



暗紫贝母水溶性成分 HPLC 指纹图谱研究

段宝忠^{1,3}, 陈士林¹, 魏大华², 黄林芳^{1*}, 王珍¹

(1. 中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100193;

2. 广州潘高寿药业股份有限公司, 广东 广州 511490;

3. 大理学院 药学院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的:建立暗紫贝母药材的水溶性成分 HPLC 指纹图谱。方法:采用 Zorbax SB-Aq C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇和水, 梯度洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 260 nm, 柱温为 25 °C。采用国家药典委员会出版的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版》软件, 对 11 批暗紫贝母药材进行指纹图谱分析。结果:11 批暗紫贝母药材中有 14 个共有峰, 指认了 9 个共有峰, 各峰分离度良好, 各批次暗紫贝母药材相似度均大于 0.970, 质量均一性好。结论:本方法具有良好的精密性、重复性、稳定性, 可用于暗紫贝母药材的质量综合评价。

[关键词] 暗紫贝母; 水溶性成分; HPLC; 指纹图谱

暗紫贝母为百合科贝母属植物暗紫贝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia 的干燥鳞茎, 为 2010 年版《中国药典》一部川贝母的基原植物之一。暗紫贝母主要分布于四川省若尔盖高原和川西高山峡谷东段, 包括四川阿坝州各县、甘孜州甘孜县以及青海久治、班玛等地, 生长于海拔 3 200 ~ 4 500 m 的草甸和灌丛中^[1], 其中以四川若尔盖县、松潘县等地所产“松贝”为最优的商品规格^[2-3]。暗紫贝母的化学成分包括生物碱、核苷、皂苷等成分, 其中水溶性成分主要是核苷类成分。近来研究表明, 贝母的水溶性成分具有抗炎、抑制血小板凝聚、降压、松弛平滑肌等作用^[4-6], 而贝母的抗炎作用能协同治疗呼吸道感染, 是贝母止咳化痰的药理学基础^[7]。暗紫贝母在民间传统用法是水煎剂, 探讨暗紫贝母药材的水溶性指纹图谱, 对考察目前市场上的暗紫贝母质量, 保证临床用药的稳定性和有效性具有一定意义。本实验采用 HPLC 法对 11 批暗紫贝母药材的水溶性指纹图谱进行了研究, 以期对暗紫贝母药材的质量控制提供参考依据。

1 材料

Waters 1525 HPLC 系统(Milford, MA, USA), 包括二元梯度泵、在线真空脱气机、自动进样器、恒温

柱箱、Waters 2487 双波长紫外检测器、Breeze 色谱工作站; Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, USA); KQ-400KDE 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); 1-14 离心机(Sigma); 1/10 万电子分析天平(Mettler, AB135-S)。色谱级甲醇、乙腈(Fisher Scientific, Fairlawn New Jersey), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

暗紫贝母药材信息见表 1。经中国医学科学院药用植物研究所陈士林教授鉴定为暗紫贝母 *F. unibracteata* 的干燥鳞茎, 凭证标本存放于中国医学科学院药用植物研究所资源中心。药材经烘干后粉碎, 过 80 目筛, 备用。尿嘧啶(批号 100469-200401, uracil), 腺苷(批号 110879-200202, adenosine), 肌苷(批号 110879-200202, inosine) 和尿苷(批号 120870-200608, uridine) 购于中国药品生物制品检定所; β-胸苷(批号 20070801, thymidine), 次黄嘌呤(批号 20080706, hypoxanthine), 胞苷(批号 20080103, cytidine) 购于天津奎青商贸有限公司; 2-脱氧腺苷(批号 16373-93, 2-deoxyadenosine) 购于北京化学试剂公司; 鸟苷(批号 G8250, guanosine), 腺嘌呤(批号 A8330, adenine) 购于北京索莱宝科技有限公司, 纯度均大于 98%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax-SB-Aq C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇(A)-水溶液(B); 梯度洗脱

[稿件编号] 20111010008

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81130069)

[通信作者] * 黄林芳, 副研究员, 博士, 研究方向为中药资源, Tel: (010)57833197, E-mail: lfhuang@implad.ac.cn



表 1 暗紫贝母样品的来源

Table 1 Origins of *Fritillaria unibracteata* samples

批号	产地或购买地	收集时间	规格
S1	四川省松潘县	2009-12	松贝
S2	四川省松潘县	2009-12	松贝
S3	四川省松潘县	2009-09	松贝
S4	四川省松潘县	2009-09	松贝
S5	四川省松潘县	2009-10	青贝
S6	湖南省邵东县(购)	2009-09	松贝
S7	河北省安国市(购)	2009-09	松贝
S8	四川省石渠县	2009-12	松贝
S9	四川省若尔盖县	2007-08	松贝
S10	广东省广州市(购)	2009-09	松贝
S11	四川省甘孜县	2009-12	青贝

0 ~ 10 min, 1% ~ 5% A; 10 ~ 15 min, 5% ~ 15% A; 15 ~ 20 min, 15% ~ 20% A; 20 ~ 40 min, 20% ~ 60% A; 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 260 nm; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取上述核苷类对照品适量,加水制成每 mL 含尿嘧啶 1.030 mg,胞苷 1.025 mg,尿苷 1.000 mg,次黄嘌呤 0.484 mg,肌苷 0.995 mg,鸟苷 1.075 mg,β-胸苷 1.130 mg,腺苷 1.150 mg,腺嘌呤 1.190 mg,2-脱氧腺苷 1.310 mg 的溶液,加水超声溶解,即得,分别精密吸取一定量各对照品溶液,置于 5 mL 量瓶中,稀释至刻度,混合均匀,得混合对照品储备液,备用。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取样品粉末 1.0 g,置 50 mL 锥形瓶中,精密加水 10 mL,混匀,称重,室温下超声提取 60 min(32 kHz),取出,放冷,补足失重,摇匀,倒入离心管中,离心 10 min(4 000 r · min⁻¹),取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

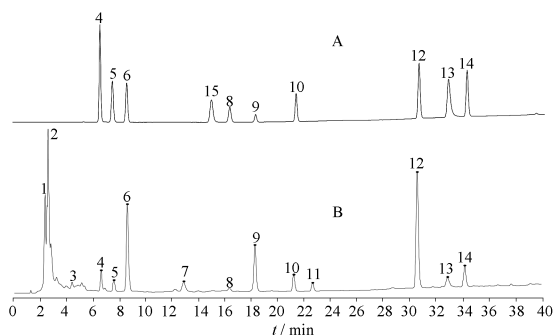
2.4.1 精密度试验 取同一批供试品溶液,按 2.1 项下方法连续进样 6 次,测得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3.8%,表明精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一样品 6 份,按 2.2 项下方法制备,进样测定。测得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 2.6%,表明重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别在 0,4,8,12,18,24,48 h 进行测定,其各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均小于 1.8%,说明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.5 样品分析

将 11 批样品按 2.3 方法制备供试品溶液,记录色谱图,通过保留时间指认了其中 9 个共有峰,分别为尿嘧啶(4 号峰),胞苷(5 号峰),尿苷(6 号峰),肌苷(8 号峰),鸟苷(9 号峰),β-胸苷(10 号峰),腺苷(12 号峰),腺嘌呤(13 号峰),2-脱氧腺苷(14 号峰),标准品色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 共有模式; 4. 尿嘧啶 uracil; 5. 胞苷 cytidine; 6. 尿苷 uridine; 8. 肌苷 inosine; 9. 鸟苷 guanosine; 10. β-胸苷 thymidine; 12. 腺苷 adenosine; 13. 腺嘌呤 adenine; 14. 2-脱氧腺苷 2-deoxyadenosine; 15. 次黄嘌呤 hypoxanthine。

图 1 暗紫贝母药材共有模式图谱及对照品 HPLC 图
Fig. 1 HPLC fingerprints of *Fritillaria unibracteata* and chromatograms of reference substances

2.6 指纹图谱的建立

2.6.1 系统聚类分析 将 11 批暗紫贝母药材共有色谱峰的峰面积与药材称样量相比,即对单位质量药材峰面积进行量化,得到 11 × 14 阶的数据矩阵,应用 The Unscrambler X 10.1 分析软件,采用 Ward's method 和 Squared Euclidean distance 进行聚类分析,分析结果见图 2,11 批样品被分为 2 类。

2.6.3 指纹图谱的建立及相似度评价 将所得的 11 批暗紫贝母药材色谱图依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2.0 版》软件,以 S2 批药材图谱作为参照谱进行指纹匹配,确定了 14 个共有峰,见图 3,暗紫贝母特征指纹图谱的共有模式色谱图见图 1,11 批暗紫贝母药材指纹色谱相似度均大于 0.97,见表 2。

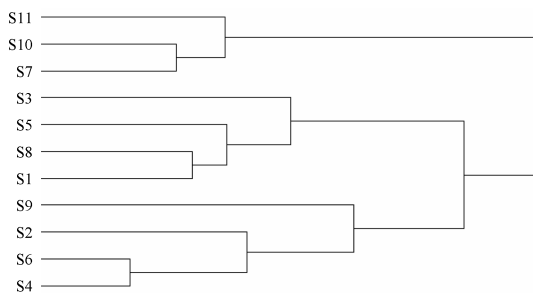
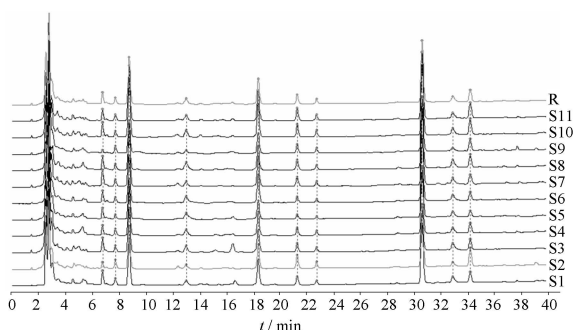


图 2 不同批次暗紫贝母药材聚类分析图
Fig. 2 Hierarchical clustering analysis of *Fritillaria unibracteata* samples



S1 ~ S11. 分别代表各批药材 (样品来源见表 1); R. 对照图谱。

图 3 11 批暗紫贝母药材的指纹图谱匹配图
Fig. 3 HPLC fingerprints of eleven batches of *Fritillaria unibracteata*

表 2 11 批暗紫贝母药材的相似度
Table 2 Results of similarity evaluation of eleven batches of *Fritillaria unibracteata*

批号	相似度	批号	相似度
S1	0.995	S7	0.986
S2	0.990	S8	0.995
S3	0.984	S9	0.970
S4	0.992	S10	0.991
S5	0.993	S11	0.990
S6	0.993		

3 讨论

3.1 提取溶剂和方法的考察

本实验考察了超声和回流提取 2 种方法,二者提取效率相当,超声提取简便易操作,是一个物理过程,浸提过程中无化学反应且无需加热,对物质的量没有损失,最后确定选择用超声提取法。在此基础上,考察了水,30%、50% 甲醇作为提取溶剂,比较发现水的提取效率最高。另外还考察了提取时间和提

取液用量,最终确定提取方法为 10 mL 水超声提取 60 min。

3.2 检测波长的选择

核苷类化合物均有显著的紫外吸收,依据 DAD 检测的三维图谱,大部分核苷类成分在 260 nm 附近均表现最大吸收峰,故选择 260 nm 作为检测波长^[8-9]。

3.3 色谱条件的考察

核苷类物质极性大,较难分离,本实验比较了以下 5 种色谱柱, Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Zorbax Extend-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), Zorbax SB-Aq C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm), Zorbax SB-Aq C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), SunFire® C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)。实验结果表明, Zorbax SB-Aq C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 出峰较多,且各成分分离良好,同时比较了甲醇和乙腈洗脱,发现甲醇分离较乙腈分离效果好,因此最终选择了 Zorbax SB-Aq C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱和甲醇作为流动相洗脱。

4 结论

本文采用 HPLC-UV 方法,根据样品峰保留时间鉴定了暗紫贝母中的 9 个成分,其中 2 个成分肌苷、2-脱氧腺苷首次从暗紫贝母药材中被检测。从分析的 11 批样品来看,均含有尿嘧啶、胞苷、尿苷、鸟苷、β-胸苷、腺苷、腺嘌呤和 2-脱氧腺苷,肌苷含量较低,部分样品中无明显的色谱峰,次黄嘌呤未检出,这与笔者之前对川贝母 *F. cirrhosa* 和太白贝母 *F. taipaiensis* 的非生物碱成分的研究结果基本一致^[8-9],3 种贝母药材中非生物碱成分较为相似。在几种成分中,尿苷、鸟苷和腺苷的含量相对较高。不同产地的样品,其色谱指纹相似度较高,均大于 0.97,这与笔者之前对暗紫贝母生物碱成分的指纹图谱研究结果一致^[10]。聚类分析结果表明,11 批暗紫贝母药材聚为二类,从河北 (S7)、广东 (S10) 购买的样品和四川甘孜 (S11) 的聚为一类,广东和河北并不产暗紫贝母,推测 S7, S10 号药材可能来自四川甘孜地区。湖南 (S6) 与四川松潘 (S4) 聚为一类,推测 S6 药材可能来自四川松潘。从分析结果可看出,暗紫贝母药材质量较稳定,均一性较好。本方法精密度、重复性、稳定性较好,可用于暗紫贝母药材的质量综合评价。



[参考文献]

- [1] 陈士林,肖小河. 暗紫贝母植被分布格局的数值分析[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,1997,22(4):416.
- [2] 陈士林,肖小河,陈善壖. 暗紫贝母的群落生态研究[J]. 中药材,1989,12(11):5.
- [3] 陈士林,肖小河,陈善壖. 松贝品质与土壤生态的相关性研究[J]. 中药材,1990,13(9):3.
- [4] Kang D G, Sohn E J, Lee Y M, et al. Effects of bulbus *Fritillaria* water extract on blood pressure and renal functions in the L-NAME-induced hypertensive rats [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 91(1):51.
- [5] 黄丽晶,高文远,李霞,等. 平贝母水提物抗炎作用研究[J]. 天津中医药,2009,26(6):495.
- [6] 邹冈. 神经药理学[M]. 北京:科学出版社,1988.
- [7] 万德光. 中药品种品质与药效[M]. 上海科技出版社,2007.
- [8] 黄林芳,段宝忠,王丽芝,等. 川贝母新资源太白贝母中水溶性成分的含量测定[J]. 中国中药杂志,2011,36(5):585.
- [9] 曹新伟,陈四保,陈士林,等. 川贝母中非生物碱类成分的研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2008,10(2):83.
- [10] Linfang H, Baozhong D, Lizhi W, et al. HPLC-ELSD fingerprint of Bulbus *Fritillariae Unibracteata* from different producing areas [J]. Med Plant, 2010,8(1):79.

Study on water-soluble constituents of *Fritillaria unibracteata* by HPLC fingerprints

DUAN Baozhong^{1,3}, CHEN Shilin¹, WEI Dahua², HUANG Linfang^{1*}, WANG Zhen¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences
& Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Guangzhou Pangaoshou Pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou 511490, China;

3. College of Pharmaceutical Science, Dali University, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC fingerprint of water-soluble constituents of *Fritillaria unibracteata*. **Method:** Zorbax SB Aq C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted for gradient elute with the mobile phase consisting of methanol and water. The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹; the detection wavelength was 260 nm, and the temperature of sample manager was set at 25 °C. Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of traditional Chinese medicine (version 2.0) published by the State Pharmacopeia Committee of China was adopted for the fingerprint analysis on the 11 batches of *F. unibracteata* herbs. **Result:** The 11 batches of *F. unibracteata* herbs had 14 common peaks, nine of which were identified with good separating degrees. The similarities of the 11 batches were more than 0.970, with good quality homogeneity. **Conclusion:** The method is so accurate, highly reproducible and stable that it is suitable for the comprehensive quality evaluation of *F. unibracteata* herbs.

[Key words] *Fritillaria unibracteata*; water-soluble constituent; HPLC; fingerprint

doi:10.4268/cjcm20121327

[责任编辑 孔晶晶]