HPLC法测定市售贝母中贝母乙素含量

王 [illegible][1],张庆林[2],陈信义[1],唐仲雄[2],吴祖泽[2]
(1. 北京中医药大学 东直门医院,北京 100700; 2. 北京放射医学研究所,北京 100850)

摘 要: 目的 为了选择贝母乙素含量较高的贝母原材料。方法 建立了 HPLC法分析贝母原材料中贝母乙素含量。贝母生药粉用氨水-95% 乙醇(1∶5)混合液提取,柱前用 2,4-二硝基苯肼(DNPH)衍生,衍生化条件 50℃下反应 30 min。分析色谱柱: Hypersil C_{18} ODS2,流动相: CH_3CN-100 mmol/L CH_3COONH_4(41∶59,pH= 5.0),流速为 1.2 mL/min。UV 375 nm检测。结果 4种市售贝母中东贝母的贝母乙素含量最高。结论 方法灵敏,重现性好,样品用量少,便于应用。

关键词: 贝母;贝母乙素;高效液相色谱
中图分类号: R927.2 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)01-0024-02

Quantitative determination of peiminine in *Bulbus Fritillaria* available on market by HPLC

WANG Yue[1], ZHANG Qing-lin[2], CHEN Xin-yi[1], TANG Zhong-xiong[2], WU Zu-ze[2]
(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of TCM, Beijing 100700, China; 2. Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

Abstract **Object** To develop a method for the quantitative determination of peiminine in *bullus Fritillariae* as a guide for the choice of a better product on the market. **Methods** An HPLC method was developed. The powdered drug was extracted with a mixed solution of ammonia-95% alcohol (1∶5). The crude peiminine obtained was derivatized to its 2,4-dinitro hydrazone at pH 2.0 and 50℃ for 30 min. The HPLC conditions were: Hypersil C_{18} column, with CH_3CN: 100 m Mol ammonium acetate (49∶51) at pH 5.0 as the mobile phase and detected at the wave length of 375 nm. **Results** Among the 4 samples obtained from the market, *F. thunbergii* var. *chekiangensis* Hsiao et K. C. Hsia gave the highest peiminine content. **Conclusion** The method was highly sensitive with good reproducibility and need only a small amount of sample, suitable for practical use.

Key words *Bulbus Fritillaria*; peiminine; HPLC

近年来研究表明,贝母乙素具有逆转肿瘤细胞多药耐药活性,可能具有临床应用前景[1]。为了选择易得且贝母乙素含量较高的贝母原材料,我们建立了贝母乙素 HPLC定量分析方法,并对 4种市售贝母中的贝母乙素含量进行了测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与样品: 液相色谱仪系统包括 Waters 600E泵,996二极管阵列检测器,2010色谱管理系统,717plus自动进样器;分析色谱柱: Hypersil C_{18} ODS2 (Shadon, 英国) 5μm, 4.6 mm× 150 mm (大连依利特科学仪器公司预装)。流动相: CH_3CN-100 mmol/L CH_3COONH_4(41∶59, pH= 5.0),流速为 1.2 mL/min。

浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq.、东贝母 *F. thunbergii* var. *chekiangensis* Hsiao et K. C. Hsia、黄炉贝 *F. delavayi* Franch.、松贝 *F. przewalskii* Maxim. 为市售统装,品种经北京中医药大学中药鉴定室鉴定,符合药典标准。生药粉碎,过 60目筛。贝母乙素标准品购于中国药品生物制品检定所。

1.2 2,4-二硝基苯肼(DNPH): 分析纯,用 CH_3CN-H_2O 重结晶 2次,溶于乙腈中,浓度为 3.0 mg/mL,该溶液每周新鲜配制。

1.3 贝母乙素提取溶剂: 将纯氨水与 95% 乙醇按 1∶5体积比混合,配成贝母乙素提取溶剂。

1.4 样品处理及衍生化方法: 称取 0.5 g贝母生药粉,置 10 mL离心管内,加入 5.0 mL提取溶剂,振荡。室温放置 48 h后,超声提取 30 min,离心,吸取 0.25 mL上清液置小烧瓶中,旋转蒸干。衍生化方法为在上述提取物中加入 10μL 2.0 mol/L盐酸和 100μL DNPH溶液(3.0 mg/mL),混合均匀后在

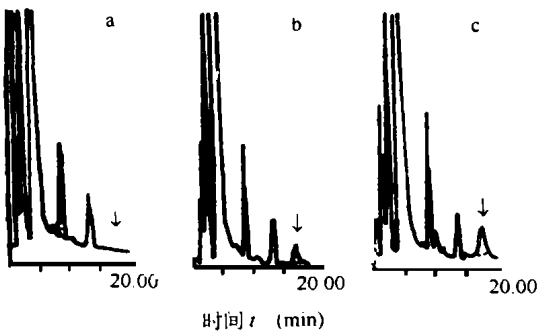
⑳ 收稿日期: 2000-02-18
作者简介: 王 [illegible](1973-),女,北京人,硕士,研究方向为贝母乙素逆转肿瘤细胞多药耐药性。现就职于 Procter& Gamble (China)。Tel (010) 62780088

50℃下反应 30 min,取 5μL进行分析。

2 结果

2.1 最大吸收波长的选择:吸取 0.2 mL贝母乙素标准溶液(190μg/mL),衍生化后,注入色谱系统,用二极管阵列检测器于 190~ 450 nm波长范围进行扫描,结果表明,最大吸收波长为 375 nm,故选作测定波长。

2.2 色谱图比较:见图 1



a空白对照 b标准品 c贝母样品

图 **1** 贝母乙素 **2,4**-二硝基苯腙色谱分离图

2.3 标准曲线:分别吸取 0.095, 0.19, 0.95, 1.9, 9.5, 19, 38, 57, 76μg 贝母乙素标准溶液置小烧瓶中,旋转蒸发至干,衍生化后分析。测定峰面积值,同一浓度测定 5次,空白对照组加 10μL 2.0 mol/L盐酸和 100μL DNPH溶液,操作步骤同前。结果表明,贝母乙素在 0.095~ 76μg范围内呈线性关系,标准曲线方程为 $Y= 8.49X - 0.0487$, $r= 0.9966$;式中 Y为峰面积值,X为贝母乙素量(μg)。

2.4 精密度:吸取含 9.5μg和 38μg贝母乙素的标准溶液,按标准曲线项下操作。日内精密度分别为 $RSD= 9.2\%$, $RSD= 8.4\%$;日间精密度分别为 $RSD= 3.6\%$, $RSD= 3.9\%$ ($n= 4$)。

2.5 回收率:称取 0.5 g两组浙贝母生药粉,在其中一组内加入贝母乙素 1.01 mg,另一组设定为对照样品,两组按测定方法项下操作。平均回收率为 93.9%, $RSD= 8.0\%$ ($n= 3$)。

2.6 样品测定结果:4种市售贝母中贝母乙素含量测定结果见表 1。

3 讨论

表 **1** 4种市售贝母中贝母乙素含量($n= 3$)

贝母品种	贝母乙素含量(%)	*RSD*(%)
浙贝母	0.016 8± 0.000 9	5.2
东贝母	0.040 3± 0.001 7	4.2
黄炉贝	0.002 1± 0.000 2	9.5
松 贝	0.001 8± 0.000 2	8.5

贝母乙素属甾体生物碱,其特异性 UV吸收峰为 290 nm。由于吸收强度较弱,无法满足样品中贝母乙素含量分析。因贝母乙素结构中含有酮基,很容易与 2,4-二硝基苯肼反应,选择 UV 375 nm测定贝母乙素苯腙衍生物能满足样品中贝母乙素定量分析要求。色谱图表明贝母乙素 2,4-二硝基苯腙色谱峰能与其它杂质峰良好分离,不受其它色谱峰的干扰。

已有文献报道甾体生物碱的其它分析方法,如毛细管气相色谱法、羟基柱前衍生化液相色谱法等[2,3]。本文报道了用 2,4-二硝基苯肼柱前衍生化 HPLC定量分析含酮基甾体生物碱的方法,可不受样品中其它非酮基生物碱的干扰。本研究测得贝母乙素含量与文献报道基本相同[4,5]。该方法具有灵敏、重复性好、样品用量少和便于应用等优点。

开展对市售贝母中贝母乙素的含量测定,选择易得且贝母乙素含量较高的品种,是贝母作为肿瘤-白血病细胞多药耐药逆转剂的研究基础,可为今后选择原材料提供依据。本文研究结果表明,浙贝母、东贝母、黄炉贝和松贝 4个品种中,东贝母中贝母乙素含量最高,提示该种贝母有可能作为提取贝母乙素的药物来源。贝母种类繁多,分布广泛[6],有待进一步研究。

参考文献:

[1] 胡凯文,陈信义. 中药活性成分抗耐药肿瘤细胞体外筛选研究[J]. 中国医药学报, 1998, 13(2): 10-11.
[2] Osman S F. High-performance liquid chromatographic analysis of *Solanum* steroidal alkaloids [J]. J Chromatogr, 1989, 479: 189.
[3] Ding K, Lin G, Ho P P. Perderivatization and high-performance liquid chromatographic analysis of alkaloids of bulbs of *Fritillaria* [J]. J Pharm Sci, 1996, 85: 1174.
[4] 郑虎占,董泽宏,余 靖. 中药现代研究与应用(第四卷)[M]. 北京:学苑出版社, 1998.
[5] 李 萍,徐国钧,徐珞珊. 贝母中的贝母碱、去氢贝母碱含量测定[J]. 中草药, 1993, 24(11): 579-580.
[6] 陈心启,夏光成. 中药贝母名实考订[J]. 植物分类学报, 1997, 15(2): 31-45.

开展公益广告宣传活动 加强社会主义精神文明建设