

HPLC 测定不同产地掌叶半夏中腺苷的含量

周成惠¹, 李春雪, 张镓小, 张慧^{1*}

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 采用 HPLC 法建立掌叶半夏中腺苷的含量测定方法。方法: 采用 Kromasil ODS-C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-水 (15:85), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 25℃, 检测波长 260 nm。方法: 腺苷在 9.84 ~ 78.72 mg·L⁻¹ 线性关系良好 (r=0.999 8), 平均加样回收率为 99.01%, RSD 1.94% (n=6)。结果: 6 个不同产地掌叶半夏中腺苷含量大小为: 山东菏泽 > 河北安国 > 陕西汉中 > 河北保定 > 安徽亳州 > 湖南浏阳。结论: 该方法操作简便, 结果可靠, 重复性好, 可作为掌叶半夏药材的质量控制方法之一。

[关键词] 掌叶半夏; 腺苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0077-03

Determination of Content of Adenosine in *Pinellia pedatisecta* from Different Districts by HPLC

ZHOU Cheng-hui¹, LI Chun-xue, ZHANG Jia-xiao, ZHANG Hui^{1*}

(The Medicine Institute of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method to determine the content of adenosine in *Pinellia pedatisecta* from different districts. **Method:** Experiment was carried out on Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-water (15:85) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was at 260 nm and the column temperature was at 25℃. **Result:** The linear range of adenosine was 9.84-78.72 mg·L⁻¹ (r=0.999 7). The average recovery was 99.01%, RSD 1.94% (n=6). The adenosine content of *P. pedatisecta* from different districts ranged in order as follows: Heze > Anguo > Hanzhong > Baoding > Bozhou > Liuyang. **Conclusion:** The method is quick, simple and reproducible for the determination of adenosine in *P. pedatisecta*.

[Key words] *Pinellia pedatisecta*; adenosine; HPLC

中药掌叶半夏是天南星科半夏属植物掌叶半夏 *Pinellia pedatisecta* 的干燥块茎, 又称虎掌南星、滇半夏、虎掌, 始载于《神农本草经》, 具有燥湿化痰, 祛风止惊、理气宽胸、消痞散结的功能^[1]。其单味药材制成的栓剂在临床上广泛用于治疗宫颈癌, 是目前

治疗宫颈癌的常用药物之一。目前研究表明掌叶半夏中含有生物碱、氨基酸、挥发油、有机酸类、掌叶半夏蛋白及无机元素等多种成分^[2]。腺苷是生物碱类成分, 具有明显的药理作用。有文献报道腺苷可以扩张冠状血管, 防止心律失常, 降血压、抗凝血和减弱心肌收缩力的作用, 是掌叶半夏治疗胸痹等证的主要活性成分之一^[3]。而《中国药典》^[4]与地方标准中尚未规定其质量控制的含量测定方法和指标。为解决上述问题, 控制药材的质量, 本文经实验摸索, 采用 HPLC 建立掌叶半夏中腺苷的含量测定方法, 同时对不同产地的掌叶半夏腺苷含量进行了比较, 为掌叶半夏的质量评价提供一定的理论依据。

[收稿日期] 20100915(001)

[基金项目] 辽宁省教育厅创新团队基金项目(2009T006)

[第一作者] 周成惠, 在读硕士研究生, 主要从事中药质量标准与创新药物研究, Tel: 13942879894, E-mail: zchzc123@163.com

[通讯作者] * 张慧, 副教授, Tel: 13998541994, E-mail: syyycs@163.com

1 材料

1.1 仪器 安捷伦 LC-1100 液相色谱仪 (G21771AA-UV 检测器、安捷伦色谱工作站), KQ3200 超声波清洗器 (江苏昆山), AY220 电子分析天平 (SHIMADZU), UV2100 紫外-可见分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司)。

1.2 试药 腺苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110879-2200202); 掌叶半夏分别采于各个产地, 由辽宁中医药大学中药鉴定教研室翟延君教授鉴定为掌叶半夏 *P. pedatisecta* 的块茎; 甲醇为色谱纯 (天津市科密欧化学试剂开发中心), 蒸馏水, 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil ODS-C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (15:85); 检测波长为 260 nm; 柱温为 25 °C; 流速 1 mL·min⁻¹; 理论塔板数按腺苷计算不低于 2500。

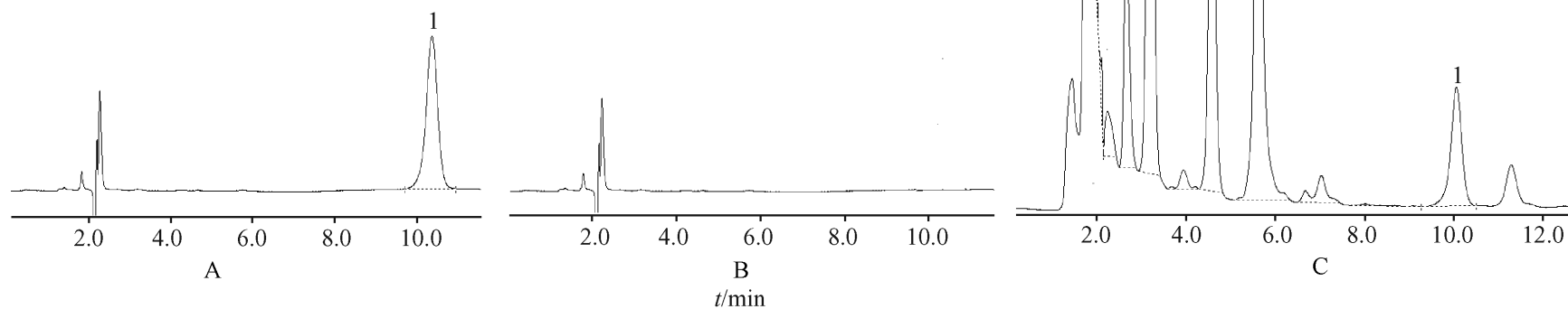


图 1 掌叶半夏高效液相色谱图

A. 对照品; B. 阴性样品; C. 供试品; 1. 腺苷

2.6 耐用性试验 分别选用 Diamonsil, Phenomenex, Agilent C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) 柱, 按上述色谱条件, 分别注入空白阴性溶液、供试品溶液、对照品溶液各 20 μL, 结果显示, 不同品牌的色谱柱腺苷的主峰均能达到基线分离, 分离度良好, 阴性空白无干扰, 3 个色谱柱测得的供试品的含量 RSD 为 1.31%, 符合规定。

2.7 线性关系考察 精密称取腺苷对照品 4.92 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用 30% 甲醇溶解并稀释至刻度, 精密量取上述溶液 1, 2, 4, 6, 8 mL 至 10 mL 量瓶中, 用 30% 甲醇稀释至刻度。精密量取 20 μL, 注入液相色谱仪, 以峰面积 (A) 对进样量 (C) 进行回归, 得标准曲线回归方程 $A = 11.205 C + 189.94$, 相关系数为 $r = 0.9998$ ($n = 5$)。结果表明, 腺苷含量在 9.84 ~ 78.72 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.8 中间精密度试验 取同一供试品 6 份, 在同一

2.2 检测波长的确定 取腺苷对照品适量, 加 30% 甲醇制成 20 mg·L⁻¹ 对照品溶液, 置紫外分光光度计中, 记录紫外吸收光谱, 结果表明, 腺苷在 260 nm 波长处有最大吸收。

2.3 腺苷对照品溶液的配制 精密称取腺苷对照品 7.91 mg, 置 200 mL 量瓶中, 加 30% 甲醇适量使其溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 供试品溶液的配制 取掌叶半夏药材粉 2 g (过 3 号筛), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 30% 甲醇 25 mL, 精密称定质量, 超声提取 (200 ~ 250 W, 60 ~ 100 Hz) 30 min, 放冷, 加 30% 甲醇补足减失的质量, 滤过, 即得。

2.5 空白干扰试验 取空白溶剂, 按“供试品溶液的配制”方法操作, 制得空白阴性溶液, 精密量取空白阴性溶液、供试品溶液、对照品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 结果显示, 阴性空白无干扰。见图 1。

实验室, 由 3 个不同的实验人员, 采用日本岛津 LC-10A、Agilent1100、大连依利特 P200II 3 种色谱仪, 按上述色谱条件, 精密量取供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算腺苷的含量, 结果 RSD 1.11% ($n = 6$), 表明方法的中间精密度良好。

2.9 稳定性试验 取同一样品, 按上述色谱条件, 分别在 0, 2, 4, 6, 8 h, 精密量取供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积。结果腺苷在不同测定时间内的峰面积基本不变, RSD 0.64%, 表明样品溶液在 8 h 内是稳定的。

2.10 重复性试验 取同一供试品精密称取 6 份, 按 2.3 项下方法平行制备供试品溶液。精密量取供试品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算含量。结果腺苷含量的均值为 0.512 mg·g⁻¹, RSD 1.24%, 重复性符合规定。

2.11 准确度试验 分别称取 6 份已知含量的样品

约 1 g,各精密加入腺苷对照品溶液($0.542\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 mL,按供试品溶液制备方法制备,测定腺苷含量,计算回收率。结果测得回收率在 95%~105%之间,平均加样回收率为 99.01%,RSD 1.94% ($n=6$),见表 1。

表 1 腺苷加样回收率试验

No.	称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	1.056	0.533	0.542	1.063	98.89		
2	1.076	0.559	0.542	1.089	102.57		
3	1.043	0.523	0.542	1.053	96.85	99.01	1.94
4	1.055	0.537	0.542	1.067	98.89		
5	1.052	0.531	0.542	1.061	97.97		
6	1.060	0.538	0.542	1.068	98.89		

2.12 样品含量测定 取山东菏泽产掌叶半夏 3 批,粉碎,按供试品溶液制备方法制备,分别精密注入供试品溶液 20 μL ,测定峰面积,计算腺苷含量,结果见表 2。

表 2 3 批样品中腺苷的含量 ($n=2$)

批号	腺苷含量 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD /%
01	0.525	0.53
02	0.522	0.68
03	0.529	1.74

2.13 不同产地样品的测定 分别精密称取陕西汉中、安徽亳州、河北保定、湖南浏阳、河北安国、山东菏泽等地的掌叶半夏药材(粉碎,过 3 号筛) 2.0 g,置具塞锥形瓶中,按供试品溶液制备方法制备,滤过,照 2.1 项下色谱条件,测定峰面积,计算腺苷含量。结果见表 3。

表 3 不同产地样品中腺苷含量测定 ($n=2$) $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

产地	腺苷	产地	腺苷
陕西汉中	0.183	河北保定	0.181
安徽亳州	0.172	湖南浏阳	0.055
河北安国	0.192	山东菏泽	0.539

3 讨论

3.1 流动相的选择 本实验比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-酸水系统对样品中腺苷分离度、峰对称性的影响,结果显示,采用甲醇-水(15:85)洗脱时腺苷分离效果和峰对称性良好。

3.2 提取方法的比较 本实验比较了超声、回流、索氏提取等方法对掌叶半夏药材中腺苷提取率的影响。结果,超声提取法既省时又方便,而且提取腺苷含量完全。

3.3 提取溶剂的选择 本实验对乙醇、甲醇、水等提取溶剂进行了优选,结果显示,水提取得到的腺苷含量最大,但因本品富含淀粉,样品溶液黏稠,测定困难,为此进一步筛选了不同浓度的甲醇溶液,结果 30% 甲醇提得的腺苷含量与水相当,故最终选择 30% 甲醇溶液为提取溶剂。

3.4 不同产地样品中腺苷含量分析 测定结果显示,本品产地不同,药材中腺苷含量差别很大,其中山东菏泽的掌叶半夏腺苷含量最高,湖南浏阳的掌叶半夏腺苷含量最低,掌叶半夏是山东菏泽的道地药材,本研究进一步证实了道地药材质量优于其他产地的规律,对临床用药的采收具有指导意义。

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 14.
- [2] 王瑞,温月笙,杨澜,等. 掌叶半夏化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(7): 421.
- [3] 毛艳,杨伟俊,贺金华,等. RP-HPLC 法测定维感泡腾片中腺苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 25.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010.

[责任编辑 顾雪竹]