

引用:赵侠,刘锦锦,张国民. 高效液相色谱法测定直立百部药材中2种生物碱的含量[J]. 湖南中医杂志,2022,38(6): 189-192.

高效液相色谱法测定直立百部药材中2种生物碱的含量

赵 侠¹,刘锦锦¹,张国民²

(1. 襄城县食品药品检验所,河南 襄城,461700;

2. 长葛市食品药品检验所,河南 长葛,461500)

[摘要] 目的:应用高效液相色谱法测定中药材百部直立百部中2种有效生物碱成分(对叶百部烯酮、脱氢对叶百部碱)的含量。方法:采用高效液相色谱法,使用 THERMO Hypersil ODS-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,2.5 μm),以乙腈 0.2% 甲酸氨缓冲溶液为流动相进行梯度洗脱(0~35 min,体积比为 45:55;35~55 min,体积比为 45:55~55:45;55~70 min,体积比为 55:45),柱温为 30℃,检测波长为 235 nm,进样量为 20 μl,流速为 1.0 ml/min。结果:对叶百部烯酮的线性关系方程为:Y = 0.9124 × 10⁴X + 3.9856 × 10⁴ (r=0.9998),脱氢对叶百部碱的线性关系方程为:Y = 1.3062 × 10⁴X + 9.5647 × 10⁴ (r=0.9996),2种成分分别在 0.0267~0.267、0.0235~0.1635 mg/ml 范围内线性关系良好。对叶百部烯酮的平均加样回收率为 99.71%,RSD 为 1.02%,脱氢对叶百部碱的平均加样回收率为 99.91%,RSD 为 1.20%。结论:采用高效液相色谱法测定百部中药材中直立百部2种生物碱的含量,操作简便,检测方式简单,仪器精密度高,重现性好,可用于百部药材直立百部的质量控制。

[关键词] 直立百部;生物碱;对叶百部烯酮;脱氢对叶百部碱;高效液相色谱法;实验研究

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.06.044

Content determination of two alkaloids in the Chinese medicinal material *Stemona sessilifolia* by high-performance liquid chromatography

ZHAO Xia¹, LIU Jinjin¹, ZHANG Guomin²

(1. Xiangcheng Institute for Food and Drug Control, Xiangcheng 461700, Henan, China;

2. Changge Institute for Food and Drug Control, Changge 461500, Henan, China)

[Abstract] Objective: To determine the content of two effective alkaloids (tuberostemoenone and didehydrotuberostemonine) in the Chinese medicinal material *Stemona sessilifolia* by high-performance liquid chromatography (HPLC). Methods: HPLC was performed on a THERMO Hypersil ODS-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 2.5 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.2% methionine buffer solution for gradient elution (with a volume ratio of 45:55 for 0~35 minutes, 45:55~55:45 for 35~55 minutes, and 55:45 for 55~70 minutes), at a column temperature of 30℃, a detection wavelength of 235 nm, a sample size of 20 μL, and a flow rate of 1.0 ml/min. Results: Tuberostemoenone showed a linear relationship with a regression equation of Y = 0.9124 × 10⁴X + 3.9856 × 10⁴ (r=0.9998), and didehydrotuberostemonine showed a linear relationship with a regression equation of Y = 1.3062 × 10⁴X + 9.5647 × 10⁴ (r=0.9996); the two constituents showed a good linear relationship within the ranges of 0.0267~0.267 mg/mL and 0.0235~0.1635 mg/mL, respectively. Tuberostemoenone showed an average recovery rate of 99.71%, with a relative standard deviation of 1.02%, and didehydrotuberostemonine showed an average recovery rate of 99.91%, with a relative standard deviation of 1.20%. Conclusion: HPLC is simple and convenient and has good precision and repeatability in determining the content of the two alkaloids in the Chinese medicinal

material *Stemona sessilifolia*, and therefore, it can be used for the quality control of *Stemona sessilifolia*.

[Keywords] *Stemona sessilifolia*; alkaloid; tuberostemoenone; didehydrotuberostemonine; high-performance liquid chromatography; experimental study

1985年版《中华人民共和国药典》开始收载百部,并记录其来源为百部科植物直立百部 *Stemona sessilifolia* (Miq. Miq.)、蔓生百部 *Stemona Japonica* (BL.) Miq 或对叶百部 *Stemona tuberosa* Lour. 的干燥块根^[1-2]。百部味甘、苦,性微温,归肺经,功能润肺下气止咳、杀虫。目前,临床上主要用于治疗新久咳嗽、肺癆咳嗽、顿咳,外用可治疗头虱、体虱、饶虫病、阴部瘙痒等^[3]。前期的研究文献报道,百部中生物碱类成分是其镇咳效果的活性成分,其与传统的镇咳药物相比,其对多种原因引发的咳嗽具有针对性的高效、低毒的优势^[4]。百部中生物碱类成分主要有对叶百部烯酮(tuberostemoenone)、脱氢对叶百部碱(didehydrotuberostemonine)、对叶百部酮(tuberostemonone)、氧化对叶百部碱等^[5]。本研究应用高效液相色谱法测定直立百部中对叶百部烯酮、脱氢对叶百部碱2种生物碱成分的含量,以期对百部质量控制提供数据参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 采用美国安捷伦公司生产的Agilent1100型高效液相色谱仪器(包括配套的Agilent检测系统),色谱处理软件为Empower2数据处理软件系统;KQ-100DE型数字控超声波清洗仪器(北京昆山超声仪器责任公司),Mettler XO215DU型电子分析天平(美国梅特勒公司,精密密度0.0001 g);MilliPore Advantage B12自动纯水机器美国默克密理博公司;KNF102型恒温水浴锅(金坛市鸿科仪器厂)。

1.2 试剂 百部生产批号分别为20161223、20170402、20170623,鉴定为百部科植物直立百部的干燥块根。其中百部中的对叶百部烯酮、脱氢对叶百部碱成分主要由本研究团队分离得到,并经过核磁、质谱确定其结构为上述生物碱成分,质量分数>98%。甲醇、乙腈为色谱纯(北京化工有限责任公司),水为三蒸水,甲酸铵溶液和试验中所用的其他检测试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: THERMO Hypersil ODS-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 2.5 μm), 流动相为乙腈-0.2%甲酸铵缓冲溶液进行梯度洗脱(0~35 min, 体

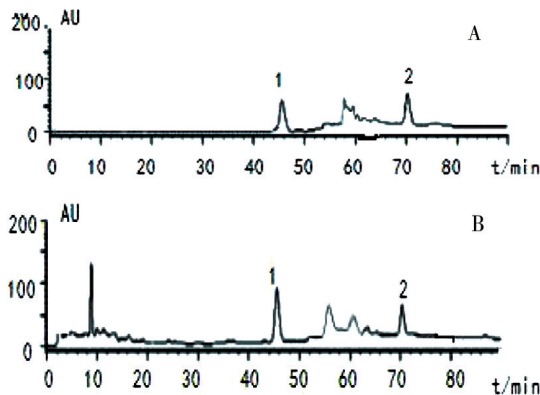
积比为45:55; 35~55 min, 体积比为45:55~55:45; 55~70 min, 体积比为55:45), 流速为1.0 ml/min, 柱温为30℃, 检测波长为235 nm, 进样量为20 μl。理论塔板数以对叶百部烯酮计算>6000。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取对叶百部烯酮、脱氢对叶百部碱对照品, 精密称定后置于5.0 ml的容量瓶中, 甲醇溶液稀释并定容至刻度, 摇匀后放置室温, 将不足部分补足后, 置于-20℃冰箱中储存备用。

2.2.2 供试品溶液 取同一批次的直立百部, 采用粉碎机进行粉碎后, 过3号筛, 精密称定10 g, 加入200 ml乙醇(浓度为55%), 精密称定重量后置于圆底烧瓶中, 回流提取2 h后放冷, 对重量再次进行称定后, 采用55%乙醇补足失重, 摇匀后重复回流提取1次, 将2次滤液合并。取滤液置于10000 r/min离心机中离心10 min^[6]。静置, 滤液过0.22 μm微孔滤膜, 得到供试品溶液, 置于-20℃冰箱中保存备用。

2.3 系统适应性试验 分别精密吸取已储存备用的混合对照品溶液和供试品溶液20 μl, 按照2.1项下的色谱条件进行测定, 对叶百部烯酮的拖尾因子为0.774, 保留时间为45 min左右, 脱氢对叶百部碱的拖尾因子为1.070, 保留时间为70 min左右, 在此色谱条件下, 2种生物碱成分与其他成分可以有效地进行分离。(见图1)



注: A—混合对照品溶液; B—供试品溶液;
1—对叶百部烯酮; 2—脱氢对叶百部碱。

图1 高效液相色谱图

2.4 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 ml,分别置于 2.0 ml 容量瓶中,采用 50%甲醇分别定容至刻度后,摇匀静置。按照试验采用的色谱条件分别进样。横坐标为对照品质量浓度,纵坐标为峰面积进行线性回归,得到 2 种生物碱的线性回归方程。对叶百部烯酮: $Y = 0.9124 \times 10^4 X + 3.9856 \times 10^4$ ($r=0.9998$);脱氢对叶百部碱: $Y = 1.3062 \times 10^4 X + 9.5647 \times 10^4$ ($r=0.9996$)。结果表明,对叶百部烯酮(0.0267~0.267 mg/ml)、脱氢对叶百部碱(0.0235~0.1635 mg/ml)与其峰面积的线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取已知混合对照品溶液,按照 2.1 项下的色谱条件重复进样 6 次,按照线性关系方程对峰面积进行测定,结果显示对叶百部烯酮峰面积的 RSD 值为 0.99%,脱氢对叶百部碱峰面积的 RSD 值为 0.87%,表明色谱仪器的精密度较好。

2.6 稳定性试验 取同一批次已配制并储存备用的供试品溶液,室温中放置 0、1、2、4、6、8、10、12、15、18、21、24 h 后分别按照色谱条件进样并进行测定,对叶百部烯酮和脱氢对叶百部碱峰面积的 RSD 值分别为 0.87%、1.21%,表明直立百部供试品溶液制备后 24 h 时间内稳定性好。

2.7 重复性试验 取同一批次的直立百部药材 6 份,精密称定后按照 2.2.2 项下供试品溶液的制备方式配制成供试品溶液,并按照 2.1 项下的色谱条件进行测定,以线性关系方程计算 2 种生物碱成分的质量。结果显示对叶百部烯酮平均质量分数的 RSD 值为 1.13%,脱氢对叶百部碱平均质量分数的 RSD 值为 0.98%,表明试验方法在测定生物碱方面的重复性结果较好。

2.8 平均加样回收率试验 精密称取同一批次的直立百部中药材 6 份,精密称定后按照 2.2.2 项下的溶液配制方法制备供试品溶液,分别加入相应的对照品适量,按照 2.1 项下的色谱条件进行色谱峰的测定,并根据线性关系方程计算质量浓度,计算两种生物碱成分的平均加样回收率。(见表 1)

2.9 样品含量测定结果 分别取 20161223、20170402、20170623 批次的直立百部各 3 份,精密称定后按照 2.2.2 项下供试品溶液的制备方式配制供试品溶液,按照 2.1 项下的色谱条件进行测定,以线性关系方程计算 3 批药材中对叶百部烯酮和脱氢对叶百部碱的含量。(见表 2)

表 1 2 种生物碱成分平均加样回收率

成分	样品量 (g)	样品中含量 (mg)	对照品 加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均加样 回收率 (%)	RSD 值 (%)
对叶	2.020	1.023	1.000	2.012	99.46	99.71	1.20
百部	2.020	1.025	1.000	2.020	99.75		
烯酮	2.800	1.120	1.100	2.215	99.77		
	2.800	1.125	1.100	2.220	99.76		
	3.500	1.250	1.300	2.547	99.88		
	3.500	1.251	1.300	2.542	99.65		
脱氢	2.020	2.320	2.000	4.315	99.88	99.91	1.02
对叶	2.020	2.320	2.000	4.312	99.81		
百部	2.800	2.504	2.200	4.700	99.91		
碱	2.800	2.506	2.200	4.701	99.89		
	3.500	2.975	2.400	5.374	99.98		
	3.500	2.980	2.400	5.378	99.96		

表 2 2 种生物碱成分的含量测定

药材批号	对叶百部烯酮		脱氢对叶百部碱	
	含量(mg)	RSD(%)	含量(mg)	RSD(%)
20161223	0.9874	1.23	1.1423	1.54
	0.9743	1.12	1.1450	1.47
	0.9825	1.20	1.1500	1.56
20170402	0.9984	1.12	1.1532	1.32
	0.9867	1.09	1.1502	1.51
	0.9900	1.20	1.1495	1.28
20170623	0.9995	1.05	1.1600	1.30
	0.9862	1.12	1.1581	1.29
	0.9847	1.30	1.1500	1.12

3 讨 论

3.1 色谱方法中流动相的选择 本次研究过程开始时对直立百部中生物碱类成分的流动相条件进行优选,分别比较了乙腈-磷酸缓冲溶液、乙腈-甲酸溶液、乙腈-甲酸铵缓冲溶液、乙腈-0.2%甲酸铵缓冲溶液^[7-10],对 4 种不同溶剂系统下百部中生物碱类成分的色谱峰的理论塔板数、分离度以及对称性进行观察。研究结果表明,在采用了乙腈-0.2%甲酸铵缓冲溶液作为流动相进行测定时,直立百部中生物碱成分的色谱峰分离度>2.0,且色谱峰对称性好,重现性高,符合含量的测定要求,可以有效地对直立百部药材的质量进行控制。因此在试验时选择乙腈-0.2%甲酸铵缓冲溶液作为流动相进行考察。

3.2 检测波长的选择 取混合对照品适量,精密称定后加入 50%甲醇配制成浓度为 1.0 mg/L 的溶液,置于 717 型紫外分光光度计下进行全波长的扫描,确定检测成分最大吸收波长为 235 nm^[11]。

3.3 供试品溶液制备方式的选择 针对直立百部中所含有的生物碱类成分,分别选择水、50%甲醇、甲醇、55%乙醇以及乙醇作为回流提取溶媒对供试品溶液中有效成分含量的提取效果进行比较^[12-13],结果表明在采用55%乙醇回流提取后测定的色谱峰效果最佳。

本次研究以直立百部为试验对象,建立了药材总生物碱中对叶百部烯酮和脱氢对叶百部碱的高效液相含量测定方法,同时对选择的3类批次直立百部药材进行了含量测定。结果表明以高效液相色谱法对直立百部中的生物碱类成分进行测定,方法简便易行,测定结果准确性高,测定的生物碱类成分在直立百部中的质量分数较高,对直立百部的质量控制具有数据参考价值,同时可以有效控制药材的质量,为其长远的有效开发利用提供了依据。

参考文献

- [1] 张彤,张亚中,陶建生,等. 中药百部中原百部碱的分离及含量测定[J]. 中国药理学杂志,2015,42(11):811-813.
- [2] 孙冬梅,董玉娟,江洁仪,等. 百部配方颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(9):2157-2159.
- [3] 王文,司文涛,杨萍,等. 消胀利水散外敷联合艾灸治疗脾肾阳虚证胃脘腹水40例临床观察[J]. 中医杂志,2019,60(16):1389-1394.
- [4] 王维,李枋甯,肖彩芝,等. 攻瘤利水散外敷联合重组人5型腺病毒注射液胸腔内灌注治疗肺癌恶性胸水的临床疗效[J]. 中国老年学杂志,2018,38(21):5184-5186.
- [5] KING R, TUTHILL C. Immune modulation with thymosin alpha 1 treatment[J]. Vitam Horm, 2016, 102(1):151-178.
- [6] WANG CJ, SPARANO J, PALEFSKY JM. Human immunodeficiency virus/AIDS, human papillomavirus, and anal cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2017, 26(1):17-31.
- [7] 何佩珊,杨公博,姜敏,等. 阳虚证肺腺癌骨转移活体荧光成像模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(3):1220-1223.
- [8] 李延玲,翟玉峰,张怀宏,等. 中医综合疗法治疗脾肾阳虚水停证肝硬化腹水60例临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(16):179-182.
- [9] 苏洪佳,陈国忠,谢君艳. 从中医脾虚“不能散精”论治肝硬化腹水[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(1):61-62.
- [10] 宋凤丽,朱旭,高辰,等. 温阳消水方治疗癌性腹水的临床观察及机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4):1513-1516.
- [11] 唐振豪,兰聪颖,林丽珠. 从肿瘤免疫编辑假说探讨肿瘤“正虚邪实”及其治疗[J]. 中医杂志, 2019, 60(13):1113-1117.
- [12] 王红玲,康斐,黄兴. 基于“阳化气,阴成形”理论探讨温阳法

- [3] 王昶,陈丽艳,张树明,等. 不同产地对叶百部中新对叶百部碱含量比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 30(10):2295-2297.
- [4] 李昕,王月茹,马利,等. 中药色谱指纹图谱在中药质量评价中的应用[J]. 生物医学工程学杂志, 2015, 29(1):192.
- [5] 吴旖,赵斌,江仁望. 百部总生物碱缓释片的质量标准研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(4):497-499.
- [6] LIAO JF, SHI CC, CHEN SY, et al. Spasmolytic effect of water extract of stemonae radix on the guinea-pig tracheal smooth muscle in vitro[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1997, 57(1):57-62.
- [7] 王红,孙磊,韦云川,等. 蔓生百部总生物碱的含量测定[J]. 中国中医药咨讯, 2014, 1(3):36-38.
- [8] 张永太,冯年平,修彦凤,等. 百部蜜炙前后总生物碱含量比较[J]. 中成药, 2015, 32(2):451-453.
- [9] 高卫东,高英,李卫民. 百部总生物碱含量测定方法的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 19(15):124-126.
- [10] 王珺,高羽,张朝凤,等. 对叶百部中的非生物碱类成分[J]. 药学与临床研究, 2015, 20(3):193-195.
- [11] 陶冶,张亚中. 电感耦合等离子质谱法测定百部药材中砷、镉、汞、铅的含量[J]. 安徽医药, 2015, 19(5):858-860.
- [12] 吕丽华,叶文才,赵守训,等. 直立百部的化学成分[J]. 中国药科大学学报, 2015, 36(5):408-410.
- [13] 胡君萍,张囡,毛一卿. 《中国药典》3种百部的止咳作用比较[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23):10-14.

(收稿日期:2021-11-08)

(上接第183页)

- [5] 王文,司文涛,杨萍,等. 消胀利水散外敷联合艾灸治疗脾肾阳虚证胃脘腹水40例临床观察[J]. 中医杂志, 2019, 60(16):1389-1394.
- [6] 王维,李枋甯,肖彩芝,等. 攻瘤利水散外敷联合重组人5型腺病毒注射液胸腔内灌注治疗肺癌恶性胸水的临床疗效[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(21):5184-5186.
- [7] KING R, TUTHILL C. Immune modulation with thymosin alpha 1 treatment[J]. Vitam Horm, 2016, 102(1):151-178.
- [8] WANG CJ, SPARANO J, PALEFSKY JM. Human immunodeficiency virus/AIDS, human papillomavirus, and anal cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2017, 26(1):17-31.
- [9] 何佩珊,杨公博,姜敏,等. 阳虚证肺腺癌骨转移活体荧光成像模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(3):1220-1223.
- [10] 李延玲,翟玉峰,张怀宏,等. 中医综合疗法治疗脾肾阳虚水停证肝硬化腹水60例临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(16):179-182.
- [11] 苏洪佳,陈国忠,谢君艳. 从中医脾虚“不能散精”论治肝硬化腹水[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(1):61-62.
- [12] 宋凤丽,朱旭,高辰,等. 温阳消水方治疗癌性腹水的临床观察及机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4):1513-1516.
- [13] 唐振豪,兰聪颖,林丽珠. 从肿瘤免疫编辑假说探讨肿瘤“正虚邪实”及其治疗[J]. 中医杂志, 2019, 60(13):1113-1117.
- [14] 王红玲,康斐,黄兴. 基于“阳化气,阴成形”理论探讨温阳法在恶性肿瘤中的应用[J]. 中医基础医学杂志, 2019, 25(7):999-1002.
- [15] 马齐襄,朱晓丹,胡凯文,等. 肿瘤转移的种子与土壤学说新认识[J]. 肿瘤防治研究, 2015, 42(10):1049-1053.
- [16] FOSSATI M, BUZZONETTI A, MONEGO G, et al. Immunological changes in the ascites of cancer patients after intraperitoneal administration of the bispecific antibody catumaxomab (anti-Ep-CAMxanti-CD3)[J]. Gynecol Oncol, 2015, 138(2):343-351.
- [17] POURMALEKI M, Young JH, SOCCI ND, et al. Extramammary paget disease shows differential expression of B7 family members B7-H3, B7-H4, PD-L1, PD-L2 and cancer/testis antigens NY-ESO-1 and MAGE-A[J]. Oncotarget, 2019, 10(58):6152-6167.
- [18] MITSUIKI N, SCHWAB C, GRIMBACHER B. What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system[J]. Immunol Rev, 2019, 287(1):33-49.
- [19] ROWSHANRAVAN B, HALLIDAY N, SANSOM DM. CTLA-4: A moving target in immunotherapy[J]. Blood, 2018, 131(1):58-67.
- [20] ZHOU X, MAO Y, ZHU J, et al. TGF-beta1 promotes colorectal cancer immune escape by elevating B7-H3 and B7-H4 via the miR-155/miR-143 axis[J]. Oncotarget, 2016, 7(41):67196-67211.
- [21] INGRAM JR, BLOMBERG OS, RASHIDIAN M, et al. Anti-CTLA-4 therapy requires an Fc domain for efficacy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(15):3912-3917.

(收稿日期:2021-11-18)