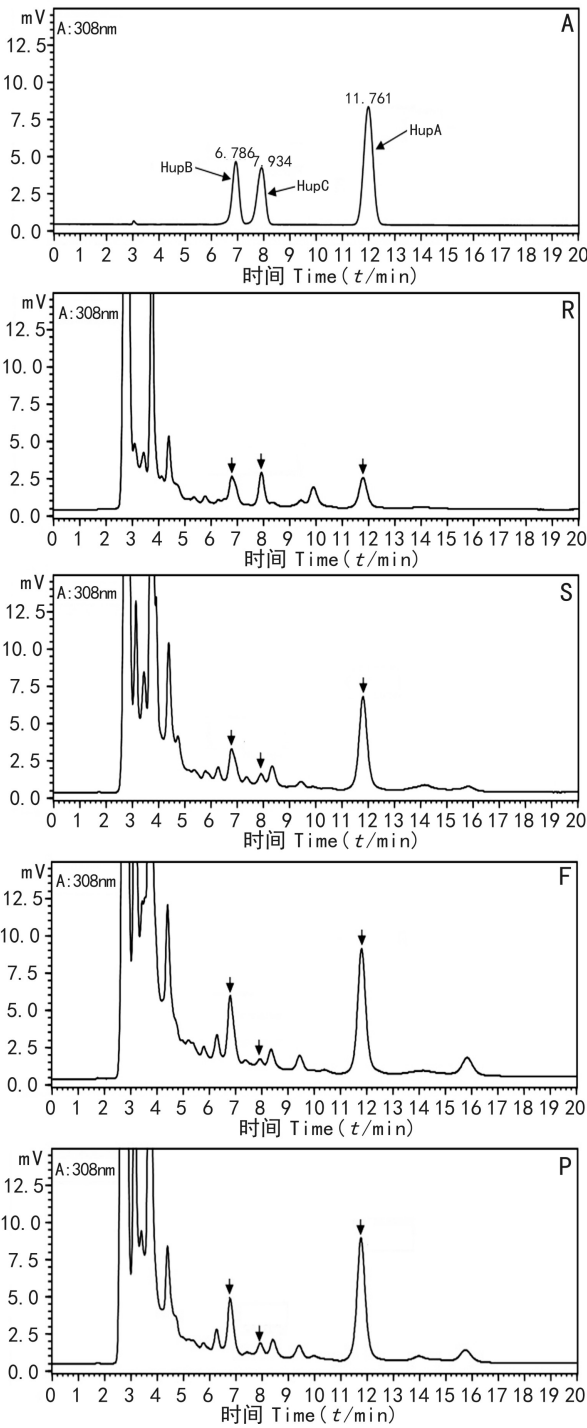


图 1 石杉碱标准品混合液(A)和蛇足石杉根(R)、茎(S)、叶(F)及全草(P)提取物样品的 HPLC 图 Hup A. 石杉碱甲; Hup B. 石杉碱乙; Hup C. 石杉碱丙。
Fig.1 HPLC chromatograms of huperzine A,B and C standard mixtures, and sample solutions extracted from root(R), stem(S), foliage(F) and whole plant (P) of *Huperzia serrata* Hup A. Huperzine A; Hup B. Huperzine B; Hup C. Huperzine C.

样品)粉末 0.2 g,按照 1.2.2 所述方法和 1.2.3 项色谱条件提取、测定,实验重复 6 次。计算得样品石杉碱甲含量的 RSD 为 1.18%,石杉碱乙含量的 RSD 为 1.71%,石杉碱丙含量的 RSD 为 0.84%,结果表明该方法具有良好的重复性。

2.2.4 稳定性试验 取供试样品(杉木河样品)溶液,分别于 0、8、16、24、48 h 进样 20 μL,记录峰面积,计算石杉碱甲、乙和丙含量的 RSD 分别为 1.89%、2.17%和 2.54%,表明供试样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.5 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的蛇足石杉全草(杉木河样品)粉末 0.2 g,分别加入适量的对照品混合液 f,按照 1.2.2 项方法制备供试液,进样 20 μL,记录峰面积,计算各对照品的加样回收率。石杉碱甲、乙和丙的平均回收率分别为 102%、99.2%和 98.8%,RSD 分别为 0.32%、1.10%和 0.48%。

2.3 样品石杉碱含量测定

分别对 4 个样地的蛇足石杉全草粉末进行处理,HPLC 测定,采用外标法定量: $\rho_{\text{石}} = A_{\text{石}}/A_{\text{标}} \times \rho_{\text{标}}$,换算得供试样品中石杉碱的含量。结果表明,永顺杉木河蛇足石杉全草中石杉碱甲含量(0.518±0.006)%、石杉碱乙(0.325±0.004)%、石杉碱丙(0.046±0.001)%;古丈高望界蛇足石杉全草中石杉碱甲、乙和丙含量分别为(0.513±0.005)%、(0.317±0.004)%和(0.042±0.001)%;保靖白云山分别为(0.504±0.006)%、(0.312±0.003)%和(0.040±0.001)%;凤凰两头羊分别为(0.510±0.004)%、(0.315±0.005)%和(0.043±0.001)%。4 个样地之间的石杉碱甲、乙和丙含量无显著差异。

同理测定了不同样地三种石杉碱在蛇足石杉根、茎和叶中的分布情况,由表 1 可知,4 个样地植株不同部位的石杉碱甲、乙和丙含量存在显著差异。即在蛇足石杉的叶、茎、根中,石杉碱甲和乙的分布规律一致,均为叶>茎>根,且叶和茎中的含量明显高于根中含量;石杉碱丙的含量则为根大于叶和茎。

3 结论与讨论

由于石杉碱甲、乙和丙是具有相似结构的石松类生物碱,同时对其进行测定有一定困难,我们通过比较多种溶剂系统、优化流动相组成配比、调节缓冲液 pH 值等方法首次建立对该三种石杉碱同时进行

表 1 不同样地不同部位蛇足石杉中石杉碱甲、乙和丙含量的测定结果

Table 1 Contents of huperzine A,B and C in the different parts of *huperzia serrata* from different regions

不同样地	不同部位	石杉碱甲(%)	石杉碱乙(%)	石杉碱丙(%)
Different plots	Different parts	Huperzine A	Huperzine B	Huperzine C
永顺杉木河 Shamuhe, Yongshun	根	0.203	0.151	0.088
	茎	0.457	0.278	0.035
	叶	0.582	0.395	0.037
古丈高望界 Gaowangjie, Guzhang	根	0.195	0.135	0.085
	茎	0.435	0.246	0.033
	叶	0.560	0.370	0.031
保靖白云山 Baiyunshan, Baojing	根	0.184	0.127	0.079
	茎	0.433	0.244	0.030
	叶	0.546	0.365	0.034
凤凰两头羊 Liangtouyang, Fenghuang	根	0.180	0.124	0.090
	茎	0.438	0.253	0.035
	叶	0.552	0.375	0.036

检测的 HPLC 方法。实验中采用二极管阵列检测仪,紫外 210~400 nm 扫描,发现三种石杉碱的紫外吸收图谱基本一致,分别在 230 nm 和 308 nm 处有强吸收峰,为了减少样品中其它组分的干扰,选择 308 nm 作为检测波长。

蛇足石杉分布范围较广,受生长环境影响,其所含石杉碱甲等生物碱有所差异(郭水良等,2006;王俊等,2009),本研究调查了湘西 4 个样地蛇足石杉全草中石杉碱甲、乙和丙含量,发现差异不显著,这可能与采样地具有相同的生态因子和地理条件有关;相比文献报道的不同产地蛇足石杉及其它石杉科植物中石杉碱甲含量(平均 0.3%)(王俊等,2003;郭水良等,2006;王俊等,2009),湘西蛇足石杉中石杉碱甲含量比较高,达到 0.5%,结果表明湘西蛇足石杉具有资源优势,非常适合作为石杉碱甲工业生产的原料;同时发现石杉碱乙的含量在 0.3%以上,甚至高于一些地区蛇足石杉中石杉碱甲含量,具有很好的开发利用潜力。本研究首次调查了蛇足石杉中石杉碱丙含量,虽比较低,但该项研究为充分利用蛇足石杉植物资源和寻找石杉碱甲替代产品提供了参考数据。

石杉碱的生物合成过程复杂,目前还没有阐明其次生代谢途径。本研究表明,湘西蛇足石杉中石杉碱甲和乙在根、茎和叶各器官的分布具有相似的规律,即叶>茎>根,该结果与孙远明等(2002)采用 HPLC 测定蛇足石杉中石杉碱甲的研究结果相吻合。推测石杉碱甲和乙的生物合成途径可能相同,首先在蛇足石杉的叶中合成,而后通过茎向地下部根中运输。让人意外的是研究中发现石杉碱丙的分

布在蛇足石杉根中含量显著高于茎和叶,即地下部分大于地上部分,此结果是否表明石杉碱丙与石杉碱甲和乙有不同的次生代谢路径还有待考证。

湘西独特的山林地貌,温暖湿润的气候环境,为蛇足石杉生长繁衍提供了有利生境,但是近些年高强度采收,其野生聚群及生态过程严重破坏,资源日趋枯竭,笔者实地调查了湘西各地区蛇足石杉资源,很难发现大量野生聚群分布。故此希望人们能够重视目前该类资源面临的现状,采收蛇足石杉地上部分,既可保证药材的质量,又利于资源的合理和可持续利用。

参考文献:

Guo SL(郭水良),Li PL(李沛玲),Li SJ(李似姣),*et al.* 2006. On determination of Hup A content in *Huperzia serrata* and comparison with populations from different areas(石杉碱甲的含量测定方法及在蛇足石杉不同产地居群中的含量比较)[J]. *J Zhejiang Norm Univ*(浙江师范大学学报),**29**(2):177-180

Liu JS,Zhu YL,Yu CM,*et al.* 1986. The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity[J]. *Can J Chem*,**64**(4):837-839

Liu JS,Huang MF. 1994. The alkaloids huperzines C and D and huperzine from *Lycopodium casuarinoides* [J]. *Phytochemistry*,**37**(6):1 759-1 761

Liu J(刘静),Zhang HY(章海燕),Wang LM(王黎明),*et al.* 1999. Inhibitory on effects of huperzine B on cholinesterase activity in mice(石杉碱乙的抗胆碱酯酶作用)[J]. *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报),**20**(2):141-145

Ma XQ,Tan CH,Zhu DY,*et al.* 2005. Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata* huperzine A content of *Huperziaceae* species in China[J]. *J Agric Food Chem*,**53**(5):1 393-1 398

Ma XQ,Tan CH,Zhu DY,*et al.* 2006. A survey of potential hu-

(下转第 394 页 Continue on page 394)