

柱的长度)为横坐标,一相对应的浸泡液 pH 值为纵坐标作图,可求得各样品胶柱上 pH 梯度曲线。

表 2 pH 值测定结果
Table 2 Result of pH value

柱长/cm	pH 值	柱长/cm	pH 值
0.5	9.4	5.0	5.2
1.0	8.9	5.5	5.0
1.5	8.2	6.0	4.8
2.0	7.8	6.5	4.5
2.5	7.5	7.0	4.2
3.0	7.0	7.5	3.7
3.5	6.5	8.0	3.1
4.0	6.0	8.5	2.0
4.5	5.5		

2.7 半夏(A 庐山、B 蛇山、C 钟祥)新鲜品自然干燥 1 周,其中钟祥半夏按照炮制方法^[2]炮制成清半夏(D)、姜半夏(E)。将上述 5 种样品按 2.1 制备样品液,按电泳方法操作,结果见图 2。

3 讨论

3.1 由图 1 可见不同产地半夏具有相似的谱带,其中江西庐山半夏因采集时间早,样品个头小,谱带较弱;半夏的近缘植物谱带与半夏有明显的区别,可用此鉴别半夏药材。

3.2 由图 2 可见干燥的半夏除具有原有的谱带外,在主带附近新增了细小的条带,可能是干燥的过程中蛋白质发生部分降解,估计放置时间越长降解越多,但干半夏和新鲜半夏的谱带非常接近。半夏炮制品中清半夏虽经过浸泡处理,但未经过高温处理,仍然有微弱条带;姜半夏由于经过了高温处理,蛋白质已变性,故无带。由该实验方法可方便、准确地鉴别

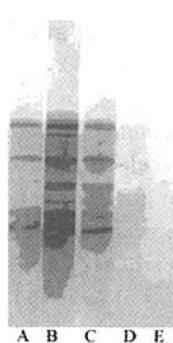


图 2 不同产地干燥品及炮制品 IEF 图谱

Fig. 2 IEF Electrophorogram of protein in dry and processed *P. ternana* from different habitats

半夏药材,且不同产地半夏具有相对稳定的谱带。

3.3 因胶柱经固定后其长度会发生变化,故由 pH—胶柱长度关系曲线求被测样品(半夏)所含主要蛋白质成分的等电点(PI),所用长度是经校正后的长度即:

$$\text{胶柱长度} = \text{蛋白质迁移距离} \times \text{原胶柱长(固定前)} / \text{现胶柱长(固定后)}$$

根据样品各条谱带在各自 IEF 胶柱上的位置(经校正后),再分别与各自的 pH—长度关系曲线对比,可方便得出样品中主要蛋白质 PI 值。半夏(3 种不同产地的半夏具有相同的谱带,可认为是半夏的特征谱带) 8 种主要蛋白质的 PI 值是:6.50,5.90,5.40,5.30,5.18,5.03,4.82,4.60。

3.4 两性电解质的加入是为了在电泳支持物上产生适宜平滑的 pH 梯度。本实验采用将样品液混入凝胶液中的点样方法,既简化了操作,增大了加样量,又避免了样品液在胶柱中所占的一段 pH 梯度,从而扩大了电泳分离范围,提高分辨率并缩短电泳时间。

References:

[1] He Z X, Zhang S Z. *Electrophoresis* (电泳) [M]. 2nd. Beijing: Science Press, 2000.
 [2] Gong Q F. *Herb Processing* (中药炮制学) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2003.

HPLC-ELSD 测定彭泽贝母中浙贝甲素和浙贝乙素

刘红宁¹, 颜冬梅¹, 朱卫丰¹, 饶毅²

(1. 现代中药制剂教育部重点实验室 江西中医学院, 江西 南昌 330004;
2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 建立 HPLC-ELSD 测定彭泽贝母中浙贝甲素、浙贝乙素的分析方法。方法 以 C₁₈柱为色谱柱,蒸发光散射检测器,运用 HPLC 法分离及分析彭泽贝母中的浙贝甲素和浙贝乙素。结果 建立了 HPLC-ELSD 测定彭泽贝母中浙贝甲素、浙贝乙素的分析方法:色谱柱:Hypersil ODS₂(200 mm×4.6 mm, 5 μm),柱温 30 ℃。流动相:乙腈-0.03% 二乙胺水(65:35),体积流量 1.0 mL/min。检测器参数:漂移管温度 83.5 ℃,载气体积流量 2.2 mL/min,进样量 10 μL。结论 运用 HPLC-ELSD 能够同时测定彭泽贝母中浙贝甲素、浙贝乙素的量。

关键词:浙贝甲素;浙贝乙素;HPLC-ELSD

中图分类号:R282.6

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)04-0600-03

Determination of peimine and peiminine in *Fritillaria monantha* bulb by HPLC-ELSDLIU Hong-ning¹, YAN Dong-mei¹, ZHU Wei-feng¹, RAO Yi²

(1. Key Laboratory of Modern Pharmaceutical Science, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. National Pharmaceutical Engineer Center of Manufacture Technology for Chinese Materia Medica Solid Preparation, Nanchang 330006, China)

Key words: peimine; Peiminine; HPLC-ELSD

彭泽贝母为百合科贝母属(*Fritillaria* L.)植物,主产于江西省彭泽、湖口、都昌、九江、瑞昌、修水等县,是贝母属植物在江西的新分布。其原植物经中国科学院植物研究所陈心启研究员鉴定为百合科植物天目贝母 *F. monantha* Migo。临床上用其干燥鳞茎入药,具有清热润肺、化痰止咳的功效,用于治疗痰热咳嗽、痰多胸闷、气管炎和慢性支气管炎等常见呼吸道疾病。初步药理研究结果表明,彭泽贝母生物碱部分具有平喘止咳之药效。张治针等^[1]利用酸性染料比色法、薄层扫描法分别测定了彭泽贝母中的总生物碱和浙贝甲素、浙贝乙素。2005年版《中国药典》在浙贝母质量控制中,采用HPLC-ELSD法同时测定浙贝甲素、浙贝乙素^[2]。本实验建立了HPLC-ELSD法测定彭泽贝母中浙贝甲素、浙贝乙素,为建立彭泽贝母的药材质量标准提供了实验依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪;G1311A系列四元梯度泵,G1322A脱气机,G1313A自动进样器;ELSD检测器;Alltech 2000(美国Alltech);色谱柱:Hypersil ODS₂(200 mm×4.6 mm, 5 μm,依利特);MZ-20型万能粉碎机(北京环亚天元机械技术有限公司);浙贝甲素、浙贝乙素对照品(购于中国药品生物制品检定所,批号:110750-200305、110751-200303);甲醇(色谱纯,江苏汉邦有限公司);乙腈(色谱纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂);二乙胺(分析纯,上海亭新化工试剂厂);甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氯仿(分析纯,山东禹王实业有限公司禹城化工厂);氨水(分析纯,广东汕头市西陇化工厂);超纯水(Milipore滤过);彭泽贝母(采于江西省彭泽县天红乡武山村,为四年生样品,经江西中医学院范崔生教授鉴定为百合科贝母属植物天目贝母 *F. monantha* Migo。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,色谱柱:Hypersil ODS₂(200 mm×4.6 mm, 5 μm,依利特),柱温30℃。流动相:乙腈-0.03%二乙胺水(65:35),体积流量:1 mL/min。蒸发光散射检测器检测,检测器参数:漂移管温度83.5℃,载气流

量2.2 mL/min。进样量10 μL。理论塔板数按浙贝甲素计算不低于2 000。

2.2 对照品溶液的制备:精密称取浙贝甲素、浙贝乙素对照品适量,分别置棕色量瓶中,加甲醇定容至5 mL,得0.328 mg/mL浙贝甲素和0.219 mg/mL的浙贝乙素对照品溶液。各取2 mL加甲醇定容至5 mL,得含浙贝甲素0.131 2 mg/mL、浙贝乙素0.087 6 mg/mL的混合对照品溶液(10℃以下保存)。

2.3 供试品溶液的制备:取60℃真空干燥彭泽贝母鳞茎粉碎,过四号筛,精密称取(1±0.000 5) g样品,加2 mL氨水浸润1 h,精密加入氯仿-甲醇(4:1)溶液20 mL,超声提取45 min,滤过,滤渣用甲醇少量多次洗涤,至洗涤液无颜色,用蒸发皿置于60℃水浴上蒸干,加少量甲醇超声溶解,定容至5 mL。0.45 μm滤膜滤过,备用。

2.4 检测限及定量限的测定:分别取浙贝甲素、浙贝乙素对照品溶液,用安捷伦自动进样阀控制,逐渐减小进样体积。取信噪比为3的进样量为检测限,结果浙贝甲素为0.459 2 μg,浙贝乙素为0.459 9 μg。取信噪比为10的进样量为定量限,结果浙贝甲素为1.082 4 μg,浙贝乙素为1.007 4 μg。

2.5 标准曲线的绘制:取浙贝甲素、浙贝乙素对照品混合溶液50 μL(最大进样量100 μL)、40、20、18、15(乙素)、10、8 μL(甲素),注入高效液相色谱仪中,以进样量自然对数为横坐标,色谱峰面积自然对数为纵坐标,绘制标准曲线,经回归处理,得回归方程: $Y_{\text{甲}} = 1.424 9 X + 0.891 6$ ($r = 0.999 4$), $Y_{\text{乙}} = 1.328 X + 1.393 3$ ($r = 0.999 7$)。浙贝甲素在6.560~1.049 mg,浙贝乙素在4.38~0.876 mg进样量自然对数与峰面积自然对数成良好线性关系。色谱图见图1。

2.6 精密度试验:取供试品溶液连续进样6次,进样量10 μL,结果RSD_甲 = 1.3%, RSD_乙 = 1.4%,表明该方法精密度良好。

2.7 重现性试验:同批样品,照供试品制备方法制备5份,各进10 μL,进样检测,结果RSD_甲 = 1.9%, RSD_乙 = 2.5%,表明该方法重现性良好。

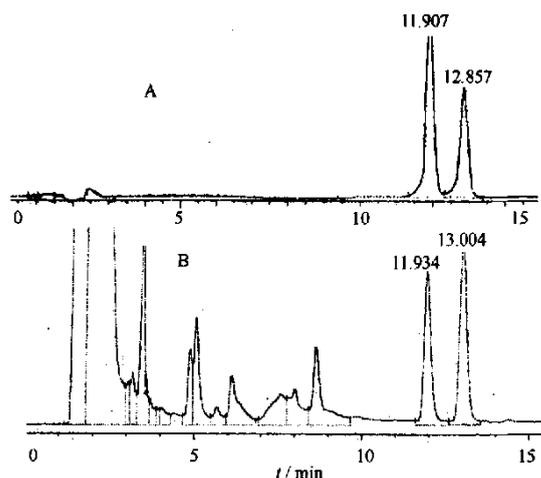


图 1 浙贝甲素和浙贝乙素(A)和样品(B)HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of peimine and peiminine (A), and sample (B)

2.8 稳定性试验:取供试品溶液于 0、2、3、6、7、19 h 测定,结果表明供试品溶液在 19 h 内稳定。 $RSD_m = 2.7\%$, $RSD_z = 2.4\%$ 。

2.9 加样回收试验:取已测得质量分数的彭泽贝母样品 0.2~0.3 g,精密称定,分别加入一定量的浙贝甲素、浙贝乙素对照品溶液,同供试品溶液的制备项下操作,制备供试溶液并测定,计算回收率,得浙贝甲素平均回收率为 104.04%,RSD 为 4.04% ($n=5$),浙贝乙素平均回收率为 96.9%,RSD 为 2.06% ($n=5$)。

2.10 样品测定:按供试品溶液项下制备样品溶液,取 10 μ L 进样,测定浙贝素和浙贝乙素的质量分数,结果见表 1。

3 讨论

3.1 测定结果表明彭泽贝母中浙贝甲素和浙贝乙素的量均高于 2005 年版《中国药典》中浙贝母项下量的要求。

3.2 在分析方法的确定研究中发现:流动相是否调整 pH 值对样品色谱行为影响很大。研究结果表明,

表 1 彭泽贝母中浙贝甲素和浙贝乙素的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of peimine and peiminine of *F. monantha* ($n=3$)

样品	浙贝甲素/%	浙贝乙素/%
1	0.096	0.111 5
2	0.106	0.100 8
3	0.107	0.101 3

在流动相中加入 0.03% 二乙胺,使峰形明显改善,浙贝甲素、浙贝乙素保留时间合理,分离度达到要求 ($R \geq 1.5$)。

3.3 本试验首次建立了 HPLC-ELSD 方法同时测定了彭泽贝母中浙贝甲素、浙贝乙素,较之应用薄层扫描法稳定可靠、重现好、检测灵敏度更理想。

3.4 实验中采用了 ODS 柱进行分析。ODS 柱为十八烷基试剂与硅胶表面的硅醇基键合而成的,其 pH 值适用范围在 2~8,适合分离弱极性、偏酸性物质。ODS 柱的分离机制为吸附与解吸附,要求化合物以分子形式参与吸附与解吸附的过程。因彭泽贝母中所含化合物偏碱性,在实验条件下部分以离子形式存在,极性偏大,不适合 ODS 柱分离的要求。此种情况下,通常通过调节流动相 pH 值抑制样品组分的解离,增加在固定相中的溶解度,增加中性分子在流动相中存在的几率,调整分离时间,从而达到合理分离的目的。综合色谱柱对 pH 的要求及彭泽贝母中化学物质的性质,选用二乙胺调节流动相 pH。

3.5 文献中贝母类生物碱的 HPLC-ELSD 分析也有采用三乙胺作为碱性改良剂的,由于二乙胺较三乙胺更容易在气化室气化,减少了流动相在气化室的残留,防止了检测器带来噪音。因此在实验中选择了二乙胺作为碱性改良剂。

References:

- [1] Zhang Z Z, Fan C S. Studies on quality assay of *Fritillaria monantha* Migo [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23 (1): 23-25.
- [2] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.

欢迎订阅《中草药》杂志 2001 年增刊

2001 年第 32 卷增刊为“第三届中草药新药研究与开发信息交流会”会议论文集,特邀了中国工程院院士、国内十多名专家和中青年学科带头人就加快中药现代化的进程、我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章 20 多篇,另有反映近年来中花化学、药理分析、制剂、药材及临床等方面的科研论文和综述文章 140 多篇。

每本定价 60 元,另加 5.00 元邮费。欢迎广大读者直接向《中草药》杂志编辑部订阅,款到寄刊。

编辑部地址:天津市南开区鞍山西道 308 号 邮编:300193 网址:www.tjpr.com

电话:(022)27474913 23006821 传真:(022)23006821 E-mail: zcyzjb@tjpr.com