

UPLC 法测定半夏提取物中尿苷、鸟苷和腺苷的含量

何丹¹, 杨林², 秦少容³, 张景勃^{1*}

(1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 2. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121;
3. 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司, 重庆 408000)

[摘要] 目的: 建立以超高效液相色谱 (UPLC) 法测定半夏提取物中尿苷、鸟苷和腺苷含量的方法。方法: 色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相水-甲醇不同比例梯度洗脱, 柱温 30 °C, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm。结果: 尿苷在 2.033 ~ 20.33 mg·L⁻¹ 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 16\ 788X - 3\ 556$ ($r = 0.999\ 9$), 平均回收率 98.65%, RSD 2.12%; 鸟苷在 1.098 ~ 10.98 mg·L⁻¹ 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 25\ 378X - 325$ ($r = 0.999\ 9$), 平均回收率 98.21%, RSD 2.32%; 腺苷在 0.201 2 ~ 2.012 mg·L⁻¹ 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 30\ 800X - 59$ ($r = 0.999\ 9$); 平均回收率 98.54%, RSD 1.91%。结论: 该方法准确、快速、可靠, 能有效地测定半夏提取物中尿苷、鸟苷和腺苷的含量。

[关键词] 半夏; 超高效液相色谱; 尿苷; 鸟苷; 腺苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0087-03

[doi] 10.11653/syfy2013170087

Determination of Content of Uridine, Guanosine and Adenosine in *Pinellia ternata* by UPLC

HE Dan¹, YANG Lin², QIN Shao-rong³, ZHANG Jing-qing^{1*}

(1. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China;

3. Taiji Chongqing Fuling Pharmaceutical Group Co. LTD, Chongqing 408000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an ultra performance liquid chromatography (UPLC) method for detecting content of uridine, guanosine and adenosine in *Pinellia ternata*. **Method:** ACQUITY UPLC BEH C₁₈

[收稿日期] 20121106(010)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI13B03)

[第一作者] 何丹, 硕士, 讲师, 从事药物分析研究, Tel: 13102347970, E-mail: ildocor@163.com

[通讯作者] * 张景勃, 博士, 研究员, 从事药物制剂研究, E-mail: zjqrae01@163.com, Tel: 13308300303

- [2] 尚志春, 于大永, 冯宝民, 等. 西南山某种子的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 85.
- [3] 王永奇, 侯蕾, 史丽颖, 等. 西南山茶抗 IgE 介导 I 型过敏有效部位及有效成分的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 519.
- [4] 王永奇, 侯蕾, 史丽颖, 等. 西南山茶种子、果皮、花抗 IgE 介导 I 型过敏的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 529.
- [5] 马俊利, 李春钢, 张博男, 等. 甜荞麦花叶化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 94.
- [6] 黄敏琪, 牙启康, 陈海燕, 等. 山慈茎枝化学成分的研究[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1079.
- [7] 李寅珊, 李冬梅, 蒋凌云, 等. 云南松松塔的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 119.
- [8] 卢汝梅, 谭新武, 廖彭莹, 等. 水龙化学成分的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 99.
- [9] 石海峰, 冯宝民, 史丽颖, 等. 西南山茶化学成分的分 离与 鉴 定 [J]. 沈 阳 药 科 大 学 学 报, 2010, 27(5): 357.
- [10] 才谦, 刘玉强. 无梗五加果实中齐墩果酸苷的分离与鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 121.
- [11] 全晓刚, 程永现. 石菖蒲的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(5): 404.

[责任编辑 邹晓翠]

(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) was used, and the mobile phase was composed of methanol and water by gradient elution mode, column temperature was 30 °C, at a flow rate of 0.5 mL · min⁻¹ and detection wavelength of 254 nm. **Result:** The linear range of uridine was 2.033-20.33 mg · L⁻¹. The regression equation was as follows: $Y = 16788X - 3556$ ($r = 0.9999$). The linear range of guanosine was 1.098-10.98 mg · L⁻¹. The regression equation was as follows: $Y = 25378X - 325$ ($r = 0.9999$). The linear range of adenosine was 0.2012-2.012 mg · L⁻¹. The regression equation was as follows: $Y = 30800X - 59$ ($r = 0.9999$). The average recovery was 98.65% (RSD 2.12%), 98.21% (RSD 2.38%) and 98.54% (RSD 1.91%) respectively. **Conclusion:** The method is accurate, rapid and reliable and can be used to determine the content of uridine, guanosine and adenosine in *P. ternata*.

[**Key words**] *Pinellia ternata*; ultra performance liquid chromatography; uridine; guanosine; adenosine

半夏为天南星科植物半夏的干燥块茎,具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结之功效,临床应用非常的广泛^[1]。半夏含有核苷类、有机酸类、生物碱类等化学成分^[2]。其中核苷类成分^[3]是半夏药材及饮片中含有的很重要有效成分,含量较高的有尿苷、鸟苷和腺苷。国内外均有学者以核苷类成分为指标对半夏水溶性成分的含量进行检测,且作为判别半夏药材及饮片质量优劣的重要依据^[4-5]。目前报道的对半夏药材及饮片核苷类成分的测定均采用 HPLC^[6-7],该方法耗时长,分离效果不佳。本文采用超高效液相色谱(UPLC)法对半夏提取物中核苷类成分进行测定,为半夏药材及饮片的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC 仪隔膜压滤机(800 × 800 型,景津压滤机集团有限公司),半夏药材(甘肃天水)经重庆太极集团质检部杨修齐研究员鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (thumb.) Breit. 的干燥块茎;尿苷对照品(批号 100635-200401,中国食品药品检定研究院),鸟苷对照品(批号 E-0575,上海同田生物有限公司),腺苷对照品(批号 110879-200202,中国食品药品检定研究院)。甲醇为色谱纯(山东禹王实业总公司化工厂),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),柱温 30 °C,流动相水-甲醇按表 1 梯度洗脱,检测波长 254 nm,流速 0.5 mL · min⁻¹,进样量 5 μL,理论塔板数按尿苷峰计算不低于 2 000。

2.2 对照品储备液的制备 精密称取尿苷对照品 20.33 mg,置 100 mL 量瓶中,中少量甲醇溶解加水稀释至刻度,摇匀,得尿苷对照储备液。精密吸取该

表 1 流动相水-甲醇梯度洗脱条件

t/min	水/%	甲醇/%
0	100	0
1.1	100	0
2	98	2
3	90	10
4	85	15
7	0	100
8	0	100
8.5	100	0
11	100	0

储备液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加少量甲醇溶解,加水稀释至刻度,摇匀,得 20.33 mg · L⁻¹ 的尿苷对照品溶液。

精密称取鸟苷对照品 10.98 mg,置 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得尿苷对照储备液。精密吸取该储备液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得 10.98 mg · L⁻¹ 的尿苷对照品溶液。

精密称取腺苷对照品 10.06 mg,置 100 mL 量瓶中,加少量甲醇溶解,加水稀释至刻度,摇匀,得腺苷对照储备液。精密吸取该储备液 1 mL,置 50 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,得 2.012 mg · L⁻¹ 的腺苷对照品溶液。

精密吸取尿苷对照储备液 5 mL、鸟苷对照储备液 5 mL 和腺苷对照品溶液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 半夏 80 g 粉碎成粗粉,另加干姜 6.8 g,粉碎成粗粉,加水 6 倍量,混匀,压入隔膜压滤机中,55 °C 加压循环提取 2 次,每次 30 min,滤过,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.10 ~ 1.20(50 °C),加入 2 倍量乙醇使沉淀,滤过,滤液回收乙醇,浓缩至 40 mL。每毫升提取液相当于原药材 2 g。精密吸取该浓缩液 1 mL 于 25 mL 量瓶中,加水稀释定容,0.22 μm 微孔滤膜

滤过取续滤液即得供试品溶液。

3 结果

3.1 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 1, 2, 3, 5, 8, 10 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得系列混合对照品溶液。按 2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积 Y 对质量浓度 $X(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 进行线性回归。尿苷的回归方程 $Y = 16\ 788X - 3\ 556$ ($r = 0.999\ 9$); 鸟苷的回归方程 $Y = 25\ 378X - 325$ ($r = 0.999\ 9$); 腺苷的回归方程 $Y = 30\ 800X - 59$ ($r = 0.999\ 9$)。结果表明, 尿苷质量浓度在 $2.033 \sim 20.33\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系; 鸟苷质量浓度在 $1.098 \sim 10.98\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系; 腺苷质量浓度在 $0.201\ 2 \sim 2.012\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

3.2 精密度试验 取混合对照品溶液, 按 2.1 项下方法连续进样 6 次, 测定峰面积。结果尿苷、鸟苷和腺苷的 RSD 分别为 0.32%, 0.33%, 0.34%。

3.3 稳定性试验 取混合对照品溶液, 室温下放置 0, 1, 2, 4, 6, 8 h, 按 2.1 项下色谱条件分别进样 $5\ \mu\text{L}$ 测定峰面积。结果峰面积基本不变, 尿苷、鸟苷和腺苷的 RSD 分别为 0.32%, 0.31%, 0.33%, 表明溶液在 8 h 内基本稳定。

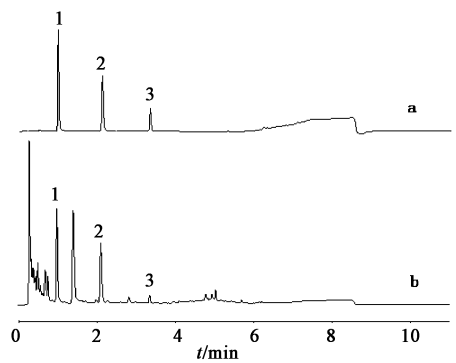
3.4 重复性试验 按供试品配制方法平行配制 6 份, 按 2.1 项下方法进样分析, 按外标法以峰面积计算含量, 尿苷、鸟苷和腺苷的平均含量分别为 0.016%, 0.011%, 0.001%, RSD 分别为 0.88%, 1.01%, 0.93%。

3.5 加样回收率试验 取已测知含量的半夏提取物, 分别精密量取 5 mL, 共 27 份, 置 10 mL 量瓶中, 分别精密加入提取物中尿苷、鸟苷和腺苷含量的 80%, 100%, 120% 的对照储备液, 加水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 按 2.1 项下色谱条件进样 $5\ \mu\text{L}$, 按外标法计算回收率。结果尿苷、鸟苷和腺苷的平均回收率分别为 98.65%, 98.21%, 98.54%, RSD 分别为 2.12%, 2.32%, 1.91%。

3.6 半夏药材含量测定 取供试品溶液, 按 2.1 项下的色谱条件测定, 用外标法以峰面积计算, 结果尿苷、鸟苷和腺苷的含量分别为 0.016%, 0.011%, 0.001%, RSD 分别为 0.88%, 1.01%, 0.93%。见图 1。

4 讨论

半夏毒性主要表现为强烈的刺激性, 若炮制不当或服用生品会对其所接触的嘴唇、咽喉、口腔、胃肠道黏膜, 产生强烈的刺激性, 导致口舌肿胀、咽喉刺痛甚至失音、呕吐、腹泻等^[8]。中医用生姜解毒, 认为“半夏性畏生姜, 用之以制其毒, 功益彰”。本文在半夏提取物的制备过程中加入干姜是对半夏进行姜制, 减少半



a. 混合对照品溶液; b. 半夏提取物;

1. 尿苷; 2. 鸟苷; 3. 腺苷

图 1 半夏提取物含量测定色谱

夏的毒性^[9]。

《中国药典》2010 年版中半夏药材的质量控制是采取电位滴定法对醇提取物中有机总酸进行测定^[1], 而对水提取物的质量控制还没有明确规定, 由于核苷的药理活性明确^[10], 在半夏药材中含量也较高, 因此建立核苷类成分的测定方法对于半夏药材及饮片质量控制具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010:110.
- [2] 张跃进, 孟祥海, 许玲, 等. 不同炮制方法对半夏化学成分含量的影响研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(12):21.
- [3] 张科卫, 吴皓, 崔小兵, 等. 不同产区半夏药材中鸟苷含量的测定[J]. 中成药, 2000, 22(11):769.
- [4] 陈钢, 崔小兵, 谈献和, 等. 半夏药材中鸟苷和尿苷的含量测定及半夏指纹图谱研究[J]. 西北药学杂志, 2011, 22(5):313.
- [5] 魏英勤, 卢恒, 刘鑫欣, 等. 毛细管区带电泳内标法测定半夏中尿苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18):49.
- [6] 张科卫, 吴皓. HPLC-PDA 测定小半夏汤中的核苷类成分[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(23):1826.
- [7] 徐锋, 杨焯, 舒秋娥, 等. 大血藤药材的 UPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12):108.
- [8] 吴皓, 钟凌云, 李伟, 等. 半夏炮制解毒机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(14):1402.
- [9] 史闰均, 吴皓, 郁红礼, 等. 生姜解半夏毒的研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(11):108.
- [10] 王勋, 陆家凤, 罗珊珊, 等. HPLC 测定半夏白术天麻汤中天麻素和鸟苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17):44.

[责任编辑 邹晓翠]