

# HPLC法测定半贝丸中腺苷、鸟苷、西贝母碱和西贝母碱苷的含量

许红莉<sup>1\*</sup>, 邓新红<sup>2</sup>(1.孝感市康复医院,湖北孝感 432000;2.孝感市中医院,湖北孝感 432000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)47-4478-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.47.21

**摘要** 目的:建立半贝丸中腺苷、鸟苷、西贝母碱和西贝母碱苷的含量测定方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法。腺苷和鸟苷的色谱柱为Hypersil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流速为0.9 ml/min,流动相为甲醇-1%冰醋酸(梯度洗脱),检测波长为260 nm;西贝母碱和西贝母碱苷的色谱柱为Hypersil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%二乙胺溶液(79:21, V/V),柱温为室温,流速为0.9 ml/min,进样量为10 μl,蒸发光散射检测器漂移管温度为85 ℃,载气(N<sub>2</sub>)流速为2.1 L/min。结果:腺苷与鸟苷的进样量分别在0.013 4~0.268 0 μg( $r=0.999\ 2$ )、0.041 2~0.824 0 μg( $r=0.999\ 7$ )范围内与峰面积积分值呈良好线性关系,平均加样回收率分别为97.66%、96.86%,RSD分别为1.72%、1.38%( $n$ 均为6);西贝母碱和西贝母碱苷进样量分别在0.031 6~0.632 0( $r=0.999\ 1$ )、0.065 2~1.304 0 μg( $r=0.999\ 8$ )范围内与各自峰面积的自然对数值呈良好线性关系,平均加样回收率分别为96.51%、98.79%,RSD分别为1.37%、0.94%( $n$ 均为6)。精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于1%。结论:该测定方法结果准确、灵敏度高、重复性好,可为完善半贝丸的质量控制标准提供依据。

**关键词** 半贝丸;腺苷;鸟苷;西贝母碱;西贝母碱苷;高效液相色谱法

## Content Determination of Adenosine, Guanosine, Sipeimine and Sipeimine-3β-d-glucoside in Banbei Pill by HPLC

XU Hong-li<sup>1</sup>, DENG Xin-hong<sup>2</sup>(1.Xiaogan Recovery Hospital, Hubei Xiaogan 432000, China; 2.Xiaogan Hospital of TCM, Hubei Xiaogan 432000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To determine the contents of adenosine, guanosine, sipeimine and sipeimine-3β-d-glucoside in *Banbei pill*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Hypersil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column at the flow rate of 0.9 ml/min. The mobile phase of adenosine and guanosine consisted of methanol-1% acetic acid at the detection wavelength of 260 nm. The determination of sipeimine and sipeimine-3β-d-glucoside was performed on Hypersil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% diethylamine solution (79:21, V/V) at the flow rate of 0.9 ml/min. The column temperature was room temperature and sample size was 10 μl. The temperature of drift tube was set at 85 ℃, and N<sub>2</sub> was used as carrier gas at the flow rate of 2.1 L/min. RESULTS: The linear range was 0.013 4-0.268 0 μg for adenosine( $r=0.999\ 2$ ) and 0.041 2-0.824 0 μg for guanosine( $r=0.999\ 7$ ); average recoveries were 97.66% (RSD=1.72%,  $n=6$ ) and 96.86% (RSD=1.38%,  $n=6$ ). The linear range was 0.031 6-0.632 0 μg for sipeimine( $r=0.999\ 1$ ) and 0.065 2-1.304 0 μg for sipeimine-3β-d-glucoside( $r=0.999\ 8$ ); average recoveries were 96.51% (RSD=1.37%,  $n=6$ ) and 98.79% (RSD=0.94%,  $n=6$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1%. CONCLUSIONS: The method is accurate, sensitive and reproducible, and can provide reference for the improvement of quality control standard of Banbei pill.

**KEYWORDS** Banbei pill; Adenosine; Guanosine; Sipeimine; Sipeimine-3β-d-glucoside; HPLC

半贝丸为中药复方制剂,处方源于卫生部药品标准《中药成方制剂》(第十三册),由半夏(制)、川贝母两味中药组成,具有止咳化痰、开郁散结的功效,可用于咳嗽痰多及瘰疬痰核病等症的治疗。原质量标准仅对半贝丸的性状进行了控制,但未对方中的药味进行定性鉴别或定量测定<sup>[1]</sup>。为保证产品质量,确保药物疗效,本研究采用高效液相色谱(HPLC)法对半夏中的腺苷、鸟苷和川贝母中的西贝母碱、西贝母碱苷分别进行含量测定,以为完善该制剂的质量标准提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-10ATVP型HPLC仪,包括SIL-10ADVP型自动进样器、ANASTAR色谱数据工作站、SPD-10AVP型紫外-可见光

检测器和Alltech 2000ES型蒸发光散射检测器(ELSD,日本岛津公司)。

### 1.2 药品与试剂

半贝丸(自制,批号:130712、130714、130716,规格:每30丸重约3 g);鸟苷对照品(批号:118-00-3,纯度≥95%)购于上海同田生物技术股份有限公司;腺苷对照品(批号:110879-200202)、西贝母碱对照品(批号:110767-201005)和西贝母碱苷对照品(批号:111917-201001)均购于中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈(色谱纯,湖北杜克化学科技有限公司);冰醋酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);二乙胺(分析纯,浙江建业化工股份有限公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 腺苷和鸟苷的含量测定<sup>[2-4]</sup>

2.1.1 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱:Hypersil C<sub>18</sub>

\* 主管药师。研究方向:临床药学、药物分析。电话:0712-2349446。E-mail: xuhonglilunwen@163.com

(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-1%冰醋酸溶液(V/V, B), 梯度洗脱(0~14 min, 26% A; 15~28 min, 26%→12%A; 29~40 min, 12% A); 检测波长: 260 nm; 流速: 0.9 ml/min。在此色谱条件下, 腺苷、鸟苷的色谱峰能与其他组分达到基线分离, 理论板数按鸟苷计应不低于2 800; 分离度>1.5。供试品溶液色谱中, 在与腺苷和鸟苷对照品相同保留时间处有吸收峰, 而阴性对照溶液在相同保留时间处未见吸收峰, 表明阴性对照无干扰。色谱见图1。

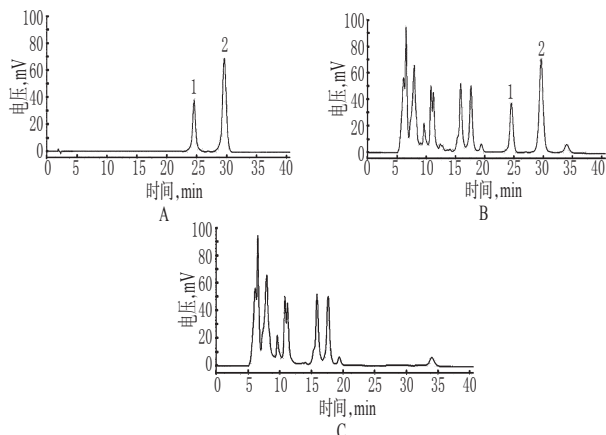


图1 腺苷与鸟苷的高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 腺苷; 2. 鸟苷

Fig 1 HPLC chromatograms of adenosine and guanosine

A. substance control; B. test samples; C. negative control; 1. adenosine; 2. guanosine

2.1.2 混合对照品溶液的制备 精密称取腺苷对照品和鸟苷对照品各适量, 加85%甲醇制成腺苷和鸟苷质量浓度分别为0.013 4、0.041 2 mg/ml的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品适量, 研细, 取约5.0 g, 精密称定, 置50 ml量瓶中, 精密加入85%甲醇50 ml, 超声(功率: 300 W, 频率: 20 kHz)处理30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加水溶解, 以水饱和的正丁醇提取, 提取液蒸干, 残渣加85%甲醇溶解并定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.1.4 阴性对照溶液的制备 按半贝丸的生产工艺制成缺半夏的阴性样品, 按“2.1.3”项下方法制备, 即得。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下的混合对照品溶液各1、5、10、15、20 μl, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。以峰面积积分值(y)为纵坐标, 进样量(x, μg)为横坐标, 绘制标准曲线, 得腺苷的回归方程为 $y=2.364 5 \times 10^6 x + 269.1 (r=0.999 2)$ ; 鸟苷的回归方程为 $y=4.023 4 \times 10^6 x - 468.7 (r=0.999 7)$ 。结果表明, 腺苷和鸟苷的进样量分别在0.013 4~0.268 0、0.041 2~0.824 0 μg范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系。

2.1.6 精密度试验 取混合对照品溶液适量, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 重复6次, 记录峰面积。结果, 腺苷与鸟苷峰面积的RSD分别为0.82%、0.59% (n=6), 表明仪器精密密度良好。

2.1.7 重复性试验 取同一批样品(批号: 130712)适量, 按“2.1.4”项下方法平行制备6份供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 腺苷与鸟苷峰面积的RSD分别为0.95%、0.78% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 在放置0、1、2、4、6、8 h后按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 腺

苷与鸟苷峰面积的RSD分别为0.37%、0.29% (n=6), 表明供试品溶液在8 h内基本稳定。

2.1.9 加样回收率试验 取已知含量(腺苷: 0.128 mg/g、鸟苷: 0.426 mg/g)的同一批样品(批号: 130712)适量, 研细, 取约2.5 g, 共6份, 精密称定, 分别置50 ml量瓶中, 精密加入85%甲醇溶液和混合对照品溶液各25 ml, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算加样回收率, 结果见表1。

表1 腺苷和鸟苷的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests of adenosine and guanosine (n=6)

对照品	称样量, g	样品含量, mg	加入量, g	测得量, mg	回收率, %	$\bar{x}$ , %	RSD, %
腺苷	2.500 4	0.320 1	0.335 0	0.642 1	96.12	97.66	1.72
	2.510 1	0.321 3	0.335 0	0.648 0	97.52		
	2.498 3	0.319 8	0.335 0	0.645 1	97.10		
	2.504 9	0.320 6	0.335 0	0.651 0	98.63		
	2.501 6	0.320 2	0.335 0	0.656 8	100.48		
	2.508 2	0.321 0	0.335 0	0.642 9	96.09		
鸟苷	2.500 4	1.065 2	1.030 0	2.088 1	99.31	96.86	1.38
	2.510 1	1.069 3	1.030 0	2.056 0	95.80		
	2.498 3	1.064 3	1.030 0	2.066 9	97.34		
	2.504 9	1.067 1	1.030 0	2.055 1	95.92		
	2.501 6	1.065 7	1.030 0	2.062 3	96.76		
	2.508 2	1.068 5	1.030 0	2.057 8	96.05		

## 2.2 西贝母碱和西贝母碱苷的含量测定<sup>[5-9]</sup>

2.2.1 色谱条件及系统适用性试验 色谱柱: Hypersil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1%二乙胺溶液(79: 21, V/V); 柱温: 室温; 流速: 0.9 ml/min; 进样量: 10 μl; ELSD漂移管温度: 85 °C; 载气(N<sub>2</sub>)流速: 2.1 L/min。在此色谱条件下, 理论板数以西贝母碱计算应不低于3 500; 分离度>1.5。结果, 供试品溶液色谱中, 在与西贝母碱和西贝母碱苷对照品相同保留时间处有吸收峰, 而阴性对照溶液在相同保留时间处未见吸收峰, 表明阴性对照无干扰。色谱见图2。

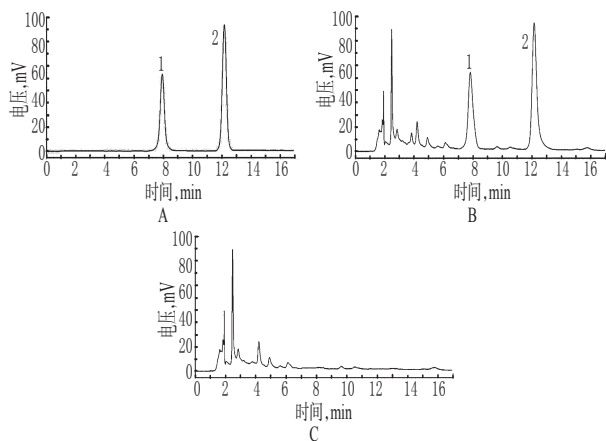


图2 西贝母碱和西贝母碱苷的高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 西贝母碱; 2. 西贝母碱苷

Fig 2 HPLC chromatograms of sipeimine and sipeimine-3-β-D-glucoside

A. substance control; B. test samples; C. negative control; 1. sipeimine; 2. sipeimine-3-β-D-glucoside

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取西贝母碱和西贝母碱苷对照品各适量, 加三氯甲烷-乙醇(1:1, V/V)溶液制成

质量浓度分别为0.031 6、0.065 2 mg/ml的西贝母碱和西贝母碱苷混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品适量,研细,取约5.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加浓氨试液3 ml,浸润1 h,加三氯甲烷-乙醇(1:1, V/V)溶液40 ml,超声(功率:200 W,频率:30 kHz)处理40 min,滤过,滤液转移至50 ml量瓶中,用适量三氯甲烷-乙醇(1:1, V/V)溶液洗涤药渣2次,洗涤液并入同一50 ml量瓶中,加三氯甲烷-乙醇(1:1, V/V)溶液至刻度,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按半贝丸的处方工艺制成缺川贝母的阴性样品,按“2.2.3”项下方法制备,即得。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下的混合对照品溶液各1、5、10、15、20 μl,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以峰面积的自然对数值(y)为纵坐标,西贝母碱、西贝母碱苷的进样量(x, μg)为横坐标分别绘制标准曲线,得西贝母碱的回归方程为 $y=2.032 4x+6.124 5(r=0.999 1)$ ;西贝母碱苷的回归方程为 $y=3.157 2x+5.157 3(r=0.999 8)$ 。结果表明,西贝母碱和西贝母碱苷的进样量分别在0.031 6~0.632 0、0.065 2~1.304 0 μg范围内,与其峰面积的自然对数值呈良好线性关系。

2.2.6 精密度试验 取混合对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,重复6次,记录峰面积。结果,西贝母碱和西贝母碱苷峰面积的RSD分别为0.77%、0.92%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批(批号:130712)样品适量,按“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件重复进样6次,记录峰面积,计算样品含量。结果,西贝母碱和西贝母碱苷峰面积的RSD分别为0.46%、0.52%(n=6),表明方法的重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液适量,分别于0、1、2、4、6、8 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,西贝母碱和西贝母碱苷峰面积的RSD分别为0.83%、0.65%(n=6),表明供试品溶液在8 h内基本稳定。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量(西贝母碱:0.308 mg/g、西贝母碱苷:0.656 mg/g)的同一批(批号:130712)样品适量,研细,取约2.5 g,共6份,精密称定,置锥形瓶中,加浓氨试液3 ml,浸润1 h,加混合对照品溶液25 ml、三氯甲烷-乙醇(1:1, V/V)溶液15 ml,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果见表2。

### 2.3 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.1”项下方法测定腺苷和鸟苷的含量,再按“2.2”项下方法测定西贝母碱和西贝母碱苷的含量,结果见表3。

## 3 讨论

### 3.1 腺苷与鸟苷含量测定中流动相的选择

笔者曾在腺苷与鸟苷含量测定时分别以甲醇-水<sup>[9]</sup>、水-乙腈<sup>[4]</sup>、甲醇-1%冰醋酸溶液的不同比例为流动相进行梯度洗脱,结果以甲醇-水为流动相梯度洗脱时两成分分离效果不好,未达到基线分离;以水-乙腈为流动相梯度洗脱时,腺苷与其他色谱峰能达到基线分离,但鸟苷与其他色谱峰不能达到基线分离;而以甲醇-1%冰醋酸溶液(V/V)为流动相进行梯度洗脱时,腺苷、鸟苷均能与其他色谱峰达到基线分离,故最终选用甲

表2 西贝母碱和西贝母碱苷的加样回收率试验结果(n=6)  
Tab 2 Results of recovery tests of sipeimine and sipeimine-β-d-glucoside (n=6)

对照品	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
西贝母碱	2.501 7	0.770 5	0.790 0	1.551 9	98.91	96.51	1.37
	2.500 5	0.770 2	0.790 0	1.521 8	95.14		
	2.502 2	0.770 7	0.790 0	1.537 3	97.04		
	2.499 1	0.769 7	0.790 0	1.529 0	96.11		
	2.498 3	0.769 5	0.790 0	1.526 1	95.77		
	2.506 4	0.772 0	0.790 0	1.531 2	96.10		
西贝母碱苷	2.501 7	1.641 1	1.630 0	3.241 3	98.17	98.79	0.94
	2.500 5	1.640 3	1.630 0	3.254 1	99.01		
	2.502 2	1.641 4	1.630 0	3.254 9	98.99		
	2.499 1	1.639 4	1.630 0	3.225 2	97.29		
	2.498 3	1.638 9	1.630 0	3.267 1	99.89		
	2.506 4	1.644 2	1.630 0	3.264 4	99.40		

表3 样品含量测定结果(n=3, mg/g)  
Tab 3 Results of content determination of samples (n=3, mg/g)

批号	腺苷	鸟苷	西贝母碱	西贝母碱苷
130712	0.128	0.426	0.308	0.656
130714	0.135	0.479	0.291	0.596
130716	0.118	0.406	0.322	0.626

醇-1%冰醋酸溶液(V/V)为流动相进行梯度洗脱。

### 3.2 腺苷与鸟苷含量测定中检测波长的选择

分别取腺苷与鸟苷的对照品各适量,加甲醇溶解,在200~400 nm波长范围内进行紫外扫描,结果发现,腺苷对照品溶液在260 nm波长处有最大吸收,而鸟苷对照品在258 nm波长处有最大吸收,参考文献<sup>[2]</sup>中的检测波长260 nm,本研究最终将260 nm作为检测波长。

综上所述,本方法操作简便、结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于半贝丸中相关成分的含量测定。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:34-35、110-111、附录30、附录36.
- [2] 隋利强,吴水生.RP-HPLC法测定不同贮存年限半夏饮片中原苷和鸟苷的含量[J].黔南民族医学学报,2012,25(03):157.
- [3] 王学军,徐文芬,冉懋雄,等.HPLC法测定不同产地半夏药材中原苷的含量[J].西北药学杂志,2010,25(02):102.
- [4] 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.
- [5] 吴启秀,王曙,严晓梁,等.栽培川贝母的地上部分与鳞茎中总生物碱的比较[J].华西药学杂志,2008,23(6):712.
- [6] 高光伟,张建业,冯向东.HPLC-ELSD法测定复方川贝母片中贝母素甲的含量[J].中国药师,2010,13(06):833.
- [7] 王聪,王曙,马静.川贝母的HPLC指纹图谱研究[J].华西药学杂志,2010,25(01):61.
- [8] 黎开强,吴卫,郑有良,等.不同光强对川贝母生长发育和总生物碱的影响[J].中草药,2009,40(09):1475.
- [9] 李爱红,陈伟健,胡文军.一测多评法测定银杏叶胶囊中总黄酮醇苷的含量[J].中国药房,2012,23(36):3446.

(收稿日期:2013-10-31 修回日期:2013-12-30)