

5 种贝母的弱极性成分 HPLC 指纹图谱研究

李斌, 于海英, 程秀民*, 周永妍, 汪淑峰
(山东大学药学院, 济南 250012)

[摘要] 目的: 建立 5 种贝母弱极性成分的 HPLC 指纹图谱, 以此鉴别贝母类药材, 并对不同种的贝母加以区分。方法: 以三相静态萃取法提取制备样品, 采用高效液相色谱法, 以乙腈-0.1% 磷酸为流动相进行梯度洗脱; 检测波长 250 nm; 记录时间 60 min; 以中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件分析图谱。结果: 建立了 5 种贝母弱极性成分的 HPLC 指纹图谱, 标定了 16 个共有指纹峰及各自的特有峰, 方法学考察符合指纹图谱技术要求。相似度计算表明, 5 种贝母弱极性成分的指纹图谱存在一定的差异。结论: 该实验建立的 HPLC 图分离度好、信息量大、基线平稳, 为 5 种贝母的鉴别和质量控制提供了可靠的分析方法。

[关键词] 贝母; HPLC; 指纹图谱; 相似度评价

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0054-04

Study the Low-polarity Parts of Five *Fritillaria* Species by HPLC Fingerprints

LI Bin, YU Hai-ying, CHENG Xiu-min*, ZHOU Yong-yan, WANG Shu-feng
(College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of five *Fritillaria* species according to the low-polarity for the identification. **Method:** Samples was prepared with static three-phase extraction, HPLC was used the gradient eluted solvert system composed of CH₃CN-0.1% H₃PO₄, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 250 nm. The HPLC fingerprints were evaluated by similarity evaluation system. **Result:** Published the fingerprints of five *Fritillaria* species, detemined 16 common peaks and special peaks of five *Fritillaria* species. The result of similarity indicated that differences exist in five *Fritillaries* species. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint has desirable accuracy, repeatability and stability, it can be used for one of the quality control of *Fritillaria* species.

[Key words] *Fritillaries*; HPLC; fingerprint; similarity evaluation

中药材贝母来源于百合科 Liliaceae 贝母属 *Fritillaria* 多种植物的鳞茎, 具有清热润肺、化痰止咳之功效。目前, 贝母属植物约有 50 余种, 40 余新变种及变型^[1], 药用者可分成 5 类: 川贝母类(川贝母、

暗紫贝母、甘肃贝母和梭砂贝母)、浙贝母类(浙贝母和东贝母)、平贝母、伊贝类(新疆贝母和伊犁贝母)和湖北贝母, 均为《中国药典》收载品。贝母种类繁多, 且种与种之间存在着药理作用的差异^[2]。因此, 亟需建立一种简单、可行的用于贝母种之间鉴别的方法, 保证贝母临床用药的安全可靠。笔者曾以液-液-液三相静态萃取 HPLC 指纹图谱对 5 种贝母亲水性成分进行了鉴别研究, 取得了满意的效果^[3]。但是, 贝母成分复杂, 仅以亲水性成分进行质量评价是不够的。因此, 在上述基础上, 又开展了 5 种贝母弱极性成分的指纹图谱研究, 实验结果良好, 为整体质量评价提供了进一步的信息支撑。

[收稿日期] 20100111(003)

[第一作者] 李斌, 女, 硕士研究生。Tel: (0531) 88380538, 15254195454, E-mail: sdulibin@126.com

[通讯作者] 程秀民, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中草药有效成分提取、中药色谱分析, Tel: (0531) 88380526, Fax: ((0531) 88382014, E-mail: minn@sdu.edu.cn

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪: G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1322A 在线脱气系统、G1316A 柱温箱、G1315A DAD 检测器; 安捷伦化学工作站; DZG-303A 超纯水器; AG135 电子分析天平; ULTRASONIC-28x 超声振荡器; LDZ5-2 离心机; BF2000 氮气吹干仪。乙腈为色谱纯(美国 Fisher Scientific), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。川贝母 *Bulbus Fritillariae unibracteatae*(1000-0301); 伊贝母 *Bulbus Fritillariae walujewii*(120929-200504); 湖北贝母 *Bulbus Fritillariae hupehensis*(0962-9903); 平贝母 *Bulbus Fritillariae ussuriensis*(924-200005); 浙贝母 *Bulbus Fritillariae thunbergii*(0972-9903), 均为中国药品生物制品检定所提供的药材对照品。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱为 SHIMADZU ODS 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 磷酸; 贝母弱极性组分的最佳色谱条件为: 流动相为 0.1% 磷酸(A)-乙腈(B), 梯度洗脱条件为 0~6 min(30% B, 0.5~0.5 mL·min⁻¹), 6~20 min(30%~50% B, 0.5~0.75 mL·min⁻¹), 20~30 min(50%~65% B, 0.75~0.75 mL·min⁻¹), 30~60 min(65% B, 0.75~0.75 mL·min⁻¹); 检测波长 250 nm 和 200~400 nm, 记录二维和三维图谱; 进样量 50 μL。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取贝母粉末约 300 mg, 分别置于 25 mL 量瓶中, 以 50% 乙醇超声提取 30 min, 离心(5 000 r·min⁻¹) 10 min, 取上清液。以二氯甲烷、上清液及环己烷各 20 mL 组成三相体系进行静态萃取。静置 24 h, 取下相(二氯甲烷层) 10 mL, 氮气吹干, 残渣以 1 mL 50% 乙醇溶解, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度实验 取 2.2 项下川贝母供试品溶液, 连续进样 5 次, 测定其 HPLC 指纹图谱。计算得各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.1%, 相对峰面积的 RSD < 3%, 符合指纹图谱技术要求。将图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版), 计算任意两图谱间的相似度 > 0.997。

2.3.2 重现性实验 取川贝母粉末 5 份, 按 2.2 项下制备供试品溶液, 分别进样。计算得各色谱峰相对保留时间 RSD < 0.04%, 相对峰面积 RSD < 3%,

符合指纹图谱技术要求。将图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版), 计算任意两样品间的相似度 > 0.986。

2.3.3 稳定性试验 取 2.2 项下制备的川贝母供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 16, 24 h 进样, 测定。计算得各色谱峰相对保留时间 RSD < 1.2%, 相对峰面积的 RSD < 3%, 符合指纹图谱技术要求。将图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版), 计算任意两图谱间的相似度 > 0.997。

2.4 5 种贝母药材弱极性成分指纹图谱的测定及分析

2.4.1 二维指纹图谱的测定及分析 按 2.2 项下制备供试品溶液, 测得 5 种贝母弱极性成分二维指纹图谱(图 1)。选择分离度较好, 且峰强度较大的共有峰 26 号峰作为参照峰, 分别求出各组分与其的相对保留时间及相对峰面积(表 1)。从二维指纹图谱可以看到, 5 种贝母弱极性成分中共有 16 个共有峰, 分别为 5, 7, 8, 10, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 号峰。

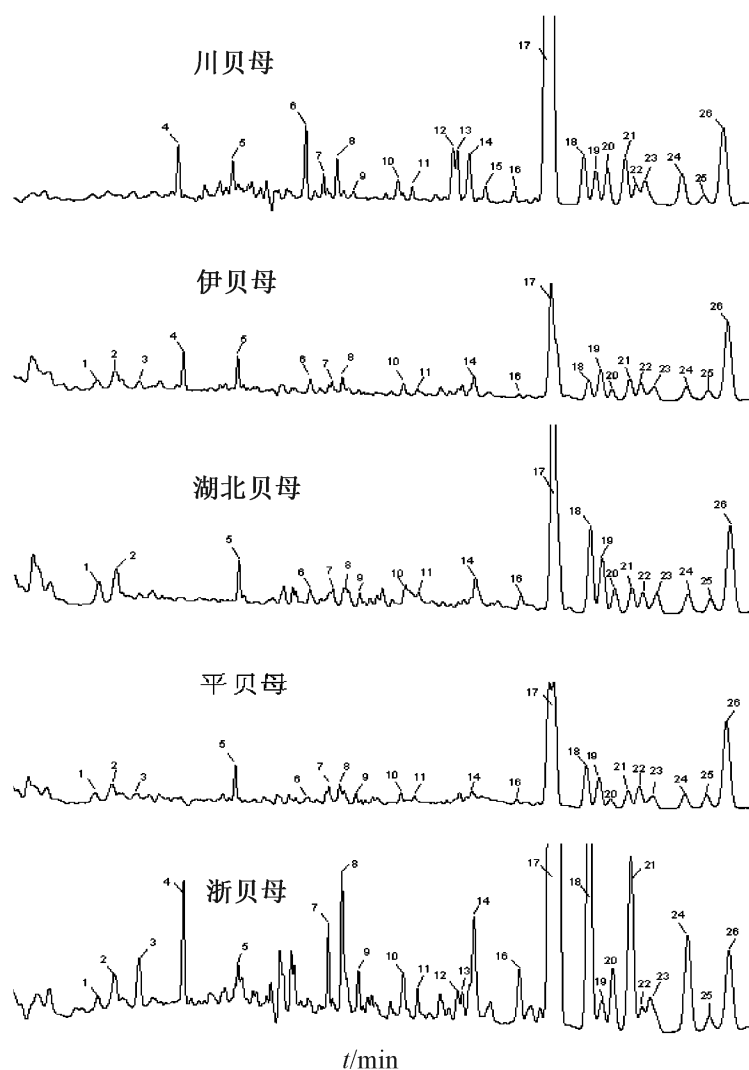


图 1 5 种贝母弱极性成分二维指纹图谱(8~40 min)

2.4.2 三维色谱图及数据分析 5 种贝母三维图谱中的特有峰以字母编号标示, 非特有峰未标示, 特有峰 t_R 以非特有峰 26 号峰为参照计算(图 1)。从图 2 中可以直观地看到 5 种贝母显著的鉴别特征及

表 1 5 种贝母弱极性成分二维图谱数据

峰号	川贝母		伊贝母		湖北贝母		平贝母		浙贝母	
	相对 <i>t</i>	相对 <i>A</i>	相对 <i>t</i>	相对 <i>A</i>	相对 <i>t</i>	相对 <i>A</i>	相对 <i>t</i>	相对 <i>A</i>	相对 <i>t</i>	相对 <i>A</i>
1	—	—	0.287	0.102	0.286	0.169	0.287	0.073	0.287	0.109
2	—	—	0.306	0.186	0.306	0.275	0.305	0.105	0.305	0.331
3	—	—	0.335	0.058	—	—	0.333	0.065	0.333	0.333
4	0.384	0.271	0.384	0.183	—	—	—	—	0.383	0.516
5	0.445	0.173	0.445	0.154	0.445	0.171	0.445	0.167	0.445	0.130
6	0.528	0.371	0.528	0.083	0.525	0.084	0.527	0.059	—	—
7	0.548	0.094	0.548	0.035	0.547	0.083	0.548	0.043	0.547	0.290
8	0.563	0.185	0.564	0.079	0.565	0.132	0.563	0.118	0.562	0.686
9	0.582	0.037	—	—	0.581	0.056	0.581	0.040	0.581	0.149
10	0.632	0.125	0.633	0.070	0.633	0.283	0.632	0.054	0.631	0.251
11	0.648	0.066	0.649	0.029	0.647	0.134	0.647	0.041	0.648	0.132
12	0.694	0.326	—	—	—	—	—	—	0.693	0.165
13	0.699	0.288	0.700	0.059	—	—	—	—	0.698	0.136
14	0.712	0.357	—	—	0.712	0.322	0.712	0.055	0.711	0.637
15	0.731	0.109	—	—	—	—	—	—	—	—
16	0.763	0.075	0.763	0.025	0.763	0.115	0.763	0.024	0.763	0.336
17	0.800	5.097	0.800	1.337	0.800	2.517	1.605	1.773	0.799	16.092
18	0.842	0.453	0.842	0.179	0.842	0.693	0.842	0.345	0.842	2.378
19	0.856	0.336	0.856	0.287	0.855	0.484	0.856	0.271	0.856	0.270
20	0.869	0.360	0.869	0.095	0.869	0.216	0.869	0.080	0.869	0.520
21	0.889	0.478	0.889	0.214	0.889	0.230	0.889	0.164	0.889	1.613
22	0.901	0.206	0.901	0.187	0.901	0.194	0.901	0.213	0.902	0.436
23	0.911	0.333	0.916	0.185	0.917	0.214	0.916	0.161	0.911	0.533
24	0.953	0.363	0.953	0.159	0.952	0.218	0.953	0.157	0.953	1.001
25	0.978	0.118	0.978	0.117	0.978	0.156	0.978	0.147	0.978	0.165
26	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

表 2 5 种贝母弱极性组分 HPLC 三维图谱特有峰光谱数据

样品	峰号	<i>t_R</i> / min	相对 <i>t_R</i>	<i>I</i>		<i>I</i>	
				max / (nm/mAU)	min / (nm/mAU)	max / (nm/mAU)	min / (nm/mAU)
川贝母	A	16.10	0.303	226/12.06	218/11.16	-	-
	C	18.29	0.345	326/10.01	266/3.27	-	-
	F	20.36	0.384	278/46.56	234/9.60	218/37.11	214/36.59
	K	28.03	0.528	282/6.90	266/4.97	234/48.68	206/19.28
	N	29.90	0.563	274/28.73	234/7.82	-	-
伊贝母	E	19.94	0.376	290/10.29	258/5.58	-	-
	Q	38.58	0.728	274/3.76	246/1.32	-	-
湖北贝母	I	25.66	0.483	310/4.34	294/3.96	278/7.06	258/4.07
	L	29.87	0.561	274/7.51	258/5.55	-	-
	O	33.57	0.632	258/7.79	254/6.95	250/7.27	242/6.95
	P	36.26	0.683	286/2.62	262/0.60	-	-
平贝母	D	18.87	0.355	326/7.50	302/5.60	286/6.32	254/4.21
	G	20.81	0.392	334/6.90	270/1.80	-	-
	H	23.95	0.451	338/4.08	294/2.47	-	-
浙贝母	B	17.68	0.333	末端吸收	-	-	-
	J	27.01	0.509	230/76.16	210/52.87	-	-
	M	29.86	0.562	274/99.90	222/27.26	-	-

其质量信息,如色谱峰的数量、峰光谱的形状及强度等。从表 2 中可以看到 5 种贝母特有色谱峰的数量各不相同;峰光谱的最大吸收和最小吸收波长以及

吸收强度等均存在显著差异。上述分析表明,三维图谱较二维图谱信息量大,鉴别能力和质量指标的量化能力更强,可用于贝母类药材专属性鉴别。

2.4.3 相似度计算结果 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)软件分析 5 种贝母的色谱指纹图谱,取共有峰 5, 7, 8, 10, 11, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 进行多点校正。相似度计算结果(表 3)表明 5 种贝母存在一定的差异。

表 3 5 种贝母弱极性组分 HPLC 图谱相似度计算结果

样品	川贝母	伊贝母	湖北贝母	平贝母	浙贝母
川贝母	1	0.824	0.859	0.877	0.839
伊贝母	0.824	1	0.95	0.818	0.815
湖北贝母	0.859	0.95	1	0.764	0.926
平贝母	0.877	0.818	0.764	1	0.588
浙贝母	0.839	0.815	0.926	0.588	1

3 讨论

3.1 相似度计算结果表明 5 种贝母各种间的差异有大小之分。如伊贝母与湖北贝母之间的相似度为 0.95,二者差异较小;而平贝母与浙贝母之间的相似度为 0.588,二者差异较大。

3.2 本实验采用 DAD 检测器,记录了 250 nm 处的二维图谱及 200 ~400 nm 间的全波长图谱(三维图谱)。二维图谱容易造成信号的漏检或无法在最大吸收处进行检测,而三维图谱对具紫外吸收的成分都能检出并显示每个色谱峰的光谱图。因此在采集二维图谱的同时采集了 5 种贝母的三维图谱,二者相互结合,准确地描述了 5 种贝母药材间的共性与差异,为其鉴别及归属做出正确判断。

3.3 本实验采用了三相静态萃取法^[4]提取贝母中的弱极性成分,实验过程中筛选了重轻两相所用的溶剂及萃取时间。实验结果表明采用二氯甲烷、环己烷作为重、轻两相萃取效果较佳。同时考察了萃取时间的影响,比较了不同萃取时间的色谱图,表明 24 h 内即可达到萃取平衡。

3.4 贝母来源植物种类多、商品药材比较复杂,加之贝母药材化学成分体系的复杂性和相近相似性,建立专属性 HPLC 鉴别方法比较困难。本文在成功采用液-液-液三相静态萃取 HPLC 法对 5 种贝母极性成分进行鉴别的实验基础上,以相似的方法分析 5 种贝母的弱极性成分,同样取得了满意的结果,为全面控制贝母类药材的质量提供可靠的依据。

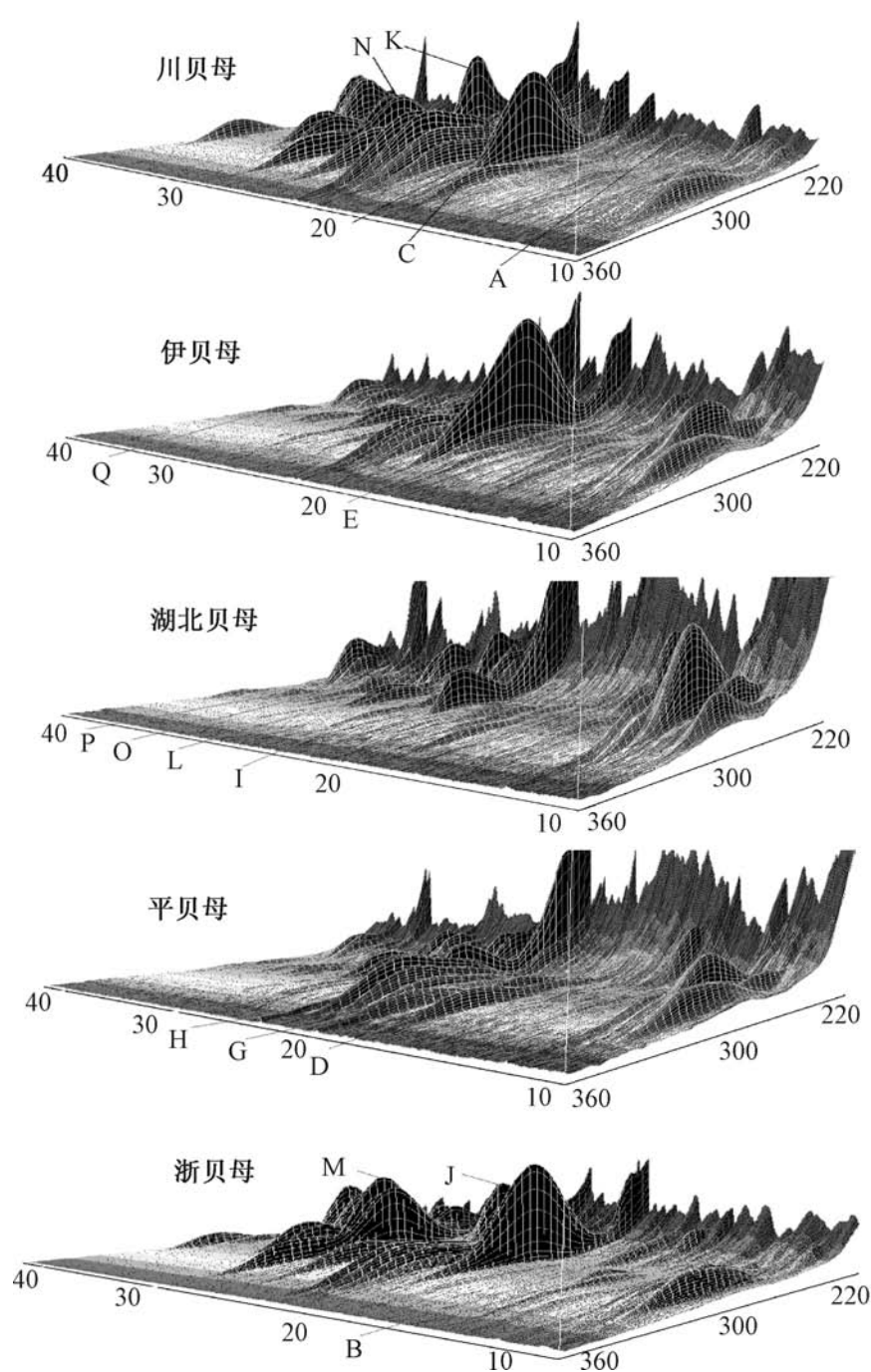


图 2 5 种贝母弱极性成分三维图谱

[参考文献]

- [1] 皮慧芳,吴继洲. 1980 年以来中药贝母新资源及其现代研究状况[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(4): 366.
- [2] 张勇慧,阮汉利,吴继洲. 贝母的药理作用研究概况[J]. 医药导报, 2003, 22(11): 797.
- [3] 于海英,程秀民,王晓坤,等. 三相静态萃取 HPLC 鉴别 5 种贝母的研究[J]. 中药材, 2008, 31(2): 210.
- [4] 王晓坤,程秀民,唐辉,等. 三相静态萃取高效液相色谱法鉴别人参、三七及西洋参[J]. 中国药业, 2007, 16(20): 30.

[责任编辑 邹晓翠]