新疆道地药材伊贝母 HPLC-ELSD 指纹图谱研究及西贝母碱的含量测定

蔡晓翠[1],贺金华[1],徐芳[1],赵军[1],毛艳[1],戎晓娟[1],康雨彤[1],凯撒·苏莱曼[2*]
(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所,乌鲁木齐 830004;
2. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所,乌鲁木齐 830002)

[摘要] **目的**:建立新疆道地药材伊贝母 HPLC-ELSD 指纹图谱及西贝母碱的含量测定方法。**方法**:采用 HPLC-ELSD 法测定了 10 批伊贝母药材样品。色谱条件:Cosmosil C_{18}色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-0.03%二乙胺溶液,梯度洗脱,流速 1.0 mL·min^{-1},柱温 30 ℃,进样量 20 μL;ELSD 检测器,漂移管温度 67 ℃;气体流速 2.0 L·min^{-1}。**结果**:建立了不同批次伊贝母的 HPLC-ELSD 指纹图谱,并进行相似度比较,对伊贝母中西贝母碱进行了含量测定。**结论**:该方法操作简便、重复性好,建立的伊贝母指纹图谱和西贝母碱的含量测定方法可用于伊贝母的质量控制。

[关键词] 伊贝母; 西贝母碱; 指纹图谱; HPLC-ELSD
[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)21-0082-04

Study on HPLC-ELSD Fingerprints of Bulbus Fritillariae Pallidiflorae and the Determination of Sipeimine in Them

CAI Xiao-cui[1], *HE Jin-hua*[1], *XU Fang*[1], *ZHAO Jun*[1], *MAO Yan*[1], *RONG Xiao-juan*[1], *KANG Yu-tong*[1], *Kaisasulaiman*[2*]
(1. *Xinjiang Institute of Materia Medica*, *Urumqi* 830004, *China*;
2. *Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethnodrug*, *Urumqi* 830002, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish HPLC-ELSD fingerprints of Bulbus Fritillariae Pallidiflorae and determine the content of sipeimine in them. **Method**: The HPLC-ELSD fingerprints of Bulbus Fritillariae Pallidiflorae from different places were obtained. The HPLC separation was performed on a Cosmosil C_{18} column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) in gradient elute mode with a mixture consisting of acetonitrile and 0.03% diethylamine solution at a flow rate of 1.0 mL·min^{-1}. The ELSD detector is used and the drift tube temperature of ELSD was set at 67 ℃ with the flow rate of 2.0 L·min^{-1}. **Result**: The HPLC-ELSD fingerprints were set up and the similar degrees to the crude drugs collected in different places were compared. The content of sipeimine was determined. **Conclusion**: The method is simple and reproducible and can be used for the quality control of Bulbus Fritillariae Pallidiflorae.

[**Key words**] Bulbus Fritillariae Pallidifolrae; sipeimine; fingerprint; HPLC-ELSD

伊贝母为百合科植物新疆贝母 *Fritillaria walujewii* Regel. 或伊犁贝母 *Fritillaria pallidiflora* Schrenk. 的干燥鳞茎,在我国有悠久的使用历史。据 2010 年版《中国药典》记载,伊贝母有清热润肺、化痰止咳的功效,可用于肺热燥咳、干咳少痰、阴虚劳嗽、咳痰带血等症状[1]。伊贝母主要含甾体类生物碱、总皂苷类成分,如西贝素、西贝素-β-D-葡萄糖苷,贝母辛,伊贝碱苷 A、B 等,其中总生物碱有显著的镇咳作用,提取物、总生物碱和总皂苷具非常显著的祛痰作用。由于甾体生物碱的结构中缺少光化学特征,用常见的光学检测器不能很好地检测,本实验

[收稿日期] 20120502(005)
[基金项目] 新疆维吾尔自治区重大专项项目(200733146-1)
[通讯作者] * 凯撒·苏莱曼,Tel:0991-8865589,E-mail:kaisa8000@yahoo.com.cn

采用 HPLC-ELSD 法建立了伊贝母药材指纹图谱和含量测定方法，为伊贝母药材的质量控制提供理论依据。

1 仪器与试药

Shimadzu-LC 2010C 高效液相色谱仪；Agilent 化学工作站，Alltech（3300）蒸发光散射检测器，Cosmosil C_{18} 色谱柱（4.6 mm × 250 mm，5 μm），Sartorius 电子天平（d = 0.01 mg）。

西贝母碱对照品购自曼斯特对照品公司，批号 A0598。

伊贝母药材 10 批，采自新疆伊犁。经新疆维吾尔自治区药物研究所徐芳副研究员鉴定为伊贝母 *Fritillaria pallidiflora* Schrenk. 的干燥鳞茎。乙腈为色谱纯（Fisher），二乙胺、甲醇、三氯甲烷均为分析纯，水为纯蒸水。

2 色谱条件

Cosmosil C_{18}（4.6 mm × 250 mm，5 μm）色谱柱，流动相乙腈-0.03% 二乙胺溶液，按表 1 程序进行梯度洗脱，流速 1.0 mL · min^{-1}，柱温30 ℃，进样量 20 μL，ELSD 检测漂移管温度 67 ℃，气体流速 2.0 L · min^{-1}。

表 1 流动相梯度洗脱程序

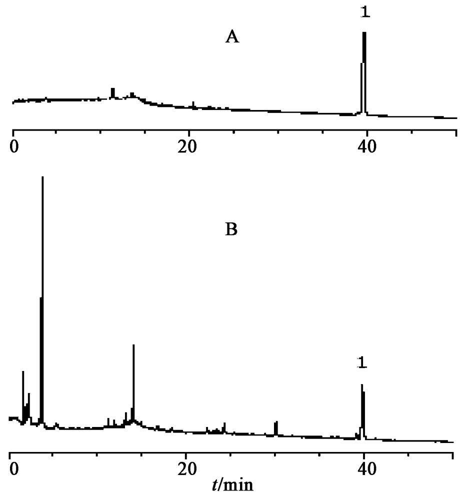
t/min	乙腈/%	0.03% 二乙胺溶液/%
0	0	100
5	0	100
10	30	70
50	75	25

3 对照品溶液及供试品溶液的制备

精密称取对照品西贝母碱适量，用甲醇溶解制成每 1 mL 含 0.2 mg 的对照品溶液。另取伊贝母药材粉末（过四号筛）约 2.5 g，精密称定，置圆底烧瓶中，加浓氨水 2 mL，再加入三氯甲烷-甲醇（4∶1）混合溶液 20 mL，置 80 ℃水浴上加热回流 2 h，放冷，滤过，用三氯甲烷-甲醇（4∶1）混合溶液洗涤药渣数次，滤液合并蒸干，残渣加甲醇溶解，并定容至 10 mL，摇匀，作为供试品溶液。

4 系统适用性

在上述色谱条件下，西贝母碱色谱峰与相邻峰色分离度 > 1.5，理论塔板数为 20 万，结果见图 1。



1. 西贝母碱

图 1 对照品（A）、伊贝母样品（B）色谱

5 指纹图谱的建立

5.1 仪器精密度试验 取同一供试品（S1）溶液，连续进样 6 次，以西贝母碱峰（10 号峰）为参照峰，计算共有峰的相对保留时间（RRT）和相对峰面积（RPA），结果表明，各共有峰 RRT 的 RSD 均 < 0.6%，RPA 的 RSD 均 < 4%。

5.2 重复性试验 取同一批号供试品（S1）6 份，同法制成 6 份供试品溶液，以西贝母碱峰（10 号峰）为参照峰，计算各共有峰的 RRT 和 RPA，结果表明，各共有峰 RRT 的 RSD 均 < 1%，RPA 的 RSD 均 < 5%。

5.3 稳定性实验 取同一供试品（S1）溶液，分别在 0，2，4，6，8，12 h 进样，以西贝母碱峰（10 号峰）为参照峰，计算各共有峰的 RRT 和 RPA，结果表明，各共有峰 RRT 的 RSD 均 < 1%，RPA 的 RSD 均 < 5%。

5.4 10 批药材的测定 取 10 批伊贝母药材粉末，按 **5.3** 项下方法制备供试品溶液，记录 HPLC-ELSD 色谱图，进行共有峰的标定，结果见图 2。

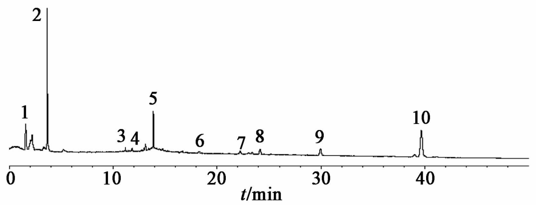


图 2 伊贝母 HPLC-ELSD 指纹图谱

5.5 相似度分析 采用国家药典委员会出版的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件（2004A 版）进行相似度评价。以 S1 样品的指纹图谱为参照图谱，结果表明，10 批伊贝母药材指纹图谱的相似度均 > 0.90。相似度结果见表 2，色谱图见图 3。

6 西贝母碱的含量测定

6.1 线性关系考察 精密称取西贝母碱对照品适

表 2　10 批次不同产地伊贝母相似度评价结果

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1										
S2	0.982	1									
S3	0.883	0.909	1								
S4	0.86	0.819	0.835	1							
S5	0.935	0.903	0.903	0.962	1						
S6	0.925	0.928	0.939	0.944	0.961	1					
S7	0.921	0.919	0.938	0.955	0.981	0.984	1				
S8	0.817	0.763	0.822	0.978	0.946	0.904	0.929	1			
S9	0.887	0.88	0.865	0.962	0.93	0.977	0.952	0.908	1		
S10	0.918	0.937	0.869	0.861	0.876	0.953	0.912	0.768	0.952	1	
R	0.931	0.931	0.924	0.956	0.966	0.997	0.987	0.914	0.984	0.954	1

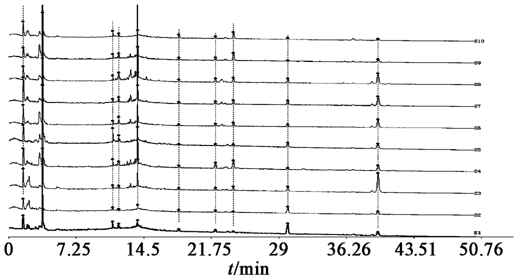


图 3　10 批伊贝母药材指纹图谱重叠

量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含 0.911 mg 的对照品贮备溶液。分别精密吸取上述对照品贮备液 0.25,0.5,1.0,1.5,2.5,4.0,10 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成系列对照品溶液,分别进样,记录峰面积。以西贝母碱浓度的 lg 对数值(X)为横坐标,峰面积的 l g 对数值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1.201\ 3X + 4.4502$,($r = 0.999\ 6$),西贝母碱质量浓度在 0.045 55 ~ 0.911 0 $g \cdot L^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

6.2　精密度试验　取同一供试品(S1)溶液,连续进样 6 次,西贝母碱峰面积的 RSD 1.44%。

6.3　重复性试验　取同一批号供试品(S1)6 份,同法制成 6 份供试品溶液,分别进样,西贝母碱含量的 RSD 1.81%。

6.4　稳定性试验　取同一供试品(S1)溶液,分别在 0,2,4,6,8,12 h 进样,西贝母碱峰面积的 RSD 1.99%。

6.5　准确度试验　取已知含量的伊贝母(S1)约 1.25 g,共 6 份,精密称定,置圆底烧瓶中,分别精密加入西贝母碱对照品储备液 0.65 mL(精密称取西贝母碱对照品 9.11 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备溶液)加浓氨水 2 mL,再加入三氯甲烷-甲醇(4∶1)混合溶液 20 mL,置 80 ℃水浴上加热回流 2 h,放冷,滤过,用混合溶液洗涤药渣数次,滤液蒸干,残渣加甲醇溶解,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。分别进样 20 μL,记录峰面积,计算回收率,结果见表 3。

表 3　加样回收率试验($n = 6$)

称样量 /g	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.250 00	0.589 9	0.592 15	1.197 7	102.64	101.8	1.55
1.250 12	0.590 0	0.592 15	1.174 6	98.72		
1.250 11	0.590 0	0.592 15	1.195 9	102.32		
1.251 33	0.590 5	0.592 15	1.191 3	101.46		
1.251 34	0.590 5	0.592 15	1.200 9	103.07		
1.250 08	0.589 9	0.592 15	1.195 9	102.33		

6.6　样品的测定　取 10 批伊贝母药材,按 **3** 项下方法制备供试品溶液,在前述色谱条件下进样 20 μL,记录峰面积,计算西贝母碱的含量,结果 10 批药材中西贝母碱的平均含量分别为 0.046 64%,0.052 37%,0.210 8%,0.069 98%,0.167 3%,0.098 16%,0.111 9%,0.122 4%,0.039 38%,0.035 50%。

7　讨论

7.1　检测方法的选择　ELSD 作为一种通用检测器,可以检测与流动相相比完全不挥发的所有化合物,弥补了紫外检测器和荧光检测器的不足,可用于

无紫外吸收、无荧光或紫外末端吸收的化合物的检测，并且对流动相组分的变化和温度的浮动不很敏感，可用于梯度洗脱，克服了紫外检测器梯度洗脱时的基线漂移，被广泛应用于皂苷、内酯、生物碱、有机酸、氨基酸等类成分的分析以及中药指纹图谱研究、药代动力学研究。伊贝母鳞茎主要含甾体类生物碱、皂苷类成分等，因此 HPLC-ELSD 适用于伊贝母的指纹图谱研究。

7.2 ELSD 条件的优化 对于 ELSD，漂移管温度和气体流量是很重要的 2 个参数，它们对优化被检测物质的响应值有重要的影响。根据 ELSD 建议值，设置气体流速为 1.5 $L \cdot min^{-1}$，漂移管温度分别为 36，45，60，70 ℃，观察基线噪音和样品峰个数及峰面积，结果低于 60 ℃时，基线水平较高，流动相得不到充分挥发；在 60 ℃时样品峰个数最多，峰形最佳；70 ℃时峰个数减少，基线漂移明显；再以 1 ℃为步长，考察温度对基线水平的影响，确定漂移管温度 67 ℃为实验最优温度，故设置漂移管温度为67 ℃；气体流速分别为 1.5，2.0，2.5，3.0 $L \cdot min^{-1}$，观察气体流速对响应值的影响、峰面积及基线变化情况，结果气体流速 >2.0 $L \cdot min^{-1}$时响应值变小，因此确定最佳气体流速为 2.0 $L \cdot min^{-1}$。

7.3 流动相洗脱条件的考察 在确定的 ELSD 条件下，考察不同梯度下样品峰的个数及分离情况，结果表明按表 1 梯度洗脱，样品中峰个数最多，分离度佳，时间适中。

7.4 指纹图谱相似度分析 通过对 10 批伊贝母药材的测定分析，可知各批药材的色谱峰数和峰面积虽然存在一定差异，但整体特征相似，具有 10 个共有色谱峰，相似度均 >0.90，说明了不同产地伊贝母之间具有较好的相关性。

7.5 10 批药材含量差异 对 10 批不同种植区伊贝母药材进行含量测定分析，结果表明，伊犁地区不同产地伊贝母药材中西贝母碱含量有明显差异，即使采自相同种植区不同采摘时间的伊贝母药材中西贝母碱的含量也有明显差异。这种差异可能与药材的生长环境、采集时间、栽培技术、田间管理等密切相关，伊贝母指纹图谱的建立对药材进一步的研究提供可靠依据。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:132.

[2] 曾令杰，林鸽，李萍. 伊贝母中活性生物碱的 HPLC-ELSD 分析[J]. 药物分析杂志，2003，23(4):274.

[3] 曾荣香，刘丽丽，陈丽华. HPLC-ELSD 测定不同来源浙贝母中贝母素甲的含量研究[J]. 江西中医学院学报，2009，21(5):51.

[4] 王光忠，张明，刘焱文. HPLC-ELSD 法测定盾叶薯蓣中薯蓣皂苷的含量[J]. 药物分析杂志，2007，27(12):1906.

[5] 齐红，林桂涛. 鼻炎胶囊质量标准研究[J]. 山东医药工业，2002，21(4):1.

[6] 曾令杰，林鸽，李萍. 伊贝母生物碱的 HPLC 分析及药代动力学研究[J]. 中药新药与临床药理，2003，14(1):37.

[7] 张燕，周铁梅，刘永江，等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器测定复方黄芪益气口服液中黄芪甲苷的含量[J]. 山西中医学院学报，2010，11(3):1.

[8] 李会军，李萍. 高效液相色谱法蒸发光散射检测器测定酸枣仁中酸枣仁皂苷 A 及 B 的含量[J]. 药物分析，2000，20(2):82.

[9] 胡迪，胡克. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定护肝胶囊中柴胡皂苷的含量[J]. 湖北中医杂志. 2006，28(11):53.

[10] 库尔班江，苏文琴，张鹏威. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定金银花中绿原酸和木犀草苷的含量[J]. 时珍国医国药，2008，19(6):1441.

[11] 邢浩，庞雪. 高效液相色谱法测定商陆植物中皂苷甲的含量[J]. 中日友好医院学报. 2004，18(5):304.

[12] 崔颖，张永旺. 黄杨宁滴丸的高效液相色谱蒸发光散射检测器含量测定方法[J]. 中国新技术新产品. 2009，14(5):5.

[责任编辑 顾雪竹]