

UPLC-ELSD 法同时测定伊贝母中贝母辛和西贝母碱的含量

段宝忠, 黄林芳*, 陈士林*

(中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

摘要: 建立同时快速测定伊贝母两种基原植物中贝母辛和西贝母碱含量的方法。采用超高效液相色谱-蒸发光散射 (UPLC-ELSD) 检测法: 色谱柱为 Waters Acquity UPLC™ BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.02%三乙胺水溶液 (B) 系统; 梯度洗脱 (0~3 min, 30%~60% A; 3~4 min, 60%~80% A; 4~10 min, 80%~100% A)。流速 0.25 mL·min⁻¹; 柱温 25 °C; 漂移管温度 40 °C, 喷雾器参数 40%, 进样量 1 μL。贝母辛和西贝母碱分别在 28.75~1150.0 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9992$)、51.5~1030.0 μg·mL⁻¹ ($r = 0.9991$) 内浓度对数与峰面积对数呈良好线性关系, 方法回收率分别为 94.5% (RSD = 1.12%) 和 98.1% (RSD = 2.36%)。结果表明, 本方法快速、简便、准确、重现性好, 能快速分析伊贝母药材中两种生物碱含量, 为伊贝母药材的质量控制提供了依据, 此外, 从 UPLC-ELSD 色谱图能快速鉴别新疆贝母和伊犁贝母药材。

关键词: UPLC-ELSD; 伊犁贝母; 新疆贝母; 贝母辛; 西贝母碱; 质量控制

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 12-1541-04

Simultaneous determination of peimisine and sipeimine in *Fritillaria walujewii* Regel and *Fritillaria pallidiflora* Schrenk by UPLC-ELSD

DUAN Bao-zhong, HUANG Lin-fang*, CHEN Shi-lin*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: The paper reports the establishment of a method for simultaneous determination of peimisine and sipeimine contents in *Fritillaria walujewii* Regel and *Fritillaria pallidiflora* Schrenk. The analyses were performed on an ultra-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection (UPLC-ELSD), equipped with a binary solvent manager, a sampler manager and a column compartment, and connected to Waters Empower 2 software. An Acquity UPLC™ BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used for all analysis. The investigated compounds were separated with gradient mobile phase consisting of acetonitrile-0.02% triethylamine-water. The temperature of sample manager was set at 25 °C. Drift tube temperature was 40 °C, and spray parameter was 40% with injection volume of 1 μL. The investigated compounds including peimisine and sipeimine had good linearity ($r \geq 0.9991$) over the tested ranges. The average recovery was 94.5% and 98.1% with $RSD \leq 2.36\%$. The UPLC-ELSD method is simple, sensitive and accurate with good repeatability, which is available for quality control of *F. walujewii* Regel and *F. pallidiflora* Schrenk.

Key words: UPLC-ELSD; *Fritillaria pallidiflora*; *Fritillaria walujewii*; peimisine; sipeimine; quality control

收稿日期: 2010-07-05.

基金项目: 科技部十一五支撑计划项目 (2006BAI09B05-3); 中央级公益性科研院所科研业务专项 (No.1381); 中医药行业专项基金 (200707007); 中医药行业专项基金 (200807020).

*通讯作者 Tel: 86-10-62811448, Fax: 86-10-62899715, E-mail: lfhuang@implad.ac.cn, slchen@implad.ac.cn

伊贝母为百合科贝母属植物新疆贝母 (*Fritillaria walujewii* Regel) 或伊犁贝母 (*Fritillaria pallidiflora* Schrenk) 的干燥鳞茎, 具清热润肺、化痰止咳之功能, 2010 年版《中华人民共和国药典》(一部) 收载。主产于新疆天山北部、伊犁、阿勒泰西部、塔城等地区^[1]。由于长期过度采挖、资源日趋减少并面临枯竭, 已被列入国家重点保护三级野生植物药材。现代化学及药理学研究表明生物碱为其主要有效部位之一, 具有镇咳、祛痰、抗炎和抑菌等作用^[2], 西贝母碱 (sipeimine) 和贝母辛 (peimisine) 为伊贝母的主要活性生物碱成分^[3, 4], 其紫外检测灵敏度低, 利用 HPLC-ELSD 检测贝母类生物碱有报道^[5, 6], UPLC 方法较 HPLC 减少了分析时间和溶剂消耗, 提高了灵敏度和分离效率, 目前尚无报道。本文在前期研究^[7]的基础上开展了 UPLC-ELSD 方法测定伊贝母中主要活性成分贝母辛和西贝母碱, 以期新疆贝母和伊犁贝母的快速鉴别和质量标准提供参考。

材料与方法

仪器与试剂 ACQUITY UPLC (美国 Waters 公司, 包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、ELSD 2420 蒸发光散射检测器、Empower 2 色谱工作站), 电子分析天平 (Mettler, AB135-S)。电热恒温水浴锅 (北京分析仪器厂), 超声清洗仪 (昆山超声仪器厂, KQ-400KDB)。高纯氮气发生器 (DF-2L, 杭州德克尔实验设备有限公司), 空气压缩机 (WK-110, 杭州德克尔实验设备有限公司)。对照品西贝母碱 (sipeimine)、贝母素乙 (peiminine)、贝母素甲 (peimine)、湖贝甲素 (hupehenine) 购自中国药品生物制品检定所, 贝母辛 (peimisine) 由本实验室自制, 结构经氢谱、碳谱和质谱鉴定, 纯度经高效液相色谱分析大于 98%。乙腈 (色谱纯, Fisher), 甲醇 (色谱纯, Fisher), 三乙胺 (triethylamine, Sigma-Aldrich), 三氯甲烷、氯仿、乙醇均为分析纯 (北京化工厂), 浓氨试液 (分析纯, 汕头化工厂)。

12 批伊贝母药材分别采自新疆和购于药材市场, 经陈士林教授鉴定为新疆贝母 (*Fritillaria walujewii* Regel) 和伊犁贝母 (*Fritillaria pallidiflora* Schrenk) 的干燥鳞茎, 凭证标本存放于中国医学科学院药用植物研究所资源中心。

对照品溶液 分别精密称取各对照品适量, 置 2 mL 量瓶中, 振摇使混合均匀, 加甲醇至刻度, 配制

成混合对照品储备液, 备用。

供试品溶液 分别取药材粉末 (过 4 号筛) 约 2 g, 精密称定, 置 100 mL 烧瓶中, 加氨水试液 4 mL 浸润 2 h, 精密加入三氯甲烷-甲醇 (4:1) 的混合溶液 60 mL, 混匀, 置 80 °C 水浴中加热回流 3 h, 放冷, 滤过。将滤液置蒸发皿中挥干, 加甲醇溶解并转移至 2 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得。进样前用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 (A) - 0.02% 三乙胺 (B), 流速 0.25 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 样品室温度 20 °C。漂移管温度 40 °C, 喷雾器参数 40%, 增益值 500, 气体压力 30 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa), 进样量 1 μL。线性梯度洗脱程序: 0~3 min, 30%~60% A, 3~4 min, 60%~80% A, 4~10 min, 80%~100% A。

结果

1 方法学考察

1.1 伊贝母的色谱分离 在该色谱条件下, 贝母辛、西贝母碱、贝母素乙、贝母素甲、湖贝甲素可很好的分离, 并与其他成分无干扰, 各相邻色谱峰之间的分离度均大于 1.5, 拖尾因子在 0.95~1.02 之间; 理论塔板数均大于 31047 (USP), 色谱图见图 1。

1.2 线性关系 取上述对照品储备液, 采用逐级稀释法分别制取贝母辛为 28.75、57.5、115.0、230.0、460.0、920.0 和 1150.0 μg·mL⁻¹, 西贝母碱为 25.75、51.5、103.0、206.0、412.0、824.0 和 1030.0 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。按上述色谱条件进行 UPLC-ELSD 分析, 用外标法以对照品的峰面积 (y) 与相对应的浓度 (x) 做双对数线性回归处理, 其回归方程和线性范围分别为: 贝母辛 $y = 1.629 7x + 1.68$, $r = 0.999 2$, 28.75~1150.0 μg·mL⁻¹; 西贝母碱 $y = 1.818 6x + 1.200 5$, $r = 0.999 1$, 51.5~1030.0 μg·mL⁻¹。各待测成分在浓度范围内呈良好线性关系。

1.3 进样精密度 取 3 个不同浓度的对照品混合溶液, 每个浓度重复进样 3 次, 每次 1 μL, 测定峰面积, 结果表明, 各对照品峰面积积分值的 RSD 分别为贝母辛 (0.54%、0.12% 和 1.09%)、西贝母碱 (0.68%、2.17% 和 3.84%)。

1.4 重复性 取同一批样品 6 份, 按供试品溶液制备方法制备和上述色谱条件测定, 同批样品中贝母

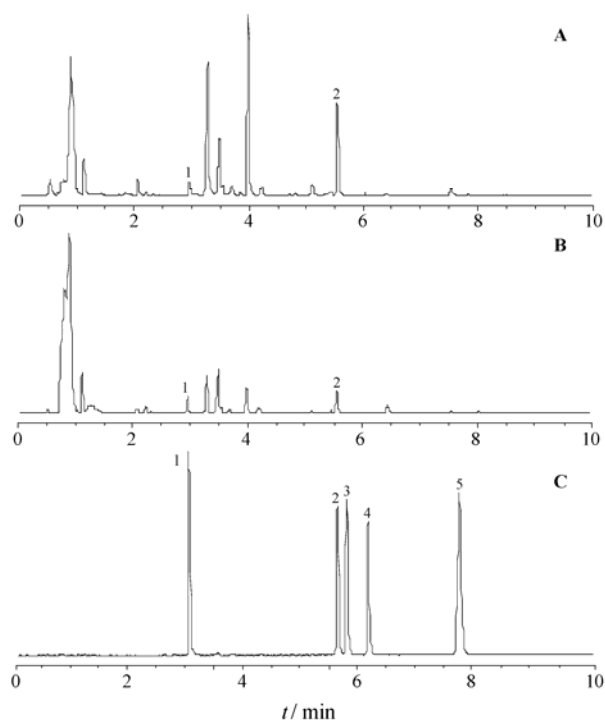


Figure 1 UPLC-ELSD chromatogram of sample extracts. Peaks 1: Peimisine; 2: Sipeimine; 3: Peimine; 4: Peiminine; 5: Hupehenine. A: *F. walujewii*; B: *F. pallidiflora*; C: Reference substance

辛和西贝母碱的平均含量分别为 81.5 和 316.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.33% 和 0.96%。

1.5 稳定性 取上述供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 和 36 h 进行测定, 记录峰面积, 贝母辛和西贝母碱色谱峰的峰面积 RSD 值分别为 0.71% 和 2.33%, 表明样品至少在 36 h 内稳定。

1.6 加样回收率 取同一批样品 6 份, 分别精密加入一定量 (相当于样品中的量) 贝母辛和西贝母碱, 按供试品溶液的制备方法制备, 进样 1 μL , 按上述色谱条件测定, 分别计算回收率和 RSD 值, 见表 1。

Table 1 Accuracy of the two components ($n = 6$)

Parameter	Peimisine	Sipeimine
Initial amount/ μg	81.5	316.4
Spiked amount/ μg	80.5	309.0
Found/ μg	157.6	619.7
Recovery	94.5%	98.1%
RSD	1.12%	2.36%

2 样品含量测定

将样品按照上述供试品制备方法制备, 进样

1 μL , 记录 10 min 色谱图, 同时用对照品溶液进样以确定生物碱成分的峰位, 采用外标法计算两个生物碱成分含量, 色谱图见图 1, 测定结果见表 2。

Table 2 Results of two alkaloids in *F. walujewii* and *F. pallidiflora* ($n = 3$)

Sample	Collection date	Sample origin	Concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	
			Peimisine	Sipeimine
<i>F. Pallidiflora</i>	10.2008	Yili, Xinjiang	81.5	316.4
<i>F. Pallidiflora</i>	09.2009	Yili, Xinjiang	137.1	205.8
<i>F. Pallidiflora</i>	10.2009	Medicine Market in Anguo, Hebei	92.5	645.1
<i>F. Pallidiflora</i>	11.2007	Medicine Market in Anguo, Hebei	208.9	582.8
<i>F. Walujewii</i>	10.2009	Medicine Market in Anguo, Hebei	296.3	368.9
<i>F. Walujewii</i>	11.2009	Medicine Market in Anguo, Hebei	166.2	139.1
<i>F. Walujewii</i>	10.2009	Medicine Market in Lianqiao, Hunan	425.3	860.3
<i>F. Walujewii</i>	10.2008	Lhasa, Tibet	—	240.3
<i>F. Walujewii</i>	12.2009	Lhasa, Tibet	—	1028.9
<i>F. Walujewii</i>	09.2009	Yili, Xinjiang	204.5	837.9
<i>F. Walujewii</i>	11.2009	Yili, Xinjiang	175.9	237.7
<i>F. Walujewii</i>	09.2009	Huocheng, Xinjiang	—	135.3

讨论

本文首次建立了 UPLC-ELSD 同时测定伊贝母中 2 种生物碱类成分的方法。与 HPLC 方法^[6, 7]比较, 贝母辛出峰时间由原来的 12 min 缩短到 3 min, 西贝母碱由 28 min、11 min, 缩短到 5.5 min, 分离效率高, 重复性好, 准确简便, 节省了分析时间和成本。

中国药典将新疆贝母和伊犁贝母收载作为伊贝母药材使用, 两者外形有一定差异。从特征色谱图来看, 二者有一定差异, 可用于两种药材植物的基原快速鉴别, 但两者均含有贝母辛和西贝母碱, 特别是西贝母碱含量均较高。本文同时检测了 5 个成分, 发现伊贝母中贝母素甲和贝母素乙含量较低或没有, 这与浙贝母、皖贝母和湖北贝母等富含贝母素甲和贝母素乙的类型差异较大, 这也从某种程度诠释了临床用药中伊贝母和浙贝母、湖北贝母、皖贝母等有差异。与目前药典收载的其他贝母类药材相比, 新疆贝母和伊犁贝母中的西贝母碱含量较高, 商品上中国药典将伊犁贝母和新疆贝母合并为伊贝母有一定

的合理性。本文建立的 UPLC-ELSD 方法对伊贝母药材的植物基源种间快速鉴别和药材质量控制具有现实意义。

References

- [1] Chang WC, Liu XQ, Liu PJ, et al. Introduction and cultivation techniques of *Fritillaria pallidiflora* Schrek [J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res (特产研究), 1991, 4: 42-45.
- [2] Xu DM, Huang EX, Wang SQ, et al. Studies on the chemical constituents of *Fritillaria pallidiflora* schrenk [J]. J Integr Plant Biol (植物学报), 1990, 32: 789-793.
- [3] Li SL, Lin G, Chan SW, et al. Existence of 5 α -cevenine isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* L. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1999, 34: 842-847.
- [4] Huang EX, Li CS, Xu DM. Studies on the alkaloid constituents of *Fritillaria pallidiflora* Schrenk [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 1990, 15: 38-41.
- [5] Li SL, Lin G, Chan SW, et al. Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. J Chromatogr A, 2001, 909: 207-214.
- [6] Li SL, Li P, Zheng LJ. Determination of imperialine and imperialine-3 β -D-glucoside in bulbs of *Fritillaria pallidiflora* by HPLC-ELSD [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2001, 36: 300-302.
- [7] Huang LF, Chen SL, Liu H, et al. Determination of three alkaloids in different processing methods on *Fritillaria cirrhosa* by HPLC-ELSD method [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2009, 31: 1560-1564.

祝贺《药学报》被评为 2009 年“百种中国杰出学术期刊”

在 2010 年 11 月 26 日召开的“中国科技论文统计结果发布”上，中国科学技术信息研究所公布了 2009 年百种中国杰出学术期刊评选结果，《药学报》再次获此殊荣。

中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》(核心版) 定期公布中国科技论文与引文数据库收录的中国科技论文统计源期刊的 20 余个科学计量指标。1999 年开始，以此指标为基础，研制了中国科技学术期刊综合评价指标体系。采用层次分析法，由专家打分确定了重要指标的权重，并分学科对每种期刊进行综合评定。2002 年公布了第一届中国百种学术期刊名单。

2010 年再次根据指标体系实施应用以来我国学术期刊的变化趋势和实际状况，修订了期刊指标体系，对期刊的指标权重进行了重新核定。在此基础上推出了 2009 年百种中国杰出学术期刊。

《药学报》从 2002 年开始，连续 8 年被评为“百种中国杰出学术期刊”。

《药学报》编辑部