



RP-HPLC 同时测定贝母药材中 5 种核苷类化合物

张建芝, 宋昌慧, 陈波*, 姚守拙

(湖南师范大学 化学生物学及中药分析教育部重点实验室, 湖南 长沙 410081)

[摘要] 目的:建立一种同时测定贝母药材中核 5 种核苷类化合物尿苷、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷的高效液相色谱法。方法:采用 Welch Materials XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵-乙酸缓冲盐(pH 4.30)作为流动相,以 1 mL · min⁻¹ 的流速进行梯度洗脱(洗脱梯度程序为:0 ~ 10 min, 0% ~ 1% A; 10 ~ 20 min, 1% ~ 5% A; 20 ~ 25 min, 5% A; 25 ~ 35 min, 5% ~ 30% A; 35 ~ 37 min, 30% ~ 0% A; 37 ~ 40 min, 0% A);进样量 20 μL;检测波长 260 nm。结果:在 0.24 ~ 13.60 mg · L⁻¹, 各核苷类化合物的响应峰面积与其相应的浓度呈现良好的线性关系, $r > 0.9983$;各待测物的日内精密度和日间精密度的 RSD 均小于 2.1%;重复性良好(RSD < 5.5%);回收率范围在 93.55% ~ 101.88%, RSD < 3.0%。结论:不同种贝母药材中核苷类化合物的含量大致顺序为湖北贝母 > 浙贝 > 川贝 ≈ 平贝;本方法简便、可靠、准确,可用于贝母药材中核苷类化合物的含量测定,为全面开发利用贝母药材提供进一步依据。

[关键词] 高效液相色谱法(HPLC);核苷类化合物;贝母

贝母系百合科贝母属多年生药用草本植物,用于治疗痰热咳嗽、痰多胸闷,对治疗气管炎和慢性支气管炎有很好的疗效。《中国药典》(2005年版)第一部共收录了 5 种贝母包括:浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq., 川贝母 *F. cirrhosa* D. Don, 伊贝母 *F. pallidiflora* Schrenk., 湖北贝母 *F. hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia, 平贝母 *F. ussuriensis* Maxim^[1]。川贝母包括百合科植物川贝母 *F. cirrhosa*, 暗紫贝母 *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia, 甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim ex Batak, 梭砂贝母 *F. delapayi* Franch;其中前三者按性状不同,商业上分别习称“松贝”和“青贝”,梭砂贝母的鳞茎习称为“炉贝”;湖北贝母即“板贝”;伊贝母是新疆产贝母的商品总称,商品主流为新疆贝母 *F. walujewii* Regel 和伊犁贝母 *F. pallidiflora* 的干燥鳞茎^[2]。

关于贝母属植物的生理活性成分研究一般集中在生物碱上^[3-5],但近年来其中的非生物碱成分也逐步得到了人们的重视^[6-7]。其中核苷类化合物作为贝母药材中的一类非生物碱成分,参与 DNA 代谢过程,具有抗肿瘤、抗病毒、基因治疗等多种生物活性,也得到了人们的关注^[8]。本实验针对不同来源贝

母药材中的该类化合物进行了含量分析及其种类差异的相关性研究,以便能更好的、全面的开发利用贝母且为其质量控制提供进一步依据。

1 材料

Waters Alliance 2695 液相色谱仪由 Waters 2695 分离单元、Waters 2487 双波长紫外检测器组成(waters, 美国);KQ-3200 B 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);PHS-3C 型酸度计(上海精科分析仪器厂);Mettler Toledo 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

标准品尿苷、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷购于 Sigma 公司(长沙杰辉生物公司代售,纯度均 > 99%);甲醇(色谱纯);冰乙酸(分析纯);水为超纯水;板贝、野生川贝、小贝、青贝、浙贝、松贝、平贝药材(各 1 份)由清华大学分析中心孙素琴主管技师提供;川贝母药材(产地四川)由中国中医科学院中药研究所何希荣教授鉴定。市售药材青贝(产地青海)、川贝 1(产地四川)、川贝 2(产地四川奉节)、川贝 3(产地广州)、浙贝 1、浙贝 2、浙贝 3(产地浙江)、松贝(市售)、平贝(产地哈尔滨)均购自长沙市高桥药材市场,由湖南师范大学生命科学院植物系李建中教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Welch Materials XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A 相为甲醇, B 相为 5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵-乙酸缓冲盐(pH 4.30);流速 1 mL ·

[收稿日期] 2009-07-03

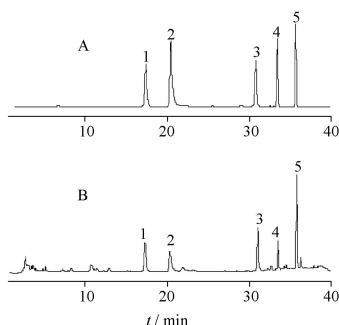
[基金项目] 国家自然科学基金(0875028)项目;国家重点基础研究发展计划(973)项目(2006CB504701)

[通信作者] * 陈波, 博士生导师, 主要从事化学生物学及中药分析, Tel: (0731) 8865515; E-mail: dr-chenpo@vip.sina.com

min^{-1} ; 柱温 20°C ; 进样量 $20\ \mu\text{L}$; 检测波长 $260\ \text{nm}$; 梯度洗脱程序见表 1; 该条件下, 贝母药材典型色谱图见图 1。

表 1 梯度洗脱程序

t/min	A/%	B/%
0	0	100
10	1	99
20	5	95
25	5	95
35	30	70
37	0	100
40	0	100



1. 尿苷; 2. 腺嘌呤; 3. 鸟苷; 4. 胸苷; 5. 腺苷。

图 1 (A) 对照品溶液 (B) 川贝 HPLC 图

2.2 对照品及供试品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

精密称取对照品尿苷、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷适量置于 $10\ \text{mL}$ 的量瓶中, 用超纯水溶解至刻度, 配制成 $320, 310, 350, 300, 340\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。分别取各对照品溶液适量, 用水配制成一定浓度的混标溶液, 置于 4°C 的冰箱内, 待用。

2.2.2 供试品溶液的制备

取不同种贝母样品, 置于研钵中粉碎后, 过 80 目筛后得到贝母粉末。分别称取样品粉末 $0.50\ \text{g}$ 于试管中, 向其中加入 $8\ \text{mL}$ 超纯水, 超声 $60\ \text{min}$ 取出, 冷却至室温后转移溶液于 $10\ \text{mL}$ 的量瓶中, 加超纯水定容至刻度。离心、过 $0.45\ \mu\text{m}$ 的滤膜后待用。

2.3 线性、线性范围和检出限

精确量取不同质量浓度的混合对照品溶液, 进样分析, 用外标法定量。将各对照品的浓度作为横坐标, 峰面积作为纵坐标, 进行线性回归得标准曲线方程和线性范围。以信噪比 $S/N = 3$ 作为检出限 (LOD), $S/N = 10$ 作为定量限 (LOQ), 见表 2。

2.4 精密度试验

在优化色谱条件下进行方法的精密度实验。取浙贝 (清华大学提供) 供试品溶液, 重复进样 5 次进行分析, 计算峰面积相对标准偏差 (RSD)。尿苷、腺

表 2 5 种核苷的线性关系

对照品	线性方程 $Y/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	线性范围 $Y/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	r	LOD $Y/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	LOQ $Y/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
尿苷	$Y = 1\ 313.6X - 997.9$	$0.256 \sim 12.8$	$0.999\ 6$	20.0	72.3
腺嘌呤	$Y = 2\ 430.8X - 2\ 022.2$	$0.248 \sim 12.4$	$0.998\ 9$	21.7	75.8
鸟苷	$Y = 1\ 099.4X - 846.4$	$0.280 \sim 14.0$	$0.998\ 3$	22.6	74.7
胸苷	$Y = 1\ 049.9X - 789.3$	$0.240 \sim 12.0$	$0.999\ 2$	16.8	56.8
腺苷	$Y = 1\ 528.4X - 1\ 173.8$	$0.272 \sim 13.6$	$0.998\ 9$	14.7	46.8

嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷的 RSD 分别为 1.0% , 1.1% , 1.8% , 1.9% , 1.5% ; 连续分析 5 d, 各物质的日间精密度分别为 1.6% , 1.7% , 2.1% , 2.0% , 1.7% ; 由结果得知该方法的精密度良好。

2.5 重复性试验

平行称取浙贝 (清华大学提供) 样品 5 份, 根据 2.2.2 项下的实验方法处理样品后, 依次进样。待测核苷类化合物尿苷、腺嘌呤、鸟苷、胸苷、腺苷的 RSD 分别为 0.38% , 4.3% ,

0.12% , 3.1% , 5.5% , 结果显示该方法的重复性好。

2.6 回收率

分别将低、中、高 3 个浓度水平的各标准品溶液 $1\ \text{mL}$ 加入到 $0.25\ \text{g}$ 浙贝 (清华大学提供) 样品中, 按照样品处理方法进行处理后, 取样, 过膜, 每个添加水平平行测定 5 次, 5 种目标物在 3 种添加水平下的加标回收率范围为 $93.55\% \sim 101.88\%$, $RSD < 3.0\%$, 见表 3, 结果都符合测定要求。



表 3 样品中添加的目标物的回收率 ($n=5$)

对照品	原有量 / μg	加入量 / μg	测得值 / μg	回收率 /%	RSD /%
尿苷	25.20	40.00	65.50	100.75	2.0
		26.70	51.20	97.37	2.0
		16.00	41.50	101.88	2.0
腺嘌呤	11.00	38.75	50.30	101.42	1.3
		10.30	21.10	98.06	1.3
		6.20	16.80	93.55	2.0
鸟苷	21.50	35.00	56.00	98.57	2.3
		23.30	44.20	97.42	2.0
		11.70	32.80	96.58	1.5
胸苷	20.50	30.00	50.80	101.00	2.5
		20.00	40.30	99.00	3.0
		15.00	35.00	96.67	3.0
腺苷	35.50	68.00	103.80	100.44	2.3
		34.00	70.00	101.47	2.3
		23.00	58.20	98.70	1.9

表 4 贝母药材中核苷类成分的质量分数 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

药材	尿苷	腺嘌呤	鸟苷	胸苷	腺苷
浙贝(清华大学)	0.102	0.044	0.086	0.082	0.142
浙贝 1(市售)	0.05	0.032	0.027	0.02	0.04
浙贝 2(市售)	0.076	0.025	-	0.02	0.027
浙贝 3(市售)	0.07	0.03	0.087	0.027	0.135
野生川贝(清华大学)	0.063	0.04	0.073	0.038	0.099
川贝(中国中医科学院 中药研究所)	0.123	0.029	0.117	0.048	0.166
川贝 1(市售)	0.05	0.03	0.056	0.02	0.076
川贝 2(市售)	0.051	0.033	0.066	0.029	0.095
川贝 3(市售)	0.053	0.049	0.071	0.032	0.101
青贝(清华大学)	0.036	0.052	0.06	0.033	0.098
青贝(市售)	0.043	0.037	0.075	0.043	0.106
松贝(清华大学)	0.094	0.058	0.117	0.065	0.144
松贝(市售)	0.038	0.044	0.03	-	0.064
板贝(清华大学)	0.054	0.039	0.095	0.07	0.122
小贝(清华大学)	0.07	0.03	0.111	0.029	0.142
平贝(清华大学)	0.055	0.04	0.076	0.035	0.095
平贝(市售)	0.1	0.02	0.031	0.023	0.03

注:1~4. 浙贝;5~9. 川贝;10~11. 青贝;12~13. 松贝;14. 板贝;15. 小贝;16~17. 平贝

2.7 样品中核苷类物质的含量分析

分别取不同来源的贝母药材 0.50 g, 按照 2.2.2 项下供试品溶液的制备制得样品提取液, 测定其中核苷类成分的含量, 结果见表 4。

将 17 个不同来源的贝母药材按照药典分类(1~4 为浙贝, 5~13 为川贝, 14 为湖北贝母“板贝”, 15 为小贝, 16~17 为平贝), 通过结果分析可以得出:①不同种贝母药材所含的核苷类化合物的含量大致顺序为“板贝”即湖北贝母 > 浙贝 > 川贝 \approx 平贝;②所有贝母药材中腺苷的含量较其他核苷类化合物含量高, 而文献报道腺苷具有降低血压、减慢心率、镇静中枢神经和松弛支气管平滑肌等作用^[9], 由此可以得出贝母药材的部分药理活性很可能与其药材中较高含量的腺苷有关。

由于贝母药材来源有限, 本实验在仅有的药材基础上, 从市场上购买了不同种贝母药材。在对不同来源贝母的研究分析中发现, 市售松贝中未检测发现胸苷成分, 而在其他来源的松贝中均含有胸苷成分; 在不同来源的川贝母中, 其中一种川贝(产地四川, 由中国中医科学院中药研究鉴定)未检测到鸟苷成分, 而在保留时间为 23.53 min 处发现有另一种成分存在, 通过质谱分析得到的碎片离子与鸟苷相同, 初步鉴定为鸟苷的同分异构体, 而在其他来源的川贝中未出现这一情况; 由于药材来源有限, 该现象还有待于进一步分析研究。

3 讨论

3.1 提取条件的选择

为了达到最佳的分离效果, 以浙贝母(清华大学提供)为提取样品, 用 20 倍水做溶剂, 分别超声提取 20, 40, 60, 80 min, 结果表明 60 min 已经提取完全; 取同样量的浙贝药材粉末, 分别用 20 倍水、5% 甲醇、10% 甲醇、15% 甲醇、20% 甲醇作溶剂, 超声 60 min, 结果表明以水做溶剂, 超声 60 min 时峰面积达到最大值, 因此选择纯水作为提取溶剂。

3.2 色谱柱的选择

为了优化待测物的分离, 测试了 5 种不同的反相色谱柱, 即 Spherigel C₈ (4.6 \times 250 mm, 5 μm), Spherigel C₈ (4.6 mm \times 200 mm, 5 μm), Spherigel C₁₈ (4.6 mm \times 200 mm, 5 μm), Spherigel C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), XB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)。实验结果表明, 使用 Welch Materials XB-C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱比普通反相柱的分离效果好, 该色谱柱不仅使腺嘌呤的拖尾现象得到了很好的抑制且分析时间也缩短。

3.3 流动相的选择

由于 5 种待测的核苷类物质均属于碱性化合物, 且腺嘌呤的 pK_a 为 4.15, 所以流动相的 pH 会影



响腺嘌呤的出峰时间。当流动相使用0.3% 乙酸-甲醇溶液时,鸟苷和胸苷未能达到完全分离,当流动相换为 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵-乙酸缓冲盐(pH 4.30)流动相时,各种待测物质的出峰顺序发生了改变,但是各物质间都达到了很好的分离。所以,实验选择了 $5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵-乙酸缓冲盐(pH 4.30)作为流动相。

4 结论

由于贝母在性状和化学成分上存在着许多的相似性,近年来市场上出现了许多以假乱真或劣代优的药材,这不仅仅影响了道地药材的质量,更为重要的是严重的误导了临床用药。因此,很有必要对贝母药材进行严格的质量控制。

本实验采用高效液相色谱法对不同种贝母中核苷类成分进行了定量分析。实验通过对色谱条件的优化,使贝母中核苷类化合物达到了良好的分离。该方法简便、快捷、准确性高,而且可以与贝母中的生物碱部分结合以更全面的作为对贝母进行质量控

制的指标。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 25, 65, 95, 205, 242.
- [2] 肖培根. 新编中药志. 第1卷. [M]. 北京:化学工业出版社, 2002: 851.
- [3] 王林辉,季辉,王长礼,等. 伊犁贝母总生物碱的药效学研究[J]. 中国药科大学学报,2003,34(2):172.
- [4] 薛燕,王峰. 不同产地浙贝母药材中3种活性成分的分析研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(16):1628.
- [5] 覃川杰,屠善军,吴月燕. 贝母-中国百合斑驳病毒的新宿主[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2006, 23(6):774.
- [6] 阮汉利,张勇慧,吴继洲. 贝母属植物非生物碱研究进展[J]. 中草药, 2002,33(9):858.
- [7] 刘震东,陈世琼,王曙. 聚酰胺薄膜色谱鉴别栽培的川贝母[J]. 华西医学杂志,2006,21(1):64.
- [8] 周建良,姜艳,李萍,等. 蒲圻贝母中核苷类化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2008,43(12):894.
- [9] 吴晓民,王艳红,郑友兰. HPLC测定不同产地平贝母中腺苷的含量[J]. 华西药理学杂志, 2006,21(1):74.

Simultaneous determination of five nucleotides in Bulbus Fritillariae by RP-HPLC

ZHANG Jianzhi, SONG Changhui, CHEN Bo*, YAO Shouzhuo

(Key Laboratory of Chemical Biology and Traditional Chinese Medicine Research, Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

[Abstract] A high-performance liquid chromatography method was developed for determination of five nucleotides in Bulbus Fritillariae. The five nucleotides were uridine, adenine, guanosine, thymidine, adenosine, respectively. A Welch materials XB-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used and the chromatographic separation was achieved using 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate-acetic acid buffer solution (pH 4.30, B) and methanol(A) as mobile phases, the gradient elution program: 0-10 min,0% -1% A, 10-20 min,1% -5% A, 20-25 min,5% A, 25-35 min,5% -30% A, 35-37 min,30% -0% A, 37-40 min,0% A with a flow rate of 1 mL·min⁻¹ and monitored at 260 nm, the injection volume was 20 μL. The peak areas of nucleotides and the concentrations showed a good linear relation ranged from 0.24 to 13.60 mg·L⁻¹, $r > 0.9983$. The intra- and inter-day precision results were adequate with the RSDs of 2.1% or below. The repeatability was good and the RSD were smaller than 5.5%. The recoveries of nucleosides were in the range of 93.55% and 101.9%, RSD < 3.0%; The order of nucleotides contents in different Bulbus Fritillariae was *F. hupehensis* > *F. thunbergii* > *F. cirrhosa* ≈ *F. ussuriensis*. The method is simple, convenient and accurate. It can be used for the determination of nucleosides and supplying evidence for exploiting and applying of Bulbus Fritillariae.

[Key words] high performance liquid chromatography; nucleotides; Bulbus Fritillariae

doi: 10.4268/cjcmm20100114

[责任编辑 王亚君]