

菝葜药材 HPLC 指纹图谱的鉴别

杨立勇, 李雨生, 王祥培*, 杨焱, 吴红梅, 靳凤云
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

摘要 目的:建立菝葜药材高效液相色谱(HPLC)指纹图谱鉴别方。方法:采用 RP-HPLC,以 Diamonsil-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱为分析柱,流动相乙腈-0.1% 磷酸水,梯度洗脱,流速 0.6 mL·min⁻¹,330 nm 波长下测定菝葜、光叶菝葜的指纹图谱,并作相似度比较分析。结果:建立了菝葜药材 HPLC 指纹图谱共有模式,18 个共有指纹峰被标定,并对菝葜与光叶菝葜药材的 HPLC 指纹图谱进行相似度比较,结果具有明显差异。结论:HPLC 指纹图谱具有方法简便,重复性好,特征性强的特点,可用于菝葜药材的鉴别。

关键词 菝葜;HPLC 指纹图谱;鉴别

中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9903(2011)08-0104-04

Identification of *Smilax china* by HPLC Fingerprint

YANG Li-yong, LI Yu-sheng, WANG Xiang-pei*, YANG Ye, WU Hong-mei, JIN Feng-yun
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:**To establish a HPLC fingerprint for the identification of *Smilax china*. **Method:** The analysis was carried out on a Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile-0.1 % phosphoric acid, gradient eluent, the flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. The wave length was 330 nm, data were analyzed by fingerprint similarity evaluation software to compare the similarity of samples. **Result:** The mutual mode to HPLC fingerprints was established, and the 18 mutual peaks were indicated. The similarities among the of *S. china* and *S. glabra* collected from different sources were obtained. there were apparent difference in fingerprint. **Conclusion:** HPLC fingerprint method is repeatable and feasible and can be suitable for identifying *Musa basjoo*.

[Key words] *Smilax china*; HPLC fingerprint; identification

菝葜为百合科植物菝葜 *Smilax china* L. 的干燥根茎,具有利湿去浊、祛风除痹,解毒散瘀之功效,临床上用于小便淋浊,带下量多,风湿痹痛,疔疮痈肿等^[1]。文献报道^[2]菝葜与光叶菝葜 *S. glabra* Roxb. 的干燥根茎在药材市场及一些药房常混用。目前 2 种药材的性状、显微和理化鉴别的比较试验已有报道^[3-4],但他们为同科同属植物,亲缘关系较为接近,

其药材性状、显微特征、成分等方面相似或相近,难以区别。因此,本文采用 HPLC 对菝葜及其混淆品光叶菝葜药材的指纹图谱进行测试,并作指纹图谱的相似度比较,以期对菝葜药材鉴别和质量控制提供一些依据。

1 仪器与试剂

菝葜药材分别采集于贵州各地,经王祥培副教授鉴定为百合科植物菝葜 *S. china* 的干燥根茎;光叶菝葜经王祥培副教授鉴定为百合科植物光叶菝葜 *S. glabra* 的干燥根茎。见表 1。

Agilent1100 型高效液相色谱仪(自动进样品),二极管阵列检测器(DAD);《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》(国家药典委员会);乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

收稿日期 20101116(004)

基金项目 贵州省中医药管理局项目(黔中医药发【2008】42 号)

第一作者 杨立勇,讲师,硕士,从事民族医药的基础研究,
Tel:18984002300, E-mail:709521748@qq.com

通讯作者 * 王祥培,博士,副教授,从事中药及民族药品种
品质与资源开发研究, E-mail:wxp0123@126.com

表 1 菝葜与光叶菝葜的相似度

编号	样品	产地	采收时间	相似度
S1	菝葜	贵州凯里	2009-08	0.952
S2	菝葜	贵州龙里湾寨	2009-07	0.949
S3	菝葜	贵州剑河	2009-08	0.976
S4	菝葜	贵州锦屏	2009-08	0.973
S5	菝葜	贵州台江 1#	2010-04	0.985
S6	菝葜	贵州天柱 1#	2009-08	0.948
S7	菝葜	贵州天柱 2#	2009-08	0.914
S8	菝葜	贵州台江 2#	2010-04	0.982
S9	菝葜	贵州台江	2010-04	0.940
S10	光叶菝葜	贵州龙里湾寨	2010-07	0.399
S11	光叶菝葜	贵州龙里湾寨	2009-07	0.614

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Dikma 公司 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) - 0.1% 磷酸 (B) 进行线性梯度洗脱, 0 ~ 78 min, 17% A ~ 43% A, 78 ~ 100 min, 43% A ~ 53% A, 100 ~ 110 min, 53% A ~ 100% A, 110 ~ 115 min, 100% A ~ 17% A; 体积流量 0.6 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 检测波长 330 nm, 运行时间 115 min。

2.2 供试品溶液的制备 取药材粉末 (3 号筛) 1.0 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加 70% 甲醇 50 mL, 加热回流 60 min, 滤过, 药渣加 70% 甲醇 50 mL, 回流提取 45 min, 滤过, 合并滤液。滤液置蒸发皿中挥干, 残渣加 70% 甲醇溶解并定容至 10 mL。用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察^[5-6]

2.3.1 空白试验 精密吸取空白溶液 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按规定的梯度条件洗脱, 结果表明空白不干扰测定。

2.3.2 精密度试验 取同一供试品溶液, 按 2.1 项下的色谱测试条件连续进样 6 次, 结果显示各共有峰相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别在 0.05% ~ 1.64% 和 0.78% ~ 2.29%, 表明精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 按 2.1 项下的色谱测试条件分别在 0, 2, 5, 10, 16, 20, 26 h 进行检测, 结果显示各共有峰相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别在 0.25% ~ 1.87% 和 1.06% ~ 2.86%, 表明供试品溶液在 26 h 内稳定。

2.3.4 重复性试验 取同一批菝葜药材分别提取制备 6 份供试品, 按 2.1 项下的色谱测试条件进行检测, 结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别在 0.15% ~ 2.06% 和 0.87% ~ 2.77%, 表明重复性良好。

2.4 指纹图谱建立^[5] 按 2.1 项下的色谱条件对供试品溶液进行检测。测得的所有供试品 HPLC 的色谱指纹图谱见图 1, 2。菝葜药材色谱指纹图谱以保留时间约为 45.39 min 的 12 号峰作为参照峰 S, 对各批次菝葜药材的指纹图谱进行考察, 确定了 18 个共有峰 (图 1, 表 2)。并对各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积进行了计算 (表 2, 3)。

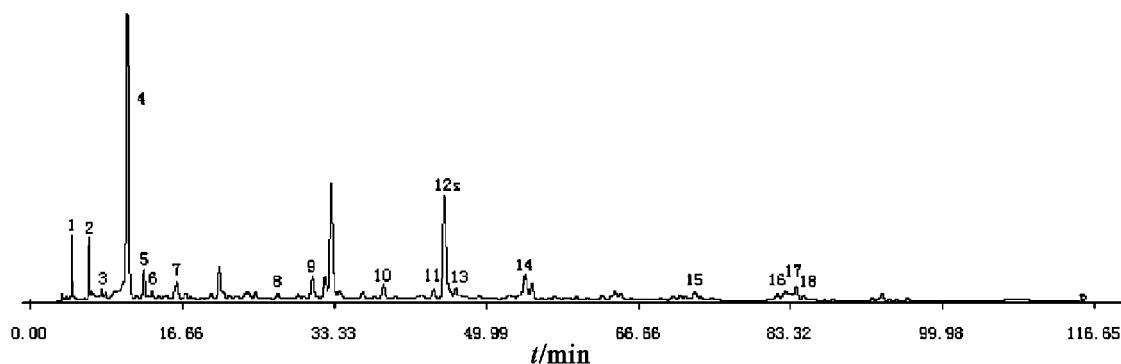


图 1 菝葜药材 HPLC 指纹图谱

2.5 指纹图谱分析^[5]

2.5.1 菝葜指纹图谱相似度评价 分别将采集于贵州各地的菝葜样品的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004 年 A 版软件, 考察色谱峰相似度的一致性。见表 1。

2.5.2 菝葜与光叶菝葜的指纹图谱比较 从菝葜与光叶菝葜的指纹图谱中, 可以看出他们的色谱指纹图谱明显不同, 其共有峰数目、位置 (相对保留时间) 有差异 (表 2)。

表 2 菝葜与光叶菝葜药材 HPLC 指纹图谱的相对保留时间

共有峰	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
1	0.100 9	0.100 8	0.100 7	0.100 8	0.100 6	0.100 8	0.100 7	0.100 4	0.100 2	0.100 5	0.100 9
2	0.141 3	0.141 5	0.141 5	0.141 4	0.141 2	0.141 3	0.141 2	0.141 0	0.141 1	0.140 9	0.141 1
3	0.172 0	0.172 3	0.173 0	0.173 3	0.172 9	0.172 9	0.172 8	0.172 5	0.172 1	—	—
4	0.233 8	0.234 3	0.235 1	0.235 4	0.235 3	0.235 2	0.234 6	0.235 2	0.235 0	0.233 6	0.234 8
5	0.254 5	0.255 9	0.257 0	0.256 0	0.257 4	0.255 7	0.255 3	0.257 0	0.256 7	0.254 4	—
6	0.294 0	0.293 2	0.294 2	0.295 2	0.294 4	0.295 3	0.294 1	0.294 0	0.293 9	0.295 1	0.296 4
7	0.353 7	0.350 8	0.355 6	0.355 8	0.351 2	0.351 4	0.355 1	0.355 1	0.355 2	0.353 9	0.354 8
8	0.597 7	0.591 7	0.593 2	0.600 1	0.600 6	0.600 2	0.599 4	0.599 5	0.592 4	0.590 7	0.589 7
9	0.725 8	0.710 9	0.712 9	0.712 2	0.712 5	0.711 8	0.711 6	0.712 4	0.712 6	0.717 8	0.717 3
10	0.854 5	0.852 6	0.855 2	0.853 0	0.851 6	0.851 0	0.852 0	0.851 1	0.852 0	0.855 5	0.854 5
11	0.975 3	0.975 7	0.971 9	0.975 7	0.973 6	0.973 8	0.974 4	0.973 4	0.971 8	—	0.973 5
12s	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
13	1.029 5	1.029 0	1.025 3	1.029 5	1.027 3	1.027 5	1.028 3	1.026 2	1.023 6	1.021 1	1.026 7
14	1.193 9	1.196 4	1.198 2	1.192 8	1.197 0	1.191 3	1.191 7	1.189 1	1.197 9	1.197 5	—
15	1.604 1	1.606 7	1.603 8	1.606 2	1.602 4	1.604 1	1.603 3	1.600 1	1.597 2	—	—
16	1.823 1	1.824 6	1.823 5	1.823 9	1.818 9	1.820 7	1.821 6	1.817 1	1.817 0	—	—
17	1.849 3	1.851 7	1.848 8	1.851 1	1.846 4	1.847 8	1.848 7	1.844 6	1.842 0	—	—
18	1.867 6	1.870 2	1.867 2	1.869 5	1.864 7	1.866 3	1.867 0	1.862 9	1.859 8	1.863 4	—

表 3 菝葜与光叶菝葜药材 HPLC 指纹图谱的相对峰面积

共有峰	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
1	0.214 2	0.140 3	0.108 0	0.445 7	0.256 9	0.173 7	0.267 0	0.182 3	0.091 0	0.275 2	0.407 2
2	0.163 8	0.098 0	0.124 8	0.296 0	0.162 2	0.115 7	0.177 9	0.145 2	0.123 4	0.253 9	0.402 3
3	0.292 9	0.056 7	0.065 2	0.094 7	0.086 5	0.045 2	0.090 4	0.013 0	0.081 2	—	—
4	1.916 6	2.186 9	3.913 7	1.823 7	1.447 8	0.940 0	1.285 9	0.767 8	3.870 0	0.142 7	0.117 8
5	0.079 7	0.040 2	0.038 5	0.110 7	0.056 8	0.065 0	0.087 7	0.010 9	0.050 0	0.192 7	—
6	0.102 8	0.068 1	0.053 7	0.161 9	0.083 8	0.082 6	0.128 1	0.023 0	0.095 5	0.302 1	0.264 1
7	0.227 2	0.125 4	0.264 5	0.175 8	0.120 1	0.068 2	0.150 5	0.049 3	0.327 6	21.034 3	34.084 8
8	0.085 7	0.143 5	0.082 2	0.046 1	0.093 9	0.012 9	0.170 0	0.032 1	0.113 3	20.948 7	23.522 0
9	0.424 5	0.229 1	0.270 9	0.166 2	0.161 4	0.047 9	0.200 8	0.145 1	0.271 8	1.944 4	1.844 0
10	0.055 5	0.135 3	0.162 6	0.594 4	0.192 6	0.161 9	0.347 5	0.057 1	0.119 4	0.477 1	0.414 4
11	0.044 4	0.132 0	0.109 4	0.372 7	0.146 8	0.137 6	0.254 1	0.076 0	0.079 6	—	0.755 5
12s	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
13	0.049 8	0.062 3	0.213 5	0.186 6	0.066 2	0.067 0	0.122 9	0.045 1	0.155 2	0.477 0	0.468 6
14	0.192 4	0.273 5	0.431 3	0.340 9	0.160 3	0.222 3	0.263 6	0.178 1	0.382 0	0.315 4	—
15	0.075 8	0.083 7	0.034 1	0.437 6	0.209 2	0.136 9	0.322 0	0.088 4	0.030 6	—	—
16	0.097 9	0.146 3	0.040 3	0.253 7	0.211 2	0.086 1	0.172 4	0.185 7	0.057 6	—	—
17	0.130 7	0.206 7	0.070 4	0.349 9	0.316 7	0.093 2	0.227 8	0.185 2	0.067 0	—	—
18	0.069 1	0.067 2	0.024 3	0.161 8	0.105 9	0.045 6	0.092 1	0.056 2	0.029 6	0.016 2	—

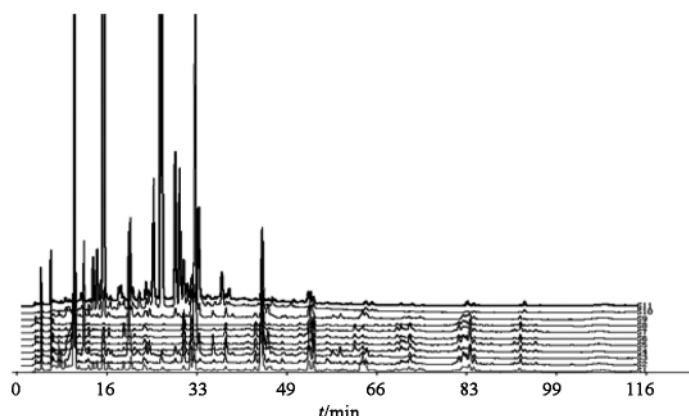


图2 菝葜与光叶菝葜药材的 HPLC 指纹图谱

3 讨论

曾考察甲醇-水,乙腈-水,甲醇-磷酸水溶液,乙腈-磷酸水溶液等系统^[7-9]对色谱分离过程的影响,结果显示乙腈-0.1%磷酸溶液系统的分离度高,峰形对称,基线稳定;对不同检测波长考察结果显示,在330 nm检测波长下,菝葜色谱中色谱峰较多,信息丰富,基线稳定。

对不同体积分数的甲醇与乙醇并采用回流提取和超声提取进行考察发现,70%甲醇回流提取比超声提取的提取效率高且色谱峰多。还对回流提取中不同提取时间,不同提取次数进行比较,结果表明70%甲醇提取2次(60,45 min)后基本完全。故拟定上述供试品的制备方法。

研究结果表明,各批次菝葜指纹图谱相似度较好并有18个共有峰,而菝葜与光叶菝葜指纹图谱相似度及共有峰的个数有明显差异,说明本文建立的高效液相色谱指纹图谱与文献报道^[7-8]的比较,具有方法简便,色谱峰多,信息丰富,基线稳定等特点,可用于菝葜药材的识别。

参考文献

- [1] 中国药典.一部[S].2010:290.
- [2] 陈峰生,陈高萍.土茯苓及其混用品菝葜的鉴别[J].中国药业,2003,12(5):62.
- [3] 杨光辉.中药材菝葜、草薢、土茯苓的鉴别与应用[J].时珍国医国药,1997,8(5):427.
- [4] 王涛,王燕青,徐长江,等.菝葜、土茯苓和土草薢的薄层色谱鉴别[J].现代食品与药品杂志,2007,17(2):37.
- [5] 王祥培,孙宜春,靳凤云,等.芭蕉根 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):30.
- [6] 王祥培,黄婕,靳凤云,等.威灵仙类药材 HPLC 指纹图谱鉴别研究[J].中成药,2010,32(5):704.
- [7] 周艳林,严海,钟小清,等.菝葜药材脂溶性成分指纹图谱研究[J].中草药,2008,39(8):1246.
- [8] 李磊,张宏桂,孙毅坤,等.土茯苓药材 HPLC 指纹图谱研究[J].中华中医药杂志,2007,22(4):206.
- [9] 许凤清,汪宁,刘金旗,等.通窍活血汤的液相指纹图谱研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(12):1.

责任编辑 邹晓翠