

高效液相色谱法同时测定中药材虎掌南星的核苷类成分

陆 丹, 罗 芬, 池玉梅*, 吴 皓

(南京中医药大学, 江苏 南京 210046)

摘要: 建立了高效液相色谱同时测定中药材虎掌南星中核苷类活性成分(腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺苷、鸟苷)含量的方法。以 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)分离, 以乙腈-水(含 0.1% 甲酸)为流动相, 梯度洗脱, 在 254 nm 下检测, 腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷及鸟苷分别在 1.6~50 mg/L 范围内、胸腺嘧啶和腺苷分别在 1.2~40 mg/L 范围内的线性关系良好, 相关系数均大于 0.999 5 加标回收率为 98.9%~101.2%, 相对标准偏差均小于 3%。方法学考察结果显示符合含量测定要求, 并应用于不同产地虎掌南星的测定。该方法操作简便、快速, 结果可靠, 重现性好, 可作为虎掌南星质量评价的参考依据。

关键词: 高效液相色谱法; 核苷; 虎掌南星; 中药材

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)01-0083-04

Determination of nucleosides in Rhizoma Pinelliae by high performance liquid chromatography

LU Dan, LUO Fen, CHI Yumei*, WU Hao

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract A high performance liquid chromatographic (HPLC) method was established to determine nucleosides in Rhizoma Pinelliae, which is a dried stem tuber of *Pinellia pedatisecta* Schott in *Pinellia* plant belonging to Araceae family and has multiple efficiencies about downbear counterflow and check vomiting, eliminating dampness and phlegm, etc. The separation of adenine, hypoxanthine, xanthine, uridine, thymine, adenosine and guanosine was achieved on a Lichrospher C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the detection at 254 nm and gradient elution by acetonitrile-water containing 0.1% formic acid as the mobile phase. The linear ranges were from 1.6 mg/L to 50 mg/L for adenine, hypoxanthine, xanthine, uridine and guanosine, while from 1.2 mg/L to 40 mg/L for thymine and adenosine with correlation coefficients above 0.999 5. The average recoveries were between 98.9% and 101.2% with the relative standard deviations below 3%. The results of methodological study demonstrated that the method met the requirements of the determination. The nucleosides in Rhizoma Pinelliae from different districts were determined. The method is convenient and accurate with good reproducibility and can be used to evaluate the quality of Rhizoma Pinelliae.

Key words high performance liquid chromatography (HPLC); nucleosides; Rhizoma Pinelliae; traditional Chinese medicinal materials

虎掌南星又名掌叶半夏, 为天南星科半夏属植物掌叶半夏 (*Pinellia pedatisecta* Schott) 的干燥块茎, 味苦、辛, 性温, 有毒, 归肺、肝、脾经^[1], 具有降逆止呕、燥湿化痰、祛风定惊、消痞散结的功效^[2], 含有生物碱类、苷类、二肽类、氨基酸、凝集素、甾醇类、脂肪酸、糖、微量元素、核苷等成分^[3], 始载于

《神农本草经》, 尚未收载于《中国药典》, 但在安徽、河北、四川等地有大面积的种植, 个小者常被当作天南星科半夏属植物半夏 (*Pinellia ternate* (Thunb.) Breit), 而大多被作为天南星科天南星属植物天南星 (*Rhizoma Arisaema*) 的主流商品使用, 自古使用多混乱。核苷类成分大多具有抗菌、

* 通讯联系人: 池玉梅, 教授, 主要研究方向为色谱及相关技术的应用、中药质量控制标准。E-mail: ymch@njutcm.edu.cn
基金项目: 国家“十一五”支撑计划项目 (2006BAI09806-10) 和国家自然科学基金项目 (30973939)。

抗病毒、抗肿瘤活性^[4],迄今,就虎掌南星质量的研究报道尚少,尚未见有测定有关核苷类活性成分含量的报道。目前,核苷类成分含量的测定方法有高效液相色谱法(HPLC)^[5-11]和毛细管电泳法(CE)^[12-14]。本课题组研究前期以超高效液相色谱-电喷雾四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-ESI-Q/TOFMS)对虎掌南星进行定性分析,结果显示其含有嘌呤、嘧啶碱基与腺苷、鸟苷等多个核苷成分。本文以HPLC建立同时测定7个嘌呤、嘧啶、核苷成分的方法,测定虎掌南星的核苷类成分含量,以期为药材水溶性成分的进一步研究奠定基础,同时为其质量评价提供参考依据。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Waters Alliance 2695 HPLC 仪(美国 Waters 公司),配 Waters 2996 光电二极管阵列检测器(PDA)和 Waters Empower 色谱工作站。

乙腈、甲酸为色谱纯(MERCK 公司),水为超纯水(由 Millipore 纯水器制备)。对照品:腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺苷、鸟苷为分析纯(含量均大于 99.5%,美国 Sigma 公司)。

虎掌南星(10 批次,产地为河北、河南、安徽、四川、山东、陕西、吉林,经南京中医药大学药植专家谈献和教授鉴定为天南星科半夏属植物掌叶半夏的块茎)。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品储备液的配制

取置干燥器中 48 h 以上的各对照品 10 mg 精密称定,分别置于 10 mL 容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,得各对照品储备液。

1.2.2 供试品溶液的制备

取虎掌南星药材粉末(过 60 目筛)约 0.6 g 精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 10 mL 水,称定质量,超声处理(频率 40 kHz 功率 250 W) 45 min 放冷,再称定质量,用水补足减失的质量,摇匀。取适量溶液离心 5 min(15 000 r/min),取上清液,供 HPLC 测定。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: Lichrospher C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈(含 0.1% 甲酸)(A)和水(含 0.1% 甲酸)(B)体系。梯度洗脱: 0~6 min, 100% B; 6~25 min, 100% B~90% B; 25~29 min, 90% B~75% B; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 方法的建立

2.1.1 色谱条件的选择

分析 7 个成分的紫外光谱(图 1),综合考虑检测时各色谱峰的响应和干扰因素,选择 254 nm 为检测波长。

分别试验以甲醇和水、乙腈和水体系为流动相,结果显示,乙腈和水体系较佳。试验显示在体系中加入酸可改善峰形,通过条件优化,以甲酸加入量 0.1% 时为宜。优化梯度程序,显示在 6 min 内维持 100% 的水相,可使腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷达到基线分离;在 19 min 内水相比比例匀速降至 90%,可使腺苷、鸟苷在 15 min 内出峰并基线分离;随后在 4 min 内将乙腈比例升至 25%,以使溶液中极性稍小的组分尽快流出。分别试验流速大小和柱温高低对峰形和分离度的影响,结果显示以流速为 1 mL/min 柱温为 30 °C 的条件为宜。对照品与样品色谱图见图 1,理论塔板数均大于 3 000 与相邻

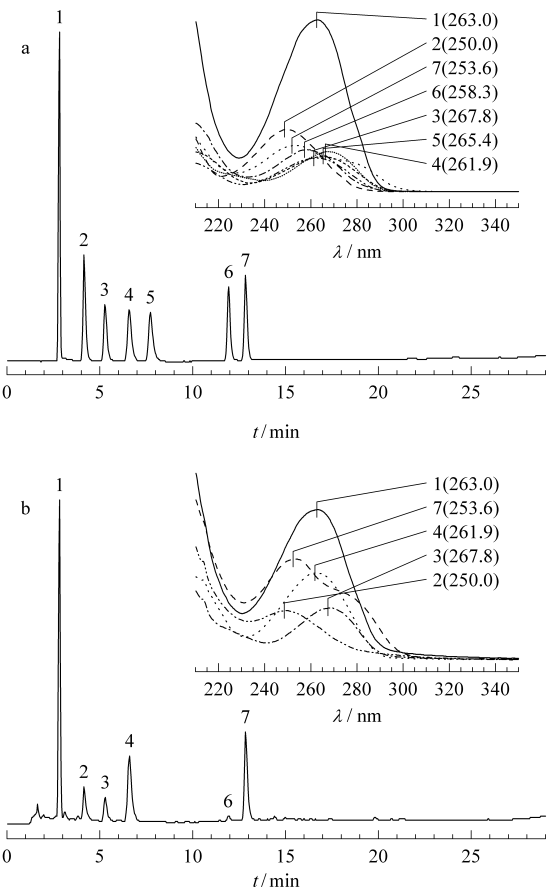


图 1 (a)对照品和 (b)样品的高效液相色谱图与紫外光谱图
Fig 1 HPLC chromatograms and UV spectra of (a) reference substances and (b) a sample

Peaks 1 adenine, 2 hypoxanthine, 3 xanthine, 4 uridine, 5 thymine, 6 adenosine, 7 guanosine

色谱峰的分离度均大于 1.5。样品的色谱图显示腺苷峰较小, 胸腺嘧啶低于检出限。

2 1 2 供试品前处理方法的优化

试验用水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇提取, 结果显示水的提取效率最高, 因此选择水作为提取溶剂。试验比较了超声提取法与回流提取法, 结果显示前者更为适宜。分别分析药材与水的质量比为 1: 5Q 1: 25 1: 10 时的提取液, 结果显示 3 种料液比的提取液中各成分提取率的相对标准偏差 (RSD) 均在 3% 以内, 考虑各色谱峰面积大小的适宜性及操作的方便性, 本法采用在 0.6 g 药材中精密加入 10 mL 水的方法。通过对超声时间的考察, 确定超声提取时间为 45 min。

表 1 7 种核苷类成分的回归方程、相关系数、线性范围、定量限和检出限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients (r^2), linear ranges, limits of quantification (LOQ) and limits of detection (LOD) of seven nucleosides					
Compound	Regression equation	r^2	Linear range/(mg/L)	LOQ/(mg/L)	LOD/(mg/L)
Adenine	$y = 96660x - 2121.6$	0.9999	1.6 - 50.2	0.15	0.05
Hypoxanthine	$y = 55764x - 1396.6$	0.9999	1.6 - 50.8	0.3	0.1
Xanthine	$y = 37356x - 1685.6$	0.9999	1.6 - 50.3	0.3	0.1
Uridine	$y = 42017x - 1639.8$	0.9999	1.6 - 51.5	0.3	0.1
Thymine	$y = 56539x - 2001.8$	0.9998	1.2 - 39.7	0.3	0.1
Adenosine	$y = 57832x - 1550.4$	0.9999	1.2 - 39.8	0.3	0.1
Guanosine	$y = 49924x - 1979.6$	0.9999	1.6 - 50.7	0.3	0.1

y: peak area; x: mass concentration, mg/L

2 2 2 重复性

取 2.2.1 节配制的 B4 溶液, 连续进样 6 次分析, 计算各成分对应的色谱峰面积的 RSD, 结果显示 RSD 均小于 1.0% (见表 2), 说明色谱系统重复性良好。

表 2 方法的重复性和稳定性

Table 2 Repeatability and stability of the method %			
Compound	Repeatability (n = 6)		Stability (n = 7)
	System	Method	
Adenine	1.0	2.2	0.8
Hypoxanthine	0.7	2.9	2.5
Xanthine	0.6	1.1	2.3
Uridine	0.9	1.6	1.2
Thymine	0.7	*	*
Adenosine	0.7	*	*
Guanosine	0.5	1.0	1.0

* below the limit of quantification

将同一份药材以 1.2.2 节的方法平行处理 6 份, 以 1.2.3 节条件进行分析, 计算各组分含量的 RSD, 考察方法的重复性, 结果见表 2 可见 RSD 均小于 3.0%, 符合测定要求。

2 2 3 稳定性

取重复性试验的同一份供试品溶液, 常温下放置, 在 24 h 内每隔 4 h 进样分析, 计算各组分含量的 RSD, 结果显示 RSD 均小于 3.0% (见表 2), 表

2 2 方法学考察

2 2 1 线性范围和检出限

分别精密量取各对照品储备液适量, 置于 10 mL 容量瓶中, 加水定容, 摇匀, 得对照品混合溶液, 腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺苷、鸟苷的质量浓度依次为 50.23、50.75、50.30、51.50、36.69、39.84、50.70 mg/L; 采用二倍稀释法连续稀释 5 次, 分别得 B1、B2、B3、B4、B5、B6 系列对照品溶液。以 1.2.3 节条件对其进行分析, 以峰面积 (y) 对对照品质量浓度 (x, mg/L) 用最小二乘法进行线性回归。对质量浓度最低的溶液 (B1) 逐步稀释, 以信噪比 (S/N) 约为 10 计定量限 (LOQ), 以 S/N 约为 3 计检出限 (LOD), 结果见表 1。

明供试品溶液稳定性良好。

2 2 4 准确性

以加标回收率试验考察方法的准确性。分别精密吸取 1.2.1 节的腺嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、尿苷、胸腺嘧啶、腺苷、鸟苷的对照品储备液适量, 置于 100 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 摇匀, 得对照品混合溶液。取已知含量的药材 (过 60 目筛) 0.3 g 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 10 mL 上述对照品混合溶液, 余下操作同供试品溶液制备相应步骤, 平行制作样品 6 份, 以 1.2.3 节的方法进行分析, 用外标法以表 1 的回归方程计算各相应成分的含量, 并计算回收率和 RSD, 结果显示回收率为 98.9% ~ 101.2%, RSD 均小于 3.0% (见表 3), 符合含量测定的准确性要求。

2 3 样品测定

以建立的方法测定 10 批次虎掌南星药材的核苷类成分含量, 结果见表 4。统计 10 批次药材中各核苷含量的 RSD 为 31.8% ~ 53.1%, 显示各产地虎掌南星的核苷类成分差异较大。分析结果同时显示实验用批次的虎掌南星中胸腺嘧啶含量和腺苷含量低于定量限, 由于前期在使用 UPLC-ESI-Q/TOF MS 对虎掌南星的化学成分进行定性分析时检测到有胸腺嘧啶和腺苷, 因此在建立方法时也对这两个

表 3 7种核苷类成分的加标回收率 (n = 6)
Table 3 Recoveries of seven nucleosides (n = 6)

Compound	Found/(mg/L)	Background/(mg/L)	Added/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
Adenine	13.95	7.010	6.955	99.8	2.4
Hypoxanthine	4.057	2.050	2.030	98.9	2.5
Xanthine	5.033	2.506	2.515	100.5	2.9
Uridine	16.29	8.296	7.931	100.9	2.4
Thymine	7.055	*	7.031	100.3	0.9
Adenosine	6.936	*	6.972	99.5	1.5
Guanosine	14.82	7.431	7.301	101.2	2.7

* below the limit of quantification

表 4 不同产地虎掌南星药材中核苷类成分的含量 (n = 3)
Table 4 Nucleoside contents of Rhizoma Pinelliae from different districts (n = 3) mg/g

No	District	Adenine	Hypoxanthine	Xanthine	Uridine	Guanosine	Total
1	Henan	0.27	0.044	0.041	0.28	0.16	0.80
2	Sichuan	0.19	0.059	0.075	0.23	0.19	0.74
3	Shandong	0.23	0.058	0.052	0.37	0.23	0.94
4	Hebei	0.23	0.067	0.056	0.28	0.24	0.87
5	Shaanxi	0.20	0.079	0.070	0.32	0.20	0.87
6	Hebei	0.35	0.11	0.11	0.55	0.40	1.52
7	Hebei	0.11	0.061	0.013	0.34	0.50	1.02
8	Jilin	0.12	0.080	0.014	0.54	0.23	0.98
9	Sichuan	0.25	0.070	0.068	0.26	0.18	0.83
10	Anhui	0.20	0.033	0.042	0.45	0.40	1.12
Mean		0.21	0.066	0.054	0.36	0.27	0.96
RSD/%		30.9	30.4	51.1	30.1	40.5	21.9

成分进行了分析,是否虎掌南星药材中这两个成分含量确实低于定量限,尚有待测试更多批次不同产地的样本。

3 结论

建立了高效液相色谱同时测定中药材虎掌南星中的 7 个核苷类成分。方法简便、快速,结果可靠,重现性好,可应用于测定中药材虎掌南星的多种核苷类成分。样品测定结果显示,药材中核苷类成分含量差异较大,提示药材质量有待规范。

参考文献:

[1] Song L R. Chinese Materia Medica Vol 23. Shanghai Shanghai Scientific and Technical Publishes (宋立人. 中华本草. 第 23 卷. 上海: 上海科学技术出版社), 1999. 504

[2] Mao S J, Cheng L P, Wu L Y, et al. Journal of Chinese Medicinal Materials (毛淑杰, 程立平, 吴连英, 等. 中药材), 2001, 24(11): 813

[3] Li X J, Li Z H, Wang Y Q, et al. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine (李晓静, 李志宏, 王玉芹, 等. 中国中医药信息), 2004, 21(1): 61

[4] Wang R. Letters in Biotechnology (王锐. 生物技术通讯), 2007, 18(3): 539

[5] Wang J, Bi K S. Chinese Traditional Patent Medicine (王棘, 毕开顺. 中成药), 2008, 30(4): 537

[6] Yao J Q, Wu H, Wang L C, et al. Chinese Journal of Marine Drugs (姚静倩, 吴皓, 王令充, 等. 中国海洋药物杂志), 2009, 28(4): 31

[7] Zhou R, Li S F. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (周冉, 李淑芬. 药物分析杂志), 2009, 29(4): 575

[8] Zhang J Z, Song C H, Chen B, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (张健芝, 宋昌慧, 陈波, 等. 中国中药杂志), 2010, 35(1): 67

[9] Zhang Y J, Qian Z M, Chen X J, et al. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (张元杰, 钱正明, 陈肖家, 等. 药物分析杂志), 2010, 30(1): 33

[10] Zhang K W, Wu H. Chinese Pharmaceutical Journal (张科卫, 吴皓. 中国药学杂志), 2008, 43(23): 1826

[11] Yan S K, Xin W F, Luo G A, et al. Chinese Journal of Chromatography (严诗楷, 辛文峰, 罗国安, 等. 色谱), 2005, 23(5): 482

[12] Ling J Y, Zhang C K, Sun Y J, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (凌建亚, 张长铠, 孙迎节, 等. 分析化学), 2003, 31(1): 123

[13] Guo H Z, Chen R, Li F, et al. Chinese Journal of Chromatography (郭怀忠, 陈蓉, 李芳, 等. 色谱), 2004, 22(5): 539

[14] Lin X C, Lin J, Wang J B, et al. Chinese Journal of Chromatography (林旭聪, 林葭, 王家斌, 等. 色谱), 2010, 28(3): 284