基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000808

HPLC法测定不同产地半夏中鸟苷和尿苷的含量

张严方，张景勋，何　丹，孙　全，雷婷婷，赵　华
（重庆医科大学药物高校工程研究中心，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：建立 HPLC 法测定不同产地半夏中鸟苷和尿苷的含量。**方法**：收集 10 个不同产地半夏药材，采用 HPLC 法测定半夏中有效成分鸟苷和尿苷含量，Hypersil ODS(5 μm，4.6×150 mm)色谱柱，柱温：25 ℃，流动相：水:甲醇=95:5，检测波长 254 nm，流速 1 mL/min。**结果**：鸟苷在 0.33 μg/mL~26 μg/mL 与峰面积线性关系良好（r=0.999 7，P<0.000 1），尿苷在 0.35 μg/mL~28 μg/mL 与峰面积线性关系良好（r=0.999 9，P<0.000 1）。10 种不同产地半夏中 2 种核苷含量之和大小为：甘肃清水>甘肃天水>甘肃西和>四川南充>重庆垫江>四川西昌>湖南邵东>贵州威宁>贵州水城>云南文山。**结论**：本法简便、准确、可靠，可作为半夏质量控制方法之一。半夏中的核苷含量从东南到西北逐渐增加，且不同居群半夏药材的鸟苷与尿苷含量都存在显著性差异，鸟苷与尿苷的含量总和分析为半夏药材的质量评价提供了依据。

【关键词】半夏；尿苷；鸟苷；HPLC
【中图分类号】R284.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-05-21

Determination of uridine and ganosine in *Pinellia ternata* from different populations by HPLC

Zhang Yanfang, Zhang Jingqin, He Dan, Sun Quan, Lei Tingting, Zhao Hua
(*Medicine Engineering Research Center, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To determine the content of uridine and ganosine in *Pinellia ternata* (*Thunb.*) *Breit.* from different populations by HPLC. ***Methods***: The Rhizoma pinelliae from different populations of southwest region was collected and the high-performance liquid chromatography (HPLC) was used to the content of the uridine and ganosine measurement. Hypersil ODS-C18 (5 μm, 4.6×150 mm) was used with aqueous solution containing 5% methanol as mobile phase, detection wavelength of 254 nm, flow rate of 1 mL/min and tempemture of 25 ℃. ***Results***: The method was developed with a good linearity with the range of 0.33 μg/mL-26 μg/mL, 0.35 μg/mL-28 μg/mL for guanosine and uridine respectively. The order of guanosine and uridine contents in Rhizoma pinelliae from different places was Qingshui >Tianshui >Xihe >Nanchong >Dianjiang >Xichang >Shaodong >Weining >Shuicheng >Wenshan. ***Conclusion***: The method is simple, accurate and can be used to control the internal quality of Rhizoma pinelliae medicine. From South to North and from east to west, the content of guanosine and uridine was increasing and was significantly different. It provides a new basis for assessing the quality of *Rhizoma pinelliae* of traditional Chinese medicine.

【Key words】*Pinellia ternate*; uridine; ganosine; high-performance liquid chromatography

半夏为天南星科植物半夏[*Pinellia ternata* (*Thunb.*) *Breit.*]的干燥块茎，其性温味辛，有毒，具有燥湿化痰降逆止呕消痞散结之功效[1]，半夏块茎为植物的贮藏器官，含多种药效成分，其中核苷具有改善脑细胞代谢、镇静中枢神经、免疫调节的作用[2]，目前评价半夏质量尚未有统一的成分指标[3]，但以鸟苷和总生物碱作为半夏评价指标成分已被广泛应用[4-7]。现参照文献[8-10]建立 HPLC 法，测定十种不同产地的半夏中鸟苷和尿苷含量，综合分析，为半夏药材的质量评价提供依据。

作者介绍：张严方，Email：zyf823vivi@163.com
研究方向：药物分析。
通信作者：赵　华，Email：247130151@qq.com。
基金项目：国家科技支撑计划资助项目（编号：2011BAI13B03）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151031.1515.002.html (2015-10-31)

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

AG135 型电子分析天平（瑞士 Mettler toledo 公司），KQ2200B 超声仪（昆山市超声仪器有限公司），LC-15C 型液相色谱仪（日本岛津公司），SAS9.2，SPSS 20.0 统计学软件。

半夏药材（经重庆太极集团质检部杨修齐研究员鉴定为天南星科植物半夏[*Pinellia ternate* (*Thunb.*) *Breit*]的干燥块茎），鸟苷标准品（上海同田生物有限公司，批号：E-0575），尿苷标准品（中国食品药品检定研究院，批号：110887-200202），甲醇为色谱纯（美国天地试剂公司），实验用水为超纯水，其他试剂均为色谱纯。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS（5 μm，4.6 × 150 mm），柱温：25 ℃，流动相为水-甲醇（95∶5，v/v），检测波长 254 nm，流速 1 mL/min，进样量 20 μL。

1.2.2 溶液的制备

1.2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取鸟苷 0.013 1 g 和尿苷标准品 0.014 0 g，置 50 mL 容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，得 0.26 mg/mL 的鸟苷和 0.28 mg/mL 尿苷对照储备液。分别精密吸取鸟苷和尿苷对照储备液各 5 mL 于 EP 管中，摇匀，得核苷混合标准品溶液。

1.2.2.2 供试品溶液的制备 共收集到 10 批样品（表 1）分别来自四川、贵州、重庆、甘肃、云南、湖南等 6 省的不同地区的半夏原药材，经重庆太极集团质检部杨修齐研究员鉴定为天南星科植物半夏[*Pinellia ternate* (*Thunb.*) *Breit*]的干燥块茎，将其在 60 ℃ 烘干，打粉，过 4 号筛，即得本品粉末，贴上标签做好记号，备用。精密称取样品各 2 g，用 40 mL 超纯水超声提取 2 次，每次 2 h，提取液过滤后用超纯水定容至 100 mL，即得供试品溶液。

1.2.3 线性关系的考察 分别精密吸取鸟苷和尿苷混合标准品溶液 0.025、0.1、0.5、1、2 mL 置于 10 mL 容量瓶中，加入超纯水稀释至刻度，得到一系列不同浓度的混合标准品溶液，按照“1.2.1”项下色谱条件进行测定。

1.2.4 精密度实验与重复性实验 取同一标准品溶液，按“1.2.1”项下方法重复进样 6 次，以峰面积计算含量。按供试品配制方法平行配制 6 份，按“1.2.1”项下方法进样分析。

1.2.5 稳定性实验 精密吸取供试品溶液，分别在 0、3、6、12、24、48 h，按“1.2.1”项下色谱条件进样 20 μL，测定鸟苷和尿苷的峰面积。

1.2.6 加样回收率的考察 分别精密量取已测的半夏提取物 0.25 mL，一共 9 份，置于 10 mL 容量瓶中，按照样品中鸟苷和尿苷含量的约 80%、100%和 120%，分别加入鸟苷和尿苷的标准品储备液，加入超纯水稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液，按“1.2.1”项下色谱条件进行测定。

1.2.7 不同产地半夏中鸟苷和尿苷含量分析比较 分别精密吸取“1.2.2”项下的混合标准品与供试品溶液，按照“1.2.1”项下色谱条件进行实验，测定各个样品含量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。线性回归分析建立标准曲线，各组均数间比较采用单因素方差分析，应用 SNK-q 法进行多重比较。检验水准为 α=0.05。

2 结 果

2.1 方法学验证

2.1.1 线性关系的考察 以峰面积为纵坐标，以鸟苷和尿苷混合标准品溶液的浓度（μg/mL）为横坐标，绘制标准曲线，以 S/N=3 和 S/N=10 确定鸟苷和尿苷的最低检测限和定量限，结果（表 1）表明各线性关系良好。

2.1.2 精密度实验 计算鸟苷和尿苷的含量与 RSD 值（表 2），结果符合精密度实验要求。

2.1.3 重复性实验 测定鸟苷和尿苷的峰面积，计算其含量及 RSD（表 3），结果符合重复性实验要求。

表 1 线性关系、最低检测限、最低定量限结果

Tab.1 Linear regression data, LOD and LOQ of the investigated compounds

分析成分	检测限（μg/mL）	标准曲线	R^2	P	LOD（μg/mL）	LDQ（μg/mL）
鸟苷	0.35 ~ 28.00	Y = 3 722.8 X + 439.18	0.999 9	0.000	0.09	0.26
尿苷	0.33 ~ 26.00	Y = 5 967.6 X + 879.25	0.999 7	0.000	0.08	0.25

表 2 精密度实验结果

Tab.2 Results of precision test

分析成分	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s	RSD（%）
鸟苷	53 073	52 425	53 722	53 388	51 369	52 497	52 745	840	1.59
尿苷	71 134	74 592	72 478	71 981	71 427	72 179	72 298	1 226	1.69

表 3 重复性实验结果

Tab.3 Results of repeatability test

分析成分（g/g，%）	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s	RSD（%）
鸟苷	0.045	0.044	0.044	0.046	0.044	0.046	0.045	0.001	2.33
尿苷	0.049	0.049	0.048	0.049	0.049	0.050	0.049	0.001	1.37

2.1.4 稳定性实验 鸟苷和尿苷的峰面积结果见表 4，结果表明样品在 48 h 内无明显变化。

2.1.5 加样回收率的考察 计算回收率，结果见表 5，回收率为 95.6%~101%，RSD 为 0.92%~1.79%，表明此方法的回收率良好。

2.2 样品含量测定

不同产地半夏中鸟苷和尿苷含量分析结果见色谱图（图 1），各含量结果如表 6 所示。

利用 SPSS 20.0 统计分析软件中的方差分析法分别对半夏药材中的鸟苷含量，尿苷含量和两含量之和进行分析，以比较不同产地半夏药材的差异性。十个产地半夏药材中鸟苷含量，尿苷含量和两含量之和的方差齐性检验结果中得 Levene 方差齐性检验的 P 值分别为 0.074、0.116 和 0.080，均大于检验水准 0.05，因此基本可以认为样本数据之间的方差是齐次的。

10个产地半夏药材中鸟苷含量多组均数比较行单因素方差分析，差异有统计学意义（F=37.010，P=0.000）。采用 SNK-q 法进行多重比较，结果显示甘肃清水、甘肃天水、甘肃西和 3 组间差别无统计学意义，四川南充、四川垫江、贵州威宁、贵州水城 4 组间差别无统计学意义，湖南邵东、云南文山 2 组间差别无统计学意义，其余组间差别有统计学意义。尿苷含量多组均数比较行单因素方差分析，差异有统计学意义（F=195.320，P=0.000）。采用 SNK-q 法进行多重比较，结果显示甘肃西和四川西昌 2 组间差别无统计学意义，四川西昌、贵州威宁 2 组间差别无统计学意义，四川南充、云南文山 2 组间差别无统计学意义，其余组间差别有统计学意义。鸟苷与尿苷含量之和的多组均数比较行单因素方差分析，差异有统计学意义（F=69.600，P=0.000）。采用 SNK-q 法进行多重比较，结果显示四川南充、四川西昌 2 组间差别无统计学意义，贵州水城、贵州威宁 2 组间差别无统计学意义，其余组间差别均有统计学意义。

表 4 稳定性实验结果

Tab.4 Results of stability test

分析成分（g/g，%）	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	s	RSD(%)
鸟苷	0.039	0.038	0.039	0.039	0.039	0.038	0.039	0.000	0.72
尿苷	0.042	0.041	0.043	0.041	0.042	0.042	0.042	0.000	1.95

表 5 加样回收率考察结果（n = 3）

Tab.5 Recovery of the nine investigated makers in the Pinellia ternate(n = 3)

分析成分	Original(μg)	Spiked(μg)	Found(μg)	Recovery [a](%)	RSD(%)
鸟苷	2.40	1.92	4.38	101.0	1.79
		2.40	4.54	95.6	1.40
		2.88	5.21	99.7	1.12
尿苷	2.70	2.16	4.77	98.1	1.13
		2.70	5.21	96.4	1.67
		3.24	5.87	98.8	0.92

注：a，Recovery(%)=[(found−original)/spiked]×100

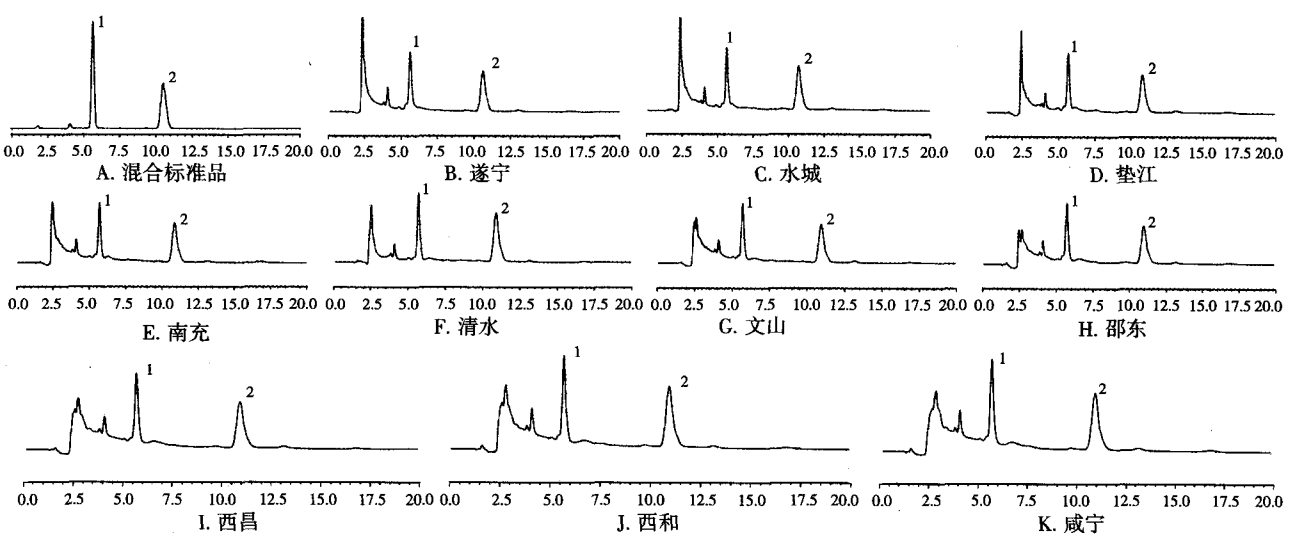


图 1 混合标准品与半夏样品的 HPLC 色谱图(t/min)

Fig.1 HPLC chromatograms of mixed standards and *Pinellia ternata*(t/min)

表 6 不同产地半夏中鸟苷和尿苷含量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.6 Contents of Pinellia ternata from different populations（$\bar{x}\pm s$，n=3）

地区（城市/省）	纬度	经度	鸟苷（g/g，%）	尿苷（g/g，%）	总含量（g/g，%）
甘肃清水	34.75	106.13	0.049 ± 0.001	0.055 ± 0.002	0.103 ± 0.003
甘肃天水	34.58	105.72	0.053 ± 0.003	0.050 ± 0.002	0.102 ± 0.004
甘肃西和	34.02	105.28	0.048 ± 0.005	0.045 ± 0.002	0.094 ± 0.004
四川南昌	30.49	106.04	0.041 ± 0.002	0.032 ± 0.001	0.073 ± 0.002
重庆垫江	30.36	107.34	0.038 ± 0.001	0.026 ± 0.001	0.064 ± 0.001
四川西昌	27.54	102.16	0.032 ± 0.002	0.044 ± 0.001	0.076 ± 0.002
湖南邵东	27.25	111.73	0.031 ± 0.001	0.037 ± 0.003	0.067 ± 0.002
贵州威宁	26.87	104.28	0.039 ± 0.002	0.043 ± 0.001	0.082 ± 0.002
贵州水城	26.58	104.82	0.038 ± 0.002	0.041 ± 0.001	0.079 ± 0.002
云南文山	23.37	104.24	0.024 ± 0.002	0.029 ± 0.002	0.054 ± 0.003
范围	23.37~34.75	104.24~111.73	0.022~0.056	0.027~0.057	0.051~0.106

注：a，北纬；b：东经

3 讨 论

由图 1 可以看出，不同居群半夏中均含有鸟苷和尿苷 2 种成分。由表 3 可看出，甘肃清水（34.58 N，105.72 E）半夏核苷类有效成分含量最高（0.103%，g/g），是云南文山（23.37 N，104.24 E）半夏核苷类有效成分含量（0.054%，g/g）的 1.9 倍。从东南到西北，半夏中的核苷含量逐渐增加。又由统计分析结果可看出 10 个不同产地半夏的尿苷和尿苷总含量差异性有统计学意义（P<0.01），而单个的鸟苷含量或尿苷含量也有一定的差异性（0.01<P<0.05）。表明半夏中的核苷含量与地域有较大关系。

本文通过同时测定鸟苷和尿苷的含量来比较 10 个不同地区半夏的质量差异，较张科卫[3]等仅以鸟苷含量为指标更全面。从东南到西北，半夏中的核苷含量逐渐增加的结果可以指导临床用药，如针对不同用药目的对半夏药材进行选择，为道地药材提供依据。半夏所含核苷类有效成分种类还很多，虽然含量相对较低，对半夏质量影响较小，但若能在分析中尽可能的测定到更多有效成分含量，就可以更准确的评价半夏质量。

参 考 文 献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京：化学工业出版社，2005：78.

[2] 范汉东，王 雪，蔡永君，等. 半夏中一种抗癌蛋白的纯化及其抗癌活性研究[J]. 湖北大学学报（自然科学版），2012，34(1)105-109.

[3] 张科卫，吴 皓，崔小兵，等. 不同产区半夏药材中鸟苷含量的测定[J]. 中成药，2000，22(11)：769-771.

[4] 陈 钢，崔小兵，谈献和，等. 半夏药材中鸟苷和尿苷的含量测定及半夏指纹图谱研究[J]. 西北药学杂志，2011，26(5)：313-316.

[5] 白 权，李敏，贾敏如，等. 川产半夏 3 种化学成分的比较[J]. 中国中药杂志，2004，29(7)：697-699.

[6] 李中贵，郭小华，曹丽萍，等. 10 个产地核桃仁中核苷类成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(10)：145 -148.

[7] 鹿野美弘，有元良巾義子，趙昌代，等. 漢方エキス製剤の品質評価について（第 3 報）小半夏加茯苓湯における（半夏）の指標物質. 生薬学雑誌，1987，41(4)：282-288.

[8] Niijima A，Kubo M，Hashimoto K，et al. Effect of oral administration of Pinellia ternata，Zingiberis rhizoma and their mixture on the efferent activity of the gastric branch of the vagus nerve in the rat[J]. Neuroscience Letters，1998，258(1)：5-8.

[9] 何 丹，杨 林，秦少容，等. UPLC 法测定半夏提取物中尿苷鸟苷和腺苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(17)：87-89.

[10] 李小亭，相海恩，李瑞盈，等. UPLC 法测定不同产地五味子的主成分并评价质量[J]. 华西药学杂志，2013，28(3)：287-289.

（责任编辑：张辉洁）