

基于水溶性成分指纹图谱与含量测定的浙贝母不同产地加工品种的质量评价研究

叶宇^{1,2}, 唐瑞^{1,2,3}, 陈好恬^{1,2}, 竹炳^{1,2}, 陈磊^{1,2}, 王帅涛^{1,2}, 方可儿^{1,2}, 葛卫红^{1,3,4*}, 杜伟锋^{1,2,3,4*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402
2. 浙江中医药大学中药炮制技术研究中心, 浙江 杭州 311401
3. 浙江中医药大学(淳安千岛湖)研究院有限公司, 浙江 杭州 311401
4. 浙江中医药大学中药饮片有限公司, 浙江 杭州 311401

摘要: 目的 建立不同产地加工品种浙贝母 *Fritillaria thunbergii* 水溶性成分的 HPLC 指纹图谱, 对不同产地的浙贝片和灰贝的质量进行评价。方法 采用 Inertsil ODS-SP-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 甲醇 (A)-水 (B) 为流动相进行梯度洗脱; 检测波长 260 nm, 柱温 25 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 15 μL。建立 HPLC 指纹图谱并分析相似度, 结合对照品对比指认化学成分并进行定量测定, 采用聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal components analysis, PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 评价浙贝母不同产地加工品种浙贝片和灰贝质量。结果 浙贝片和灰贝的指纹图谱共匹配了 15 个共有峰, 指认了其中 10 个成分, 分别为峰 3 (尿嘧啶)、峰 5 (次黄嘌呤)、峰 6 (鸟嘌呤)、峰 8 (胸腺嘧啶)、峰 9 (肌苷)、峰 10 (鸟苷)、峰 11 (腺嘌呤)、峰 12 (胸苷)、峰 14 (腺苷)、峰 15 (2-脱氧腺苷), 进一步采用 HCA、PCA、OPLS-DA 对 15 个共有峰峰面积进行分析, 结果均能将浙贝片与灰贝很好的区分, 以 VIP>1 为指标共出 8 个贡献率较大的差异性成分, 分别为峰 3、7、10、5、12、14、6、8。结论 建立的浙贝片和灰贝水溶性成分的指纹图谱和多成分含量测定方法操作简便, 且重复性好, 可用于浙贝母不同产地加工方式的质量评价及质量控制。

关键词: 浙贝片; 灰贝; 指纹图谱; 水溶性成分; 尿嘧啶; 次黄嘌呤; 鸟嘌呤; 胸腺嘧啶; 肌苷; 鸟苷; 腺嘌呤; 胸苷; 腺苷; 2-脱氧腺苷。

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)05-1877-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.05.024

Quality evaluation of processed *Fritillariae thunbergii* from different origins based on water-soluble components fingerprint and content determination

YE Yu^{1,2}, TANG Rui^{1,2,3}, CHEN Yutian^{1,2}, ZHU Bing^{1,2}, CHEN Lei^{1,2}, WANG Shuaitao^{1,2}, FANG Keer^{1,2}, GE Weihong^{1,3,4}, DU Weifeng^{1,2,3,4}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China
2. Research Center of TCM Processing Technology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311401, China
3. Zhejiang Chinese Medical University (Chun'an Qiandao Lake) Research Institute Co., Ltd., Hangzhou 311401, China
4. Zhejiang Chinese Medical University Chinese Medicine Yinpian Co., Ltd., Hangzhou 311401, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of water-soluble components for different habitat-processed products of *Fritillaria thunbergii*, and evaluate the quality of *F. thunbergii* piece and Huibe from different origins. **Methods** Inertsil ODS-SP-

收稿日期: 2025-10-02

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LTGN23H280001); 杭州市自然科学基金项目 (2024SZRYBC200002); 杭州市农业与社会发展科研重点项目 (202204A06); 宁波市“科技创新 2025 重大专项” (2020Z089)

作者简介: 叶宇 (2001—), 男, 浙江台州人, 硕士研究生, 从事中药药理与新产品开发研究。Tel: 13858686093

E-mail: yeyutaizhou@126.com

*通信作者: 葛卫红 (1969—), 男, 浙江台州人, 教授, 从事中药药理与新产品开发研究。Tel: (0571)87195895

E-mail: geweihong@hotmail.com

杜伟锋 (1984—), 男, 河北任县人, 副研究员, 从事中药炮制及质量控制研究。Tel: (0571)87195895

E-mail: duweifeng_200158@sohu.com

C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) was used with methanol (A)-water (B) as mobile phase for gradient elution. The detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 25 °C, the volume flow rate was 1.0 mL/min, and the injection volume was 15 μL. The HPLC fingerprint was established and the similarity was analyzed. The chemical constituents were identified and quantitatively determined by comparing with the reference substances. Hierarchical cluster analysis (HCA), principal components analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discrimination analysis (OPLS-DA) were used to evaluate the quality of *F. thunbergii* from different producing areas. **Results** A total of 15 common peaks were matched in the fingerprints of *F. thunbergii* piece and Huibei, and ten components were identified including peak 3-uracil, peak 5-hypoxanthine, peak 6-guanine, peak 8-thymine, peak 9-inosine, peak 10-guanosine, peak 11-adenine, peak 12-thymidine, peak 14-adenosine and peak 15-2-deoxyadenosine. The areas of 15 common peaks were further analyzed by HCA, PCA and OPLS-DA. The results can distinguish *F. thunbergii* piece and Huibei well. With VIP > 1 as the index, a total of eight differential components with large contribution rate were obtained, which were peak 3,7,10,5,12,14,6 and 8. **Conclusion** The established fingerprint and multi-component content determination methods of water-soluble components of *F. thunbergii* piece and Huibei are simple and reproducible, and can be used for the quality evaluation and quality control of different processing methods of *F. thunbergii* from different producing areas.

Keywords: *Fritillariae thunbergii* piece; Huibei; fingerprint; water-soluble components; uracil; hypoxanthine; guanine; thymine; inosine; guanosine; adenine; thymidine; adenosine; 2-deoxyadenosine

浙贝母为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq.的干燥鳞茎,是浙江省著名道地药材“浙八味”之一,种植面积占全国的90%左右。浙贝母具有化痰止咳、清热散结的功效^[1],主要成分包括生物碱类、水溶性成分、皂苷类等^[2],常用于止咳化痰^[3-5]、抗炎^[6-8]、抗肿瘤^[9-10]等。新鲜浙贝母鳞茎富含水分,采挖后若不及时进行产地加工处理,极易腐烂,从而影响药材的品质并造成损耗。因此,产地加工是保证浙贝母质量的关键步骤。《中国药典》2025年版收载的浙贝母产地加工方式主要是鲜切片法和粉吸法,分别制得浙贝片和灰贝,二者在形态结构上存在较大差异。结合大量的文献查阅及走访调查显示,灰贝的加工方式是浙江省特色产地加工方式之一,但加工工艺尚不规范,相关质量评价研究较少。

本研究基于前期的工艺规范化研究,确定了灰贝的最佳工艺条件。随后,收集了不同产地的新鲜浙贝母,同一批样品分别加工成浙贝片和灰贝。尽管目前暂未有浙贝母中水溶性成分与药理活性成分的研究报道,但课题组先前研究中,通过将浙贝片与灰贝的水煎液灌服小鼠,发现二者均展现出良好的止咳化痰的效果。通过 HPLC-DAD 技术分析比较浙贝片和灰贝的水煎液与供试品溶液,结果显示二者的水煎液与供试品溶液图谱均一致,这表明水溶性成分在止咳化痰方面发挥着重要作用。鉴于浙贝母药材在临床上主要采用水煎液剂型,推测水溶性成分与浙贝母药理活性成分密切相关。因此,把控浙贝片与灰贝中水溶性成分的质量尤为重要。本研究对浙贝片和灰贝的水溶性 HPLC 指纹图谱进

行研究,建立了二者水溶性成分的含量测定方法;同时,结合多元统计分析方法进行综合评价,旨在识别差异性成分,为浙贝片和灰贝的质量评价研究提供参考,为后续药效实验提供物质基础。

1 材料

1.1 仪器

U3000 高效液相色谱仪 (ThermoFisher, 美国) 配置包括四元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、恒温柱温箱、变色龙色谱数据工作站; NT-xs105 十万分之一电子天平 (Mettler Toledo 公司, 瑞典); 华兴 HX-T 型电子秤 (杭州三里亭电子秤行); KQ-500DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

尿嘧啶 (批号 RZ9658M334, 质量分数 98.0%)、胸腺嘧啶 (批号 RZ2576M450, 质量分数 99.0%)、鸟嘌呤 (批号 RZ0359M651, 质量分数 98.0%) 购自上海瑞永生物科技有限公司; 肌苷 (批号 140669-201305, 质量分数 99.1%)、胸苷 (批号 101215-201401, 质量分数 98.0%)、鸟苷 (批号 111977-201501, 质量分数 93.6%) 购自中国食品药品检定研究院; 2-脱氧腺苷 (批号 200054-201905, 质量分数 98.0%) 购自上海鸿永生物科技有限公司; 次黄嘌呤 (批号 DSTDC010001, 质量分数 98.0%)、腺嘌呤 (批号 DSTDP001301, 质量分数 98.0%)、腺苷 (批号 DSTDX004701, 质量分数 98.0%) 购自成都德思特生物技术有限公司。甲醇 (Tedia 公司, 美国) 为色谱纯; 购自广东光华科技股份有限公司; 纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。

1.3 药材

新鲜浙贝母从不同地区农户处采收而来, 共 18 批样品, 具体信息见表 1, 样品均由浙江中医药大学葛卫红教授鉴定来源为百合科贝母属植物浙贝母 *F. thunbergii* Miq. 的鳞茎, 将每批样品分别加工成浙贝片 (ZB) 和灰贝 (ML)。浙贝片由新鲜贝母切片晾干而成; 灰贝样品为浙江省宁波市海曙区灰

贝加工处用新鲜贝母加工而成, 加工工艺按照前期课题组筛选的最优工艺加工, 即取新鲜浙贝母 20 kg, 大于 2.5 cm 的掰开, 小于 2.5 cm 的不掰, 洗净, 撞破皮 4 min, 加入过 100 目 2% 煨牡蛎粉, 混匀 7 min, 闷制 6 h, 晒干。样品均保存于浙江中医药大学中药饮片有限公司药材室中。浙贝片和灰贝样品如图 1 所示。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

序号	编号	来源	收集日期
1	PK	浙江省金华市磐安县仁川镇磐康加工点	2023-05-11
2	XZ	浙江省宁波市象山县西周镇官山村	2023-05-11
3	YJ	浙江省宁波市海曙区鄞江镇悬慈村	2023-05-14
4	ZS	浙江省宁波市海曙区章水镇	2023-05-14
5	YC	江苏省盐城市东台市新街镇	2023-05-19
6	QT	浙江省丽水市青田县	2023-05-19
7	FS	浙江省金华市磐安县仁川镇方山村	2023-05-23
8	LP	浙江省金华市磐安县仁川镇柳坡村	2023-05-23
9	YZ	浙江省金华市磐安县仁川镇洋庄村	2023-05-23
10	XW	浙江省金华市磐安县新渥镇大树下加工点	2023-05-23
11	LS	浙江省金华市磐安县冷水镇朱山村	2023-05-23
12	CX	浙江省金华市磐安县新渥镇祠下村	2023-05-23
13	WK	浙江省金华市东阳市马宅镇坞口村	2023-05-23
14	YQT	浙江省丽水市缙云县壶镇镇杨桥头村	2023-05-23
15	HM	江苏省南通市海门区	2023-05-23
16	XY	浙江省金华市磐安县冷水镇泗岩村	2023-05-29
17	QX	浙江省金华市东阳市千祥镇	2023-05-29
18	QC	浙江省丽水市缙云县壶镇镇下潜村	2023-06-05

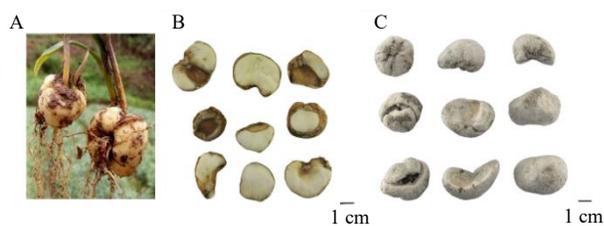


图 1 新鲜浙贝母 (A)、浙贝片 (B) 和灰贝 (C) 样品
Fig. 1 Fresh *F. thunbergii* (A), *F. thunbergii* piece (B) and Huibei (C) samples

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称定适量的尿嘧啶、次黄嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、肌苷、鸟苷、腺嘌呤、胸苷、腺苷、2-脱氧腺苷, 用 10% 的甲醇溶液溶解, 分别配制成质量浓度为 28.995、23.520、130.732、23.276、27.913、

20.717、6.261、29.999、22.562、29.454 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取浙贝片、灰贝粉末 (过四号筛) 约 2 g, 精密称定, 置烧瓶中, 加蒸馏水 40 mL, 称定质量, 混匀后超声 30 min, 放冷, 再次称定质量, 用蒸馏水补足质量, 滤过, 取续滤液, 摇匀过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-SP-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为甲醇 (A)-水 (B), 梯度洗脱 (0~7 min, 1%~11% A; 7~11 min, 11% A; 11~15 min, 11%~15% A; 15~20 min, 15%~20% A; 20~25 min, 20% A), 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 260 nm; 进样量 15 μL 。

2.4 指纹图谱建立及相似度评价

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一批供试品溶液 (MLXW), 按“2.3”项色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。以尿嘧啶为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD 值均 $\leq 2\%$, 相对峰面积 RSD 值均 $\leq 3\%$, 指纹图谱相似度大于 0.9, 表明仪器精密度良好, 符合实验要求。

2.4.2 重复性试验 取同一样品 6 份 (MLXW), 平行制备供试品溶液, 按“2.3”项色谱条件进样, 记录色谱图, 以尿嘧啶为参照峰, 计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD 值均 $\leq 2\%$, 相对峰面积 RSD 值均 $\leq 3\%$, 指纹图谱相似度大于 0.9, 表明方法重复性良好, 符合实验要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一批供试品溶液 (MLXW), 按“2.3”项色谱条件, 分别在 0、5、10、15、20、25 h 进样, 记录色谱图, 以尿嘧啶为参照峰, 计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 值均 $\leq 2\%$, 相对峰面积 RSD 值均 $\leq 3\%$, 指纹图谱相似度大于 0.9, 表明供试品溶液在 25 h 内稳定, 符合实验要求。

2.4.4 指纹图谱的建立 采集浙贝片、灰贝样品的 HPLC-DAD 谱图, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 建立各样品的指纹图谱以及各自的共有模式图谱。对浙贝片、灰贝的色谱峰进行相应编号, 共标定了 15 个共有峰。经与对照品比对, 指认出 10 个成分, 结果见图 2、3。

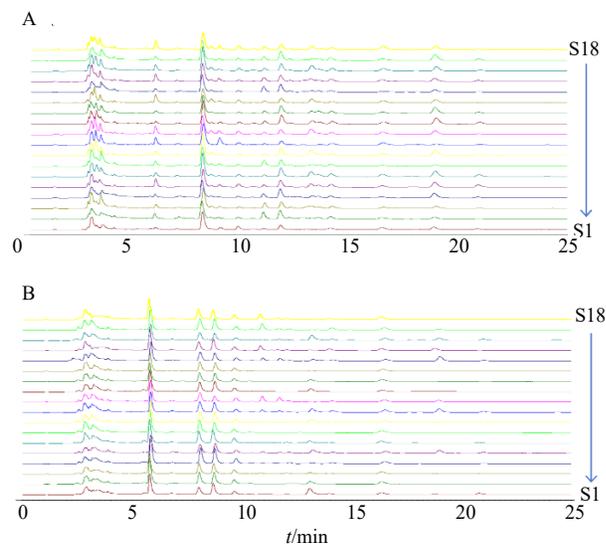
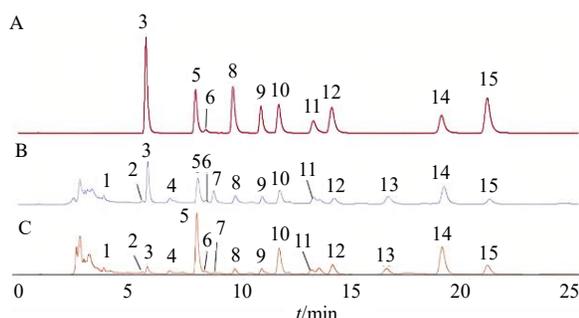


图 2 浙贝片 (A) 和灰贝 (B) 的 HPLC 指纹图谱
Fig. 2 HPLC fingerprints of *F. thunbergii* piece (A) and Huibei (B)



3-尿嘧啶; 5-次黄嘌呤; 6-鸟嘌呤; 8-胸腺嘧啶; 9-肌苷; 10-鸟苷; 11-腺嘌呤; 12-胸苷; 14-腺苷; 15-2-脱氧腺苷。
3-uracil; 5-hypoxanthine; 6-guanine; 8-thymine; 9-inosine; 10-guanosine; 11-adenine; 12-thymidine; 14-adenosine; 15-2-deoxyadenosine.

图 3 混合对照品 (A) 及浙贝片 (B)、灰贝 (C) 共有模式图谱

Fig. 3 Common pattern chromatograms and of mixed reference substances (A), *F. thunbergii* piece (B) and Huibei (C)

2.4.5 指纹图谱相似度评价 18 批浙贝片及 18 批灰贝色谱图分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”, 分别以 ZBXW 和 MLXW 为参照图谱, 采用多点校正后进行全峰匹配 (时间窗为 0.1 min), 用平均数法生成指纹图谱, 进行相似度评价, 结果见表 2、3, 18 批浙贝片相似度均 ≥ 0.9 , 18 批灰贝相似度为 0.804~0.971, 其中 14 批相似度均 > 0.9 , 说明不同批次的浙贝片和灰贝同一加工方式下质量较接近, 相似度较高, 建立的指纹图谱具有代表性。将 18 批浙贝片和灰贝色谱图同时导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”中进行相似度评价, 以 MLXW 为参照图谱, 相似度结果见表 4, 结果为 0.732~0.904, 只有 1 批样品大于 0.9, 有 8 批样品相似度小于 0.8, 说明浙贝片和灰贝的指纹图谱之间存在差异。

表 2 浙贝片的相似度评价

Table 2 Similarity evaluation of <i>F. thunbergii</i> piece			
编号	相似度	编号	相似度
ZBPK	0.954	ZBXW	0.905
ZBXZ	0.957	ZBLS	0.972
ZBYJ	0.944	ZBCX	0.958
ZBZS	0.953	ZBWK	0.916
ZBYC	0.962	ZBYQT	0.969
ZBQT	0.980	ZBHM	0.970
ZBFS	0.935	ZBXY	0.960
ZBLP	0.950	ZBQX	0.963
ZBYZ	0.900	ZBQC	0.934

表3 灰贝的相似度评价

Table 3 Similarity evaluation of Huibei

编号	相似度	编号	相似度
MLPK	0.915	MLXW	0.871
MLXZ	0.959	MLLS	0.961
MLYJ	0.964	MLCX	0.920
MLZS	0.953	MLWK	0.959
MLYC	0.914	MLYQT	0.804
MLQT	0.971	MLHM	0.923
MLFS	0.961	MLXY	0.859
MLLP	0.953	MLQX	0.915
MLYZ	0.890	MLQC	0.945

表4 浙贝片和灰贝的相似度评价

Table 4 Similarity evaluation of *F. thunbergii* piece and Huibei

编号	相似度	编号	相似度
ZBPK	0.826	MLPK	0.809
ZBXZ	0.848	MLXZ	0.865
ZBYJ	0.817	MLYJ	0.883
ZBZS	0.763	MLZS	0.851
ZBYC	0.877	MLYC	0.796
ZBQT	0.817	MLQT	0.868
ZBFS	0.835	MLFS	0.879
ZBLP	0.794	MLLP	0.857
ZBYZ	0.869	MLYZ	0.818
ZBXW	0.867	MLXW	0.811
ZBLS	0.779	MLLS	0.853
ZBCX	0.769	MLCX	0.820
ZBWK	0.871	MLWK	0.881
ZBYQT	0.822	MLYQT	0.732
ZBHM	0.896	MLHM	0.862
ZBXY	0.834	MLXY	0.772
ZBQX	0.796	MLQX	0.822
ZBQC	0.904	MLQC	0.895

表5 10个水溶性差异成分的线性关系结果

Table 5 Linear relationship results of ten water-soluble differential components

化合物	回归方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
尿嘧啶	$Y=0.7461X-0.0883$	0.9994	0.06~28.99	0.001	0.003
次黄嘌呤	$Y=0.6018X-0.0313$	0.9995	0.05~23.52	0.001	0.003
鸟嘌呤	$Y=0.0968X+0.1348$	0.9995	0.26~130.73	0.052	0.135
胸腺嘧啶	$Y=0.5648X+0.0017$	0.9996	0.05~28.28	0.002	0.005
肌苷	$Y=0.2818X+0.0092$	0.9996	0.06~27.91	0.001	0.002
鸟苷	$Y=0.2622X-0.0141$	0.9997	0.04~20.72	0.003	0.008
腺嘌呤	$Y=1.7670X-0.0293$	0.9994	0.01~6.26	0.002	0.005
胸苷	$Y=0.4337X+0.0182$	0.9996	0.06~29.99	0.001	0.003
腺苷	$Y=0.5696X+0.0124$	0.9995	0.05~22.56	0.005	0.014
2-脱氧腺苷	$Y=0.2873X+0.0048$	0.9996	0.06~29.45	0.003	0.009

2.5 水溶性成分含量测定

2.5.1 线性关系考察 精密吸取对照品溶液适量，用甲醇逐级稀释1、5、25、100、250、500、1000倍系列溶液后进样测定。以各成分峰面积(Y)对浓度(X)绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程。结果表明(表5)，在线性范围内，10个特征成分的R²均大于0.999。

2.5.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液，按“2.3”项色谱条件连续进样6次，计算各待测成分含量的RSD值，结果显示10个待测成分的RSD值均小于1.5%。

2.5.3 重复性试验 取同一样品6份(MLXW)，平行制备供试品溶液，按“2.3”项色谱条件进样，计算各待测成分质量分数的RSD值，结果显示10个待测成分的RSD值均小于2.5%。

2.5.4 稳定性试验 取供试品溶液(MLXW)，按“2.3”项色谱条件，分别在0、5、10、15、20、25h进样，计算各待测成分含量的RSD值，结果显示10个待测成分的RSD值均小于2.0%。

2.5.5 加样回收率试验 称取6份已测定含量灰贝样品，每份约2g，分别加入一定体积的混合对照品溶液，按“2.2”项下制备供试品溶液，按“2.3”项色谱条件进样，分别计算各成分的加样回收率。加样回收试验计算得尿嘧啶、次黄嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、肌苷、鸟苷、腺嘌呤、胸苷、腺苷、2-脱氧腺苷的加样回收率分别为100.16%、99.85%、97.94%、98.58%、100.06%、100.63%、96.63%、100.72%、101.05%和102.75%，且RSD值分别为2.63%、0.54%、2.10%、1.70%、1.86%、1.40%、2.27%、2.34%、2.49%、2.30%。

2.5.6 样品测定 按照样品含量测定法进行含量测定, 并采用标准曲线法计算得出最终含量, 结果如表 6、7 所示。测定结果显示浙贝片的 10 个水溶性成分总量为 0.506%~0.827%, 平均值为 0.697%; 灰贝的 10 个水溶性成分总量范围为 0.271%~0.584%, 平均值为 0.431%; 表明新鲜浙贝母经煅牡蛎壳加工成灰贝后, 水溶性成分整体含量下降。

将 18 批浙贝片和 18 批灰贝中 10 个水溶性成分的含量导入微生信科研绘图平台, 得到聚类热图, 见图 4 (颜色由红到蓝表示含量由高到低)。结果表明浙贝片与灰贝聚为 2 类, 其中肌苷、2-脱氧腺苷、腺苷、鸟嘌呤、胸苷、次黄嘌呤、鸟苷 7 个成分在浙贝片中含量较高; 灰贝中尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤这 3 个成分含量高于浙贝片。

表 6 18 批浙贝片差异性水溶性成分含量测定

Table 6 Determination of differential water-soluble components in 18 batches of *F. thunbergii* piece

批次	质量分数/%										总计
	尿嘧啶	次黄嘌呤	鸟嘌呤	胸腺嘧啶	肌苷	鸟苷	腺嘌呤	胸苷	腺苷	2-脱氧腺苷	
ZBPK	0.015	0.221	未检出	0.042	0.021	0.111	0.001	0.040	0.048	0.043	0.542
ZBXZ	0.035	0.199	0.015	0.021	0.155	0.223	0.004	0.050	0.042	0.015	0.759
ZBYJ	0.025	0.207	0.013	0.018	0.124	0.167	0.005	0.051	0.039	0.010	0.659
ZBZS	0.019	0.181	0.010	0.018	0.092	0.246	0.002	0.043	0.094	0.038	0.744
ZBYC	0.053	0.186	0.007	0.047	0.046	0.150	0.002	0.060	0.069	0.072	0.690
ZBQT	0.027	0.223	0.015	0.026	0.039	0.230	0.002	0.062	0.111	0.085	0.820
ZBFS	0.033	0.206	0.014	0.016	0.145	0.163	0.005	0.046	0.029	0.006	0.662
ZBLP	0.028	0.255	0.015	0.023	0.034	0.190	0.001	0.043	0.098	0.045	0.732
ZBYZ	0.033	0.239	0.021	0.025	0.029	0.134	0.001	0.047	0.064	0.046	0.640
ZBXW	0.052	0.190	0.030	0.039	0.047	0.128	0.002	0.042	0.073	0.027	0.630
ZBLS	0.014	0.226	0.007	0.021	0.067	0.236	0.002	0.057	0.112	0.069	0.810
ZBCX	0.018	0.183	0.010	0.013	0.053	0.207	0.002	0.042	0.122	0.049	0.700
ZBWK	0.066	0.139	0.029	0.036	0.039	0.111	0.001	0.025	0.048	0.011	0.506
ZBYQT	0.022	0.186	0.012	0.017	0.134	0.204	0.004	0.042	0.052	0.014	0.687
ZBHM	0.052	0.194	0.010	0.019	0.098	0.163	0.003	0.057	0.068	0.047	0.712
ZBXY	0.040	0.240	0.024	0.034	0.061	0.184	0.002	0.055	0.083	0.044	0.768
ZBQX	0.023	0.198	0.009	0.023	0.085	0.234	0.004	0.064	0.124	0.064	0.827
ZBQC	0.060	0.176	0.025	0.048	0.071	0.139	0.003	0.046	0.069	0.025	0.661
平均值	0.034	0.203	0.015	0.027	0.074	0.179	0.003	0.048	0.075	0.039	0.697

表 7 18 批灰贝差异性水溶性成分含量测定

Table 7 Determination of differential water-soluble components in 18 batches of Huibei

批次	质量分数/%										总计
	尿嘧啶	次黄嘌呤	鸟嘌呤	胸腺嘧啶	肌苷	鸟苷	腺嘌呤	胸苷	腺苷	2-脱氧腺苷	
MLPK	0.137	0.083	未检出	0.039	0.010	0.008	0.002	0.023	0.009	0.059	0.370
MLXZ	0.176	0.127	未检出	0.053	0.002	未检出	0.003	0.016	未检出	0.021	0.396
MLYJ	0.148	0.115	未检出	0.051	0.016	未检出	0.004	0.013	0.004	0.008	0.359
MLZS	0.186	0.157	未检出	0.063	0.010	0.027	0.005	0.029	0.050	0.012	0.540
MLYC	0.126	0.093	未检出	0.042	0.037	0.024	0.005	0.025	0.057	0.048	0.457
MLQT	0.153	0.121	未检出	0.059	未检出	0.022	0.004	0.014	未检出	0.026	0.400
MLFS	0.152	0.128	未检出	0.044	未检出	未检出	未检出	0.001	0.006	未检出	0.331
MLLP	0.147	0.124	未检出	0.043	0.017	0.012	0.003	0.023	0.009	0.031	0.410
MLYZ	0.134	0.107	未检出	0.032	0.046	0.012	0.004	0.041	0.062	0.046	0.484
MLXW	0.134	0.079	0.011	0.052	0.121	0.097	0.003	0.022	0.019	0.005	0.542
MLLS	0.144	0.101	未检出	0.046	未检出	未检出	未检出	0.003	未检出	0.024	0.317
MLCX	0.125	0.094	未检出	0.037	未检出	0.005	未检出	0.001	未检出	0.010	0.271
MLWK	0.128	0.104	未检出	0.040	未检出	未检出	未检出	0.001	0.004	0.013	0.289
MLYQT	0.131	0.093	未检出	0.039	0.072	0.064	0.002	0.025	0.082	0.033	0.541
MLHM	0.150	0.105	未检出	0.046	0.115	0.018	0.004	0.041	0.049	0.021	0.548
MLXY	0.110	0.081	0.006	0.034	0.014	0.021	0.002	0.021	0.041	0.052	0.383
MLQX	0.155	0.129	未检出	0.043	0.142	0.039	0.005	0.050	0.016	0.006	0.584
MLQC	0.146	0.118	未检出	0.059	0.127	0.036	0.005	0.031	0.005	0.006	0.533
平均值	0.143	0.109	0.001	0.046	0.040	0.021	0.003	0.021	0.023	0.023	0.431

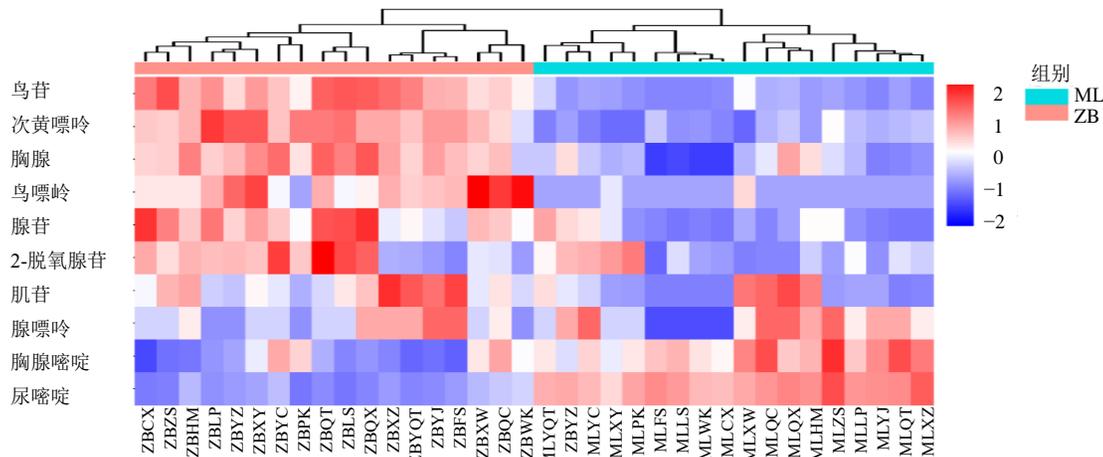


图4 聚类热图分析

Fig. 4 Cluster heatmap analysis

2.6 统计学分析

2.6.1 聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)

将 18 批浙贝片和 18 批灰贝的 15 个共有峰峰面积导

入 SIMCA 14.0 中进行 HCA, 见图 5。结果显示浙贝片聚为第 1 类, 灰贝聚为第 2 类。说明二者水溶性成分有明显差异, 可从 HCA 明显区分。

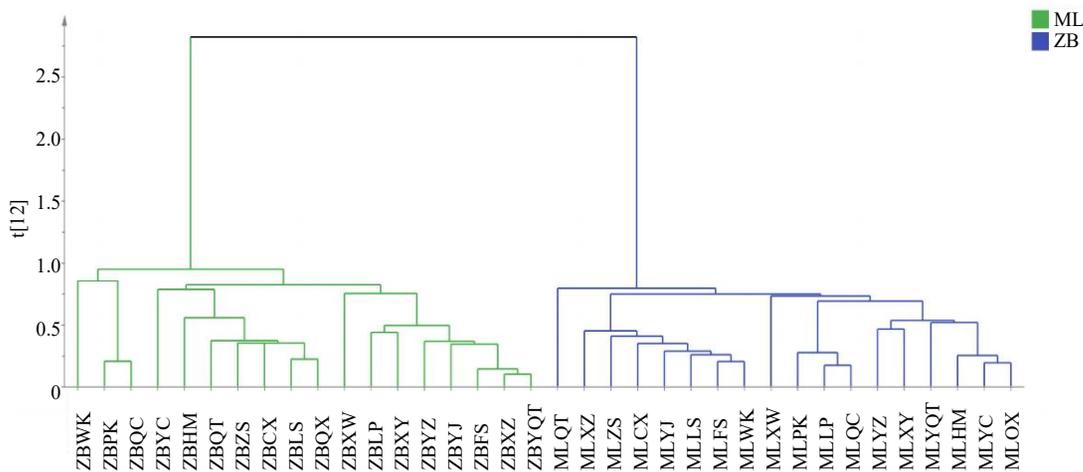


图5 浙贝片与灰贝的 HCA

Fig. 5 HCA of *F. thunbergii* piece and Huibei

2.6.2 主成分分析 (principal components analysis, PCA) 将 18 批浙贝片和 18 批灰贝的 15 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.0 中进行 PCA, 见图 6。在无监督的模式下, PCA 分析将浙贝片与灰贝划分为 2 类, 浙贝片样品分布于 2、3 象限, 灰贝样品分布于 1、4 象限, 二者可明显区分, 表明浙贝片与灰贝之间水溶性成分存在较大差异, 结果与 HCA 结果一致。

2.6.3 正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 将 18 批浙贝片和 18 批灰贝的 15 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.0 中进行 OPLS-DA, 见

图 7, 该模型的拟合参数 $R^2_x=0.668$, $R^2_y=0.968$, 预测参数 $Q^2=0.934$, 表明所建立的模型较稳定且预测能力较好。由图可知, 浙贝片与灰贝明显各自聚成一类, 这与上述 HCA 与 PCA 的结果一致。由图 8 所示, 将模型进行 200 次置换检验, 由图可知 R^2 和 Q^2 的回归线分别与左侧纵轴相交于 2 条回归线, 斜率均较大, 且左侧随机排列得到的 R^2 和 Q^2 随机值均小于右侧的原始值, 说明所建立的原模型有效、稳定, 且未出现过拟合, 可用于进行进一步的数据分析。为了进一步筛选出浙贝片和灰贝的水溶性成分中贡献较大的成分, 生成模型的 VIP 图, 见图 9, 以 $VIP>1$ 为标准, 结果

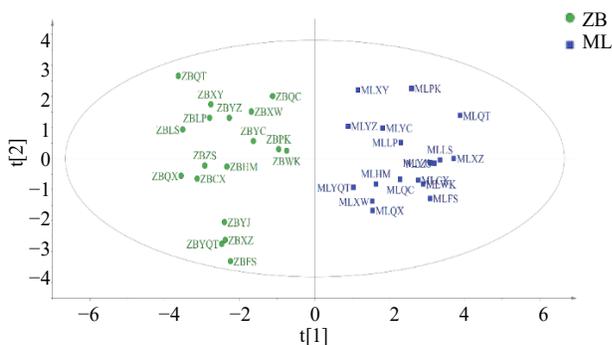


图 6 浙贝片与灰贝的 PCA 得分图

Fig. 6 PCA score plot of *F. thunbergii* piece and Huibei

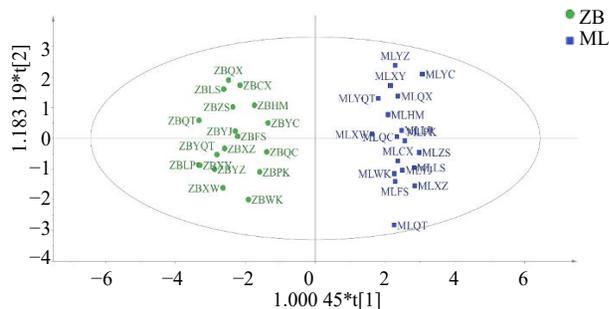


图 7 浙贝片与灰贝的 OPLS-DAD 得分图

Fig. 7 OPLS-DAD score plot of *F. thunbergii* piece and Huibei

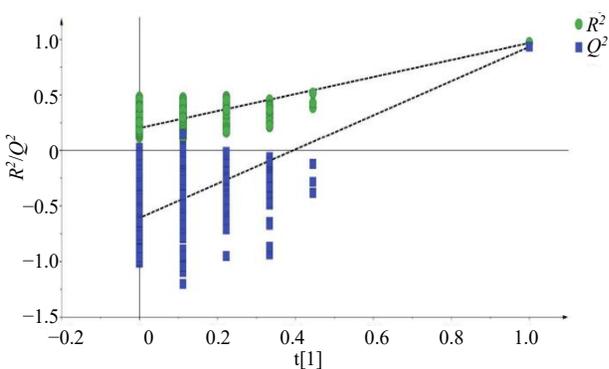


图 8 浙贝片与灰贝的 OPLS-DA 模型置换检验图

Fig. 8 OPLS-DA model replacement test diagram of *F. thunbergii* piece and Huibei

筛选出了 8 个差异性成分，分别为峰 3（尿嘧啶）、峰 7、峰 10（鸟苷）、峰 5（次黄嘌呤）、峰 12（胸苷）、峰 14（腺苷）、峰 6（鸟嘌呤）、峰 8（胸腺嘧啶），在 15 个共有峰中贡献值较大，具体 VIP 值见表 8。

3 讨论

近年来，浙贝母指纹图谱的研究主要集中在生物碱类成分上^[11-13]，而对不同产地加工方式下浙贝母水

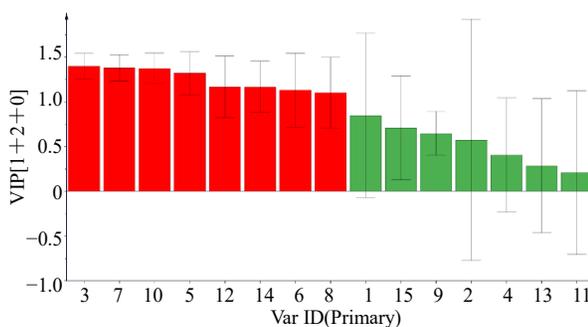


图 9 浙贝片与灰贝 OPLS-DA 的 VIP 图

Fig. 9 VIP diagram of *F. thunbergii* piece and Huibei OPLS-DA

表 8 浙贝片与灰贝的差异性成分 VIP 值

Table 8 VIP value of differential components between *F. thunbergii* piece and Huibei

成分	峰号	VIP 值
尿嘧啶	3	1.400 17
未知	7	1.378 98
鸟苷	10	1.376 60
次黄嘌呤	5	1.320 47
胸苷	12	1.170 61
腺苷	14	1.167 10
鸟嘌呤	6	1.131 82
胸腺嘧啶	8	1.102 10

溶性成分的指纹图谱的构建尚未有深入研究，仅有少数文献对浙贝母核苷类成分进行了测定^[14-16]。在临床应用中，浙贝母药材通常采用煎煮法，即将浙贝母药材加水煎煮取汁。因此水溶性成分可能与浙贝母的药效密切相关，把控浙贝片和灰贝中水溶性成分的质量尤为重要。

本研究对多种色谱条件进行考察，包括不同色谱柱（Agilent ZORBAX SB-C₁₈（250 mm×4.6 mm，5.0 μm）、Agilent Eclipse XDB-C₁₈（250 mm×4.6 mm，5.0 μm）和 Inertsil ODS-SP-C₁₈（250 mm×4.6 mm，5.0 μm）；4 种流动相系统（乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水、甲醇-0.1%磷酸水、甲醇-水），4 个检测波长（200、230、260、300 nm）和 3 种柱温（20、25、30 °C）。经过综合比较和优化，最终确定采用 Inertsil ODS-SP-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5.0 μm），甲醇（A）-水（B）为流动相，检测波长 260 nm，柱温 25 °C，体积流量 1.0

mL/min, 进样量 15 μ L。该条件下得到的色谱峰数量丰富, 峰型良好, 色谱峰分离度优异, 基线平稳。方法学验证也表明该方法高效、准确、特征性强、重复性和稳定性好, 适合用于指纹图谱的研究, 且能兼顾指标性成分的含量的测定, 为完善浙贝母的质量评价手段提供了技术支撑和科学依据。

在对浙贝片与灰贝水溶性成分进行分析时, 共检测到 15 个共有峰, 指认了其中 10 个峰, 即尿嘧啶、次黄嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、肌苷、鸟苷、腺嘌呤、胸苷、腺苷、2-脱氧腺苷。含量检测结果显示, 浙贝片的 10 个水溶性成分总量普遍高于灰贝, 表明浙贝母加工成灰贝后, 水溶性成分整体含量下降。聚类热图分析显示浙贝片与灰贝聚为 2 类, 浙贝片中肌苷、2-脱氧腺苷、腺苷、鸟嘌呤、胸苷、次黄嘌呤和鸟苷的含量较高, 而灰贝中尿嘧啶、胸腺嘧啶和腺嘌呤的含量则相对较高, 表明浙贝片和灰贝在药效上可能存在区别。尿嘧啶、鸟苷、次黄嘌呤、胸苷、腺苷、鸟嘌呤、胸腺嘧啶均为核苷类成分, 且来自 OPLS-DA 筛选的差异性成分。核苷类成分与免疫系统密切相关, 是许多抗肿瘤、抗病毒药物的中间体^[17-19], 作为浙贝母质量的评价指标具有一定的科学依据。

指纹图谱相似度评价显示, 18 批浙贝片相似度均超过 0.9, 18 批灰贝中 14 批相似度大于 0.9, 表明浙贝母在同一加工方式下质量较接近。而浙贝片和灰贝之间的指纹图谱差异显著, 推测与炮制加工方式的不同有关。进一步运用化学计量学方法, 包括 HCA、PCA 和 OPLS-DA, 三者均能有效区分浙贝片和灰贝。以变量重要性投影值大于 1 的标准, 从 15 个共有峰中筛选出 8 个贡献值较大的差异性成分, 可作为浙贝片和灰贝水溶性成分中的主要差异性成分, 指认了其中 7 个成分, 分别为峰 3 (尿嘧啶)、峰 10 (鸟苷)、峰 5 (次黄嘌呤)、峰 12 (胸苷)、峰 14 (腺苷)、峰 6 (鸟嘌呤)、峰 8 (胸腺嘧啶), 峰 7 有待后续进一步定性研究。

推测导致浙贝片与灰贝水溶性成分存在差异的原因可能包括: (1) 灰贝加工过程中添加了煅牡蛎粉, 称取同样质量的浙贝片和灰贝, 灰贝中的壳灰占比大, 有效成分含量降低; (2) 灰贝在加工中表皮会因碰撞而破损, 而表皮中有效成分含量较高, 导致有效成分的流失; (3) 加工过程中内在成分可能发生转化。

综上, 本研究不仅构建了二者的指纹图谱, 建立了浙贝母不同产地加工方式下浙贝片与灰贝的 10 种水溶性成分的测定方法, 验证方法稳定性和可靠性, 还筛选了潜在的差异性标志物。这些成果初步揭示了浙贝片与灰贝的水溶性成分的差异性, 为后续药效实验提供了物质研究基础, 同时也为浙贝母不同加工方式的质量评价提供了重要参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 304-305.
- [2] 孙禹, 梁伟. 浙贝母的化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 特产研究, 2022, 44(1): 87-92.
- [3] 杨泽敏, 王业, 吴宇涵, 等. 川贝母种质资源的表型多样性及综合评价 [J]. 中草药, 2025, 56(2): 635-646.
- [4] 王翰华, 陈雁虹, 姜雨辰. 浙贝母-知母药对的止咳、化痰及平喘作用研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6): 2474-2476.
- [5] Kim M, Nguyen D V, Heo Y, et al. Antiviral activity of *Fritillaria thunbergii* extract against human influenza virus H1N1 (PR8) *in vitro*, *in ovo* and *in vivo* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(2): 172-177.
- [6] 王翰华, 杨晓春, 崔明超, 等. 浙贝母花与宁海白枇杷花配伍的抗炎及抗菌作用 [J]. 中成药, 2018, 40(1): 46-50.
- [7] Kim J H, Yang W K, Lee S W, et al. Experimental study on anti-inflammatory, antitussive, and expectoration effects of *Fritillariae Thunbergii Bulbus* [J]. *J Int Korean Med*, 2020, 41(3): 339-349.
- [8] Zhou A Z, Li X D, Zou J, et al. Discovery of potential quality markers of *Fritillariae Thunbergii Bulbus* in pneumonia by combining UPLC-QTOF-MS, network pharmacology, and molecular docking [J]. *Mol Divers*, 2024, 28(2): 787-804.
- [9] 刘韦璠, 邹富胜, 李东华. 浙贝母抑制耐药肿瘤 P 糖蛋白的活性组分研究 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2015, 21(4): 379-382.
- [10] Rafiei A, Kardan M, Yazdani Z, et al. Cytotoxic effect of methanolic extracts of *Fritillaria imperialis* bulbs and *Eryngium caucasicum* leaves on hepatoma and colon cancer cells [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2019, 9(8): 353.
- [11] 程斌, 周爱珍, 彭昕, 等. 浙贝母 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱的建立及其抗炎质量标志物的分析 [J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2129-2135.

- [12] 梁月仪, 李振雨, 吕渭升, 等. 基于 HPLC-ELSD 指纹图谱和多成分定量的浙贝母与湖北贝母质量差异研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(7): 1101-1111.
- [13] 朱广磊, 睢宁, 张春椿, 等. 不同产地浙贝母药材 HPLC-ELSD 指纹图谱的研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(5): 352-361.
- [14] 赵顺鑫, 周浓, 杨琳琳, 等. 不同产地浙贝母中 10 种核苷类成分含量分析 [J]. 中国野生植物资源, 2020, 39(10): 35-40.
- [15] 李婷婷, 徐胜, 毕健丽, 等. 基于化学计量学对浙贝母组织中核苷化合物测定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(8): 686-695.
- [16] 唐瑞, 杜伟锋, 孙贝贝, 等. 基于多指标成分含量结合化学计量学评价不同产地浙贝母质量 [J]. 中成药, 2023, 45(7): 2317-2322.
- [17] 刘璐, 盛唯瑾, 刘秀均. 抗肿瘤核苷类似物研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2024, 19(2): 151-154.
- [18] 刁小川, 韩梅芳. 常用核苷类似物对乙型肝炎病毒相关慢加急性肝衰竭患者的疗效及安全性比较 [J]. 内科急危重症杂志, 2024, 30(3): 264-266.
- [19] 杨松霖. 嘌呤核苷类抗新冠病毒药物的构效关系和修饰合成研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2024.

[责任编辑 时圣明]