川贝母新资源太白贝母中生物碱类成分含量测定

段宝忠[1], 王丽芝[1], 黄林芳[1*], 魏大华[2], 卢其福[2] (1. 中国医学科学院-北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 广州潘高寿药业股份有限公司, 广州 511490)

摘要: 目的 利用高效液相色谱法测定太白贝母中的生物碱成分。方法 采用 Agilent Extend C_{18}柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.02% 三乙胺水溶液, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min^{-1}, 漂移管温度 90 ℃; 载气体积流量 2.3 L·min^{-1}, 增益值 2, 进样量 10 μL; 柱温 25 ℃。结果 贝母辛在 28.75~690.0 μg·mL^{-1}, 贝母素乙在 27.37~560.6 μg·mL^{-1}, 贝母素甲在 25.75~527.0 μg·mL^{-1}与峰面积的对数值呈线性关系, 平均回收率分别为 99.4% (n=6), RSD为 1.10%; 99.7% (n=6), RSD为 3.61%; 100.3% (n=6), RSD为 2.82%。结论 太白贝母中的生物碱成分与川贝母非常相似, 为其作为川贝母来源的合理性奠定了基础。

关键词: 太白贝母; 生物碱; 高效液相色谱-蒸发光检测法
中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)05-0382-03

Determination of Main Alkaloids in *Fritillaria taipaiensis* by HPLC-ELSD

DUAN Bao-zhong[1], WANG Li-zhi[1], HUANG Lin-fang[1*], WEI Da-hua[2], LU Qi-fu[2] (1. *Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing* 100193, *China*; 2. *Guangzhou Pangaoshou Pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou* 511490, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a HPLC method for determining the contents of peimisine, imperialine and peiminine in *Fritillaria taipaiensis*. **METHODS** The analyses were performed on an Agilent Extend-C_{18} column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The investigated compounds were separated with gradient mobile phase consisting of methanol-water-triethylamine at the flow of 1.0 mL·min^{-1}. The temperature for the detector drift tube was set at 90 ℃ and the nitrogen flow-rate was 2.3 L·min^{-1}, the gain in ELSD was set at 2 in order to obtain the best sensitivity, and the injection volume was 10 μL. **RESULTS** The investigated compounds including peimisine, peiminine and peimine had good linearity ($r^2 \geqslant 0.9991$) within the tested ranges. The average recoveries were 99.4%, 99.7% and 100.3% with RSD≤3.61%. **CONCLUSION** The developed method can be applied to control the quality of the *F. taipaiensis* with a good accuracy, sensitivity and repeatability.

KEY WORDS: *Fritillaria taipaiensis*; alkaloids; HPLC-ELSD

太白贝母为百合科 (Liliaceae)贝母属 (*Fritillaria*)植物 *Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li的干燥鳞茎, 具清热润肺、止咳化痰之功效, 为 2010年版《中国药典》(一部)新增的川贝母药材基原植物。太白贝母适应性强, 栽培技术成熟, 是川贝母中适宜家种栽培的最佳品种[1]。据研究报道, 生物碱是贝母的主要活性成分[2], 目前有关太白贝母的生物碱含量尚未见相关研究, 为探讨其与川贝母化学成分的相关性, 本实验建立了 HPLC-ELSD法同时测定太白贝母中 3种生物碱的方法, 并对重庆地区的 5个批次的太白贝母含量进行了分析, 取得了较满意的结果, 为太白贝母的质量控制提供了科学参考。

1 仪器与试药

Waters高效液相色谱仪 (1525二元泵, 717型自动进样器, Waters In-line Degasser AF在线脱气机, 恒温柱箱); Alltech ELSD 2000蒸发光散射检测器 (Deerfield, USA); 无油空气泵 (天津华生分析仪器厂, WYK-Ⅲ), Breeze色谱工作站, 电子分析天平 (Mettler, AB135-S)。

贝母素甲 (peimine, 批号 110750-200609)、贝母素乙 (peiminine, 批号 110751-200608)、西贝母碱 (Sipeimine, 批号 110769-200504)对照品购于中国药品生物制品检定所 (供定量测定用), 贝母辛由本实验室自制, 结构经氢谱、碳谱和质谱鉴定, 纯度经

基金项目: 科技部十一五支撑计划项目 (2006BAI09B05-3); 中医药行业专项基金 (200707007); 中医药行业专项基金 (200807020)
作者简介: 段宝忠, 男, 硕士 研究方向: 中药资源与质量控制 * 通讯作者: 黄林芳, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师 研究方向: 中药资源与质量控制 Tel: (010)62811448 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HPLC峰面积归一化法计算大于 98%。甲醇(色谱纯),其他试剂均为分析纯,水为重蒸水。

太白贝母 5份样品采于重庆市,经中国医学科学院药用植物研究所陈士林教授鉴定为 *Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Extend C_{18} 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相为甲醇(A)-0.02% 三乙胺(B);流速 1.0 mL·min^{-1};漂移管温度 90 ℃;载气体积流量 2.3 L·min^{-1},增益值 2,进样量 10 μL;柱温 25 ℃。线性梯度洗脱程序:0~15 min, 35%~55% A, 15~30 min, 55%~72% A, 30~32 min, 72%~75% A, 32~37 min, 75%~80% A, 37~40 min, 80%~85% A, 40~50 min, 85%~90% A。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取各对照品约 2.00 mg,置 2 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,振摇使混合均匀,配制成混合对照品储备液,备用。

2.3 供试品溶液制备

取药材粉末约 2 g(过 80目筛),精密称定,置 100 mL烧瓶中,加浓氨试液 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 ℃水浴中加热回流 3 h,放冷,滤过,滤液挥干,加甲醇定容至 2 mL,即得。进液相前用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.4 标准曲线与线性关系考察

取“2.2”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、690.0 μg·mL^{-1},贝母素乙 27.37、54.75、109.5、219.0、560.6 μg·mL^{-1}和贝母素甲 25.75、51.50、103.0、206.0、527.0 μg·mL^{-1}的对照品标准液。按“2.1”色谱条件进行 HPLC-ELSD分析,用外标法以对照品的峰面积(y)与相对应的浓度(ρ)做双对数线性回归处理,回归方程见表 1。

2.5 精密度实验

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 10 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(0.76%、0.43%、0.69%)、贝母素乙(0.83%、0.77%、0.82%)和贝母素甲(1.81%、1.69%、1.44%)。

2.6 重复性实验

取同一批样品 6份,按“2.3”方法制备和“2.1”色谱条件测定,同批样品中贝母辛的平均含量为 601.6 μg·g^{-1},RSD为 1.45%,贝母素甲的平均含量为 98.6 μg·g^{-1},RSD为 1.91%,贝母素乙的平均含量为 58.6 μg·g^{-1},RSD为 1.69%。

2.7 稳定性实验

取“2.3”供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24、36 h进行测定,记录峰面积,贝母辛、贝母素甲、贝母素乙色谱峰的峰面积 RSD值分别为 1.51%、2.76%、3.69%,表明样品至少在 36 h内稳定。

2.8 加样回收率实验

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)各生物碱对照品,按供试品溶液的制备方法制备并测定,各贝母辛、贝母素乙、贝母素甲平均回收率分别为 99.4%、99.7%和 100.3%,RSD值分别为 1.10%、3.61%和 2.82%。

2.9 样品测定

将采集的样品按照“2.3”方法制备,进样 10 μL,平行操作 3次,采用外标法计算 3个生物碱成分含量,色谱图见图 1,测定结果见表 2。

3 讨 论

3.1 流动相的选择

为了使贝母样品中的各成分分离,比较了甲醇-水和乙腈-水两种流动相系统,结果表明,以甲醇-水流动相为佳,各主要色谱峰分离度好,在 60 min内

表 1 回归方程与线性范围

Tab. 1 Regression equation and calibration range

Components	Regression equation	r	Calibration range /μg·mL^{-1}
Peimisine	y = 1.526 0ρ + 3.133 6	0.999 1	28.75-690.00
Peiminine	y = 1.645 3ρ + 2.945 1	0.999 3	27.37-560.60
Peimine	y = 1.649 4ρ + 2.961 8	0.999 3	25.75-527.00

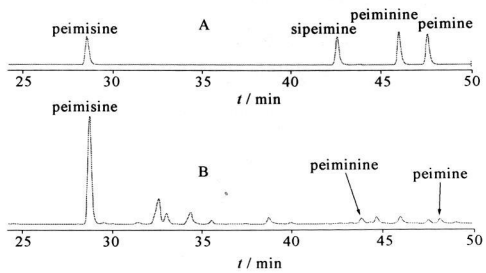

图 1 生物碱混合对照品溶液(A)和太白贝母样品(B)的 HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of reference substance (A) and sample (B)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 太白贝母药材来源及 3 个生物碱成分含量测定结果 (n= 3, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 The contents of three alkaloids in *Fritillaria taipaiensis*. (n= 3, $\bar{x}\pm s$)

Collection site	Collection time	Product type	Content/%		
			Peimisine	Peiminine	Peimine
Wuxi county (wild)	2008-5-3	Qingbei	0.000 50±0.003	0.000 07±0.006	0.000 06±0.001
Wuxi county (wild)	2008-5-3	Songbei	0.000 70±0.009	0.000 13±0.001	0.000 09±0.006
Wuxi county (wild)	2008-5-3	Songbei	0.000 60±0.002	0.000 10±0.003	0.000 06±0.002
Wuxi county (wild)	2008-6-15	Qingbei	0.000 30±0.007	0.000 07±0.006	0.000 04±0.006
Chengkou county (cultivated)	2008-6-15	Qingbei	0.000 35±0.002	0.000 09±0.005	0.000 09±0.007

能达到很好分离,综合考虑保留时间、分离度及峰形对称性的要求,我们选择以甲醇-水系统梯度洗脱。另外,生物碱易发生拖尾现象,在流动相中加入改性剂 0.02% 三乙胺后,得到了满意的分离度和较好的峰形。

3.2 ELSD检测器条件优化

为了使流动相充分挥发和降低灵敏度损失,选择不分流模式。在此基础上,考察了漂移管温度和雾化气流速两个最重要参数。按照推荐温度和气流实验,发现噪音较大,随着飘移管温度的升高,检出限降低,通过实验不同条件,最后确定最佳条件为漂移管温度 90 ℃,雾化气流速 2.3 L·min^{-1},增益值 2。

3.3 提取条件的选择

3.3.1 提取方式的选择 经比较超声提取和回流提取两种方式。结果回流提取效果较好,因此采用回流提取。

3.3.2 氨水碱化条件的考察 生物碱类化合物提取前应使生物碱类成分充分游离,浓氨试液的加入量对生物碱提取有显著影响[3-4]。实验比较了浓氨试液不同用量和不同碱化时间对提取率的影响。最终确定浓氨试液碱化用量为 4 mL,时间为 2 h。

4 结 论

本实验应用 HPLC-ELSD法,建立了同时测定 4 种生物碱的方法,并对太白贝母 3种生物碱进行了定量测定,实验结果表明,太白贝母中贝母辛含量较高,是总生物碱的主要组成成分,贝母素甲和贝母素乙含量都较低,未检测到西贝母碱。这一实验结果与笔者等对川贝母的生物碱成分测定结果基本一致[5-7]。从商品规格角度,松贝中 3种生物碱的含量明显较青贝高。太白贝母和川贝母中都含有贝母辛,但贝母素甲和贝母素乙均较低,二者生物碱成分比较相似。根据对野生和栽培川贝母 (*Fritillaria cirrhosa* D. Don.)形态特征的观察和分析,陈心启等[2,8]认为太白贝母 (*Fritillaria taipaiensis*)和川贝母 (*Fritillaria cirrhosa*)的区别较难把握,且有过渡,很可能仅仅是它的一个类型,其植物形态上较为相似。从化学成分和植物形态角度来看,2010年版《中国药典》将太白贝母纳入川贝母项下,有一定的科学依据。

REFERENCES

[1] LIU X Q. Cultivation techniques of bulbus *Fritillariae* cirrhosae [J]. *Stockbreeding Market* (畜牧市场), 1992, 6: 455.

[2] DUAN B Z, CHEN X L, HUANG L F, *et al*. Research progress on resources in bulbus *Fritillariae taipaiensis* [J]. *Modern Chin Med* (中国现代中药), 2010, 12(4): 12-14.

[3] XIAO P G, JIANG Y, LI P, *et al*. The botanical origin and pharmacophylogenetic treatment of Chinese materia medica Beimu [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 2007, 45(4): 473-487.

[4] JIANG Y, LI P. Determination of verticine and verticinone in bulbus *Fritillariae* thunbergii by HPLC-ELSD [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2005, 40(16): 1257-1259.

[5] HUANG L F, CHEN S L, LIU H, *et al*. Determination alkalobids in different processing methods by HPLC-ELSD [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2009, 31(10): 1560-1564.

[6] CAO X W. Studies on the chemical constituents from the bulbus fritillariae cirrhosae and quality assessment of *Fritillaria* species [D]. Beijing: Peking union Medical College, 2007.

[7] YU H, JIANG Y, LI P, *et al*. Study on analytical method for alkaloids in bulbus *Fritillariae cirrhosae* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(8): 572-575.

[8] CHEN X Q, XIA G C. A taxonmic study of the Chinses drug Beimu (Fritillaria) [J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 1977, 15(2): 31-46.

(收稿日期: 2010-09-27)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net