

## 不同产地和品种浙贝母中贝母素乙含量 HPLC 分析

王忠华\*, 郭 芙, 张惠恩, 沈 秋, 庄欣晨

浙江万里学院生物技术研究所, 宁波 315100

**摘要:** 本文以宁波章水、金华磐安、江苏南通 3 个不同产地和狭叶、宽叶、多籽 3 个不同品种的浙贝母鳞茎为材料, 采用 Hypersil C<sub>18</sub> ODS2 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为 CH<sub>3</sub>CN (A) 和 100 mmol/L CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (B), 流速为 1.0 mL/min, 进样量为 10 μL, 检测波长为 375 nm, 并以贝母素乙为参照峰, 初步建立了不同产地和不同品种的浙贝母 HPLC 特征图谱, 并根据峰面积计算出浙贝母主成分生物碱贝母素乙的含量, 结果表明不同产地依次为宁波章水、江苏南通和金华磐安, 分别为 0.323%、0.281% 和 0.194%; 不同品种依次为狭叶、宽叶和多籽, 分别为 0.317%、0.269% 和 0.214%。该法建立的 HPLC 代谢谱可为浙贝母不同产地和品种的鉴别提供参考。

**关键词:** 浙贝母; 贝母素乙; HPLC 分析

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## HPLC Analysis of Peiminine Content of *Fritillaria thunbergii* of Different Species and from Different Areas

WANG Zhong-hua\*, GUO Fu, ZHANG Hui-en, SHEN Qiu, ZHUANG Xin-chen

Institute of Biotechnology, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China

**Abstract:** In this study, the contents of peiminine in bulbs of *Fritillaria thunbergii* from 3 different areas: Zhangshui region at Ningbo city, Panan county at Jinhua city, Nantong county at Jiangsu province and 3 different species: narrow leaves, broad leaves and multi-bulb cultivars were determined using high performance liquid chromatography (HPLC). Chromatographic separation was carried out on an Hypersil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) eluted with CH<sub>3</sub>CN (A) and 100 mmol/L CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> (pH 5.0) (B) at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 375 nm. The sample volume was 10 μL. The HPLC specific chromatogram of *F. thunbergii* from different areas and species was primarily constructed and the content of peiminine was gained according to peak areas. The results showed that the contents of peiminine in *F. thunbergii* from Zhangshui region at Ningbo city, Panan county at Jinhua city, Nantong county at Jiangsu province were 0.323%, 0.281% and 0.194%, respectively. The contents of peiminine in narrow leaves, broad leaves, multi-bulb species of *F. thunbergii* were 0.317%, 0.269% and 0.214%, respectively. HPLC metabolic profile developed by this experiment can be used to identify *F. thunbergii* from different areas and species.

**Key words:** *Fritillaria thunbergii* Miq; peiminine; HPLC analysis

浙贝母 (*Fritillaria thunbergii* Miq) 属于百合科多年生草本植物, 是止咳化痰的一味常用中药<sup>[1,2]</sup>。浙贝母又称大贝母、象贝母, 是“浙八味”地道药材之一, 在国内外享有盛誉, 主产于浙江、江苏和安徽等地<sup>[1,2]</sup>。现已探明, 浙贝母的次生代谢产物主要是生物碱, 包括贝母素甲、贝母素乙和贝母素辛等。其中贝母素甲, 贝母素乙又分别称为浙贝母碱和去

氢浙贝母碱, 具有镇咳、祛痰松弛平滑肌, 镇痛抗炎, 降压、活血化瘀, 溶石、抗溃疡、止泻, 抗菌, 抗肿瘤等功效<sup>[3]</sup>。其前体物质由色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸等组成<sup>[4]</sup>。这些氨基酸在不断的转化过程中, 可从初级的代谢产物转变成为物种高度特异性的生物碱代谢底物<sup>[5]</sup>。

代谢产物谱分析, 是对某一类结构、性质相关的化学物, 或某一代谢途径的特定代谢物进行定量分析<sup>[6]</sup>, 它是提高中药材道地性质量的一种重要方法<sup>[7]</sup>。中药材在不同年龄、不同发育阶段、不同部位以及不同光照、水肥、耕作等环境因素的微小差异

收稿日期: 2013-8-14 接受日期: 2014-01-21

基金项目: 本研究受浙江省科技厅育种专项项目 (2012C12912); 宁波市科技局农业择优委托项目 (2012C10036); 宁波市科技特派员团队项目 (2013C80045)

\* 通讯作者 Tel: 86-574-88222851; E-mail: wang1972@zwu.edu.cn

都可引起生理状态的变化,因而会导致代谢产物积累量的差异。因此中药材代谢物分析有利于建立规范化生产技术规程,包括品种、栽培措施、土壤条件和气候等当地生态条件等。

近年来对浙贝母的研究已涉及到很多学科,但对浙贝母代谢产物分析和研究的报道相对较少,因而开展对浙贝母生物碱代谢产物分析具有重要意义。本文以不同产地和不同品种浙贝母成熟鳞茎为材料,采用高效液相法对贝母素乙含量进行检测与分析,以建立不同产地和不同品种浙贝母 HPLC 特征性图谱,为浙贝母不同产地和品种的鉴别提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

本实验所采用的不同产地浙贝母(都为狭叶种)鳞茎分别来源于宁波章水、金华磐安、江苏南通三个贝母种植地区。不同品种分别为来自宁波章水产品示范基地的狭叶、宽叶和多籽。上述所有样品均采自同一时间,并通过浙江省中药研究所相关专家鉴定。

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Sigma 3 K30 台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司);PB-10 酸度计(德国 Sartorius 公司);AB-L 电子精密天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);DZF-6050 真空干燥箱(上海一恒科技有限公司);FW100 高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。标准品贝母素乙购自上海同田生物科技有限公司,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

### 1.2 样品预处理

将不同产地的浙贝母新鲜鳞茎洗净后置于烘箱中,于 60 ℃ 的条件下烘 24 h,再将药材粉碎过 60 目筛,备用。

### 1.3 对照品的制备

称取 2 mg 贝母素乙标准品溶于 2 mL 氯仿中,得到 1 mg/mL 的贝母素乙标准品溶液,用 0.45 μm 微孔过滤膜过滤后备用。

### 1.4 标准曲线的绘制

精密吸取 600、500、400、300、200 μL 标准品溶液置于 2 mL 离心管中,用氯仿定容至 2 mL 后分别得到浓度为 0.150、0.125、0.100、0.075、0.050 mg/mL。吸取 2 mL 氯仿溶液作为空白对照。进样 10 μL,以贝母素乙含量为 x 轴,峰面积为 y 轴绘制标

准曲线,并求出回归方程。

### 1.5 样品中生物碱的提取

称取 6 个浙贝母品种粗粉 4 g,分别置于 25 mL 的离心管中,再分别向 6 个离心管中加入 80% 乙醇提取溶剂,结合室温冷浸提取 48 h,得到粗提取液后,用高速离心机离心(10,000 rpm,15 min),滤液置真空干燥箱中干燥后加入 4 mL 氯仿复溶,备用。

### 1.6 样品衍生化

取 0.1 mL 样品溶液,加入 20 μL 1.0 mol/L 盐酸和 5 μL DNPH 溶液(3.0 mg/mL),混合均匀后 50 ℃ 下反应 30 min 后,用 0.45 μm 微孔过滤膜过滤。

### 1.7 高效液相色谱条件

分析色谱柱:Hypersil C<sub>18</sub> ODS2(4.6 mm × 150 mm,5 μm),流动相为 CH<sub>3</sub>CN(A)和 100 mmol/L CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>(pH 5.0)(B),等度洗脱,A:B=41:59;流速为 1.0 mL/min。进样量为 10 μL;检测波长为 375 nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 HPLC 方法学考察

#### 2.1.1 稳定性

取同一供试品溶液,分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 进样,各色谱峰相对保留时间 RSD 均小于 2%,符合特征图谱研究的技术要求,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

#### 2.1.2 回收率

取同一供试品溶液,分别添加 0.150、0.100 和 0.050 mg/mL 3 个浓度水平的贝母素乙标准溶液。每个处理 3 个平行。按照 1.7 所述色谱检测条件进行测定,平均回收率分别为 108.1%、105.4% 和 102.3%。

#### 2.1.3 精密度

取同一供试品溶液,连续进样 5 次,各色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 2%,符合特征图谱研究的技术要求,仪器精密度良好。

#### 2.1.4 重复性

取同一来源浙贝母样品,按 1.5 项下平行制备供试品溶液 6 份,分别进样,各色谱峰相对保留时间的 RSD 均小于 2%,符合特征图谱研究的技术要求。

### 2.2 标准曲线

得到的回归方程是  $y = 3E + 06x + 682015$ ,相关系数  $R^2 = 0.9968$ 。贝母素乙在 0.05 ~ 0.15 mg/mL 范围内贝母素乙含量与峰面积呈线性关系。

## 2.3 不同产地对浙贝母贝母素乙含量的影响

本文对不同产地浙贝母主成分-贝母素乙含量

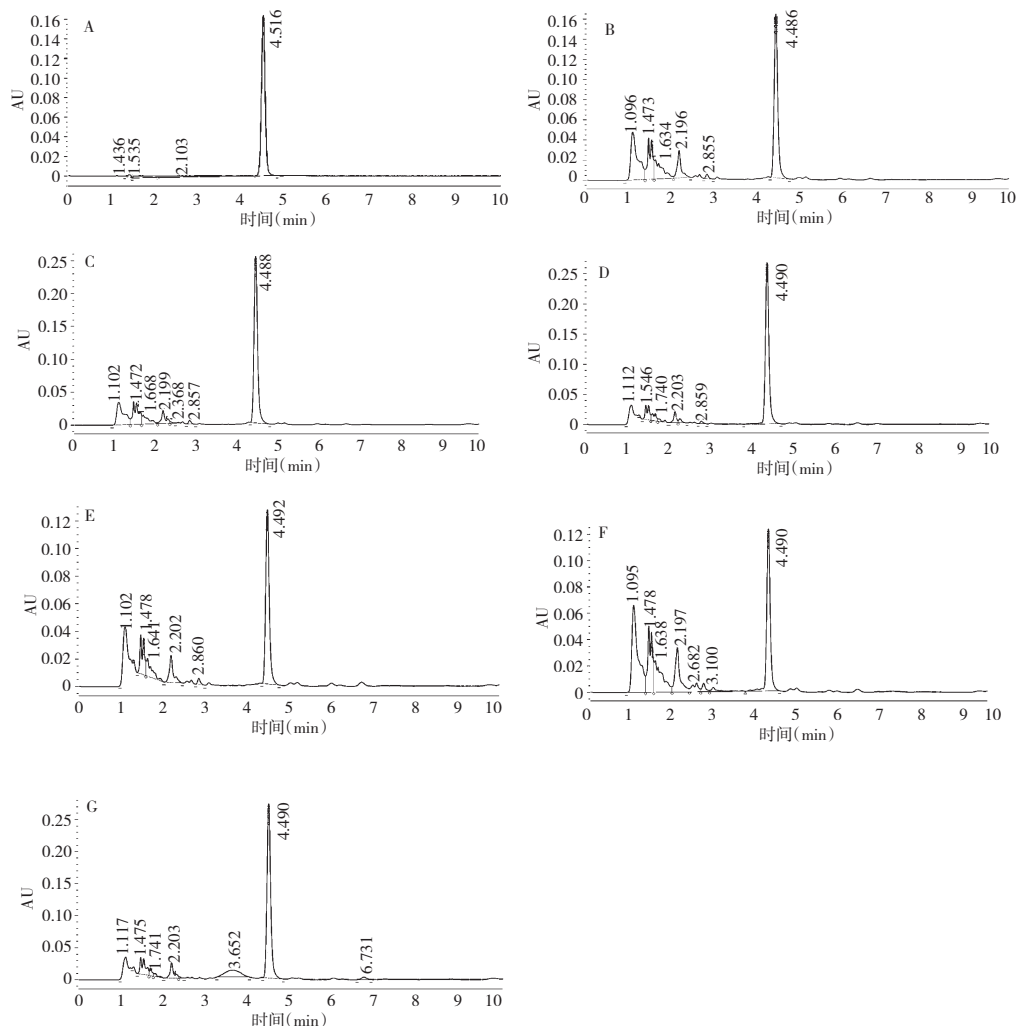


图1 不同产地和品种浙贝母 HPLC 图

Fig. 1 HPLC profiles of *F. thunbergii* of different species and from different areas

注:A 为标准品;B 为宁波章水;C 为金华磐安;D 为江苏南通;E 为狭叶种;F 为宽叶种;G 为多籽种

Notes: A: Standard; B: Zhangshui region; C: Panan region; D: Nantong region; E: narrow leaves; F: broad leaves; G: multi-bulbs

由表1可见,不同产地对浙贝母主成分含量的影响较大,其中以宁波章水产地的最高,含量高达0.323%,其余依次为江苏南通和金华磐安。由此表明,进行浙贝母原产地保护技术研究是十分必要的。造成这种含量差异的可能原因是由于不同产地的土壤、光照、温度等环境因素所导致。

## 2.4 不同品种对浙贝母贝母素乙含量的影响

本文对不同品种浙贝母主成分-贝母素乙含量进行了HPLC分析,结果如图1和表2所示。由表2可见,不同品种浙贝母中贝母素乙含量有差异,其中

进行了HPLC分析,结果如图1和表1所示。

以狭叶浙贝母含量最高,含量为0.317%,其余依次为宽叶和多籽浙贝母。

表1 不同产地浙贝母的贝母素乙含量

Table 1 Total peiminine content of *F. thunbergii* from different areas

产地 Area	贝母素乙含量 Peiminine content (%)
金华磐安 Panan region	0.194
江苏南通 Nantong region	0.281
宁波章水 Zhangshui region	0.323

表 2 不同品种浙贝母的贝母素乙含量(%)

Table 2 Total peiminine content of *Fritillaria thunbergii* of different species (%)

品种 Species	贝母素乙含量 Peiminine content (%)
狭叶 Narrow leaves	0.317
宽叶 Broad leaves	0.269
多籽 Multi-bulb	0.214

## 3 讨论

### 3.1 不同产地对浙贝母主成分代谢谱的影响

本文对 3 个不同地区的浙贝母的代谢产物-贝母素乙的含量进行了测定。从结果来看不同产地的浙贝母中贝母素乙的含量存在较大差异。这与三个产地的气候、水分与土壤等条件戚戚相关。

浙贝母是阳性植物,生长期要求阳光充足、土壤透水性高和养分充足、雨水充沛及昼夜温差大等<sup>[2]</sup>。浙贝母的生长旺期是 3~5 月,光照强度和ación 时间会直接影响浙贝母的光合作用,从而间接影响代谢产物的积累。浙贝母生长期的最适宜温度为 20~25℃。在这个温度范围内,浙贝母的同化作用大于异化作用,即所制造的养分超过正常呼吸作用的消耗,因此浙贝母生长良好,能获得较高的产量和品质。昼夜温差较大有利于植株的生长,白天温度比晚上高,光合作用所产生的有机物质大于呼吸作用消耗,因此这样更有利于物质的积累。对照上述诸多条件,鄞州章水最适合于浙贝母的种植。这也是章水被评为“中国贝母之乡”的主要原因所在。

### 3.2 不同品种对浙贝母主成分代谢谱的影响

本次实验采用不同品种的浙贝母分别是狭叶、宽叶和多籽。从实验结果可得出贝母素乙含量从高到低依次为狭叶、宽叶和多籽。

从叶片形状看,狭叶浙贝母叶色较深,叶片伸展度好,有利于光能的捕获与转换,而宽叶和多籽相对来说,对光能的吸收能力较弱,因此这三者中叶片光合强度不同,导致光合作用形成的有机物质不同,间接影响叶片中生物碱的积累。

### 3.3 影响 HPLC 测定的因素

#### 3.3.1 提取方法

生物碱的提取方法很多,采用不同的提取方法

提取的生物碱含量有很大的差异。利用加热回流法提取生物碱,进行 HPLC 分析,在图谱上不能出现生物碱图谱峰。采用混合溶剂超声提取法,对浙贝母生物碱进行 HPLC 分析时,色谱图中有峰出现,但是生物碱含量很低,不能读出其峰面积。采用室温冷浸提取法,色谱图中能出现峰,但峰型不理想。

#### 3.3.2 其他因素

本实验采用的 2,4-二硝基苯肼衍生化法进行高效液相测定。贝母素乙属于甾体生物碱,其结构中含有酮基,其特异性的吸收峰波长是 290 nm,但是由于吸收强度较弱,无法满足贝母素乙含量分析。将样品进行衍生化后,在 375 nm 波长下检测,可检测出贝母素乙。

#### 参考文献

- Gao WY(高文远),Li ZL(李志亮),Xiao PG(肖培根). Review on the study of traditional medical plant *Fritillaria thunbergii*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),1996,21:323-325.
- Ye PG(叶培根),Cui PZ(崔培章),Zhang LM(张林苗). *Fritillaria thunbergii*. Beijing:China Agricultural Press(中国农业出版社),2004. 1-5.
- Zhang MF(张明发),Shen YQ(沈雅琴). Progress in the study of medical mechanism of *Fritillaria thunbergii*. *Shanghai Medicine*(上海医药),2007,28:459-462.
- Chen XY(陈晓亚),Liu P(刘培). Molecular biology and genetic engineering of plant second metabolite. *Chinese Bulletin Life Sci*(生命科学),1996,8(2):8-12.
- Li JY(李家玉),Wang HB(王海斌),Lin ZH(林志华),et al. The structure, biosynthesis, and function of plant secondary metabolism compounds-alkaloid. *Research of Agri Sci*(农业科学研究),2009,30(4):68-73.
- Yan MQ(颜美秋),Chen SH(陈素红),Lv GY(吕圭源),et al. HPLC specific chromatogram of *Dendrobium officinale*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2013,38:516-519.
- Lin PL(林培玲),Zeng JW(曾建伟),Ding CH(丁春花),et al. HPLC characteristic chromatographic profile of *Sarcandra glabra*. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2013,38:856-860.