

HPLC法测定不同产地半夏及其伪品中4种核苷

夏成凯^{1,2}, 杨葛俊³, 刘耀武^{1,2*}

(1. 安徽省中医药科学院亳州中医药研究所, 安徽 亳州 236800; 2. 亳州职业技术学院, 安徽 亳州 236800; 3. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230031)

摘要: 目的 建立HPLC法测定不同产地半夏及其伪品中尿苷、肌苷、鸟苷和腺苷的含有量。方法 半夏水溶液的分析采用Agilent ZORBAX SB-Aq C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相乙腈-水,梯度洗脱;体积流量1 mL/min;检测波长260 nm;柱温25 °C。结果 尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷分别在0.002 0~0.040 μg/mL(*r*=0.999 2)、0.002 4~0.048 μg/mL(*r*=0.999 4)、0.032 3~0.323 μg/mL(*r*=0.999 9)、0.002 9~0.058 μg/mL(*r*=0.999 1)范围内线性关系良好;平均回收率(RSD)分别为100.49% (2.05%)、100.19% (1.16%)、98.99% (1.92%)、100.12% (1.65%)。结论 该方法准确稳定,重复性好,可用于半夏的质量控制。

关键词: 半夏; 尿苷; 肌苷; 鸟苷; 腺苷; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)06-1532-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.027

Determination of four nucleosides in *Pinellia ternata* and its adulteration from different growing areas by HPLC

XIA Cheng-kai^{1,2}, YANG Ge-jun³, LIU Yao-wu^{1,2*}

(1. Bozhou Institute of Chinese Medicine, Anhui Academy of Chinese Medicine, Bozhou 236800, China; 2. Bozhou Vocational and Technical College, Bozhou 236800, China; 3. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for content determination of uridine, inosine, guanosine and adenosine in *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. and its adulteration from different growing areas. **METHODS** The analysis of aqueous extract of *P. ternata* was performed on a 25 °C thermostatic ZORBAX SB-AqC₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of andacetonitrile-water flowing at 1 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 260 nm. **RESULTS** Uridine, inosine, guanosine and adenosine showed good linear relationships within the ranges of 0.002 0~0.040 μg/mL (*r*=0.999 2), 0.002 4~0.048 μg/mL (*r*=0.999 4), 0.032 3~0.323 μg/mL (*r*=0.999 9), 0.002 9~0.058 μg/mL (*r*=0.999 1), whose average recoveries (RSD) were 100.49% (2.05%), 100.19% (1.16%), 98.99% (1.92%), 100.12% (1.65%), respectively. **CONCLUSION** This accurate, stable and reproducible method can be used for the quality control of *P. ternata*.

KEY WORDS: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; uridine; inosine; guanosine; adenosine; HPLC

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的块茎, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结之功效^[1], 为临床常用中药, 主产于甘肃、贵州、湖北等地。

半夏质量的优劣越来越受到人们的关注, 其主要药效成分受到土壤、水分、气候、光辐射、生物传播等环境条件的影响, 化学成分的含有量差异很大。

收稿日期: 2019-12-04

基金项目: 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2017120); 亳州市重点研发计划项目(bzzc2019012); 安徽省中药炮制技术教学团队(2018jxtd045)

作者简介: 夏成凯(1982—), 男, 副教授, 研究方向为中药质量控制与评价。Tel: 13225679777, E-mail: 65005441@qq.com

*通信作者: 刘耀武(1975—), 男, 教授, 研究方向为中药质量标准。E-mail: lywahljy@163.com

目前文献报道的半夏的化学成分主要为生物碱类、挥发油、核苷类成分^[2-5]。吴皓等^[5]从半夏中分离得到肌苷被作为其主要指标性成分，核苷类成分具有广泛的生理活性。

目前有研究^[6-7]报道半夏代表性成分的含有量测定主要为生物碱类，部分关于核苷类成分的含有量测定方法^[8-11]；许宏亮等^[12]通过对半夏皮与块茎中4类成分进行分析；阮洪根等^[13]则对不同规格中半夏的核苷类成分进行分析。但对于不同产地半夏及其伪品中多种核苷类成分的含有量测定较少，特别是肌苷的含有量测定较少。由于半夏的价格较贵，市场上诸多伪品，如水半夏、天南星等直接影响其质量，主要从性状、显微等鉴别方法进行区分，无法实现定量鉴别^[14-16]。

为了更好的探索不同产地半夏及其伪品中核苷类成分的含有量，建立多种核苷类成分的检测方法，更好的区分半夏及其伪品。本实验分别收集了来自甘肃、贵州、云南、河北、湖北的正品生旱半夏及来源于江西鞭檐犁头尖生水半夏、天南星、河北掌叶半夏、东北生天南星等，对尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷的含有量进行测定，以期建立快捷、方便、可靠的方法检测半夏中4种核苷类成分，为不同产地半夏及其伪品的评价提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 BS200S电子天平（杭州康纳科技有限公司）；MettlerToledo电子分析天平（百万分之一，瑞士梅特勒-托利多公司）；DL-720D超声波清洗器（杭州法兰特超声波科技有限公司）；RJ-TGL-16C型高速离心机（成都智楷分离科技有限公司）；UPH-II-107型优普超型纯水器（西安优普仪器设备有限公司）；皖仪L600高效液相色谱仪（安徽皖仪科技股份有限公司）。

1.2 试剂与药物 对照品尿苷（批号170329，纯度≥98%）、肌苷（批号161013，纯度≥98%）；鸟苷（批号130107，纯度≥98%）、腺苷（批号170417，纯度≥98%），均购于成都普菲德生物技术有限公司。乙腈（色谱纯）；高纯水（自制）。

9批药材经亳州职业技术学院刘耀武教授鉴定为天南星科植物半夏属半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎、天南星科犁头尖属水半夏 *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume. 的干燥块茎、天南星科植物异叶天南星 *Arisaema heterophyllum* Bl. 的干燥块茎、天南星科植物半夏

属掌叶半夏 *Pinellia pedatisecta* Schott. 的干燥块茎。信息见表1。

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	品名	产地	类别
1	生半夏	甘肃	正品
2	生半夏	贵州	
3	生半夏	云南	
4	生半夏	河北	
5	生半夏	湖北	
6	水半夏	江西	伪品
7	天南星	未知	
8	掌叶半夏	河北	
9	生天南星	东北	

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取尿苷对照品10.108 mg，置于10 mL量瓶中，加水溶液溶解并定容至刻度，精密量取1 mL置于100 mL量瓶中，加水溶解并定容至刻度，得尿苷对照品溶液。

精密称取肌苷对照品12.145 mg，置于10 mL量瓶中，加水溶解并定容至刻度，精密量取1 mL置于100 mL量瓶中，加水溶解并定容至刻度，得肌苷对照品溶液。

精密称取鸟苷对照品16.128 mg，置于10 mL量瓶中，加水溶解并定容至刻度，精密量取1 mL置于100 mL量瓶中，加水溶解并定容至刻度，得鸟苷对照品溶液。

精密称取腺苷对照品14.682 mg，置于10 mL量瓶中，加水溶解并定容至刻度，精密量取1 mL置于100 mL量瓶中，加水溶解并定容至刻度，得腺苷对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 称定半夏正品粉末（过3号筛）约2 g，置具塞锥形瓶中，精密加入水20 mL，称定质量，超声处理45 min（500 W，40 kHz），冷却至室温，再称定质量，用纯水补足减失质量，全部转移至离心管中，4 000 r/min离心5 min，取上清液1.5 mL，经0.22 μm微孔滤膜过滤，即得。

2.2 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-AqC₁₈色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）-高纯水（B），梯度洗脱（0~15 min，100% B；15~20 min，100%~97% B；20~30 min，97%~85% B；30~40 min，85%~80% B；40~50 min，80%~100% B）；检测波长260 nm；柱温25 °C；体积流量1 mL/min；进样量20 μL。色谱图见图1。

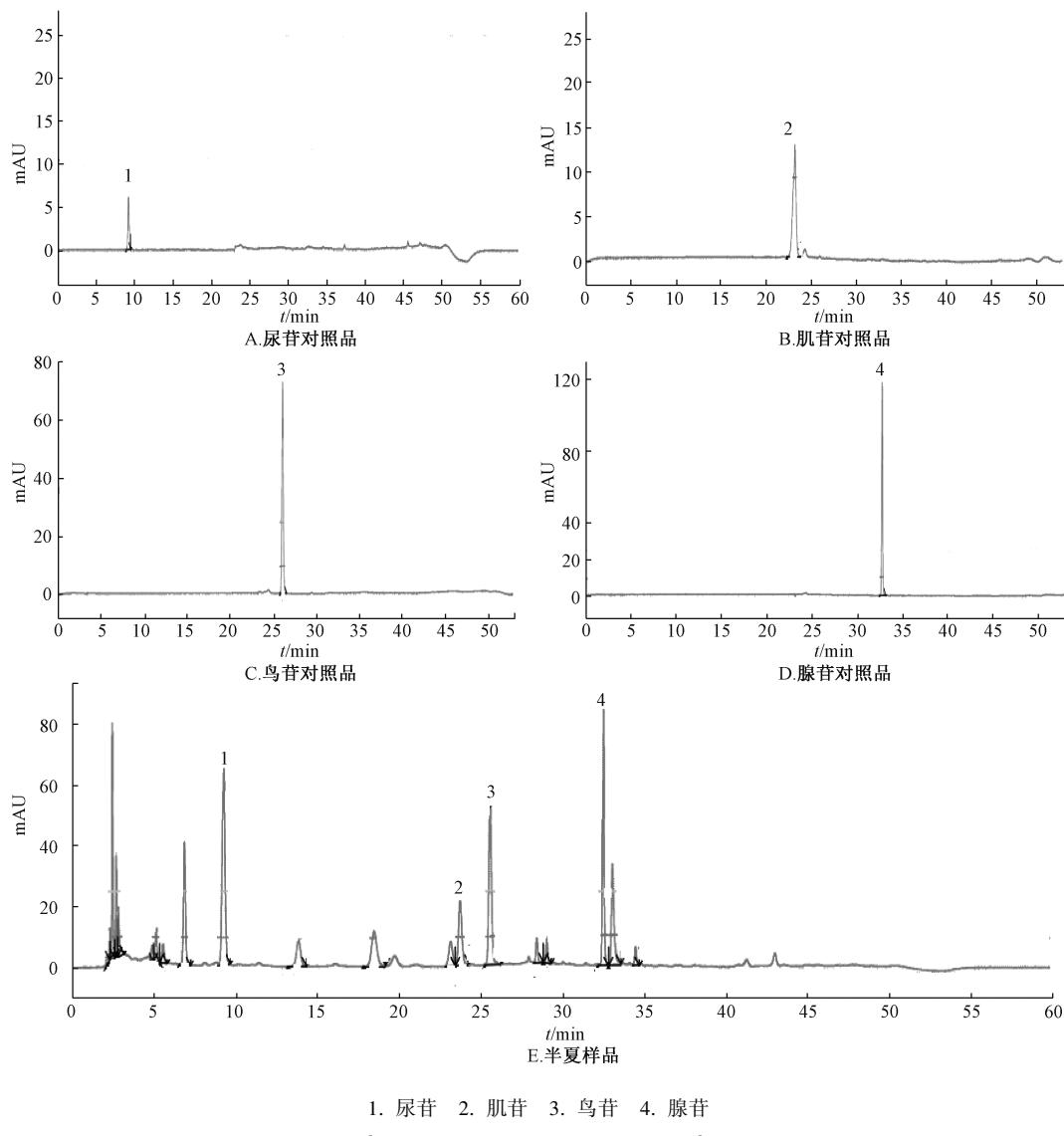


图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 分别精密量取“2.1.1”项下尿苷、肌苷、腺苷对照品溶液0.1、0.5、1、1.5、2.0 mL置10 mL量瓶中，用高纯水稀释至刻度，摇匀，得到不同浓度的进样对照品溶液。分别精密量取“2.1.1”项下配制的鸟苷对照品溶液1、2、3、5、10 mL置10 mL量瓶中，用高纯水稀释至刻度，摇匀，得到不同浓度的鸟苷进样对照品溶液。在“2.2”项色谱条件下，分别以上述各对照品溶液进样，每个浓度进样3次，记录峰面积，取峰面积的平均值。以峰面积为纵坐标(Y)，对照品的质量浓度为横坐标(X)进行回归，结果见表2。表明各成分在各自范围内线性关系良好。

表2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
尿苷	$Y=46.492X+1.647$	0.999 2	0.002 0~0.040
肌苷	$Y=14.85X+0.2437$	0.999 4	0.002 4~0.048
鸟苷	$Y=39.804X-0.6563$	0.999 9	0.032 3~0.323
腺苷	$Y=51.439X+1.499$	0.999 1	0.002 9~0.058

2.3.2 精密度试验 分别量取尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷对照品溶液适量，在“2.2”项色谱条件下进样，进样量20 μL ，重复6次，记录色谱峰面积，RSD($n=6$)分别为0.16%、0.21%、0.94%、0.06%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取河北产生旱半夏正品样品6份，取“2.1.2”项下供试品溶液，在

“2.2”项色谱条件下进样，记录色谱峰面积，结果尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷的 RSD ($n=6$) 分别为 0.16%、0.59%、0.43%、0.41%，表示该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取来源于河北生半夏供试品溶液，于 0、2、4、8、12、16、24 h 在“2.2”项色谱条件下进样，记录峰面积，尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷的 RSD ($n=6$) 分别为 0.05%、0.03%、0.32%、0.27%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取 6 份已知含有量的河北生半夏样品约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入已知含有量的尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷对照品溶液各 1 mL，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.2”项色谱条件下进样，计算加样回收率。结果见表 3。

表 3 各成分加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab. 3 Results of recovery tests for various constituents ($n=6$)

成分	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
尿苷	0.012 9	0.010 1	0.023 0	100.49	2.05
肌苷	0.004 6	0.012 1	0.016 6	100.19	1.16
鸟苷	0.013 1	0.016 1	0.029 1	99.89	1.92
腺苷	0.026 7	0.014 6	0.041 2	100.12	1.65

2.4 样品含有量测定 对 9 批样品中 4 种不同的核苷类成分尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷进行测定，结果见表 4。

表 4 各成分含有量测定结果 ($n=6$, $\mu\text{g/g}$)

Tab. 4 Results of content determination of various constituents ($n=6, \mu\text{g/g}$)

编号	样品	产地	尿苷	肌苷	鸟苷	腺苷
1	生半夏	甘肃	172.00	89.80	146.00	116.00
2	生半夏	贵州	—	—	12.60	—
3	生半夏	云南	13.10	—	7.83	—
4	生半夏	河北	122.00	43.50	126.00	257.00
5	生半夏	湖北	7.24	21.10	—	11.50
6	水半夏	江西	74.30	101.50	9.39	128.00
7	天南星	未知	86.50	96.60	—	69.60
8	掌叶半夏	河北	387.00	127.70	196.00	345.00
9	生天南星	东北	—	84.30	18.20	—

注：“—”表示低于定量限。

3 结果与讨论

3.1 含有量比较 研究结果表明，不同产地的半夏与其伪品中各核苷的含有量差别较大，其中肌苷在贵州、云南产半夏中未检出；腺苷在贵州、云南产半夏及东北生天南星片中未检出；鸟苷在湖北产半夏及天南星中未检出；尿苷在贵州半夏与东北生

天南星中未检出。半夏中 4 种核苷总量在 12.6~523.80 $\mu\text{g/g}$ 之间，水半夏中核苷总量为 313.19 $\mu\text{g/g}$ ，天南星中核苷总量为 252.7 $\mu\text{g/g}$ ，掌叶半夏核苷总量为 1 055.70 $\mu\text{g/g}$ ，生天南星片核苷总量为 102.5 $\mu\text{g/g}$ 。

在采集的半夏样品中，甘肃产半夏中肌苷、鸟苷、尿苷含有量较其他产地略高。目前市场上所用半夏产地也以甘肃为多；而在贵州产半夏中仅检测出鸟苷，肌苷、腺苷、尿苷均未被检出，这与其余 4 个产地半夏正品检测结果出入较大，此数据是否具有代表性，还有待进一步实验。通过对现阶段市场流通半夏伪品采样进行检测发现，掌叶半夏所含肌苷、腺苷、尿苷和鸟苷的含有量均较大，甚至比半夏正品的含有量大。目前市场上多用掌叶半夏混为天南星入药，甚至有多数省份将掌叶半夏看为质量较优的天南星药材，同时也存在与半夏通用的情况^[17-18]，这可能与掌叶半夏中核苷类成分含有量较多有关。有文献研究报道，水半夏与半夏的药理作用基本相似，临幊上可局部作为半夏的代替品^[19-20]。

3.2 提取方法及色谱条件选择 本实验选择纯水、甲醇、乙醇、甲醇-水、乙醇-水等作为提取溶剂，结果显示纯水的提取效率较高。在提取方法的选择上，考察回流提取法、超声提取法等，结果超声提取效率较高。选择超声法提取的同时，对影响超声条件的功率、频率、提取时间进行考察最后选择超声功率 500 W，频率 40 kHz，提取 45 min 效果最优。

色谱条件的选择上，分别比较了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-甲酸水等不同流动相对色谱峰的影响，结果乙腈-水分离效果较好。本实验选择用色谱柱 Agilent ZORBAX SB-AqC₁₈ 亲水柱进行实验，保证了条件的优化。

本实验对不同产地的半夏与其伪品中 4 种核苷类成分进行含有量测定，建立的方法稳定、高效、快捷，以期有利于在种植、产地初加工、炮制等方面进行质量控制，同时为半夏的药效及毒性的物质基础研究提供依据。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：119.
- [2] 徐剑锟，张天龙，易国卿，等. 半夏化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报，2010，27(6)：429-433.
- [3] 张之昊，戴忠，胡晓茹，等. 半夏化学成分的分离与鉴

- 定[J]. 中药材, 2013, 36(10): 1620-1622.
- [4] Ji X, Huang B, Wang G, et al. The ethnobotanical, phytochemical and pharmacological profile of the genus *Pinellia* [J]. *Fitoterapia*, 2014, 93: 1-17.
- [5] 吴皓, 李伟, 张科卫, 等. 半夏药材鉴别成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 46-49.
- [6] 杨冰月, 敬勇, 赖月月, 等. HPLC 法同时测定半夏中 5 个代表性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 1992-1997.
- [7] 翟兴英, 张凌, 李冰涛, 等. 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析半夏药材中的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 173-183.
- [8] 王朋展, 相美容, 李灿, 等. HPLC 法同时测定不同来源半夏及其伪品中 9 种核苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 212-218.
- [9] 吕爱娟, 张志澄, 张科卫, 等. RP-HPLC 法同时测定半夏中 5 种核苷含量的研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(7): 1051-1054.
- [10] 赵杨, 靳风云, 伍庆, 等. 高效液相色谱法测定贵州不同产地半夏药材中鸟苷和腺苷的含量[J]. 时珍国医药, 2007, 18(1): 23-24.
- [11] 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.
- [12] 许宏亮, 常建平, 梁宗锁, 等. 半夏皮与块茎中 4 类成分的比较[J]. 中成药, 2016, 38(9): 1998-2002.
- [13] 阮洪根, 何禄仁, 宋平顺, 等. 不同产地与规格半夏中 4 种核苷(或碱基)的含量测定及统计分析[J]. 中国药业, 2014, 23(18): 40-42.
- [14] 许卫锋, 张保国, 李勉, 等. 半夏及其混淆品水半夏的鉴别研究[J]. 中成药, 2008, 30(4): 561-563.
- [15] 郑司浩, 魏文龙, 任伟光, 等. 基于 DNA 条形码的半夏属及其伪品分子鉴别[J]. 植物学报, 2014, 49(6): 710-719.
- [16] 乔民, 白鸥, 张丽明. 中药半夏及其伪品的鉴定[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(4): 850-853.
- [17] 谢宗万. 中药材正名词典[M]. 北京: 北京科技出版社, 2004: 284-285.
- [18] Liu Y, Liang Z, Zhang Y. Induction and *in vitro* alkaloid yield of calluses and protocorm-like bodies (PLBs) from *Pinellia ternata* [J]. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant*, 2010, 46: 239-245.
- [19] 刘继林, 钟莽. 水半夏与半夏部分药理作用的对比研究[J]. 成都中医学院学报, 1989, 12(2): 41-44.
- [20] 张文虎, 沈志君. 半夏与水半夏的性状及临床功效比较之我见[J]. 南京中医药大学学报, 1995, 11(4): 32-33.

北苍术商品药材等级标准及质量评价

朱思敏, 欧阳丽敏, 王新宏, 安徽, 崔波*, 尤丽莎*
(上海中医药大学, 上海 201203)

摘要: 目的 建立北苍术商品药材等级标准。方法 收集 36 批样品, 测定其长度、单个质量、断面色泽、质地、每 1 kg 的头数等外观指标, 对各外在指标进行 Pearson 相关性分析并确定分级指标; 测定其杂质、水分、总灰分、酸不溶性灰分、水溶性浸出物、醇溶性浸出物、苍术素含有量、β-桉叶醇含有量及挥发油含有量, 对各内在质量指标进行 Pearson 相关性分析和 t 检验并确定分级指标, 同时结合主客观分析, 综合判定北苍术商品药材等级划分指标。**结果** 头数与长度、单个质量的相关系数分别为 -0.868、-0.835, 为极显著负相关。建立北苍术商品药材等级标准为一等品, 头数少于 140 头/kg, 且能过 2.5 cm×2.5 cm 方孔筛的部分小于 5%、苍术素超过 0.45%、杂质小于 1.5%; 二等品, 头数超过 140 头/kg, 且能过 1.5 cm×1.5 cm 方孔筛的部分小于 5%、苍术素超过 0.30%、杂质小于 1.5%; 统货, 能过 1.5 cm×1.5 cm 方孔筛的部分小于 35%、苍术素超过 0.30%、杂质小于 3%。**结论** 建立的北苍术商品药材等级标准, 有利于确保北苍术药材的临床质量与疗效、促进优质优价良性市场秩序的建立。

关键词: 北苍术; 等级; 外观性状指标; 内在质量指标

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)06-1536-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.028

收稿日期: 2019-10-27

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-HEB-15)

作者简介: 朱思敏 (1994—), 女, 硕士生, 研究方向为中药活性成分。Tel: (021) 51322452, E-mail: berlyjustdo@163.com

*通信作者: 崔波 (1981—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药化学。Tel: (021) 51322183, E-mail: cuibo-81@163.com

尤丽莎 (1977—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为中药活性成分。Tel: (021) 51322183, E-mail: youlisha@126.com