

骨碎补的 HPLC 指纹图谱研究

刘珂弟, 乔 雪, 梁永红, 果德安, 叶 敏*

北京大学药学院 天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

摘要:目的 对市售骨碎补进行化学成分分析并建立 HPLC 指纹图谱, 为骨碎补的品种鉴别和质量评价提供依据。方法 采用 HPLC 方法对购自全国各地共 33 批骨碎补进行指纹图谱分析, 利用 LC-MS 指认特征色谱峰, 并结合药材性状特征探讨品种鉴别方法。结果 建立了 33 批市售骨碎补的化学成分指纹图谱, 共标定了 17 个共有峰, 指认了其中 5 个色谱峰。将化学组成与药材性状特征进行了关联, 骨碎补药材分为 4 大类, 其中包括正品槲蕨与常用混淆品种大叶骨碎补, 另外两类药材的原植物尚待鉴定。结论 建立的 HPLC 方法可应用于骨碎补的质量控制。

关键词: 骨碎补; HPLC 指纹图谱; 槲蕨; 大叶骨碎补; 质量控制

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0510-05

HPLC fingerprint of *Drynariae Rhizoma*

LIU Ke-di, QIAO Xue, LIANG Yong-hong, GUO De-an, YE Min

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, College of Pharmacy, Peking University, Beijing 100191, China

Key words: *Drynariae Rhizoma*; HPLC fingerprint; *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm.; *Davallia formosana* Hayata; quality control

骨碎补是著名的骨伤科常用中药。《中国药典》2010 年版^[1]规定, 中药骨碎补为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎。除形态特征外, 均以其主要成分柚皮苷为主要标准, 《中国药典》2010 年版收录骨碎补的定性、定量鉴别方法。我国有 3 科 6 属 12 种植物均作为“骨碎补”药用, 其中以槲蕨为主要品种^[2]。骨碎补中黄酮类化合物是骨碎补药材的主要活性成分^[3]。李晓红等^[4]建立了骨碎补 HPLC 指纹图谱, 并用主成分分析法对其差异进行了解释。然而, 目前市售骨碎补药材的来源比较混乱, 性状比较相似, 而化学组成又很复杂, 现有的形态鉴别、单成分定量及指纹图谱等方法仍然难以对骨碎补药材的品种及质量进行有效的评价。因此, 本课题组在系统研究骨碎补化学成分的基础上, 建立了骨碎补药材的 HPLC 指纹图谱, 利用 LC-MS 技术及对照品^[5-6]对主要色谱峰进行指认, 并将化学组成与药材的性状特征进行关联, 基本明确了骨碎补药材的品种鉴别特征。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪: 配有四元泵溶剂洗脱系统、柱温箱、自动进样器及二极管阵列检测器 (Agilent, Waldbronn, Germany); Finnigan LCQ Advantage 离子阱质谱仪, ESI 接口 (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA); KQ-500DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 十万分之一电子分析天平 (Sartorius), 甲酸 (色谱级), 乙腈 (色谱级), 去离子水 (色谱级, Milli-Q 系统纯化), 其他试剂均为分析纯。

原儿茶酸、4-*O*- β -D-葡萄糖基反式咖啡酸、对羟基苯甲酸、新北美圣草苷、柚皮苷由本研究室分离纯化得到, 质量分数大于 98%。从全国各地药店及药材市场先后收集 33 批骨碎补药材, 均由北京大学药学院叶敏副教授鉴定, 见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 保护柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (12.5 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相 A-乙腈, B-0.088%

收稿日期: 2010-06-09

基金项目: 北京大学医学部 985 项目 (985-2-119-121)

作者简介: 刘珂弟 (1990—), 男, 土家族, 湖南省张家界市人, 研究生阶段在北京大学医学部天然药物学系生药生物技术研究室从事中药、天然药物的研究工作。Tel: (010)82802024 E-mail: cordillera.liu@gmail.com

* 通讯作者 叶 敏 Tel/Fax: (010)82802024 E-mail: yemin@bjmu.edu.cn

表 1 骨碎补药材产地及来源

Table 1 Origins and sources of *Drynariae Rhizoma*

编号	产地	购买时间	编号	产地	购买时间
G1	广东	2008.11	G18	广东	2010.02
G2	内蒙古包头	2008.09	G19	河北安国	2010.02
G3	黑龙江哈尔滨	2007.09	G20	山东泰安	2010.02
G4	湖北武汉	2007.09	G21	陕西西安	2010.02
G5	上海	2007.09	G22	广东肇庆	2010.02
G6	湖南长沙	2007.09	G23	内蒙古东河	2010.02
G7	黑龙江哈尔滨	2007.09	G24	吉林长春	2010.02
G8	山东泰安	2008.09	G25	湖北宜昌	2010.02
G9	云南昆明	2008.09	G26	北京同仁堂	2010.02
G10	河北廊坊	2008.09	G27	河北唐山	2010.02
G11	四川成都	2008.09	G28	江西宜春	2010.02
G12	广东深圳	2008.09	G29	贵州贵阳	2010.02
G13	云南昆明	2009.08	G30	北京同仁堂	2010.02
G14	云南昆明	2007.09	G31	山东菏泽	2010.02
G15	安徽怀远	2007.09	G32	云南昆明	2010.02
G16	湖北宜昌	2008.09	G33	河北邢台	2010.02
G17	湖南张家界	2010.02			

甲酸；二元线性梯度洗脱：0~7 min, 6% A；7~10 min, 6%~12% A；10~12 min, 12% A；12~20 min, 12%~18% A；20~35 min, 18%~25% A；体积流量：1 mL/min；柱温：30 ℃；进样量：10 μ L；检测波长：263 nm。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取原儿茶酸、4-*O*- β -D 葡萄糖基反式咖啡酸、对羟基苯甲酸、新北美圣草苷、柚皮苷适量，加甲醇分别制成 0.8 mg/mL 对照品储备液，各取 100 μ L 混合，0.45 μ m 滤膜滤过，即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

粉碎骨碎补药材，精密称取药材粉末 1.0 g，加 70% 甲醇 5 mL，摇匀，超声 30 min，振摇，0.45 μ m 滤膜滤过，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份供试品溶液，按“2.1”项色谱条件连续测定 6 次，测得各主要色谱峰的保留时间 RSD 均小于 0.2%，峰面积 RSD 均小于 3.2%，表明本方法精密度良好。

2.4.2 重现性试验 取同一批药材样品 6 份，按“2.3”项方法平行制备，按“2.1”项色谱条件测定，测得各主要色谱峰的保留时间 RSD 均小于 0.2%，峰面积 RSD 均小于 2.7%，表明本方法重现性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液，置室温条件下，按“2.1”项中色谱条件，分别于 0、2、4、8、12、24、48 h 进行测定，测得各主要色谱峰的保留时间 RSD 均小于 0.2%，峰面积 RSD 均小于 3.4%，表明样品溶液于 48 h 内保持稳定。

2.5 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价

将 33 批不同产地收集的骨碎补药材分别按“2.3”项方法制备，按“2.1”项色谱条件测定并建立 HPLC 指纹图谱。将所得指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A）”，计算各样品指纹图谱与生成的对照图谱的相似性系数，结果见表 2。从各批药材的 HPLC 图谱与相似性系数都可以看出，不同批次骨碎补药材的化学组成差异十分显著。

表 2 33 批骨碎补药材相似度结果

Table 2 Similarities of 33 batches of commercial *Drynariae Rhizoma*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
G1	0.285	G12	0.900	G23	0.328
G2	0.853	G13	0.499	G24	0.703
G3	0.529	G14	0.687	G25	0.718
G4	0.477	G15	0.875	G26	0.917
G5	0.273	G16	0.879	G27	0.364
G6	0.808	G17	0.896	G28	0.266
G7	0.931	G18	0.897	G29	0.937
G8	0.295	G19	0.372	G30	0.464
G9	0.456	G20	0.498	G31	0.602
G10	0.929	G21	0.865	G32	0.285
G11	0.872	G22	0.697	G33	0.475

2.6 共有峰的标定

将 33 批骨碎补药材指纹图谱中的主要共有峰与“2.2”项各对照品储备液的色谱峰进行对照，其中共有峰 1~5 分别指认为原儿茶酸、4-*O*- β -D 葡萄糖基反式咖啡酸、对羟基苯甲酸、新北美圣草苷、柚皮苷，见图 1。对于没有对照品的共有成分，采用 LC-MS 分析，获得其最大吸收波长及质荷比信息，见表 3。此外，LC-MS 还用于判断相同保留时间的色谱峰是否为同一化合物，为指纹图谱提供依据。质谱条件为：负离子扫描模式；扫描范围： m/z 100~1 500；鞘气体积流量：50 arb；辅助气体积流量：15 arb；电喷雾电压：4.50 kV；毛细管温度：330 ℃；毛细管电压：-11 V；管棱镜补偿电压：-40 V。

2.7 骨碎补药材化学分类与形态特征的关联

不同批次骨碎补药材 HPLC 图谱存在极大差异，干扰了指纹图谱的建立。同时证明市售骨碎补

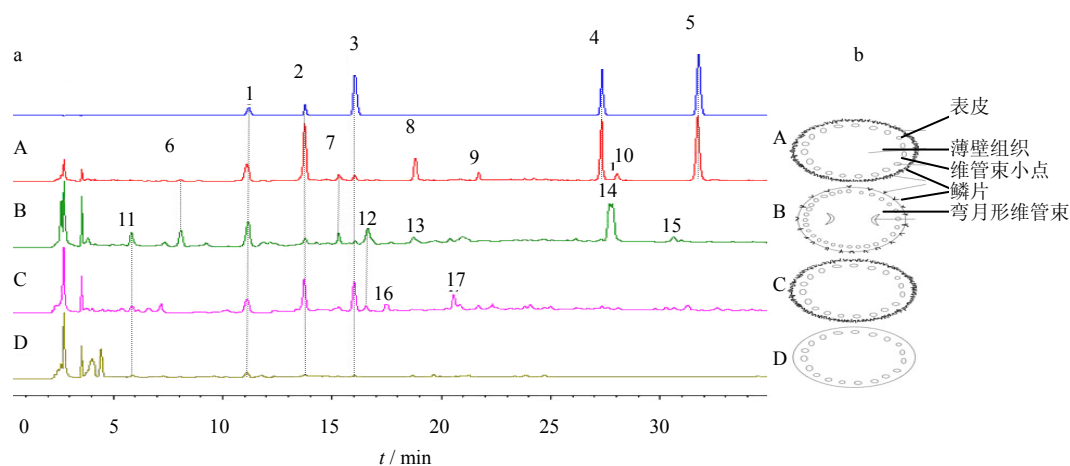


图 1 4 类 (A~D) 骨碎补药材与对照品的指纹图谱 (a) 及横切面简图 (b) 对照

Fig. 1 Chromatographic fingerprints and reference standards (a) of four types (A—D) of *Drynariae Rhizoma*, and corresponding cross-section diagrams (b)

表 3 4 类骨碎补药材 17 个共有峰的最大吸收波长及质荷比

Table 3 Maximum absorption wave length and mass-to-charge ratio of 17 common peaks for four types of *Drynariae Rhizoma*

峰号	t_R/min	m/z	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	峰号	t_R/min	m/z	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$
1	11.198	153	226, 262, 296	10	28.03	593	238, 262, 346
2	13.777	341	234, 296	11	5.825	191 (w)	298
3	16.042	137	256	12	16.656	1 153	208, 226, 284
4	27.354	595	232, 280, 324	13	18.741	577	204, 226, 278
5	31.781	579	232, 280, 328	14	27.708	577	204, 286, 330
6	8.074	657	284		27.832	463	204, 286, 330
7	15.317	193	234, 314	15	30.634	177	226, 284
8	18.822	485	232, 258, 290, 314	16	17.521	239	228, 276
9	21.723	593	238, 262, 346	17	20.588	347	234, 272

药材品种繁多, 很可能有习用品或混淆品掺杂其中, 需要进行进一步的品种鉴别。结合药材形态特征^[7], 本研究将 33 批药材分成 4 类。

A 类: 在 33 批骨碎补药材中, 14 批药材的 HPLC 指纹图谱有很高的相似度, 将其划分为 A 类。在指纹图谱中共标定 10 个共有峰(1~10), 可知该类药材含有原儿茶酸、4-*O*- β -D 葡萄糖基反式咖啡酸、对羟基苯甲酸 (少量)、新北美圣草苷、柚皮苷。

经切片观察, A 类骨碎补药材有着一致的形态特征。药材经炮制, 呈扁平长条形, 有分枝, 长 5~15 cm, 宽 1~2 cm, 厚 0.2~0.5 cm。表面密被深棕色至暗棕色的小鳞片, 小鳞片两种类型, 一种为披针形的鳞毛, 另一种为鱼鳞状鳞片, 均柔软如毛。两侧及上面具凸起或凹下的圆形叶痕。体轻, 质脆, 折断面红棕色, 有 17~25 个维管束小点排列成环。味淡, 微涩。横切面简图见图 1-b-A。依据以上特征, 鉴定 A 类骨碎补药材来源为槲蕨 *Drynaria roosii*

Nakaike, 为《中国药典》(2010 版) 收录的正品骨碎补药材。

将 14 批样品的指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A”, 各样品指纹图谱见图 2, 生成的对照图谱与各样品图谱的相似度见表 4。其中较有代表性的样品 G10 的指纹图谱见图 1-a-A。大部分批次的相似性系数超过 0.90, 表明此类型药材的化学组成比较相似。

B 类: 在 33 批骨碎补药材中, 另有 8 批药材的 HPLC 指纹图谱相似度较高, 但与 A 类差异较大, 归为 B 类。B 类样品共标定 10 个共有峰(1、2、3、6、7、11、12、13、14、15), 该类药材含有原儿茶酸、4-*O*- β -D 葡萄糖基反式咖啡酸 (少量)、对羟基苯甲酸 (少量), 基本不含新北美圣草苷和柚皮苷。B 类骨碎补药材均呈扭曲的圆柱状, 直径约 1 cm, 表面具突起的圆柱形叶基直径约 7 mm, 质坚硬, 不易折断; 横切面显微特征为除近边缘外可见黄白维管束小

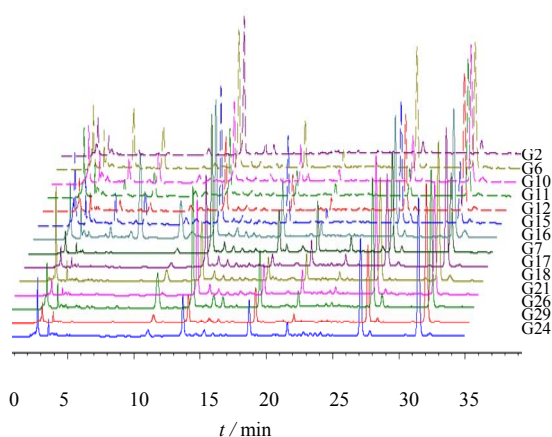


图 2 槲蕨药材(共 14 批)的指纹图谱
Fig. 2 Fingerprint of 14 batches of *D. fortunei* samples

表 4 槲蕨类样品相似度结果

Table 4 Similarities of *D. fortunei* samples

编号	相似度	编号	相似度
G2	0.948	G7	0.939
G6	0.919	G17	0.901
G10	0.975	G18	0.984
G11	0.959	G21	0.927
G12	0.964	G26	0.955
G15	0.972	G29	0.972
G16	0.944	G24	0.679

点 14~20 个,排列成环状,中央有 2 个大的弯月形维管束,与文献报道^[7]的骨碎补混淆品种大叶骨碎补基本一致。横切面简图见图 1-b-B。故将 B 类药材来源鉴定为大叶骨碎补,又名硬骨碎补、广骨碎补,为骨碎补科植物大叶骨碎补 *Davallia formosana* Hayata 的根茎。将 8 批样品的指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”,各样品指纹图谱见图 3,生成的对照图谱与各样品图谱的相似度见表 5。其中较有代表性的样品 G27 的指纹图谱见图 1-a-B。各批次药材的成分类似,但其量差异显著,多批药材的相似性系数低于 0.90。

C 类: C 类药材指纹图谱含有部分 A、B 类药材的共有峰,但在 HPLC 谱图中,25 min 后基本不再有任何成分被洗脱。共有 8 批样品的指纹图谱符合 C 类模式(G1、G5、G9、G13、G14、G22、G25、G31)。C 类样品共标定 7 个共有峰(1、2、3、11、12、16、17),其中有代表性的 G13 与对照品指纹图谱对比见图 1-C。可知该类药材含有原儿茶酸、

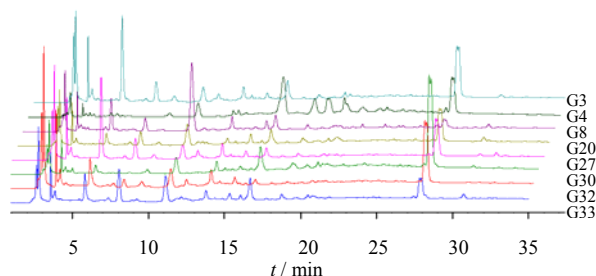


图 3 大叶骨碎补药材(共 8 批)的 HPLC 指纹图谱
Fig. 3 Fingerprint of eight batches of *D. formosana* samples

表 5 大叶骨碎补类样品相似度结果

Table 5 Similarities of *D. formosana* samples

编号	相似度	编号	相似度
G3	0.919	G27	0.959
G4	0.909	G30	0.752
G8	0.859	G32	0.661
G20	0.935	G33	0.957

4-*O*- β -D 葡萄糖基反式咖啡酸、对羟基苯甲酸,不含新北美圣草苷和柚皮苷。形态上, C 类骨碎补药材形态特征与槲蕨相似,横切面简图见图 1-b-C,未发现明显的共同特征。此类药材原植物的拉丁名尚待进一步鉴定。

D 类: D 类样品的指纹图谱响应应低,成分少,相似度高,并与 A、B、C 3 类均有明显差异。D 类样品共标定 4 个共有峰(11、1、2、3),可知该类药材含原儿茶酸(少量)、4-*O*- β -D 葡萄糖基反式咖啡酸(极少量)、对羟基苯甲酸(极少量),不含新北美圣草苷和柚皮苷。符合这一模式的样品(G19、G23、G28)形态特征与槲蕨相似,区别在于没有鳞毛或鳞毛极易脱落。横切面简图见图 1-b-D。其中较有代表性的 G23 与对照品指纹图谱对比见图 1-a-D。此类药材原植物的拉丁名也待进一步鉴定。

3 讨论

本实验建立了骨碎补药材的 HPLC 指纹图谱,相对于已有的图谱^[4,8]分离度更好、指纹性更强,且指认了 5 个共有峰相应的指标成分:原儿茶酸、4-*O*- β -D 葡萄糖基反式咖啡酸、对羟基苯甲酸、新北美圣草苷、柚皮苷。该方法简便、快速,可用于骨碎补药材的质量评价。

本实验测试了购自全国 15 个省市的 33 批骨碎补药材,基本反映了目前市售骨碎补药材的混用现状。研究结果发现目前骨碎补药材商品的质量差异显著,亟待建立简便、可靠的鉴别方法。本研究将骨碎补药材的 HPLC 指纹图谱与其性状鉴别特征相

关联, 将 33 批药材归为 4 类, 其中 A 类 14 份药材的化学组成及性状特征均符合《中国药典》的规定, 来源于正品槲蕨。B 类 8 批药材因性状及化学组成与正品均有显著差异, 尤其是基本不含有主要成分柚皮苷, 药材的横断面也以有两个弯月形维管束作为明显的鉴别特征。C 类及 D 类药材的情况比较复杂, 其药材性状与正品相近, 但化学组成差异十分明显, 其原植物尚待进一步鉴定。由于 B、C、D 类药材不含柚皮苷, 采用《中国药典》2010 年版相应的鉴别及定量测定方法完全可以与正品区分。

骨碎补药材一般需经炮制后制成饮片入药, 炮制过程对药材有效成分的影响是中药质量控制必不可少的一个环节, 值得深入探讨。本实验所建立的骨碎补 HPLC 指纹图谱亦可用于此类研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010
- [2] 周铜水, 周荣汉. 骨碎补类生药商品调查和性状鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 1993, 18 (12): 710.
- [3] 高 颖, 房德敏. 骨碎补黄酮类化合物的研究进展与开发前景 [J]. 中草药, 2009, 40 (2): 323-326.
- [4] 李晓红, 熊志立, 虞明阳, 等. 基于主成分分析的骨碎补药材乙醇和环己烷提取物的高效液相色谱指纹图谱及指标成分的定量分析 [J]. 色谱, 2009, 27(4): 453-457.
- [5] 梁永红, 叶 敏, 张灵芝, 等. 骨碎补中的两个新酚酸类化合物 [J]. 药学学报, 2010, 45(7): 72-76.
- [6] 梁永红, 叶 敏, 韩 健, 等. 骨碎补的木脂素和黄酮类成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 25-30.
- [7] 毛菊敏, 李丽香. 骨碎补的真伪优劣鉴别 [J]. 中草药, 2004, 35 (9): 111-112.
- [8] 李遇伯, 孟繁浩, 潘晓峰, 等. HPLC 同时测定骨碎补药材中新北美圣草苷和柚皮苷的含量 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26 (6): 808-810.

欢迎订阅

Chinese Herbal Medicines (CHM)

我国第一份中药专业的英文期刊——*Chinese Herbal Medicines* (CHM) (《中草药》英文版) 经国家新闻出版总署 (新出综合[2008]1343 号文件) 批准, 国内统一连续出版号为: CN12—1410/R, 已于 2009 年 10 月正式创刊。

CHM 由天津药物研究院和中国医学科学院药用植物研究所主办, 天津中草药杂志社出版。中国工程院院士、中国医学科学院药用植物研究所名誉所长肖培根教授担任主编; 中国工程院院士、天津药物研究院刘昌孝研究员, 天津药物研究院院长汤立达研究员, 中国医学科学院药用植物研究所所长陈士林研究员共同担任副主编; 天津药物研究院医药信息中心主任、《中草药》杂志执行主编陈常青研究员担任编辑部主任。

办刊宗旨 以高起点、国际化为特点, 继承和发扬祖国医药学遗产, 报道和反映中草药研究最新进展, 宣扬我国中草药的传统特色, 加强与世界各国在传统药物研究的经验交流, 在中医和西医、传统与现代、东方与西方之间架起一座理解和沟通的桥梁, 促进中药现代化、国际化。

主要栏目 综述与述评、论著、快报、简报、文摘、信息和国际动态、人物介绍、来信、书评等栏目。

读者对象 国内外从事中医药研究、管理、监督、检验和临床的专业技术人员。

CHM 邀请相关领域的院士和国内外知名专家加盟, 组建一支国际化、高水平、精干的编委会队伍 (第一届编辑委员会由 49 位专家组成, 其中院士 10 名, 国外编委 19 名)。吸引国内外高质量的稿件, 提高期刊的学术质量; 坚持按照国际标准编排, 加强刊物规范化和标准化, 充分利用计算机、网络技术和英语, 加强与国际知名科技期刊的交流合作; 充分发挥中医药特色, 争取在较短时间内进入国际最著名的检索系统——美国科学引文索引 (SCI), 把 CHM 办成国际知名期刊之一。

欢迎广大作者踊跃投稿! 欢迎广大读者积极订阅! 自办发行, 直接与编辑部订阅!

本刊已正式开通网上在线投稿系统。欢迎投稿、欢迎订阅! 网址: www.tiprpress.com

Chinese Herbal Medicines 编辑部

天津编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号

邮编: 300193

E-mail: chm@tiprpress.com

Tel: (022)27474913

Fax: (022)23006821

开户银行: 兴业银行天津南开支行 账号: 44114010010081504 户名: 天津中草药杂志社

北京编辑部

地址: 北京市海淀区马连洼北路 151 号

邮编: 100193

E-mail: chm@tiprpress.com

Tel: (010)62894436

Fax: (010)62894436