

## 牛大力中刺桐碱的分离鉴定和含量测定\*

张宏武<sup>1</sup>, 丁刚<sup>1</sup>, 李榕涛<sup>2</sup>, 魏建和<sup>1</sup>, 邹忠梅<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医院药用植物研究所, 北京 100193;

2. 中国医学科学院北京协和医院药用植物研究所海南分所, 万宁 571533)

**摘要** 目的: 首次从牛大力药材中分离制备刺桐碱对照品并应用高效液相色谱方法建立牛大力药材中刺桐碱含量的测定方法。方法: Agilent (SB-C<sub>18</sub>) (5 μm 4.6 mm × 150 mm) 色谱柱, 乙腈-水(1:9) 为流动相, 流速为 0.8 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长为 280 nm, 柱温 30 °C。结果: 刺桐碱在 0.0113 ~ 2.825 mg · mL<sup>-1</sup> 范围内呈良好的线性关系( $r=0.9996$ ,  $n=5$ ), 平均回收率( $n=9$ ) 为 99.6%。结论: 本方法准确、简便、重复性好, 可用于牛大力药材中刺桐碱的含量测定。

**关键词:** 中药材; 牛大力; 豆科; 崖豆藤属; 刺桐碱; 分离; 鉴定; 含量; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)06-1024-03

## Isolation, identification and quantitative analysis of hypaphorine in the root of *Millettia speciosa* Champ.\*

ZHANG Hong-wu<sup>1</sup>, DING Gang<sup>1</sup>, LI Rong-tao<sup>2</sup>, WEI Jian-he<sup>1</sup>, ZOU Zhong-mei<sup>1\*\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science &amp; Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Hainan Branch Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Science &amp; Peking Union Medical College, Wanning 571533, China)

**Abstract Objective:** To firstly report the isolation of hypaphorine from the roots of *Millettia speciosa* Champ. and establish an HPLC method for determination of hypaphorine in the root of *Millettia speciosa* Champ. **Method:** A SB-C<sub>18</sub> (5 μm 4.6 mm × 150 mm) column was adopted with a mobile phase of acetonitrile-water (1:9) at the flow rate of 0.8 mL · min<sup>-1</sup> and the column temperature was set at 30 °C. The detection wavelength was 280 nm. **Results:** The linear range of hypaphorine was 0.0113 - 2.825 mg · mL<sup>-1</sup> ( $r=0.9996$ ,  $n=5$ ) and the average recovery ( $n=9$ ) was 99.6%. **Conclusion:** The method is accurate, simple, reproducible and can be used to determine the content of hypaphorine in *Millettia speciosa* Champ.

**Key words:** traditional Chinese medicine; *Millettia speciosa*; Leguminosae; *Millettia*; hypaphorine; isolation; identification; content; HPLC

牛大力为豆科崖豆藤属植物美丽崖豆藤 *Millettia speciosa* Champ. 的根<sup>[1]</sup>, 又名猪脚笠、山莲藕、大力薯等, 具补虚润肺、强筋活络之功效, 可用于治疗腰肌劳损、风湿性关节炎、肺虚咳嗽等病症。现代药理研究表明: 牛大力具有祛痰、镇咳、平喘<sup>[2]</sup>, 保护肝损伤<sup>[3]</sup> 及免疫调节作用<sup>[4]</sup>。牛大力为岭南地区药食两用植物, 常用于煲汤, 具有补骨强筋保健作用, 化学成分研究表明含有三萜皂苷、黄酮类化学成分<sup>[5,6]</sup>。为了建立评价其质量的含量测定方法, 我们选择提取物中主要特征性成分, 进行了分离制备和结构测定, 得吡啶类生物碱刺桐碱对照品, 并对海

南产牛大力药材中刺桐碱含量进行了测定。

### 1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(美国 Waters 公司): 600 泵; PDA 紫外检测器; 半制备液相色谱仪(日本岛津公司): LC-6AD 泵; SPD-20A 检测器; 试剂: 色谱甲醇(天津西华试剂), 重蒸水, 其余试剂均为分析纯。

样品: 10 批海南产牛大力样品分别采自海南儋州、琼中县及五指山市, 由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所海南分所李榕涛助理研究员鉴定为崖豆藤属植物美丽崖豆藤 *Millettia speciosa* Champ. 的根。

\* 十一五国家科技支撑计划(2007BAI27B06)

\*\* 通讯作者 Tel: (010) 57833290; E-mail: zmzou@implad.ac.cn

## 2 对照品制备

**2.1 提取与分离** 牛大力药材细粉 1 kg 95% 乙醇提取 2 次, 每次 2 h。得浸膏 100 g, 加适量水混悬后, 分别用乙酸乙酯和正丁醇萃取。正丁醇部分(约 25 g) 溶于水中经 D-101 大孔树脂分离(10% 乙醇、30% 乙醇、60% 乙醇、95% 乙醇梯度洗脱) 将 30% 乙醇部分再经反相硅胶色谱分离, 甲醇和水梯度洗脱。甲醇-水(1:9) 流分经 Sephadex LH-20 凝胶柱分离, 甲醇洗脱, 再经制备高效液相纯化, 得化合物 1(9 mg)。

**2.2 结构鉴定** 刺桐碱: 无色结晶, mp 246 °C, 溶于水, 碘化铋钾反应阳性, UV(MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 289, 281, 274 nm; IR(KBr)  $\nu_{\max}$  1640, 1360; EI-MS  $m/z$  (%) 187 ( $M^+ - 59$ ), 143 (187 - COO<sup>-</sup>), 130, 115 (吡啶环), 59 [ $N^+$  (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 58 (100%); <sup>1</sup>H NMR(D<sub>2</sub>O)  $\delta$  3.30 [9H, s,  $N^+$  (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 3.37(1H, dd,  $J = 13.2, 12.0$  Hz, H-10a), 3.44(1H, br. d,  $J = 12.6$  Hz, H-10b), 3.95(1H, br. d,  $J = 11.4$  Hz, H-11), 7.25(1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-7), 7.32(1H, t,  $J = 7.2$  Hz, H-6), 7.56(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-8), 7.70(1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-5); <sup>13</sup>C NMR(D<sub>2</sub>O)  $\delta$  22.8(C-10), 52.0 [ $N^+$  (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>], 78.9(C-11), 107.1(C-3), 112.0(C-8), 118.1(C-5), 119.4(C-7), 122.0(C-6), 124.7(C-2), 126.4(C-4), 136.1(C-9), 171.5(-COO<sup>-</sup>)。以上数据与文献报道从 *Pterocarpus officinalis*<sup>[7]</sup> 种子分离得到的 *N,N,N*-三甲基色氨酸(hypaphorine)一致, 中文名为刺桐碱<sup>[8]</sup>。为首次在牛大力中分离得到, 经 HPLC 归一化法测定其纯度大于 95%。

## 3 色谱条件

Agilent (SB-C<sub>18</sub>) 色谱柱 (5  $\mu$ m 4.6 mm  $\times$  150 mm); 乙腈-水(1:9) 为流动相; 流速为 0.8 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; 检测波长为 280 nm; 柱温 30 °C。色谱分离见图 1。

## 4 实验方法及方法学考察

**4.1 供试品溶液的制备** 称取牛大力样品细粉(过 60 目筛) 2.0 g, 用 70% 乙醇 50 mL 超声提取 2 次(功率: 200 W; 频率 40 kHz), 每次 20 min。合并滤液, 蒸干, 甲醇-水(1:1) 定容于 5 mL 量瓶中, 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 即得。

**4.2 对照品溶液的制备** 精密称取刺桐碱对照品约 1.0 mg, 甲醇-水(1:1) 定容于 1 mL 量瓶中, 即得。

**4.3 线性及定量限的测定** 精密称取刺桐碱对照品配制成 2.825, 2.26, 1.13, 0.565, 0.0113 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 系列对照品溶液, 以浓度为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程:

$$Y = 1.000 \times 10^7 X - 5.110 \times 10^5 \quad r = 0.9996$$

结果表明: 刺桐碱在 0.0113 ~ 2.825 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 范围内呈良好的线性关系。最低定量限为 2.26 ng  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> ( $S/N \geq 10$ )。

**4.4 重复性试验** 精密称取同一批牛大力药材粉末 5 份, 按“4.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“3”项下色谱条件测定, 平均含量为 0.16%, RSD 为 0.21%。

**4.5 精密度试验** 取同一对照品溶液, 连续进样 5 次, 测得峰面积, 其日间精密度 RSD 为 0.72%, 日间精密密度为 1.2%。

**4.6 稳定性试验** 取同 1 份供试品溶液, 在 0, 4, 8, 24, 48 h 分别按照“3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 结果表明供试品溶液在 48 h 内基本稳定, 其峰面积 RSD 为 1.0%。

**4.7 回收率试验** 精取同一已知含量的牛大力药材粉末 9 份(1.0 g), 分别置三角瓶中, 每 3 份为 1 组, 按样品中刺桐碱含有量的 120%, 100%, 80% (即 1.2 g, 1.0 g, 0.8 g), 分别加入适量刺桐碱对照品溶液(0.786 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), 然后按“4.1”项下方法制备供试溶液, 进样测定, 结果平均加样回收率( $n = 9$ ) 为 99.6%, 见表 1。

表 1 刺桐碱加样回收率 ( $n = 3$ )

Tab 1 Recovery of Hypaphorine

样品量 (sample) /mg	加入量 (addition) /mg	测定量 (determination) /mg	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
0.44	0.40	0.825	98.21	99.5	1.7
0.44	0.40	0.832	99.04		
0.44	0.40	0.852	101.4		
0.55	0.55	1.091	99.18	98.7	1.1
0.55	0.55	1.072	97.46		
0.55	0.55	1.093	99.36		
0.66	0.63	1.280	99.23	100.6	1.2
0.66	0.63	1.304	101.1		
0.66	0.63	1.309	101.5		

**4.8 样品测定** 取 10 批牛大力药材粉末, 按“4.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“3”项下条件测定, 结果见表 2。

表2 牛大力药材中刺桐碱含量测定结果  
Tab 2 The content of hypaphorine in the root of *Millettia speciosa* Champ

样品编号 (sample No.)	产地 (habit)	含量 (content) /(% (n=3))
1	琼中县乘坡农场( Chengpo ranch Qiongzong county)	0.055
2	琼中县牙钗农场( Yachai ranch Qiongzong county)	0.041
3	五指山市毛阳镇( Maoyang town ,Wuzhishan city)	0.159
4	儋州南丰( Nanfeng region ,Danzhou city)	0.027
5	儋州兰洋( Lanyang region ,Danzhou city)	0.089
6	儋州兰洋( Lanyang region ,Danzhou city)	0.125
7	儋州雅拉农场( Yala ranch ,Danzhou city)	0.062
8	儋州南丰( Nanfeng region ,Danzhou city)	0.027
9	儋州兰洋( Lanyang region ,Danzhou city)	0.141
10	儋州南丰( Nanfeng region ,Danzhou city)	0.0028

## 5 讨论

**5.1 对照品的选择** 牛大力临床上多为水煎液,刺桐碱水溶性极好。在牛大力药材的指纹图谱中发现,刺桐碱是牛大力药材中的主要成分。同时现代药理研究表明牛大力具有祛痰、镇咳、平喘的作用,而刺桐碱则具有镇静作用,与牛大力的功效具有一定相关性。因此对该成分进行了分离制备,建立其含量测定方法,以期为牛大力药材的质量评价提供方法。但刺桐碱是否为牛大力药材祛痰、镇咳、平喘作用的活性物质基础还有待进一步研究。

**5.2 提取方法的选择** 本实验曾分别用二氯甲烷、70%乙醇和甲醇作为提取溶剂,超声提取牛大力中刺桐碱,提取2次,合并滤液,甲醇-水(1:1)定容于5 mL量瓶中,HPLC测定结果发现70%乙醇提取物中刺桐碱含量最高。并对70%乙醇超声提取和回流提取方式及提取次数进行了考察,最后确定提取方法为70%乙醇超声提取2次,每次20 min。

**5.3 耐用性的考察** 本实验换用 Shiseido (Pak-C<sub>18</sub>) 色谱柱(5 μm A. 6 mm × 250 mm),用适当乙腈和水等度洗脱,刺桐碱也达到基线分离,结果表明该方法耐用性较好。

**5.4 样品测定结果** 从海南不同产地10批牛大力中刺桐碱含量测定结果来看,10批牛大力药材中刺桐碱的含量差异比较大,儋州兰洋地区所产牛大力

中刺桐碱含量均较高,因此有必要对牛大力药材的种植进行集中管理。

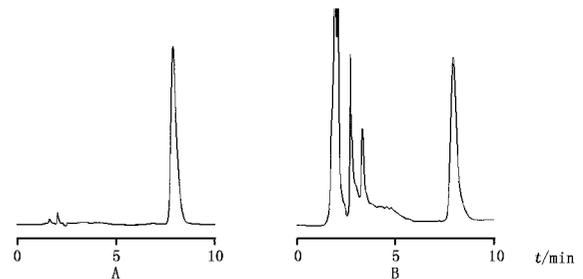


图1 刺桐碱对照品(A)和牛大力样品(B) HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of hypaphorine reference substance(A) and the roots of *Millettia speciosa*(B)

## 参考文献

- Editorial Committee of Guangdong Zhongyaozhi (广东中药志编辑委员会). Guangdong Zhongyaozhi (广东中药志). Guangzhou (广州): Guangzhou Science and Technology Publishers(广东科学技术出版社),1991
- LIU Dan - dan (刘丹丹),TANG Li - hai (唐立海),WANG Yan (王艳) *et al.* Experiment study on the expectorant ,antitussive and antiasthmatic effect of Radix Millettiae Speciosae. (牛大力祛痰、镇咳和平喘作用的实验研究). *J Guangzhou Univ TCM* (广州中医药大学学报) 2009 26 (3):266
- ZHOU Tian - nong(周添浓),LIU Dan - dan (刘丹丹),TANG Li - hai (唐立海),*et al.* Experimental study on hepatic - protective effects of Radix Millettiae Speciosae(牛大力对四氯化碳及酒精所致小鼠急性肝损伤的保护作用). *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药) 2009 20 (10):2585
- WEI Cui - ping (韦翠萍),LIU Dan - dan (刘丹丹),TANG Li - hai (唐立海) *et al.* Effect of Radix Millettiae Speciosae on mice immune function(牛大力对小鼠免疫功能的影响). *J Guangzhou Univ TCM*(广州中医药大学学报) 2009 26 (6):539
- Uchiyama T ,Furukawa M ,Isobe S *et al.* New oleanane - type triterpene saponins from millettia speciosa. *Heterocycles* 2003 60 (3):655
- WANG Chun - hua (王春华),WANG Ying (王英),WANG Guo - cai (王国才),*et al.* Chemical constituents from roots of Millettiae Speciosae(牛大力的化学成分研究). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药) 2008 39(7):279
- Dantel HJ ,David GL ,Linda EF *et al.* The indole alkaloid ,Hypaphorine and Pterocarpus seed protection. *Phytochemistry* ,1982 ,21 (5):1035
- ZHANG Xue - wu (张雪吾). English - Chinese Medicine Dictionary (英汉药学用语词典). Taiyuan (太原): Shanxi Science and Technology Publishers(山西科学技术出版社),1994

(本文于2010年7月5日收到)