

土贝母的 HPLC 指纹图谱研究

李晓晶¹, 姜琳琳¹, 吴智南², 赵陆华^{1*}

(1. 中国药科大学分析测试中心, 江苏 南京 210009; 2. 广州固志医药科技有限公司, 广东 广州 510663)

摘要:目的 采用 HPLC 法研究并建立各产地土贝母药材的指纹图谱。方法 用 Alltech C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水, 梯度洗脱; 体积流量: 1.0 mL/min, 在 230 和 203 nm 波长处测定了 15 个不同产地的土贝母药材, 并用聚类分析和相似度计算进行数据分析。结果 建立了土贝母药材的 HPLC 指纹图谱, 标定了 18 个共有指纹峰, 方法学考察结果符合指纹图谱技术要求, 经相似度计算, 各产地药材之间的相似性良好。结论 方法稳定、可靠、重现性好, 可用来控制土贝母药材的质量。

关键词: 土贝母; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度; 聚类

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)06-0926-04

Fingerprints of *Rhizoma Bolbostemmae* by HPLCLI Xiao-jing¹, JIANG Lin-lin¹, WU Zhi-nan², ZHAO Lu-hua¹

(1. Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Guangzhou Guzhi Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China)

Key words: *Rhizoma Bolbostemmae*; HPLC; fingerprints; similarity; clustering

土贝母为葫芦科植物土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet 的干燥块茎, 是一种传统中药, 也称土贝、大贝母、地苦胆、草贝等。主产于河南、陕西、山东等地。临床具有清热解毒、消肿散结之功效。土贝母所含的主要成分有脂肪酸、甾醇、三萜皂苷等^[1], 其中皂苷类成分主要为土贝母苷甲、乙、丙、丁 (tubeimoside I, II, III, IV), 土贝母苷甲量达 11.9%, 具有抗肿瘤、抗病毒等多种药理活性^[2]。由于受产地、气候和生态环境等的影响, 各产地土贝母的化学成分存在一定的差异。长期以来, 对土贝母的质量控制多是通过对其性状和薄层进行鉴别。近年来, 虽对其中土贝母苷甲的量进行测定^[3], 但是对于土贝母成分多、组分复杂的中药材而言, 仅测定某个成分的量, 难以客观、有效地评价或控制药材的质量。而指纹图谱技术作为一种多组分复杂样品的有效质量控制方法, 能够反映出待测样品的整体性、特征性。本实验采用 HPLC 法对土贝母药材的指纹图谱进行了研究, 对不同产地的土贝母药材指纹图谱进行了对比, 为该药材全面质量控制建立了有效的方法, 并为土贝母临床用药及选择种植基地提供参考。

1 仪器、试剂与药材

日本岛津 LC-10AD VP 高效液相色谱仪, 岛

津 SPD-10A VP 紫外检测器, 浙江大学 N2000 型色谱工作站。乙腈为色谱纯(美国天地公司), 水为纯净水(经 0.45 μm 微孔滤膜滤过)。

土贝母苷甲对照品由中国药品生物制品检定所提供, 不同产地土贝母药材由笔者于各产地收集, 来源见表 1, 经中国药科大学宋学华教授鉴定。

表 1 土贝母样品来源

Table 1 Source of *B. paniculatum* samples

编号	产地或来源	编号	产地或来源
1	陕西宝鸡	9	宁夏固原
2	河南	10	河北
3	四川 1	11	四川 2
4	青海	12	湖北恩施
5	山东青岛	13	陕西
6	甘肃	14	宁夏
7	安徽亳州	15	云南
8	山西		

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Alltech C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), B 相浓度梯度: 0~5 min(95%), 5~25 min(95%~75%), 25~55 min(75%~65%), 55~60 min(65%); 体积流量: 1 mL/min; 检测波长: 0~4 min(230 nm), 4~6 min(203 nm); 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

收稿日期: 2006-08-20

作者简介: 李晓晶(1982-), 女, 宁夏银川人, 中国药科大学分析测试中心在读硕士研究生, 主要从事中药分析研究。

* 通讯作者 赵陆华 Tel: (025)83271185 E-mail: zhaoluhua@hotmail.com

2.2 对照品溶液的制备:取土贝母苷甲对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成 1 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:取土贝母药材粉末(过三号筛)约 1.0 g,精密称定,置 50 mL 圆底烧瓶中,精密加入 70%乙醇 20 mL,加热回流 1 h,滤过,水浴蒸干,加水 20 mL 溶解,移至分液漏斗中,先用 15 mL 醋酸乙酯萃取 2 次,弃去醋酸乙酯层,水层用 20 mL 水饱和的正丁醇萃取 4 次,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,作为供试品溶液。

2.4 测定方法:分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,见图 1。

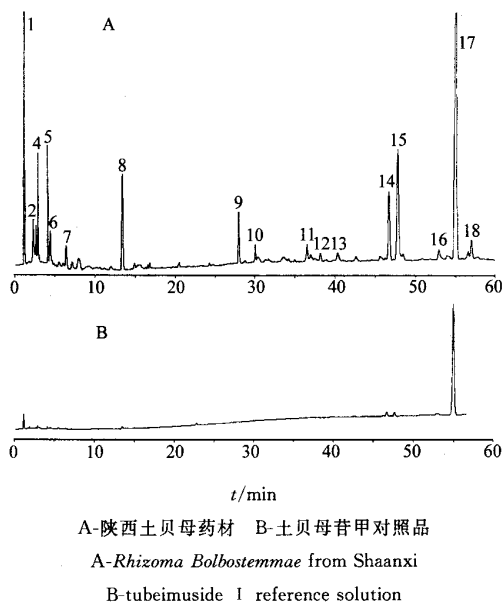


图 1 土贝母药材指纹图谱(A)及土贝母苷甲对照品(B)
Fig. 1 Fingerprint of *Rhizoma Bolbostemae* (A) and tubeimusiide I reference substance (B)

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验:取供试品溶液(第 13 号样品),连续进样 6 次,测定,计算得各共有峰相对峰面积的 RSD < 3%。

2.5.2 重现性试验:取第 13 号样品 6 份,制备供试品溶液,分别进样测定,计算得各共有峰相对峰面积的 RSD < 3%。

2.5.3 稳定性试验:取第 13 号样品供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样,测定,计算得各共有峰相对峰面积的 RSD < 3%,表明样品溶液在 12 h 内稳定性较好。

2.6 不同产地土贝母药材指纹图谱的比较及相关技术参数:在上述条件下测定 15 个产地土贝母药材,结果见图 2。在陕西道地药材色谱指纹图谱中选取量较高的 18 个峰为土贝母药材的共有峰,在共有峰中,17 号峰为土贝母苷甲,是土贝母中最主要的活性成分,量较高且比较稳定,将其作为参照峰,分别求出各组分与之的相对保留时间之比,结果见表 2。以 17 号峰的峰面积作为 1,15 号峰面积接近或大于总峰面积的 10%,计算该峰与 17 号峰峰面积比值,结果见表 3,其余各峰按其保留时间定性。

2.7 相似度计算^[4]:相似度是评价中药指纹图谱的

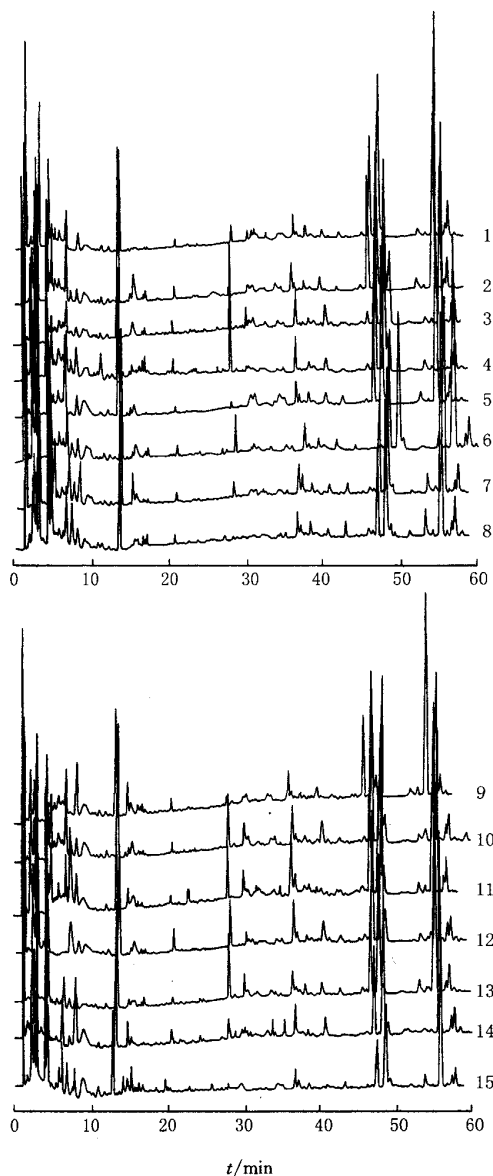


图 2 不同产地土贝母样品的指纹图谱
Fig. 2 Fingerprints of *B. paniculatum* samples from various habitats

表 2 15 个产地土贝母样品的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of *B. paniculatum* from 15 habitats

样品号	各峰相对保留时间																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.023	0.044	0.051	0.056	0.079	0.085	0.119	0.246	0.514	0.553	0.667	0.696	0.736	0.849	0.870	0.961	1.000	1.036
2	0.024	0.043	0.050	0.055	0.078	0.082	0.123	0.248	0.512		0.665	0.695	0.734	0.848	0.869	0.961	1.000	1.037
3	0.023	0.041	0.049	0.054	0.078	0.082	0.124	0.244	0.506	0.544	0.663	0.694	0.733	0.849	0.871	0.962	1.000	1.035
4	0.023	0.043	0.049	0.054	0.077	0.082	0.124	0.244	0.507		0.663	0.694	0.733	0.849	0.870	0.961	1.000	1.036
5	0.023	0.042	0.050	0.055	0.077	0.084	0.119	0.246	0.514		0.671	0.701	0.740	0.854	0.874	0.962	1.000	1.035
6	0.022	0.041	0.048	0.052	0.074	0.083	0.119	0.241	0.499		0.661	0.693	0.732	0.851	0.872	0.961	1.000	1.035
7	0.023	0.042	0.049	0.054	0.077	0.082	0.123	0.243	0.507		0.664	0.694	0.733	0.849	0.870	0.961	1.000	1.036
8	0.022	0.042	0.049	0.054	0.076	0.084	0.118	0.244			0.666	0.696	0.735	0.852	0.873	0.962	1.000	1.035
9	0.023	0.042	0.051	0.055	0.080	0.085	0.127	0.247	0.515		0.668	0.698	0.736	0.850	0.871	0.962	1.000	1.036
10	0.023	0.041	0.049	0.054	0.077	0.082	0.123	0.245	0.508	0.546	0.664	0.694	0.734	0.853	0.874	0.961	1.000	1.035
11	0.023	0.042	0.050	0.055	0.079	0.084	0.125	0.246	0.509	0.547	0.665	0.696	0.735	0.852	0.874	0.963	1.000	1.032
12	0.021	0.042	0.049	0.054	0.072	0.076		0.245	0.509	0.546	0.664	0.694	0.733	0.850	0.871	0.961	1.000	1.035
13	0.022	0.042	0.049	0.053	0.075	0.082	0.117	0.243	0.509	0.547	0.665	0.695	0.734	0.850	0.870	0.961	1.000	1.036
14	0.022	0.042	0.048	0.053	0.074	0.080	0.113	0.237	0.502		0.662	0.692	0.732	0.847	0.868	0.959	1.000	1.037
15	0.021	0.039	0.045	0.050	0.070	0.076	0.110	0.228	0.461		0.661	0.692	0.734	0.852	0.872	0.961	1.000	1.037

表 3 15 个产地土贝母药材共有指纹峰的峰面积比值

Table 3 Relative peaks areas of common of *B. paniculatum* from 15 habitats

样品号	15 号共有		非共有峰面		样品号	15 号共有		非共有峰面	
	峰峰面积	积占总峰面积	积占总峰面积	积的百分数/%		峰峰面积	积占总峰面积	积的百分数/%	
1	0.363	6.60			9	0.379	7.96		
2	0.412	7.91			10	0.439	6.82		
3	0.513	8.62			11	0.476	7.40		
4	0.392	5.91			12	0.526	7.03		
5	0.355	5.92			13	0.344	6.26		
6	0.345	7.52			14	0.368	6.52		
7	0.347	8.43			15	0.316	8.81		
8	0.389	6.23			平均值	0.398			

一个重要参数,是根据指纹图谱的整体相似程度来计算重要化学组成的整体波动程度,据此分析中药质量的稳定性。本实验将不同产地的土贝母药材指纹图谱进行量化,利用 Excel 软件,运用公式计算,采用夹角余弦和相关系数两个统计量为测试,对不同产地土贝母药材的相似度进行了计算。15 个产地土贝母指纹图谱相关系数依次为:0.981、0.993、0.984、0.990、0.994、0.948、0.990、0.961、0.987、0.989、0.984、0.988、0.989、0.979、0.906;夹角余弦依次为:0.986、0.994、0.988、0.992、0.996、0.964、0.992、0.973、0.990、0.992、0.988、0.991、0.992、0.985、0.935。结果表明,各产地相似度均在 0.900 以上,各产地药材之间的相似性良好。其中只有 15 号样品相似度小于 0.95,在聚类分析中 15 号样品也单独聚为一类,表明相似度计算与聚类分析结果一致。

2.8 系统聚类分析:系统聚类分析是一种无管理、无指导的模式识别法,可依据所测样品的数据,对样

品进行分类。本实验以 15 个不同产地的土贝母药材为研究对象,进行指纹图谱研究,将各色谱峰相对于参照物土贝母苷甲的峰面积量化,得到 15×18 阶原始数据矩阵,运用 Matlab 7.0.1 软件编写程序对其进行系统聚类分析,采用离差平方和法(Ward's Method),利用欧氏距离(Euclidean)作为样品的测度,15 个样品基本可以分为 3 大类,样品聚类结果见图 3。

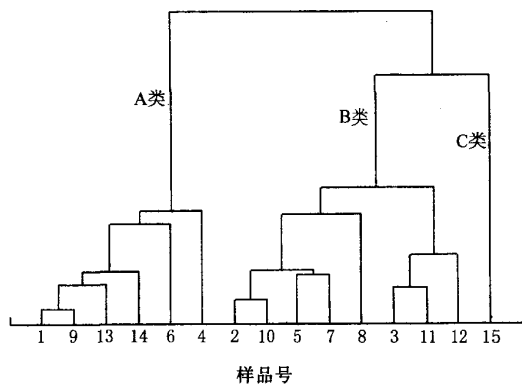


图 3 土贝母样品聚类谱系图

Fig. 3 Dendrogram of hierarchical clustering analysis for *B. paniculatum* samples

3 讨论

3.1 本实验分别考察了超声、加热回流的提取方法,发现加热回流得到的峰数较多,另外又比较了不同提取溶剂如水、甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇,结果表明 70%乙醇提取效果较好,由于土贝母主要含有皂苷类成分,并且皂苷类成分在正丁醇中溶解度最大,所以综合考虑最终确定提取条件为 70%乙醇加热回流,正丁醇萃取。

3.2 本实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水体系进行

洗脱,由于检测波长较低,甲醇有末端吸收,用甲醇-水为流动相基线波动较大,选用乙腈-水系统可以消除溶剂的干扰,基线较平稳且色谱峰有较好的分离。使用等度洗脱时,有效成分出峰时间长且分离效果不够理想,梯度洗脱在 60 min 内可使色谱峰全部洗出,且多数峰达到基线分离。

3.3 本实验采用二级管阵列检测器对指纹图谱的检测波长进行了选择,从 200~400 nm 进行了紫外扫描,200、203 nm 处所包含的信息量最大,同时各峰的响应较大,但是由于 200 nm 波长较短,基线波动较大,影响色谱峰型和分离度,所以选择 203 nm 为测定波长。另外在 0~4 min 时由于溶剂的影响以及色谱峰在 203 nm 的响应太大使色谱峰很难达到分离,所以选择波长为 230 nm,可以改善各峰的分离度和峰形。

3.4 土贝母为单品种来源,主要考察产地的影响。不同产地土贝母药材所含各有效成分基本相同,但是各成分的量差别较大。由聚类结果可以看出,15 个样品大致可以分为 3 大类,从地理分布考虑:第 A

类样品的产地是陕西、宁夏、甘肃、青海,这些地区都属于西北地区气温较低且比较干燥;第 B 类样品的产地是河南、河北、山东、安徽、山西、四川、湖北,这些地区气温比较适中,并且此类又可分为两类,四川、湖北为一类与其他产地分开,说明四川、湖北的气候与其他产地有所不同,从而影响了土贝母药材的质量;第 C 类样品的产地是云南,气温较高且潮湿。由于药材的生长受到温度、光照和湿度的影响,所以不同产地的土贝母之间的内在质量存在一定的差异。由此可见如果要保证药材的一致性,应注意药材的产地。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Yu L J, Ma R D, Yu T X. Anti-tumor effect of tubeimosides I and II isolated from *Bolbostemma paniculatum* [J]. *China New Drugs* (中国新药杂志), 2002, 11(9): 692-694.
- [3] Wei Y L, Liang X M, Xu C G, et al. HPLC for determining tubeimoside I in *Bolbostemma paniculatum* [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2000, 15(3): 107-108.
- [4] Miao A D, Sun D J. Application of microsoft excel 2002 to calculate the similarity in fingerprints of Chinese herbs [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2003, 27(1): 51-54.

白术药材的指纹图谱研究

黎琼红,马兴田,谢 晨,龚秀琦

(广东康美药业股份有限公司,广东 普宁 515300)

摘要:目的 建立白术药材的高效液相指纹图谱分析方法。方法 采用 Dikma Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以乙腈-水梯度洗脱(45%~100%乙腈),体积流量为 1.0 mL/min,柱温 25 °C,检测波长 242 nm。结果 通过对 13 批不同产地的白术样品的测定,标定了 24 个共有峰,并通过“中药指纹图谱计算机辅助相似度软件”和聚类分析等辅助手段,计算相似度等相关参数。结论 该方法准确可靠,重现性好,为更好地控制白术内在质量提供了科学依据。

关键词:白术;指纹图谱;高效液相色谱

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)06-0929-03

Fingerprints of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*

LI Qiong-hong, MA Xing-tian, XIE Chen, GONG Xiu-qi

(Guangdong Kangmei Pharmaceutical Co., Ltd., Puning 515300, China)

Key words: *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*; fingerprint; HPLC

白术为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根,主产于浙江、安徽、湖北、湖南等省。其味甘、苦性温,具有健脾益气、燥湿利水、止

汗、安胎的功效^[1]。主要含有挥发油成分和内酯类成分。为控制和保证产品质量的稳定性,本实验依据国家药品监督管理局颁布的《中药注射剂指纹图谱研

土贝母的HPLC指纹图谱研究

作者: [李晓晶](#), [姜琳琳](#), [吴智南](#), [赵国华](#), [LI Xiao-jing](#), [JIANG Lin-lin](#), [WU Zhi-nan](#),
[ZHAO Lu-hua](#)

作者单位: [李晓晶, 姜琳琳, 赵国华, LI Xiao-jing, JIANG Lin-lin, ZHAO Lu-hua\(中国药科大学分析测试中心, 江苏, 南京, 210009\)](#), [吴智南, WU Zhi-nan\(广州固志医药科技有限公司, 广东, 广州, 510663\)](#)

刊名: [中草药](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名: [CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)

年, 卷(期): 2007, 38(6)

被引用次数: 2次

参考文献(4条)

1. [中华人民共和国药典\(一部\)](#) 2005
2. [Yu L J;Ma R D;Yu T X Anti-tumor effect of tubeimosides I and II isolated from Bolbostemma paniculatum\[期刊论文\]-中国新药杂志 2002\(09\)](#)
3. [Wei Y L;Liang X M;Xu C G HPLCfordetermining tubeimoside I in Bolbostemma paniculatum\[期刊论文\]-西药学杂志 2000\(03\)](#)
4. [Miao A D;Sun D J Application of microsoft excel 2002 to calculate the similarity in fingerprints of Chinese herbs\[期刊论文\]-药学进展 2003\(01\)](#)

本文读者也读过(10条)

1. [马挺军. 李军. 屠鹏飞. 吕飞杰. MA Ting-jun. LI Jun. TU Peng-fei. LU Fei-jie 土贝母中一个新的三萜皂苷\[期刊论文\]-中草药2006, 37\(3\)](#)
2. [黄玮. 陆兔林. 王巧晗. 毛春芹 野生与人工栽培岩黄连药材的比较\[期刊论文\]-中草药2008, 39\(5\)](#)
3. [韩加怡. 李会林. HAN Jia-yi. LI Hui-lin RP-HPLC测定复方麻黄碱滴鼻液中盐酸麻黄碱、盐酸林可霉素和地塞米松磷酸钠含量的方法学研究\[期刊论文\]-中国现代应用药学2008, 25\(2\)](#)
4. [孙健. 温庆辉. SUN Jian. WEN Qing-hui 土贝母的化学成分及药理作用研究进展\[期刊论文\]-中国药物警戒 2010, 07\(7\)](#)
5. [吴昭晖. 罗佳波. 游文玮. WU Zhao-hui. LUO Jia-bo. YOU Wen-wei 甘草药材HPLC指纹图谱研究\[期刊论文\]-中草药 2005, 36\(12\)](#)
6. [任永申. 张萍. 杜晓曦. 李燕. 王晶彬. 金城. 段惠娟. 肖小河. REN Yong-shen. ZHANG Ping. DU Xiao-xi. LI Yan. WANG Jing-bin. JIN Cheng. DUAN Hui-juan. XIAO Xiao-he 基于HPLC指纹图谱的茵栀黄注射液质量一致性和稳定性研究\[期刊论文\]-中草药2008, 39\(6\)](#)
7. [刘军. 郎爱东. 聂磊 柿叶黄酮类成分的HPLC指纹图谱研究\[期刊论文\]-中国中药杂志2008, 33\(6\)](#)
8. [崔翰明. 程慧平. 刘喜明. 朱晓芸 HPLC法测定甲肿消及大鼠血清中土贝母苷甲的含量\[期刊论文\]-中国中医药信息杂志2008, 15\(11\)](#)
9. [赵夕秋. 杨洁. ZHAO Xiqiu. YANG Jie 用HPLC法比较拟野生条件下种植土贝母与生药饮片土贝母中土贝母苷甲的含量\[期刊论文\]-科学技术与工程2006, 6\(15\)](#)
10. [石荣. 王少云. 姜维林. 聂磊. 侯准. SHI Rong. WANG Shao-yun. JIANG Wei-lin. NIE Lei. HOU Zhun 大豆总异黄酮HPLC指纹图谱研究\[期刊论文\]-中草药2006, 37\(2\)](#)

引证文献(2条)

1. [邹科. 卢立琼 浙贝母和土贝母的鉴别\[期刊论文\]-中国药业 2010\(10\)](#)
2. [肖玉燕. 翁金月. 樊建霜 土贝母与丽江山慈姑的鉴别\[期刊论文\]-中医临床杂志 2008\(2\)](#)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200706051.aspx