

对叶百部化学成分液相行为研究

王 昶, 陈丽艳, 张树明, 魏文峰, 王伟明*

黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 150036

摘要: 本文对对叶百部化学成分 HPLC 行为进行了细致研究并尝试了一种新的 HPLC 测定方法, 全面考察了流动相组成及 pH 值变化对百部生物碱及非生物碱 HPLC 行为的影响, 并首次应用 pH 梯度洗脱 HPLC 色谱法进行不同产地对叶百部非生物碱成分比较分析。结果表明流动相组成及 pH 值变化对对叶百部化学成分 HPLC 行为有较大影响, 尤其是 pH 值对生物碱色谱峰峰形及非生物碱色谱峰保留时间影响更大。HPLC 图谱显示不同产地对叶百部生物碱成分差异显著, 非生物碱成分相似度较高。同时发现, 本文所应用 pH 梯度洗脱 HPLC 色谱法在实现较好色谱峰分离基础上, 有效抑制基线漂移。

关键词: 对叶百部; 液相色谱; pH 梯度; 指纹图谱

中图分类号: R931.5

文献标识码: A

Analysis of Chemical Constituents of *Stemona tuberosa* Lour. by HPLC

WANG Chang, CHEN Li-yan, ZHANG Shu-ming, WEI Wen-feng, WANG Wei-ming*

Heilongjiang academy of chinese medicine sciences, Heilongjiang 150036, China

Abstract: In this study, a new high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the detection of chemical constituents of *Stemona tuberosa*. The influence of mobile phase composition and pH value on HPLC behavior of alkaloid and non-alkaloid components of *S. tuberosa* was examined. In addition, pH gradient elution was applied to separate the non-alkaloid constituents of *S. tuberosa* from different habitats for the first time. The results showed that mobile phase composition and pH value had large impact on the HPLC behavior of chemical constituents of *S. tuberosa*. In particular, the pH value of mobile phases had a greater impact on the peak shape of alkaloids and retention times of non-alkaloid. Meanwhile, the alkaloid constituents of *S. tuberosa* from different habitats were very different, but non-alkaloid constituents were similar. The baseline of the developed method did not have significant drift under the optimized conditions.

Key words: *Stemona tuberosa* Lour.; HPLC; pH gradient; fingerprint

对叶百部(*Stemona tuberosa* Lour. Radix)为较常用中药,主要用于治疗咳嗽、杀虫,中国药典记载了直立百部[*S. sessilifolia* (Miq.) Miq.]、蔓生百部[*S. japonica* (Blume) Miq.]及对叶百部(*S. tuberosa* Lour.)^[1],其中对叶百部分布最广,为临床主要应用品种,同时,研究表明,其止咳效果优于另两种百部^[2]。中国药典对百部的质量控制仅限于形态组织学研究,具有一定的局限性,故对百部,尤其是对叶百部进行深入研究十分必要,本文对对叶百部生物碱及非生物碱类成分进行液相行为的研究,以进

一步推动百部质量标准的规范,并可为百部的相关基础研究提供更多的实验数据。

1 仪器与试剂

液相色谱:岛津 2010c 一体机,双波长紫外检测器,岛津色谱工作站;电子天平:OHAUS 万分之一电子天平, SATORIOUS 十万分之一电子天平;酸度计:PHS-2,上海第二分析仪器厂。

百部药材:采集自不同产地的对叶百部,具体见表 1,经黑龙江省中医研究院王伟明研究员鉴定为对叶百部;对照品:金刚大碱盐酸盐(croomine hydrochloride)、新对叶百部碱盐酸盐(neotuberostemonine hydrochloride),实验室自制。乙腈:色谱纯, MERCK 公司;液相用水:市售纯净水;其它溶剂均为分析纯。

收稿日期:2013-05-02 接受日期:2013-09-27

基金项目:哈尔滨市科技局青年科技创新人才项目(2011RFQYS090);
国家重大新药创制项目(2010ZX09101-104)

* 通讯作者 E-mail: zyyjy@163.com

表1 对叶百部产地及采集时间

Table 1 Origin and harvesting time of *S. tuberosa* sample

产地 Place	河北安国 Hebei Anguo	四川大巴山 Sichuan Dabashan	广西河池 Guangxi Hechi	云南临沧 Yunlin Lincang	安徽滁县 Anhui Chuxian
采集时间 Harvesting time	2009.08	2009.07	2009.09	2009.09	2009.07

2 实验方法

2.1 样品溶液制备

取药材粉末 2.5 g, 精密称定, 加甲醇 100 mL, 超声提取两次, 每次 40 min, 过滤, 残渣加甲醇 10 mL 分次洗涤, 合并滤液和洗液, 45 °C 减压浓缩至干, 残渣加甲醇 25 mL 溶解, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2 对照品溶液配制

分别取金刚大碱盐酸盐及新对叶百部碱盐酸盐各 5 mg, 加甲醇配制各含 0.5 mg/mL 的对照品混合溶液, 此两种生物碱代表了对叶百部中生物碱的主要结构类型。

2.3 色谱条件

色谱柱: 资生堂 MG II (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 检测波长: 210 nm; 柱温: 25 °C; 流速: 1.0 mL/min。流动相: 生物碱检测为乙腈、0.02% 氨水、水三相组成; 非生物碱检测为乙腈、0.01% 磷酸、水三相组成, 二者均采用 pH 梯度洗脱。

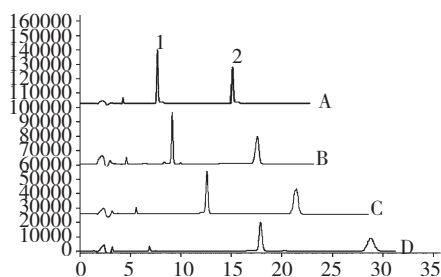


图1 不同流动相比比例对对叶百部主要生物碱 HPLC 行为的影响

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards of croamine hydrochloride and neotuberostemonine hydrochloride with different ratios of acetonitrile

从上往下流动相乙腈比例依次为 A: 55%; B: 50%; C: 45%; D: 40%

1: 金刚大碱; 2: 新对叶百部碱

The ratios of acetonitrile in mobile phases were A: 55%, B: 50%; C: 45%, D: 40%, respectively

1: croamine, 2: neotuberostemonine

3 实验结果

3.1 对叶百部生物碱成分 HPLC 测定及分析

3.1.1 流动相比比例变化对对叶百部生物碱 HPLC 行为的影响

以金刚大碱盐酸盐及新对叶百部碱盐酸盐对照品混合溶液为样品, 按“2.3”项下 HPLC 色谱条件进行检测, 流动相为乙腈: 0.02% 氨水, 进样量 10 μL, 分别调整氨水的比例依次为 45%、50%、55%、60%, 结果如图 1。

由图 1 可知, 随着氨水比例的增加, 两种生物碱色谱峰保留时间拖后, 峰高降低、峰宽增加, 但新对叶百部碱盐酸盐色谱峰(峰 2)保留时间拖后要大于金刚大碱盐酸盐(峰 1), 从图谱观察, 流动相为乙腈: 0.02% 氨水(45: 55)时较为适宜。

3.1.2 流动相 pH 值变化对对叶百部生物碱 HPLC 行为的影响

为考察 pH 值变化对 HPLC 行为的影响, 分别调整流动相 pH 值进行检测, 采用三元洗脱, 固定乙腈比例为 45%, 依次调整 0.02% 氨水所占比例为 1%、2%、3%、4%、5%、10%, 其余为纯水相, 以金刚

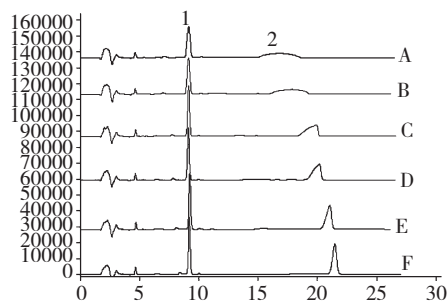


图2 不同 pH 值流动相对百部生物碱色谱行为的影响

Fig. 2 HPLC chromatograms of mixed standards of croamine hydrochloride and neotuberostemonine hydrochloride under mobile phases with different pH values

从上往下流动相氨水比例依次为 A: 1%; B: 2%; C: 3%; D: 4%; E: 5%; F: 10%

1: 金刚大碱; 2: 新对叶百部碱

The ratio of aqueous ammonia (0.02%) in mobile phases were A: 1%, B: 2%, C: 3%, D: 4%, E: 5%, F: 10%, respectively

1: croamine, 2: neotuberostemonine

大碱盐酸盐及新对叶百部碱盐酸盐混合溶液进行检测,结果见图2。

从图可以看出,随着氨水比例增加,二者色谱峰均呈现尖锐化特征,但金刚大碱盐酸盐峰形(峰1)在低碱度条件下明显好于新对叶百部碱盐酸盐(峰2),而随着碱度的增加新对叶百部碱盐酸盐峰形有所改善,通过此现象可初步推断,除与使用的色谱柱、柱温的高低有关外,不同生物碱结构对pH值反应存在较大差异,从而影响其HPLC行为。但二者的保留时间并未随pH变化有明显改变,此现象尚不能合理解释。

3.1.3 不同产地对叶百部生物碱 HPLC 图谱分析

为比较不同产地对叶百部生物碱成分 HPLC 行为差异,选取了5种不同产地对叶百部进行检测(见表1),样品处理按“2.1”项下方法,色谱条件根据以上实验确定为乙腈:0.02%氨水(45:55),进行量 10 μ L,结果见图3。

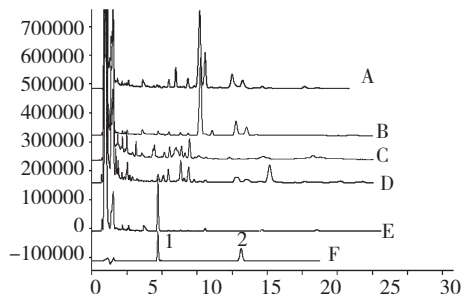


图3 不同产地对叶百部生物碱 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms of alkaloid components of *S. tuberosa* from different habitats

从上往下依次为 A: 四川; B: 广西; C: 安徽; D: 河北; E: 云南; F: 对照品

1: 金刚大碱; 2: 新对叶百部碱

A: Sichuan, B: Guangxi, C: Anhui, D: Hebei, E: Yunnan, F: reference substance

1: croomine, 2: neotuberostemonine

从图中可看出,不同产地对叶百部生物碱成分 HPLC 图谱差异显著,本文采用两种结构的生物碱对照品进行标定,根据色谱峰出峰特点及流动相组成可初步判断图谱中的主要色谱峰为生物碱类成分,从图中分析云南产对叶百部主含金刚大碱,而其它生物碱含量较少,而四川、广西含有新对叶百部碱的同时,还含有较多的其它种类生物碱,这说明生长环境对生物碱的组成及含量有较大影响。

3.2 对叶百部非生物碱 HPLC 测定及分析

3.2.1 流动相比比例变化对对叶百部非生物碱成分 HPLC 行为的影响

取云南产对叶百部,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,进行 HPLC 检测,流动相为乙腈-0.01%磷酸(m/v)-水,其三相的比例分别为 10:40:50、20:40:40、30:30:40,结果见图4。

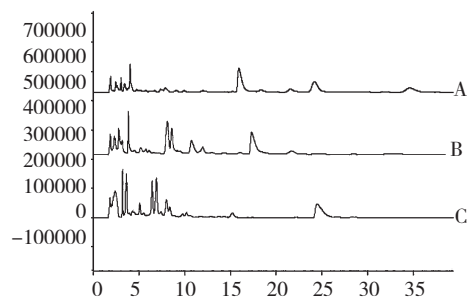


图4 不同流动相比比例对对叶百部非生物碱 HPLC 行为的影响

Fig. 4 HPLC chromatograms of non-alkaloid components of

S. tuberosa under mobile phases with different ratios

从上往下流动相比比例依次为乙腈-0.01%磷酸(m/v)-水(A 10:40:50; B 20:40:40; C 30:30:40)

Acetonitrile : Phosphoric acid (0.01%, m/v) : Water (A 10:40:50, B 20:40:40, C 30:30:40)

从图谱分析,流动相中乙腈所占比例对色谱峰保留时间影响较大,随着乙腈比例增加色谱峰保留时间均有所提前,综合峰形及保留时间考虑,流动相中乙腈比例为20%时较为适宜。

3.2.2 流动相 pH 值变化对对叶百部非生物碱 HPLC 行为的影响

取云南对叶百部,按“2.1”项下方法制备供试品溶液,进行 HPLC 检测,流动相为乙腈-0.01%磷酸(m/v)-水,其中乙腈比例为20%,0.01%磷酸比

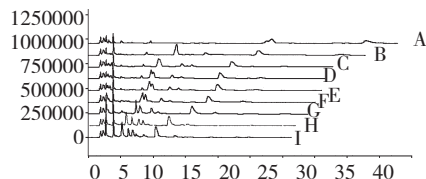


图5 不同 pH 值流动相对对叶百部非生物碱 HPLC 行为的影响

Fig. 5 HPLC chromatograms of non-alkaloid components of

S. tuberosa under mobile phases with different values

从上往下流动相中 0.01% 磷酸比例依次为 A: 10%; B: 20%; C: 25%; D: 28%; E: 29%; F: 30%; G: 40%; H: 60%; I: 80%

The proportions of phosphoric acid (0.01%) were A: 10%, B: 20%, C: 25%, D: 28%, E: 29%, F: 30%, G: 40%, H: 60%, I: 80%

例依次为 10、20、25、28、29、30、40、60、80%，其余为水相，结果见图 5。

从图中可看出，随磷酸比例增加，色谱峰保留时间逐渐前移，峰宽变小，说明对叶百部中非碱性成分对 pH 敏感度较高，随 pH 值减低，流动相洗脱能力增强，出峰提前。同时，可看出保留时间较长的色谱峰对 pH 敏感度高于保留时间较短的色谱峰，这为 pH 梯度洗脱 HPLC 检测提供了可能。

3.2.3 采用 pH 梯度洗脱进行对叶百部非生物碱部位 HPLC 检测分析

根据上述实验结果，通过梯度改变流动相 pH 值的方法进行对叶百部非生物碱成分 HPLC 检测。取 5 种不同产地对叶百部，按“2.1”项下方法制备供试品，进行 HPLC 检测，流动相为乙腈-0.01% 磷酸(m/v)-水，其中乙腈比例为 20%，磷酸比例梯度为：0~8 min, 10%；8~16 min, 20%；16~24 min, 30%；24~32 min, 40%；32~40 min, 10%。结果见图 6。

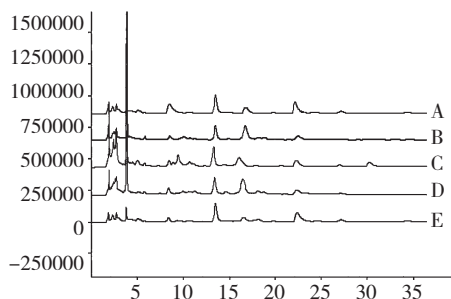


图 6 采用 pH 梯度洗脱进行对叶百部非碱性部位 HPLC 分析图谱

Fig. 6 pH gradient elution of non-alkaloid components of *S. tuberosa* from different habitats

从上往下依次为 A: 安徽; B: 广西; C: 河北; D: 四川; E: 云南产对叶百部

Origins of *S. tuberosa* samples, A: Anhui, B: Guangxi, C: Hebei, D: Sichuan, E: Yunnan

从图中可以看出采用 pH 梯度洗脱进行百部非碱性部位的 HPLC 检测，各色谱峰分离度较好，保留时间多集中在 5~25 min 以内，可用较短时间测定较多的色谱峰，并且图谱基线较为平直。同时，从色谱图比较分析，不同产地对叶百部非碱性部位的色谱峰相似度较高，各主峰基本可以一致，可用于指纹图谱鉴别之用。

4 讨论

百部生物碱具有吡咯氮杂环或吡啶氮杂环母核的独特结构骨架，至今已从百部中分离得到 100 余种生物碱，而对叶百部中主要含有对叶百部碱型及

金刚大碱型生物碱^[3,4]，实验表明各产地对叶百部生物碱组成及含量差异大，不宜以此作为指纹图谱研究对象用于对叶百部的鉴别及质量控制。但生物碱属植物次生代谢产物，其含量及组成与土壤、气候、光照等地理条件密切相关^[5]，通过生物碱的组成与产地之间的相关性研究，可能为对叶百部产地鉴别提供了一种方法，同时生物碱作为百部主要药效成分，也可作为评判药材质量优劣的重要参考。

通过流动相中氨水比例对百部生物碱 HPLC 行为的影响可初步分析，在碱性环境下，pH 值变化对色谱峰峰形有显著影响，大碱度流动相中色谱峰峰形尖锐，而流动相碱度减低，峰形变差，同时，不同生物碱对环境 pH 值反应存在较大差异，本实验中新对叶百部碱的峰形变化较金刚大碱更加显著。峰形变差可能是由于生物碱在色谱柱内洗脱过程中扩散所致，在高碱度流动相中，生物碱在固定相中更为集中，故出峰尖锐，而随着碱度减低，生物碱在柱内扩散，峰形变差，而新对叶百部碱较金刚大碱在固定相的扩散程度更易受流动相 pH 值影响，这可能与其分子结构、自身碱度及 pH 值对分子电子分布的影响等因素有关，此尚待进一步研究。

据报道，百部中非碱性成分多为二苯乙烯类及其它酚酸性成分，这类成分已被证明有较好的药理活性^[6]。本实验发现不同产地对叶百部的非碱性成分 HPLC 图谱相似度较高，这为进行对叶百部指纹图谱研究提供了可能，但尚需进一步增加样本量；本实验中首次进行了 pH 梯度洗脱 HPLC 色谱法应用尝试，采用流动相中有机相与水相组成比例不变，而仅改变流动相的 pH 值的方式，利用待测成分对 pH 变化的敏感性而进行分离，由于流动相中有机相及水相比例不发生变化，故基线不产生明显漂移，而以往改变流动相组成的梯度洗脱方法往往存在显著的基线漂移现象，应用此方法在发挥梯度洗脱优势的同时，更便于色谱峰的比较和计算。在一些含有酸性或碱性成分的植物药材中，如黄酮、蒽醌及有机酸等均对 pH 值变化比较敏感，均可采用此方法鉴别，有较好的应用前景，因此在以后研究中将继续完善并报导。

参考文献

- 1 Zhang L(张雷), Qiu QD(邱乾栋), Zhang XL(张晓林), et al. The research advancement on the genus stemona in China. *Nor Hort*(北方园艺), 2009, 4: 105-108.