

## HPLC-ELSD法测定浙贝母中主要生物碱的含量

薛燕<sup>1\*</sup>, 顾好粮<sup>2</sup>

(1. 中国医学科学院·中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050; 2. 沃特斯中国有限公司 北京代表处, 北京 100005)

**摘要:** 目的 利用 HPLC-ELSD 测定贝母类药材中的贝母素甲和贝母素乙。方法 XTerra RP18 色谱柱 (150 mm × 3.9 mm ID, 5 μm), 流动相为乙腈-10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (浓氨水调至 pH 10.10) = A: B 系统, 梯度洗脱, 以 ELSD 检测。结果 贝母素甲在 1.09 - 4.36 μg, 贝母素乙在 1.04 - 4.16 μg 与峰面积的对数值呈线性关系, 回收率分别为 98.96% (n=4), RSD 1.01%; 98.40% (n=4), RSD 2.63%。结论 本方法能够很好地测定浙贝母药材中的主要生物碱贝母素甲、贝母素乙, 可用于浙贝母药材的质量控制。

**关键词:** 浙贝母; 贝母素甲; 贝母素乙; HPLC-ELSD

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)06 - 0550 - 03

## Determination of peimine and peiminine in *Fritillaria thunbergii* by HPLC-ELSD

XUE Yan<sup>1\*</sup>, GU Hao-liang<sup>2</sup>

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

2. Waters China Limited-Beijing Office, Beijing 100005, China)

**Abstract:** **Aim** To determine peimine and peiminine in *Fritillaria* drug simultaneously by RP-HPLC-ELSD. **Methods** HPLC was carried out with a Waters Alliance, Model 2690, equipped with XTerra RP18 column (150 mm × 3.9 mm ID, 5 μm) and evaporated light scattering detector. The mobile phase (acetonitrile-10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> adjusted to pH 10.10 by ammonia solution) was eluted in gradient mode. **Results** The recoveries of peimine and peiminine were 98.96% (n=4), with RSD 1.01% and 98.40% (n=4), with RSD 2.63%, respectively. **Conclusion** The method is simple, sensitive and reliable. It can be used for quantitative determination of *Fritillaria* drug.

**Key words:** *Fritillaria thunbergii*; peimine; peiminine; HPLC-ELSD

浙贝母为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎, 其有效成分为生物碱, 具有止咳化痰的作用。生物碱主要以贝母素甲和贝母素乙为主。由于贝母素甲、贝母素乙属于异甾体生物碱, 缺少发色团, 用常见的紫外吸收检测器不能很好地检测到。为了测定浙贝母中这类生物碱, 有用薄层扫描法<sup>[1]</sup>、柱前衍生化 HPLC 法<sup>[2,3]</sup>、气相色谱法<sup>[4]</sup>, 但多因检测方面的局限性难以令人满意。采用 HPLC-ELSD 法同时测定浙贝母中贝母素甲、贝母素乙, 尚未见报道。本文利用 HPLC-ELSD 法定量

测定了几十种不同产地来源的浙贝母中的贝母素甲及乙的含量, 取得了较满意的结果。

### 材料与amp;方法

**仪器与材料** Waters Alliance 2690 液相色谱仪, Waters ELSD-2420 型蒸发光散射检测器, Empower 色谱管理软件, XTerra RP18 色谱分析柱 (150 mm × 3.9 mm ID, 5 μm)。

贝母素甲、贝母素乙对照品及浙贝母 (*Fritillaria thunbergii* Miq.)、川贝母 (*F. cirrhosa* D. Don)、伊贝母 (*F. pallidiflora* Schrenk.)、平贝母 (*F. ussuriensis* Maxim.)、湖北贝母 (*F. hupehensis*) 对照药材均购自中国药品生物制品检定所。其他浙贝母药材经鉴定, 符合 2000 年版中国药典规定。

收稿日期: 2004-10-20.

基金项目: 科技部中央级科研院所科技基础性工作专项研究课题。

\* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63025981, E-mail: yanxue@imm.ac.cn

色谱分析条件 流动相为乙腈-10 mmol·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (浓氨水调至 pH 10.10) = A: B系统。梯度洗脱, 0→5 min A为 40%→45%, 5→15 min A保持 45%, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 温度 40℃, 进样量 10 μL。ELSD参数: 漂移管温度 85℃, 氮气压力 0.2 MPa, 增益 50。

样品溶液的制备 精密称取浙贝母粉末约 3 g, 加氨水 1.2 mL 放置 30 min, 加入氯仿 20 mL, 密闭, 放置 20 h 后, 过滤。吸取续滤液 10 mL, 回收氯仿至干, 残渣加甲醇定溶于 2 mL 量瓶中, 过滤, 备用。

## 结果与讨论

### 1 线性关系考察

精密称取贝母素甲及贝母素乙对照品适量, 加甲醇制成内含贝母素甲 2.18 mg·mL<sup>-1</sup>, 贝母素乙 2.08 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液作为对照品溶液。取上述溶液 5, 15 和 20 μL 依次进样, 按上述色谱分析条件测定, 用外标法以对照品的峰面积 (y) 与相对应的进样量 (x, μg) 做双对数线性回归处理。回归方程见表 1。

Table 1 Linear equation, correlation coefficient and the linear range of the two alkaloids

Reference substance	Linear equation	Correlation coefficient	Linear range /μg
Peimine	$y = 1.18x + 5.99$	0.9985	1.09 - 4.36
Peiminine	$y = 1.26x + 6.13$	0.9996	1.04 - 4.16

### 2 重现性试验

精密称取同批浙贝母药材粉末约 3 g, 共 4 份, 按“样品溶液的制备”项下操作, 并取 10 μL 进样。同批浙贝母药材中贝母素甲的含量为 0.0213%, RSD 为 1.30%, 贝母素乙的含量为 0.0144%, RSD 为 1.95%。

### 3 精密度试验

取对照品溶液 10 μL, 重复进样 4 次, 贝母素甲及乙的峰面积积分值的 RSD 分别为 1.50% 和 1.26%。

### 4 回收率测定

精密称取已知贝母素甲含量为 0.213 mg·g<sup>-1</sup> 和贝母素乙含量为 0.144 mg·g<sup>-1</sup> 的浙贝母药材粉末 4 份, 加入内含 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的贝母素甲及 1.2 mg·mL<sup>-1</sup> 的贝母素乙对照品溶液, 按“样品溶液的制备”项下方法操作, 并取 10 μL 进样。测定并计算回收率得: 贝母素甲 98.96%, RSD 为 1.01%; 贝

母素乙 98.40%, RSD 为 2.63%。

## 5 浙贝母药材的测定

取所收集的不同来源的 26 种浙贝母药材粉末及 5 种对照药材粉末, 按“样品溶液的制备”项下方法操作, 并取 10 μL 进样。结果见表 2-4 及图 1。

Table 2 Test data of *Fritillaria* drug from various sources (%)

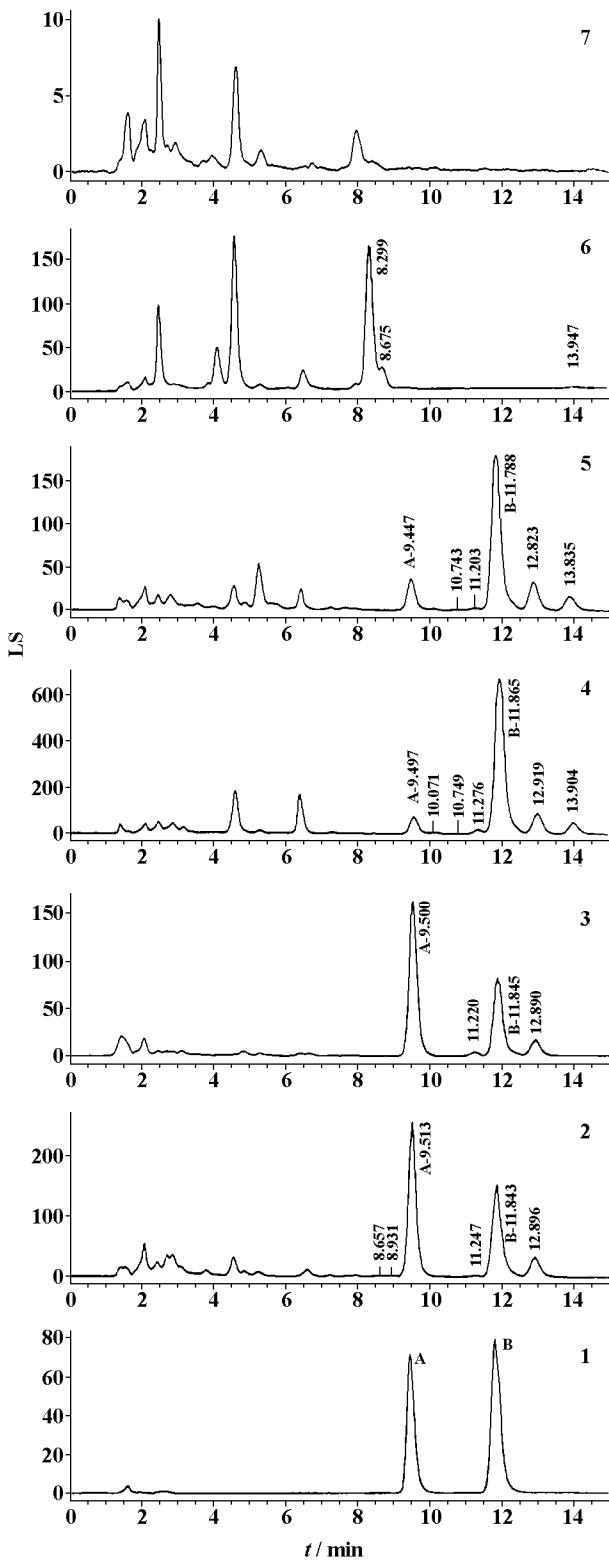
Sample	Source	Peimine	Peiminine
1	Zhejiang yinzhuzhangshui	0.0088	0.054
2	Zhejiang yinzhuzhangshui	0.0122	0.0076
3	Zhejiang yinzhuo	0.0215	0.0093
4	Zhejiang yinzhuzhangshui	0.0266	0.0024
5	Zhejiang banan	0.0303	0.0146
6	Zhejiang bananshuangxi	0.0155	0.0070
7	Zhejiang bananxinwu	0.0215	0.0093
8	Zhejiang bananxinwu	0.0252	0.0132
9	Zhejiang banangaoer	0.0230	0.0011
10	Zhejiang dongyangsanlian	0.0177	0.0083
11	Zhejiang dongyangmazhai	0.0237	0.0122
12	Zhejiang dongyangmazhai	0.0234	0.0107
13	Zhejiang dongyangmazhai	0.0140	0.0080
14	Zhejiang dongyangmazhai	0.0210	0.0126
15	Zhejiang fenghua	0.0240	0.0142
16	Anhui haozhou	0.0250	0.0086
17	Anhui haozhou	0.0158	0.0070
18	Anhui haozhou	0.0104	0.0173
19	Zhejiang yinzhuo	0.0017	0.00039

Table 3 Analytical data of *Fritillaria* from differently processed drugs (%)

Sample	Source	Peimine	Peiminine
Dabei	Zhejiang yinzhuzhangshui	0.0088	0.0054
Dabei	Zhejiang yinzhuzhangshui	0.00122	0.0076
Dabei	Zhejiang yinzhuzhangshui	0.0219	0.0094
Dabei	Zhejiang fenghua	0.0320	0.0189
Zhubei	Zhejiang yinzhuzhangshui	0.0266	0.0024
Zhubei	Zhejiang bananshuangxi	0.0155	0.0070
Zhubei	Anhui bezhou	0.0250	0.0086
Zhubei	Zhejiang dongyangsanlian	0.0177	0.0083
Zhebeipian	Jiangsu nanjing	0.0176	0.0094
Zhebeipian	Zhejiang lanxi	0.0228	0.0087
Zhebeipian	Beijing	0.0139	0.0083
Zhebeipian	Beijing	0.0168	0.0090

Table 4 Analytical data of reference *Fritillaria* (%)

Sample	Peimine	Peiminine
<i>Fritillaria thunbergii</i>	0.0416	0.0238
<i>F. hupehensis</i>	0.0158	0.0808
<i>F. ussuriensis</i>	0.0082	0.0277
<i>F. pallidifloca</i>	-	-
<i>F. cirrhosa</i>	-	-



A: Peimine; B: Peimine; 1: Reference substance; 2: Sample No. 1; 3: *Fritillaria hupehensis*; 4: *F. thunbergii*; 5: *F. ussuriensis*; 6: *F. pallidiflora*; 7: *F. cirrhosa*

Figure 1 Chromatograms of peimine and peimine

### 讨论

本文采用 ELSD 检测器,配合梯度洗脱,分离样品中的贝母素甲及贝母素乙。结果表明,浙贝母中的贝母素甲及乙能够获得很好的分离,且分离度及重现性均令人满意。提示可用于浙贝母药材的质量监控。

从样品的检测结果来看,传统上认为质量上乘的元宝贝,其中的贝母素甲及贝母素乙在含量上并不占优势,未去贝芯的珠贝,可能因比表面积大而含有更多的贝母素甲及贝母素乙。另外值得注意的是,药材市场上不少作为浙贝母出售的样品中,贝母素甲及贝母素乙未检测到。从整体上来看,各样品之间,贝母素甲的含量差异要明显大于贝母素乙的含量差异,这一点对浙贝母临床疗效的影响还有待于进一步的研究。

5 个对照药材中,在川贝母及伊贝母的样品中未能检测到贝母素甲及贝母素乙,湖北贝母含有贝母素乙的量是所有样品中最高的,而其甲素与乙素的含量相差近 6 倍,这一现象是否是湖北贝母的普遍现象,在药效作用上和浙贝母是否有差异,还有待于更多样品的收集与验证。另外,从色谱图上看,5 种对照药材在此分离条件下,不仅贝母素甲、乙能够很好地被指认,色谱图上的其他成分的色谱峰也很大,因此,用梯度洗脱 ELSD 检测不失为一种很好的指纹图谱检测法。

### References

- [ 1 ] Li P, Xu G, Xu LS. Determination of verticine and verticinone in *Hupei Fritillaria* (*Fritillaria hupehensis*) [ J ]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(11): 579 - 580.
- [ 2 ] Wang Y, Zhang QL, Chen XY, et al. Quantitative determination of peimine in *Bulbus Fritillaria* available on market by HPLC [ J ]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(1): 24 - 25.
- [ 3 ] Kan D, Ge L, Yee Ph, et al. Prederivatization and high-performance liquid chromatographic analysis of alkaloids of bulbs of *Fritillaria* [ J ]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(11): 1174 - 1179.
- [ 4 ] Yan M, Zhong J, Liu QH, et al. Identification of 10 kinds of *Fritillaria* by pyrolytic gas chromatography [ J ]. *Mod Appl Pharm* (现代应用药学), 1996, 13(5): 19 - 21.