

江苏产不同采收期明党参中 *L*-天门冬酰胺的动态累积变化

段志富¹, 陈建伟^{1,2*}, 李祥^{1,2}, 干玲玲³, 李恩彬¹

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046; 2. 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046;
3. 南京中医药大学 GLP 中心, 南京 210046)

[摘要] 目的: 探讨不同采收月份明党参根中 *L*-天门冬酰胺的动态累积规律。方法: 采用邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生 HPLC 测定明党参中 *L*-天门冬酰胺的含量。取供试品溶液 1 mL, OPA 衍生试剂 1 mL, 硼酸缓冲液(0.2 mol·L⁻¹, pH 10.5) 5 mL, 定容至 10 mL, 反应时间 20 min; 流动相: A 为 1.35% 醋酸钠缓冲液(pH 7.3), B 为 1.35% 醋酸钠(pH 7.2)-乙腈-甲醇(100:175:225)。洗脱梯度(0~20 min, 7% B); 20~25 min, 100% B, 维持 8 min, 柱温 40 °C, 检测波长 333 nm。结果: 在质量浓度 100~1 000 mg·L⁻¹ 对不同采收期的样品在实验条件下测定, *L*-天门冬酰胺平均含量为 0.26%~1.87%。结论: *L*-天门冬酰胺含量在 5~8 月及 1 月较高, 9 月至次年 4 月较低。

[关键词] 明党参; *L*-天门冬酰胺; OPA 柱前衍生; 高效液相色谱; 动态累积

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0137-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0934.022.html>

[网络出版时间] 2012-10-12 9:34

Dynamic Accumulation of *L*-asparagine in Roots of *Changium smyrnioides* from Different Collection Month Cultivated in Jiangsu

DUAN Zhi-fu¹, CHEN Jian-wei^{1,2*}, LI Xiang^{1,2}, GAN Ling-ling³, LI En-bin¹

(1. Pharmacology College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China;
3. GLP Center of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[收稿日期] 20120115(002)

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金课题(200803150009); 江苏高校优势学科建设工程项目(ysxk-2010); 江苏省自然科学基金项目(BK2003107); 国家药典研究项目(YZ-124)

[第一作者] 段志富, 硕士, 助理研究员, 从事中药资源品质评价研究, Tel:025-85811153, E-mail: duanzhifu1981@163.com

[通讯作者] * 陈建伟, 教授, 博士生导师, 从事中药资源化学与中药品质评价研究, Tel:025-85811695, E-mail: chenjw695@126.com

- [8] Pedersen B F. Structure of a new triterpene oxide, 3-filicanon[J]. Acta Crystallographica Section B, 1982, 38: 1652.
- [9] 宋龙, 张承忠, 李冲, 等. 单脉大黄化学成分研究[J]. 中药材, 2003, 26(4): 260.
- [10] Paul Dubs, Hans-Peter Schenk. Isolation and total synthesis of (*E*)-6, 10-dimethyl-9-methylidene-undec-5-en-2-one, a constituent of Costus root oil [J]. Helvetica Chem Acta, 1978, 61: 984.
- [11] 许卉, 杨晓玲, 刘生生, 等. 土木香的倍半萜类化学成分研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2738.
- [12] 尹宏权. 云木香及两种海洋生物次级代谢产物的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 1999.
- [13] LI Guoqiang, JIA Zhongjian, ZHANG Shusheng. Two new compounds from *Rhododendron przewalskii* Maxim [J]. Che Res Chin Uni, 2003, 19(4): 422.
- [14] Hideaki Otsuka1, Akie Tamaki. Platanionosides D-J: megastigmane glycosides from the leaves of *Alangium platanifolium* (SIEB. et ZUCC.) HARMS var. *platanifolium* SIEB. et ZUCC. [J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50(3): 390.

[责任编辑 邹晓翠]

[Abstract] Objective: To study the dynamic accumulative law of *L*-asparagine in *Changium smyrnioides* from different collection month. **Method:** *L*-asparagine in roots of *C. smyrnioides* from different collection month were derived with *o*-phthaldialdehyde (OPA) in pre-column, and separated by RP-HPLC. *L*-asparagine was determined. 1 mL sample solution, 1 mL colorimetric reagent and 5 mL borax buffe ($0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 10.5) were settled to the volume of 10 mL and reacted 20 min; mobile phase A was 1.35% sodium acetate buffer (pH 7.3), mobile phase B was 1.35% sodium acetate (pH 7.2) -acetonitri-methanol (100:175:225), 0-20 min A: B (93:7), 20-25 min A: B (0:100), at the rate of $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The temperature of column was $40 \text{ }^\circ\text{C}$ and the wavelength was at 333 nm. **Result:** The content of *L*-asparagine was 0.26% -1.87% in 100-1 000 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** The contents of *L*-asparagine was higher in May-August, January than other months.

[Key words] *Changium smyrnioides* *L*-asparagine; OPA pre-column derivatization; HPLC; dynamic accumulation

明党参是我国特有的伞形科明党参属的单种属植物,为我国著名的特产药材之一,江苏特产道地药材之一,具有补气生津,润肺化痰,平肝和胃,消肿解毒之功效。本课题组^[1-4]首次从明党参根的水溶液中分离得 *L*-天门冬酰胺,并经药理实验证实其对氨水雾化刺激引起的小鼠咳嗽有显著的抑制作用,能显著抑制乙酰胆碱和组胺引起的豚鼠哮喘,具有明显的镇咳、平喘、祛痰作用^[1-3]。并以其为指标成分优选了止咳祛痰宁参胶囊的制备工艺^[3]。近年来,有学者运用 HPLC 和比色法分析了明党参植株内不同部位的多糖、甘露醇、胆碱、生理性灰分和水溶性成分显示茎叶与根中胆碱、多糖、水溶性浸出物和生理性灰分含量均差异显著。其多糖累积呈现 2 个明显的拐点,最高含量在 6 月份左右,最低含量在 12 月份左右^[5-7]。关于明党参主要中医功效水溶性成分 *L*-天门冬酰胺动态积累变化尚未见报道。本文采用 OPA 柱前衍生 HPLC 逐月测定江苏产明党参中的 *L*-天门冬酰胺含量,绘制了动态累积变化曲线,为栽培明党参适宜采收期的确定提供了科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Tu-1800 型紫外分光光度计(北京普通分析用仪器有限责任公司),Waters 515 型高效液相色谱仪,Waters 2487 型检测器,Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm,江苏汉邦科技有限公司)。

1.2 试药

1.2.1 试剂 邻苯二甲醛(OPA)及 3-巯基丙酸(3-MPA)、硼酸、氢氧化钠、醋酸钠、三乙胺、冰醋酸、乙腈、甲醇。

1.2.2 衍生试剂的制备 OPA 衍生试剂:OPA 1 000 mg,3-MPA 1 mL,甲醇(或乙腈)定容至 250

mL,临用时配制。硼酸缓冲液:取硼酸适量,加水溶解并稀释至 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (用氢氧化钠调 pH 10.5)。

1.3 药材 选取句容市天王乡红山村明党参栽培基地第 3 年生的明党参为研究对象,自当年 9 月份开始取样,每月取样 1 次,每次 10 株,直至第 4 年 8 月份,所有样品均经南京中医药大学药学院陈建伟教授鉴定为伞形科明党参属植物明党参 *Changium smyrnioides* Wolff 的根。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备 将明党参鲜品去泥,洗净,干燥,粉碎成粗粉,精密称定 2 g,置入 150 mL 圆底烧瓶内,加 50 mL 蒸馏水回流提取 1 h,提取完后将烧瓶内的提取液无损的转移至离心管内,以 $4 800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液定容至 50 mL,待用。

2.2 测定波长的确定 取 *L*-天门冬酰胺对照品适量,用蒸馏水配成 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。取该对照品溶液 2 mL,OPA 衍生试剂 2 mL,硼酸缓冲液 10 mL,混合反应 20 min,反应完后进行紫外扫描,确定最佳检测波长。结果显示,*L*-天门冬酰胺在 265,333 nm 有较为明显的 2 个吸收峰,其中 265 nm 的吸收峰峰形较尖锐,而 333 nm 的吸收峰峰形相对平缓,故选择 333 nm 作为 *L*-天门冬酰胺的检测波长。

2.3 反应条件的优化

2.3.1 pH 对 *L*-天门冬酰胺衍生化反应的影响 将 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸溶液分别用 NaOH 调节至 pH 为 4,7,8.5,10.5,11.5,12.5 的 6 种缓冲液,取 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 1 mL,OPA 衍生试剂 1 mL,硼酸缓冲液 45 mL,混合反应 20 min,于 333 nm 处测定紫外吸光度。结果表明,当硼酸缓冲液的 pH 为酸性时,衍生物吸光度很小,当 pH 为碱性时,吸光度较大,并且随着缓冲液 pH 的增加,在 pH 10.5 时

吸光度达到最大,因此选择 pH 10.5 作为 *L*-天门冬酰胺衍生反应中缓冲液的最佳 pH。

2.3.2 衍生反应时间对衍生化反应的影响 将 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硼酸缓冲溶液调节至 pH 10.5,取 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 1 mL,OPA 衍生试剂 1 mL,硼酸缓冲液 5 mL,混合使其反应,于 333 nm 处测定其吸光度。自反应开始计,分别于第 2,5,10,20,30,45,60,75 min 观察衍生产物的吸光度。结果表明,*L*-天门冬酰胺的衍生化反应与时间有着密切的关系,随着反应时间的延长,衍生物的吸光度也随之增大,至 20 min 左右达到稳定,因此选择衍生反应的时间为 20 min。

2.3.3 硼酸缓冲液的浓度对衍生化反应的影响 分别配制 0.01,0.05,0.1,0.2,0.5,1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6 种浓度的硼酸溶液,调节 pH 10.5。取 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液 1 mL,OPA 衍生试剂 1 mL,不同浓度的硼酸缓冲液各 5 mL,分别混合使其反应,反应 20 min 后,于 333 nm 处测定其吸光度。结果表明,硼酸缓冲液的浓度对衍生反应有着重要的影响。硼酸浓度过低或者过高时,衍生化产物的紫外吸光度相对较低,当硼酸浓度达到 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时吸光度达到最大,因此选择硼酸缓冲液的浓度为 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.4 OPA 衍生试剂对衍生化反应的影响 将 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硼酸缓冲溶液调节至 pH 10.5,取样品溶液 1 mL、硼酸缓冲液 5 mL,分别加入 OPA 衍生试剂 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mL,并定容至 10 mL,混合使其反应,20 min 后,于 333 nm 处测定其吸光度。结果表明,衍生试剂的用量对衍生反应有明显影响,衍生产物的吸光度随衍生试剂用量的增加而增大,并且在当衍生试剂用量为 0.6 mL 时趋于稳定。表明在按 2.2 项操作制备供试品溶液时,衍生试剂用量为 0.6 mL 即可使反应趋于完全。

2.4 衍生产物稳定性考察 取硼酸缓冲溶液 ($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 10.5) 5 mL,衍生试剂 1 mL,供试品溶液(2.2 项下) 1 mL,混合后定容至 10 mL,反应 20 min,于 333 nm 处测其吸光度,每 15 min 记录其读数。结果表明,样品衍生化产物在相当长的一段时间内,吸光度保持稳定,即衍生反应的产物是相对稳定的。

2.5 色谱条件考察 Lichrospher C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相 A 为醋酸钠缓冲液(取醋酸钠 2.72 g,三乙胺 0.2 mL,加水至适量使溶解,用冰醋酸调节 pH 7.3,加水至 1 L),B 为 1.35% 醋酸钠 (pH 7.2)-乙腈-甲醇 (100:175:225);

洗脱梯度 (0 ~ 20 min, 7% B; 20 ~ 25 min, 100% B, 维持 8 min),检测波长 333 nm,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。图 1 ~ 2。

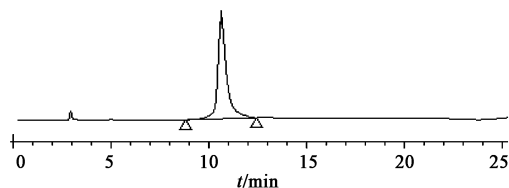


图 1 *L*-天门冬酰胺对照品 HPLC

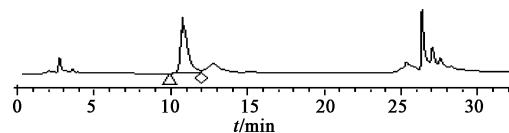


图 2 明党参样品中 *L*-天门冬酰胺 HPLC

2.6 标准曲线及线性范围的考察 分别取 100, 200, 400, 600, 800, 1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 *L*-天门冬酰胺对照品溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶内,加入 1 mL OPA 衍生试剂及 5 mL 硼酸缓冲液 ($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.5),定容至 10 mL,放置反应 20 min 后,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后,取 10 μL 按上述条件进样测定,得标准曲线为 $Y = 1\,393.7X - 47\,014$ ($R^2 = 0.9994$)。

2.7 精密度考察 取 *L*-天门冬酰胺对照品溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶内,加入 1 mL OPA 衍生试剂及 5 mL 硼酸缓冲液 ($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 10.5),定容至 10 mL,放置反应 20 min 后,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后,取 10 μL 进样测定,连续进样 6 次,结果 RSD 3.87%。

2.8 加样回收率考察 取已知 *L*-天门冬酰胺含量的明党参样品 6 份各 1.0 g,粉碎后置入 150 mL 圆底烧瓶内,加 50 mL 蒸馏水,分别加入一定量的 *L*-天门冬酰胺对照品,回流提取 1 h,提取完毕后将烧瓶内的提取液无损的转移至离心管中,以 4 800 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液定容至 50 mL。取上述供试品溶液 1 mL,OPA 衍生试剂 1 mL,硼酸缓冲液 ($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 10.5) 5 mL 置于 10 mL 量瓶内,定容。反应 20 min,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后,取 10 μL 进样测定,结果 RSD 3.6%。

2.9 明党参样品中 *L*-天门冬酰胺含量的测定 将明党参样品 1 ~ 12 号 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重,粉碎过 80 目筛,各取 3 份,每份 2 g,精密称定,分别置 150 mL 圆底烧瓶内,加 50 mL 蒸馏水回流提取 1 h,提取完毕后将烧瓶内的提取液无损的转移至离心管内,以 4 800 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液定容至 50 mL。

取上述供试品溶液 1 mL, OPA 衍生试剂 1 mL, 硼酸缓冲液(0.2 mol·L⁻¹, pH 10.5) 5 mL 置于 10 mL 量瓶内, 定容。反应 20 min, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后, 取 10 μL 进样测定, 记录峰面积并计算含量, 结果见表 1。

表 1 明党参样品中 L-天门冬酰胺含量 %

No.	采收月份	样品 1	样品 2	样品 3	平均	RSD
1	当年 09 月	0.32	0.32	0.31	0.32	1.8
2	当年 10 月	0.27	0.26	0.26	0.26	2.2
3	当年 11 月	0.50	0.47	0.48	0.48	3.2
4	当年 12 月	0.50	0.50	0.47	0.49	3.5
5	次年 1 月	1.33	1.36	1.39	1.36	2.2
6	次年 2 月	0.58	0.61	0.62	0.60	3.5
7	次年 3 月	0.41	0.44	0.42	0.42	3.6
8	次年 4 月	0.35	0.33	0.34	0.34	2.9
9	次年 5 月	1.09	1.03	1.09	1.07	3.2
10	次年 6 月	1.39	1.48	1.49	1.45	3.8
11	次年 7 月	1.04	1.07	1.03	1.05	2.0
12	次年 8 月	1.84	1.89	1.84	1.87	1.5

3 讨论

OPA 柱前衍生紫外检测高效液相色谱法是测定氨基酸类广泛适用的分析方法, OPA 与巯基试剂(如 2-巯基乙醇)在碱性条件下与具有不同 R 基团的氨基酸迅速反应衍生成 1-硫代-2-烷基异吡嗪, 不同的氨基酸都能生成唯一的衍生产物, 该产物具有紫外和荧光吸收^[8-9]。由于 L-天门冬酰胺的结构与 γ-氨基丁酸相似, 邵旭等^[9]亦采用柱前衍生 RP-HPLC 测定芦笋中 L-天门冬氨酸的含量。故本课题组也尝试采用 OPA 衍生后进行液相色谱的分析, 结果表明衍生产物稳定, 准确性高, 精密度好, 在 333 nm 处有良好吸收。

结果显示, 江苏栽培明党参根中 L-天门冬酰胺的含量积累曲线峰值呈现 3 高峰 3 低谷的特征。1 月份(1.36%)、6 月份(1.45%)和 8 月份(1.87%)出现的 3 个高峰, 表明明党参中 L-天门冬酰胺合成累积增加出现在根芽萌发前、果后期和地上部分全部枯萎阶段。3 个低谷出现在明党参进入休眠期后合成减弱(9~12 月份), 幼苗出土(2~4 月份)阶段。

明党参为多年生早春植物, 喜凉爽的湿润环境, 耐旱、怕涝, 具有一定的耐寒性, 但不耐高温。其繁

殖方法是用种子繁殖, 生产上可直播, 也可育苗移栽, 直播一般于每年 10 月中旬条播或穴播; 育苗移栽一般于 10 月中旬条播或撒播。播种后, 翌春 2~3 月出苗, 当年 9~10 月即可移栽。前期幼苗生长缓慢, 后期生长迅速, 每年都有生长和休眠 2 个时期。通常 12 月至次年 1 月明党参根芽开始萌发, 2 月左右幼苗出土, 3~4 月中旬抽苔孕蕾, 4 月下旬至 5 月开花, 6 月中旬为果熟期, 夏至前后随着气温升高植株地上部分开始变黄枯萎进入休眠, 休眠期达 6~7 个月。明党参一般栽后 2~3 年, 于 4~5 月抽苔前后采挖, 留种株宜选 3~5 年生, 健壮无病的植株, 并适当打去侧枝, 使养分充分供给主干, 于 6 月中旬至下旬, 当种子变为褐色或黑褐色时即可分批采收。为了保证根通常江苏栽培明党参一般在 5 月份割去地上部分, 割去地上部分是否会刺激根致合成增加, 7 月下旬至 8 月气温升高是否会促使合成上升, 尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 李祥, 陈建伟, 孙骏, 等. 明党参中水溶性活性成分的分
离、鉴定及定量分析[J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(2): 1.

[2] 胡小鹰, 陈汝炎, 周建英, 等. 明党参水提液及结晶 VI
的镇咳祛痰平喘作用[J]. 南京中医药大学学报, 1995, 11(6): 28.

[3] 周杰. 江苏地产中药材明党参化学成分与药理研究
[J]. 中国中医药科技, 1997, 4(5): 301.

[4] 李祥, 陈建伟, 陈亮. 宁参胶囊制备工艺的研究[J]. 中
国实验方剂学杂志, 1998, 4(1): 10.

[5] 王长林, 郭巧生, 程搏幸, 等. 明党参化学成分分布规
律研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2662.

[6] 王长林, 郭巧生, 程搏幸, 等. 不同株龄明党参化学成
分分析[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 2945.

[7] 郭巧生, 王长林, 厉彦森, 等. 明党参干物质积累及多
糖含量的动态研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1): 24.

[8] 朱松, 王洪新. OPA 柱前衍生-高效液相色谱法测定茶
氨酸的研究[J]. 分析检测, 2005, 26(2): 182.

[9] 邵旭, 牛海军, 李晓亮, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定
芦笋中 L-天门冬氨酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 8.

[责任编辑 邹晓翠]