

不同贝母的指纹图谱鉴别研究

闵会¹,吴健¹,胡江宁¹,叶剑锋^{2*}

(1. 浙江康恩贝药品研究开发有限公司,浙江杭州 310052;2. 浙江康恩贝制药股份有限公司,浙江杭州 310052)

摘要 [目的]建立指纹图谱方法,区分与鉴别浙贝母、平贝母、川贝母药材。[方法]采用高效液相色谱法,蒸发光散射检测器。[结果]测定方法稳定可靠,3种贝母测定精密度、重复性RSD均小于5%,同时色谱峰均具有各自的特征性。[结论]该方法稳定可靠,可作为浙贝母、平贝母、川贝母区分与判定的有效途径。

关键词 浙贝母;平贝母;川贝母;HPLC-ELSD;指纹图谱
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)34-12051-02

The Identification of Different *Fritillaria* Species by Fingerprints
MIN Hui², WU Jian², HU Jiang-ning², YE Jian-Feng¹ (1. Zhejiang Conba Drug Discovery & Development Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310052;2. Zhejiang Conba Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310052)
Abstract [Objective] To establish a fingerprint determination method to distinguish and identify *Fritillariae thunbergii* bulbus, *Fritillariae cirrhosae* bulbus, *Fritillariae ussuriensis* bulbus. [Method] HPLC and ELSD were adopted. [Result] The method is reliable, the reproducibility and precision of *Fritillariae thunbergii* bulbus, *Fritillariae cirrhosae* bulbus, *Fritillariae ussuriensis* bulbus are all less than 5%, and the chromatographic peaks are characterized. [Conclusion] This method is stable and reliable, it can be a good method to distinguish and identify *Fritillariae thunbergii* Bulbus, *Fritillariae cirrhosae* bulbus, *Fritillariae ussuriensis* bulbus.
Key words *Fritillariae thunbergii* bulbus; *Fritillariae cirrhosae* bulbus; *Fritillariae ussuriensis* bulbus; HPLC-ELSD; Fingerprint

浙贝母(*Fritillariae thunbergi* ibulbus.)为百合科贝母属浙贝母的干燥鳞茎,为传统常用中药之一,被列为著名的“浙八味”之一,其味苦、性寒,有清热润肺、化痰止咳、散结消肿等功效。川贝母(*Fritillariae cirrhosae* bulbus.)为百合科植物川贝母的干燥鳞茎,是润肺止咳的名贵中药材,具有良好的止咳化痰功效,且能养肺阴、宣肺、润肺而清肺热,是一味治疗久咳痰喘的良药。平贝母(*Fritillariae ussuriensis* bulbus.)为百合科植物平贝母的干燥鳞茎,有清热润肺、止咳化痰的作用,为一种常用中药,与川贝母、浙贝母同属贝母属,但在药用上有一定差别,3种贝母药材均具有止咳化痰功效,其有效成分均为生物碱类物质。但由于其内在生物碱类成分种类不同,药用上存在一定差别。目前市场上的贝母品种较多,且价格差别大,以川贝母价格最高,存在互相代替或者以伪替真的现象。由于众多原因,从性状、显微、理化上不易将它们区别开,同时采用传统的薄层鉴别法人为影响因素大,重现性不好,无法将三者共性与特性进行良好的展现与区分,故急需建立一种良好的方法将三者进行有效的指认与区分。

高效液相色谱法具有高效、快速、稳定的特点,重现性好,灵敏度高。同时中药材指纹图谱的建立是药材鉴别的新标准,能够全面反映中药材化学成分的种类与数量,从整体上反映中药材的特性。采用高效液相色谱法建立中药材指纹图谱用以鉴定中药材特性,稳定、可靠、重现性高,目前已得到国际公认,亦是未来发展趋势。

基金项目 国家科技支撑计划项目(2011BAI04B06);浙江省重点实验室和中试基地计划项目(2009E10009);浙江省企业研究院项目(2010E90011)。
作者简介 闵会(1982-),女,河南南阳人,工程师,硕士,从事中药材质量研究。*通讯作者,教授级高工,博士,从事中药、植物药新药研发。
收稿日期 2014-09-19

1 材料与方法

1.1 试验材料 浙贝母样品来自浙江宁波、磐安、舟山产地,川贝母样品分别购自华东中药饮片有限公司及康恩贝集团医疗保健品有限公司,平贝母样品购自吉林省药房。贝母素甲标准品(11750-201311)、贝母素乙标准品(110751-201110)均购自中国食品药品检定研究院,含量分别以97.3%、99.9%计。

表1 不同贝母样品信息

样品名称	批号	样品名称	批号
平贝母	1103001	川贝母	120118
平贝母	20100412	浙贝母	120538
平贝母	070118	浙贝母	120552
平贝母	110710868	浙贝母	120572
川贝母	120308	浙贝母	1205114
川贝母	110501	浙贝母	1205136
川贝母	120401		

1.2 仪器 BS210S电子天平(德国赛多利斯)、HH.S电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)、Agilent1200液相色谱仪(ELSD)(美国Aglient公司)。

1.3 方法

1.3.1 标准品溶液的制备。取贝母素甲标准品、贝母素乙标准品适量,精密称定,加甲醇溶解,即得。

1.3.2 供试品溶液的制备。取本品粉末(过四号筛)约2.0g,精密称定,置具塞烧瓶中,加浓氨试液4ml浸润1h,精密加入氯仿:甲醇(4:1)的混合溶液40ml,称定重量,混匀,置于80℃水浴中加热回流2h,放冷,精密加入6ml无水乙醇,用力摇匀,滤过,精密量取续滤液20ml,水浴蒸干,残渣加5ml甲醇溶解,滤过,取续滤液,即得。

1.3.3 测定方法。色谱条件:色谱柱:以十八烷基键合硅胶为固定相;流动相:甲醇(含0.05%三乙胺)^[1],水梯度洗脱:0

~10 min 甲醇(含 0.05% 三乙胺)由 60 到 70;10~35 min 甲醇(含 0.05% 三乙胺)由 70 到 90,35~50 min 甲醇(含 0.05% 三乙胺)由 90 到 100,50~60 min 甲醇(含 0.05% 三乙胺)保持 100;流速 1.0 ml/min;记录 60 min 色谱图;进样量:供试品及对照品溶液各 20 μ l;ELSD 条件:漂移管温度 70 $^{\circ}$ C;氮气流速 1.6 L/min。

2 结果与分析

2.1 方法学验证

2.1.1 浙贝母。

2.1.1.1 精密度试验。取“1.3.2”方法制备供试品溶液,参照“1.3.3”测定方法连续进样 6 次,记录色谱图,以贝母素乙的色谱峰为参照峰,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0~0.16%、0~4.02%,精密度良好。

2.1.1.2 重复性试验。参照“1.3.2”方法制备供试品溶液 6 份,参照“1.3.3”测定方法测定,记录色谱图,以贝母素乙的色谱峰为参照峰,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0~0.32%、0~4.46%,重复性良好。

2.1.1.3 稳定性试验。取“1.3.2”方法制备供试品溶液,参照“1.3.3”测定方法记录 0、4、8、12、24 h 的色谱图。各色谱峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别在 0~0.33%、0~3.82%,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.2 平贝母。

2.1.2.1 精密度试验。取“1.3.2”方法制备供试品溶液,参照“1.3.3”测定方法连续进样 6 次,记录色谱图,以贝母素乙的色谱峰为参照峰,各色谱峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别在 0~0.30%、0~1.97%,精密度良好。

2.1.2.2 重复性试验。参照“1.3.2”方法制备供试品溶液 6 份,参照“1.3.3”测定方法测定,记录色谱图,以贝母素乙的

色谱峰为参照峰,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0~0.26%、0~3.15%,重复性良好。

2.1.2.3 稳定性试验。取“1.3.2”方法制备供试品溶液,参照“1.3.3”测定法记录 0、4、8、12、24 h 的色谱图。各色谱峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别在 0~0.22%、0~3.20%,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.3 川贝母。

2.1.3.1 精密度试验。取“1.3.2”方法制备供试品溶液,参照“1.3.3”测定法连续进样 6 次,记录色谱图,以贝母素乙的色谱峰为参照峰,各色谱峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别在 0~0.47%、0~3.80%,精密度良好。

2.1.3.2 重复性试验。参照“1.3.2”方法制备供试品溶液 6 份,参照“1.3.3”测定法测定,记录色谱图,以贝母素乙的色谱峰为参照峰,各色谱峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别在 0~0.47%、0~4.82%,重复性良好。

2.1.3.3 稳定性试验。取“1.3.2”方法制备供试品溶液,参照“1.3.3”测定法记录 0、4、8、12、24 h 的色谱图。各色谱峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 分别在 0~0.30%、0~4.80%,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2 不同贝母指纹图谱 由图 1 可知,不同贝母指纹图谱特征存在明显差异。浙贝母色谱峰个数最多,且峰响应也最大,其次为平贝母,川贝母样品色谱峰个数较少,且峰响应亦较小。与此同时,浙贝母、平贝母、川贝母亦存在共有峰峰 1、峰 2、峰 4、峰 7。

浙贝母样品其特征图谱中峰 5、峰 6 为各色谱峰中相应最大色谱峰,且满足峰 5 < 峰 6;平贝母样品其特征图谱中峰 1、峰 2 响应最大,峰 5、峰 6 响应较小;川贝母样品其特征图谱中峰 1、峰 2 响应最大,但在峰 5、峰 6 出峰处无明显色谱峰出现。

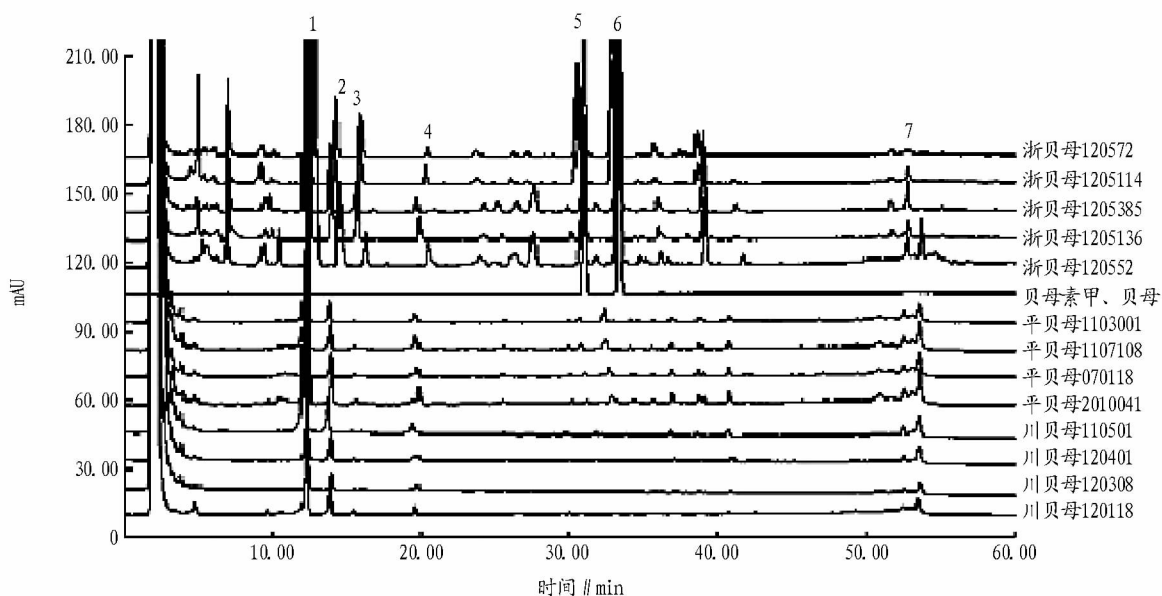


图 1 不同贝母指纹图谱分析测定结果

3 讨论

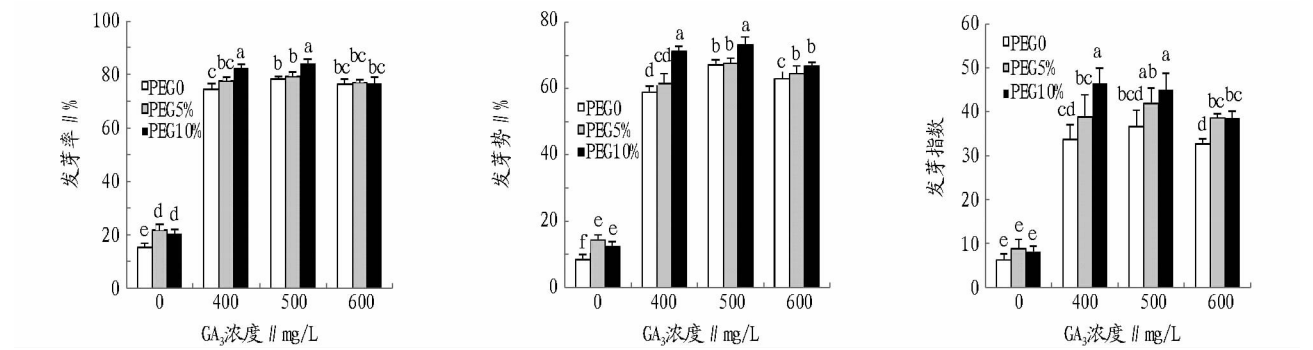
贝母辛、贝母芬、贝母啖、贝母替啖、原贝母碱、异浙贝甲素

张建兴^[2]研究表明,浙贝母中含有浙贝甲素、浙贝乙素、

(下转第 12070 页)

佳。这再次证明一定浓度范围的 GA₃ 浸种可显著提高杜鹃种子的发芽率和发芽一致度^[5-8]。

PEG 是一种高分子渗压剂,通过渗透调节作用,限制水



注:不同小写字母表示差异在 0.05 水平显著。

图1 GA₃ 与 PEG-6000 二次浸种对短果杜鹃种子发芽率、发芽势、发芽指数的影响

分进入种子的速率以减少吸涨过程中膜系统的损伤,进而促进种子萌发,在狗尾草^[9]、烟草^[10]、青稞^[11]等作物上已有应用报道。该试验结果表明,适宜浓度(5%~10%)PEG-6000 浸种处理可提高短果杜鹃种子活力。

在试验过程中,发现 GA₃ 浸种处理后短果杜鹃胚芽增长效果明显,而 PEG-6000 浸种处理后胚根粗壮且增长效果较明显。这可能是因为 GA₃ 可促进茎的伸长,而 PEG 则渗透调节根系吸收而伸长,故设计 GA₃ 与 PEG-6000 二次浸种法来探讨其对短果杜鹃种子萌发的影响。结果表明,经 400~600 mg/L GA₃ 浸种 24 h 后再由浓度 5%~10% PEG-6000 浸种 24 h 可极显著促进短果杜鹃种子萌发,提高短果杜鹃种子活力,幼苗胚根增长粗壮,胚芽伸长,说明试验采用的二次浸种法是促进短果杜鹃种子萌发行之有效的前处理方法。400 mg/L GA₃ 与浓度 10% PEG-6000 分别浸种 24 h 以及 500 mg/L GA₃ 与 10% PEG-6000 分别浸种 24 h 这 2 个组合处理的短果杜鹃种子效果最佳,可在短果杜鹃的引种驯化和生态恢复中推广应用。

参考文献

[1] 周繇. 长白山区野生木本观赏树木调查[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2004,30(5):524-535.

[2] 周繇. 长白山区杜鹃花科稀有濒危植物的区系特点和保护评价[J]. 湖北大学学报:自然科学版,2006,28(4):393-396.
[3] 张长芹,冯宝钧,赵革英,等. 杜鹃花的种子繁殖[J]. 云南植物研究,1992,14(1):87-91.
[4] 张乐华,刘向平,王凯红,等. 不同因子对常绿杜鹃亚属种子萌发及成苗的影响[J]. 武汉植物研究,2007,25(2):178-184.
[5] 高贵龙,龙秀琴,胡小京,等. 赤霉素对两种高山杜鹃种子发芽的影响[J]. 种子,2010,29(5):23-25.
[6] 黄承玲,周洪英,陈训,等. GA₃ 浸种对大白杜鹃种子萌发的影响[J]. 植物生理学通讯,2010,46(8):793-796.
[7] 苏家乐,李畅,陈璐,等. 不同预处理方法对牛皮杜鹃和小叶杜鹃种子萌发的影响[J]. 植物资源与环境学报,2011,20(4):64-69.
[8] 李畅,苏家乐,陈璐,等. 赤霉素浸种对毛毡杜鹃种子萌发的影响[J]. 江苏农业科学,2011,39(6):278-279.
[9] 马向丽,毕玉芬,黄梅,等. 不同赤霉素和聚乙二醇处理对非洲狗尾草种子萌发和幼苗的影响[J]. 热带作物学报,2009,30(10):1479-1483.
[10] 张燕,方力,吴也池,等. PEG 浸种处理提高烟草种子活力的效应[J]. 种子,2003,22(6):26-28.
[11] 姚晓华,吴昆仑. PEG 预处理对青稞种子萌发和幼苗生理特性的影响[J]. 西北植物学报,2012,32(7):1403-1411.
[12] 李长慧,孙海群,杨元武,等. 陇蜀杜鹃种子发芽率的研究[J]. 青海大学学报:自然科学版,1998,16(3):15-17.
[13] 王光苟,刘晶,冯元. 硫酸和盐酸对杜鹃花种子发芽特性的影响[J]. 贵州林业科技,2009,37(4):30-33.
[14] 杨元武,孙海群,张志和. 黄毛杜鹃种子发芽率的研究[J]. 青海大学学报:自然科学版,1997,15(4):17-20.

(上接第 12052 页)

等。川贝母其生物碱成分为川贝碱、岷贝碱、松贝碱、青贝碱、西贝素等。李兴斌等^[3]研究表明,平贝母中含有西贝素、贝母辛、平贝碱甲、平贝碱乙、西贝素苷等。3 种贝母在成分上虽有类似,但亦有较大不同,该研究结果表明,3 种贝母之间,其化学成分的类型存在明显差异,但亦存在共有峰。

对于浙贝母、平贝母、川贝母 3 种市场上常用的贝母类药材,该研究通过其各自色谱峰的特征,可以很好地将药材进行区分与鉴别,为其规范应用提供判定依据。同时该研究

所建立的指纹图谱方法,简便、快捷、稳定、可靠度高,亦可以为后期 3 种贝母类药材的深入研究提供理论依据。

参考文献

[1] 张国欣,李娟,张鹏. 湖北贝母的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 药学报,2005,40(9):850-853.
[2] 张建兴. 浙贝母新鲜鳞茎化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,1993,18(6):354-355.
[3] 李兴斌,高燕飞,李吉良. 平贝母化学成分及药理活性研究进展[J]. 中医药信息,2004,21(4):28-29.