

不同产地山豆根 UPLC 指纹图谱的研究

程钱 赵崇军 代一航 汪建芬 夏青 张文婷 王金凤 马志强 林瑞超

【摘要】 目的 建立山豆根的 UPLC 指纹图谱分析方法,为山豆根的质量控制和质量评价提供参考。**方法** 采用超高效液相色谱 Waters UPLC H-Class, Agilent Zorbax SB C-18 RRHD 色谱柱(2.1×100 mm, 1.8 μm), 预柱: Agilent SB-C18 色谱柱(2.1×5 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸溶液梯度洗脱, 洗脱程序 0~5 分钟, 5% A; 5~6 分钟, 5%~9% A; 6~6.5 分钟, 9%~12% A; 6.5~11 分钟, 12%~15% A; 11~21 分钟, 15%~34% A; 21~23 分钟, 34%~45% A; 23~26 分钟, 45%~47% A; 26~27 分钟, 47%~77% A; 27~35 分钟, 77%~98% A, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 检测波长 215 nm, 柱温 30℃, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2004A 版软件进行数据处理。**结果** 建立的山豆根指纹图谱有 27 个共有峰, 指认了 2 个共有峰; 各批药材指纹图谱比较相似度大部分在 0.90 以上, 符合指纹图谱研究技术的要求, 说明本研究中的不同产地的山豆根在化学成分上相似度良好。**结论** 该方法精密度、稳定性及重复性较好, 特征性及专属性较强, 可以有效地对山豆根药材进行质量控制, 同时可以对山豆根和北豆根的指纹图谱的比较提供思路, 从而避免因临床混用导致的药物中毒事件的发生。

【关键词】 山豆根; 超高效液相色谱; 指纹图谱

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.12.008

Study of the UPLC fingerprint of sophorae tonkinensis radix et rhizoma from different regions

CHENG Qian, ZHAO Chongjun, DAI Yihang, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing Key Laboratory for Quality Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: LIN Ruichao, E-mail: linrch307@sina.com

【Abstract】 Objective To establish the UPLC fingerprint methods of sophorae tonkinensis radix et rhizoma and provide reference for quality evaluation and quality control of sophorae tonkinensis radix et rhizoma. **Methods** The UPLC method was used. An Agilent Zorbax SB C-18 RRHD (2.1×100 mm, 1.8 μm) column was adopted and the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.2% phosphoric acid solution with a gradient elution. The elution program: 0~5 min, 5% A; 5~6 min, 5%~9% A; 6~6.5 min, 9%~12% A; 6.5~11 min, 12%~15% A; 11~21 min, 15%~34% A; 21~23 min, 34%~45% A; 23~26 min, 45%~47% A; 26~27 min, 47%~77% A; 27~35 min, 77%~98% A. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, column temperature was 30℃ and detection wavelength was 215 nm. A software "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM" 2004A was used for data processing. **Results** The establishment fingerprint of sophorae tonkinensis radix et rhizoma has 27 common peaks and 2 peaks of them were identified. The similarity of fingerprints of each batch was above 0.90 which was in line with the requirements of fingerprint technology research. So it proved that the

基金项目: 2015 年公益性行业科研专项(201507002)

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院[程钱(硕士研究生)、赵崇军(博士研究生)、代一航(硕士研究生)、汪建芬(硕士研究生)、夏青(博士研究生)、张文婷(博士研究生)、王金凤(博士研究生)、马志强、林瑞超]

作者简介: 程钱(1992-), 2014 级在读硕士研究生。研究方向: 中药检验与分析。E-mail: chengq_0713@163.com

通信作者: 林瑞超(1956-), 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 天然药物化学、民族药品品质评价。E-mail: linrch307@sina.com

composition of sophorae tonkinensis radix et rhizoma from different habitats in this research had good similarity. **Conclusion** The precision, stability and reproducibility of the established method were good, and the characterization and specificity is strong. The method could be effectively used for quality control of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma herb, at the same time, it can provide idea to distinguish Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma and Menisperm Rhizoma, so as to help avoid the occurrence of drug poisoning caused by clinical mixing.

【Key words】 Sophorae tonkinensis radix et rhizoma; Ultra-high performance liquid chromatography; Fingerprint

山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎,而北豆根为防己科植物蝙蝠葛 *Mertispermum dauricum* DC. 的干燥根茎^[1]。山豆根主要分布于广西百色、东兰县、金城江、云南等地,北豆根则主要分布在北方,湖北亦有^[2]。两者皆性寒味苦,有清热解毒,消肿利咽之功效,但山豆根毒性比北豆根较强^[3]。因山豆根与北豆根有相似的功效,植物形态相似,所以在民间常把两者混用,因此中毒事件也是屡见报道^[4]。李妃等^[5]对山豆根的化学成分、药理作用、毒理作用以及毒性成分检测等内容进行了较为详细的总结和讨论。超高效液相色谱法 (ultra-high performance liquid chromatography, UPLC) 是近些年新型的色谱分离分析技术,采用了更为细小的 1.8 μm 填料的色谱柱,相对于传统的 HPLC,有更好的分离效率及灵敏度^[6],本文采用 UPLC 对不同产地山豆根进行指纹图谱研究,为综合评价和控制山豆根的质量提供了科学依据,也为区分山豆根与北豆根提供了研究思路。

1 材料与方法

1.1 仪器

Waters H-Class 超高效液相色谱仪(美国 Waters 科技有限公司),98-1-B 型电热套(天津市泰斯特仪器有限公司),NewClassic MF 电子分析天平(Mettler Toledo)。

1.2 药材样品

实验所用的山豆根及北豆根药材样品从广西、云南、湖北等地采集,见表 1。样品经北京中医药大学中药学院中药鉴定系王晶娟副教授鉴定为山豆根 *Sophora tonkinensis* Gagnep.。苦参碱和氧化苦参碱对照品(均由成都普思生物科技有限公司提供,批号分别为 PS0187-0010、PS0187-020,纯度均 ≥ 98%);乙腈为色谱纯,水为去离子水,其他试剂均为分析纯。

表 1 山豆根及北豆根产地及采摘日期

品种	编号	产地	采摘日期
山豆根	S1	广西百色 1	2015. 11
	S2	广西百色 2	2015. 10
	S3	广西百色 3	2015. 11
	S4	广西金城江五圩镇	2016. 05
	S5	广西金城江九圩镇	2016. 05
	S6	广西环江下南乡	2016. 05
	S7	广西环江水源	2016. 05
	S8	广西东兰县	2016. 05
	S9	云南 1	2015. 11
	S10	云南 2	2015. 11

1.3 色谱条件

Agilent Zorbax SB C-18 RRHD 色谱柱(2.1 × 100 mm, 1.8 μm), 流速 0.3 mL/min, 检测波长 215 nm, 柱温 30℃, 理论板数以氧化苦参碱计不低于 4000, 流动相乙腈(A) - 0.2% 磷酸溶液(B) 进行梯度洗脱(0 ~ 5 分钟, 5% A; 5 ~ 6 分钟, 5% ~ 9% A; 6 ~ 6.5 分钟, 9% ~ 12% A; 6.5 ~ 11 分钟, 12% ~ 15% A; 11 ~ 21 分钟, 15% ~ 34% A; 21 ~ 23 分钟, 34% ~ 45% A; 23 ~ 26 分钟, 45% ~ 47% A; 26 ~ 27 分钟, 47% ~ 77% A; 27 ~ 35 分钟, 77% ~ 98% A)。

1.4 供试品溶液的制备

精密称定山豆根粉末 2.5 g, 置圆底烧瓶中, 加入无水乙醇-氨水(3 : 2) 1 mL^[7], 放置 0.5 小时后加入 70% 甲醇 25 mL, 在电热套上加热回流 2 小时, 冷却, 滤过, 回收溶剂, 残渣加适量甲醇溶解, 转移至 10 mL 容量瓶, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

1.5 对照品溶液的配制

分别取苦参碱和氧化苦参碱对照品约 6 mg、10 mg, 精密称定, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

1.6 方法学考察

1.6.1 精密度试验 精密称定 S1 号山豆根药材粉末 2.5 g, 按 1.4 项下的方法制备供试品溶液, 按

1.3 项下的色谱条件连续进样 6 次,测定,结果显示,各色谱峰相对保留时间 RSD 0.05% ~ 0.3%;各色谱峰相对峰面积 RSD 0.5% ~ 3.6%,表明仪器精密密度良好。

1.6.2 重复性试验 精密称定 S1 号山豆根药材粉末 6 份,每份 2.5 g,按 1.4 项下的方法制备供试品溶液,按 1.3 项下的色谱条件进行测定。结果显示,6 份样品的各色谱峰相对保留时间 RSD 0.02% ~ 0.15%;各色谱峰相对峰面积 RSD 1.8% ~ 3.9%,表明样品重复性良好。

1.6.3 稳定性试验 取重复性试验项下的一供试品溶液,按 1.3 项下的色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 小时进行测定。结果显示,各色谱峰相对保留时间 RSD 0.05% ~ 0.4%,各色谱峰相对峰面积 RSD 0.6% ~ 4.1%,表明供试品溶液在 24 小时内稳定。

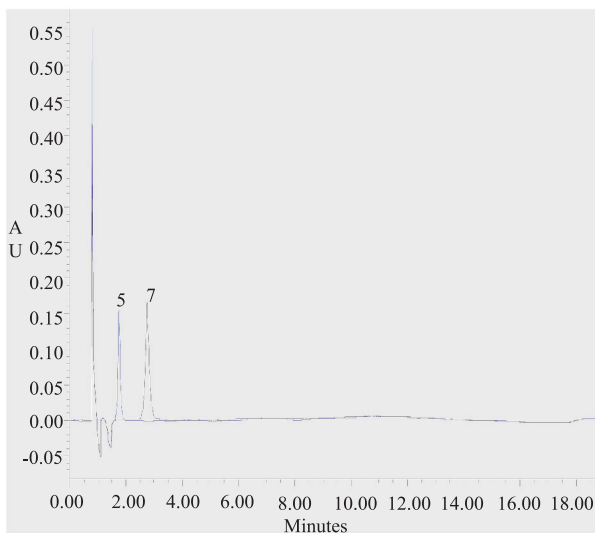
2 结果

2.1 各个批次指纹图谱的采集

精密称定各个批次山豆根药材粉末 2.5 g,按照 1.4 项下的方法制备供试品溶液,并按照 1.3 项下的色谱条件进行测定,记录 10 批次山豆根的色谱图,以《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》建立山豆根药材 UPLC 指纹图谱。

2.2 参照色谱峰的建立

本实验中的苦参碱和氧化苦参碱为山豆根中的共有成分,含量较高,且氧化苦参碱的保留时间比苦参碱稍长,故选用氧化苦参碱(7 号峰)为参照峰,见图 1。



注:5:苦参碱;7:氧化苦参碱。

图1 混合对照品溶液色谱图

2.3 共有峰的确定

运用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》对各批次色谱图进行分析,各个批次都具有的色谱峰标定为共有色谱峰。本文共标定 29 个共有峰,见图 2。相似度软件设置,选择 S1 号山豆根药材的色谱图为参照图谱,以中位数法作为生成对照指纹图谱的方法,设定时间窗宽度为 0.2 分钟,软件自动进行多点校正,全峰匹配,系统根据各个批次样品色谱图的共有模式生成对照指纹图谱作为山豆根的指纹图谱。以参照峰的保留时间和峰面积为基准 1,分别计算 10 批山豆根药材共有峰的相对保留时间和相对峰面积,见表 2、3。结果表明不同批次山豆根药材共有峰相对保留时间 RSD 3.925% ~ 4.588%,而相对峰面积的 RSD 较大。由此可知,不同批次山豆根具有相似的成分,但是不同批次相似成分的含量却相差较大。

2.4 共有峰的指认

利用对照品对照法对共有峰进行指认,取苦参碱、氧化苦参碱适量配成对照品溶液,按 2.1 项下的色谱条件进行测定,得到 5 号峰、7 号峰两个色谱峰和对照品的保留时间一致,并且通过 PDA 检测器紫外吸收光谱进行对比,结果均一致,因此确定 5 号峰为苦参碱,7 号峰为氧化苦参碱。

2.5 山豆根相似度评价

本实验采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》对 10 批山豆根药材 UPLC 指纹图谱进行相似度计算,见表 4。

3 讨论

提取方法的选择:本文在综合参考相关文献^[8-9]的基础上,结合药材的化学成分属性和提取效率等因素,考察了不同的提取方法,结果显示,加入无水乙醇-氨水(3:2)适量 0.5 小时后,以十倍药材量 70% 甲醇提取 2 小时,提取效果较好,供试品色谱峰较多,可更大程度地反应药材的特征信息。

检测波长的选择:本文选用了 Waters 超高效液相色谱二极管阵列检测器,对样品进行了全波长的扫描,在遵循信息最大量的原则下,经过比较发现,215 nm 时,色谱图峰数量丰富、分离度较好,基线平稳。因此以 215 nm 作为检测波长。

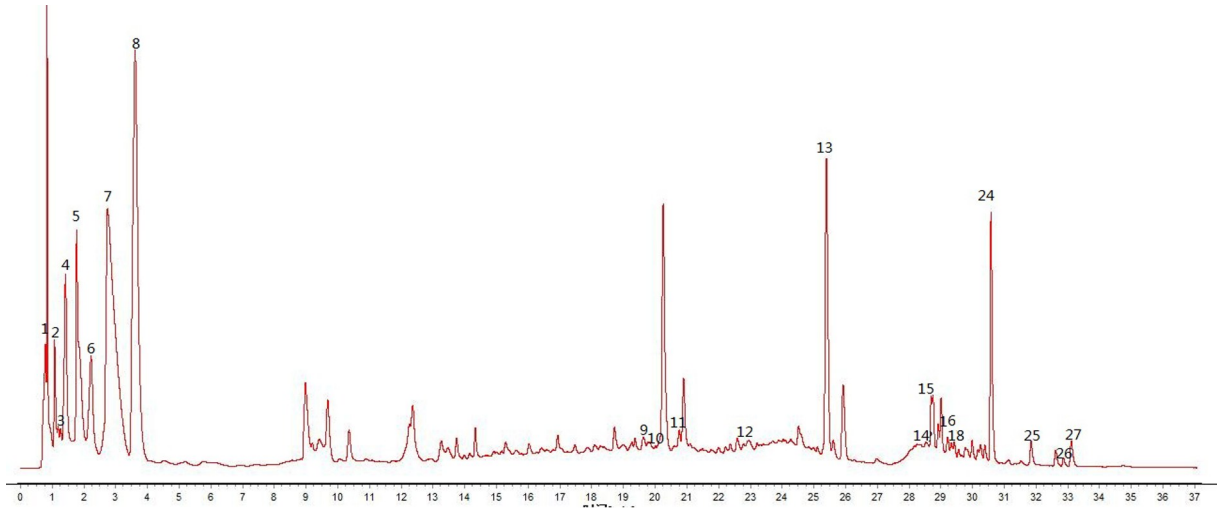


图 2 S1 号山豆根药材色谱图

表 2 10 批山豆根药材样品共有峰相对保留时间

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.305	0.308	0.308	0.292	0.272	0.271	0.293	0.293	0.292	0.304	4.588
2	0.393	0.384	0.395	0.372	0.349	0.369	0.399	0.384	0.372	0.409	4.586
3	0.462	0.452	0.456	0.434	0.411	0.422	0.450	0.446	0.448	0.451	3.610
4	0.517	0.517	0.518	0.491	0.458	0.460	0.507	0.497	0.491	0.508	4.465
5	0.645	0.645	0.636	0.590	0.565	0.604	0.640	0.625	0.590	0.632	4.544
6	0.810	0.809	0.793	0.769	0.723	0.726	0.778	0.752	0.769	0.765	3.925
7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
8	1.317	1.310	1.300	1.241	1.164	1.158	1.236	1.203	1.241	1.236	4.522
9	7.159	7.149	7.261	6.830	6.400	6.511	7.047	7.039	6.830	7.272	4.357
10	7.300	7.299	7.367	6.935	6.506	6.630	7.176	7.139	6.936	7.357	4.323
11	7.572	7.570	7.686	7.237	6.790	6.895	7.470	7.440	7.238	7.662	4.241
12	8.316	8.318	8.388	7.919	7.407	7.534	8.160	8.137	7.917	8.394	4.362
13	9.264	9.263	9.390	8.826	8.269	8.447	9.155	9.134	8.826	9.422	4.401
14	10.406	10.405	10.546	9.921	9.306	9.445	10.239	10.227	9.920	10.533	4.346
15	10.470	10.468	10.609	9.969	9.347	9.495	10.298	10.291	9.960	10.570	4.376
16	10.657	10.658	10.797	10.147	9.516	9.658	10.475	10.463	10.151	10.781	4.394
17	10.701	10.700	10.841	10.190	9.562	9.703	10.527	10.512	10.192	10.830	4.379
18	10.734	10.735	10.877	10.224	9.592	9.733	10.556	10.544	10.223	10.860	4.377
19	10.782	10.781	10.925	10.271	9.635	9.769	10.590	10.588	10.271	10.901	4.373
20	10.858	10.849	11.002	10.344	9.704	9.849	10.682	10.666	10.344	10.987	4.361
21	10.941	10.941	11.084	10.420	9.775	9.921	10.684	10.746	10.350	11.065	4.391
22	11.006	11.002	11.154	10.480	9.830	9.972	10.815	10.807	10.482	11.128	4.387
23	11.087	11.086	11.232	10.559	9.907	10.049	10.900	10.886	10.559	11.208	4.369
24	11.156	11.154	11.304	10.626	9.966	10.111	10.967	10.951	10.626	11.280	4.377
25	11.617	11.614	11.775	11.061	10.371	10.516	11.410	11.390	11.061	11.736	4.400
26	11.990	11.992	12.157	11.423	10.708	10.850	11.771	11.754	11.424	12.105	4.390
27	12.080	12.081	12.248	11.502	10.782	10.933	11.856	11.840	11.502	12.202	4.408

表 3 10 批山豆根样品共有峰相对峰面积

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD/%
1	0.247	0.248	0.348	0.667	1.077	1.054	0.677	0.708	0.667	0.684	45.721
2	0.092	0.090	0.134	0.359	0.561	0.378	0.187	0.279	0.359	0.215	56.804
3	0.033	0.033	0.045	0.139	0.225	0.165	0.127	0.150	0.139	0.147	52.728
4	0.264	0.265	0.328	0.242	0.418	0.327	0.186	0.237	0.242	0.163	27.801
5	0.367	0.366	0.563	1.349	2.485	1.301	0.555	0.991	1.349	0.727	64.682
6	0.212	0.212	0.332	0.319	0.673	0.838	0.471	0.689	0.319	0.633	47.540
7	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
8	0.877	0.845	1.456	1.724	3.635	1.884	0.923	1.324	1.724	1.072	53.459
9	0.055	0.056	0.056	0.070	0.116	0.120	0.050	0.015	0.070	0.033	51.160
10	0.020	0.014	0.059	0.062	0.125	0.048	0.025	0.027	0.062	0.045	66.206
11	0.049	0.048	0.040	0.084	0.240	0.281	0.164	0.212	0.084	0.205	63.956
12	0.030	0.025	0.036	0.063	0.075	0.114	0.061	0.100	0.063	0.076	44.991
13	0.371	0.356	0.410	0.526	0.599	0.050	0.029	0.044	0.526	0.031	78.932
14	0.050	0.048	0.104	0.108	0.142	0.048	0.035	0.043	0.108	0.035	54.174
15	0.050	0.060	0.251	0.076	0.115	0.027	0.022	0.031	0.076	0.016	96.455
16	0.036	0.037	0.105	0.116	0.190	0.027	0.026	0.030	0.116	0.022	81.604
17	0.023	0.029	0.059	0.053	0.073	0.013	0.012	0.012	0.053	0.008	71.035
18	0.026	0.028	0.059	0.056	0.074	0.011	0.008	0.010	0.056	0.012	73.090
19	0.017	0.016	0.036	0.065	0.076	0.011	0.008	0.010	0.065	0.008	87.330
20	0.023	0.028	0.091	0.097	0.121	0.009	0.020	0.017	0.097	0.014	84.779
21	0.030	0.029	0.082	0.086	0.117	0.008	0.011	0.010	0.086	0.010	88.013
22	0.014	0.016	0.046	0.047	0.072	0.024	0.012	0.017	0.047	0.015	66.232
23	0.024	0.023	0.048	0.038	0.033	0.002	0.004	0.003	0.038	0.003	81.050
24	0.224	0.226	0.450	0.430	0.432	0.021	0.034	0.030	0.430	0.025	83.607
25	0.030	0.029	0.020	0.052	0.051	0.003	0.001	0.003	0.052	0.010	83.664
26	0.008	0.008	0.019	0.013	0.011	0.001	0.001	0.001	0.013	0.001	84.866
27	0.028	0.028	0.014	0.065	0.079	0.002	0.001	0.002	0.065	0.006	103.384

表 4 山豆根药材 UPLC 指纹图谱相似度计算

NO	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	SR
S1	1	0.936	0.939	0.890	0.809	0.659	0.733	0.684	0.890	0.675	0.901
S2	0.936	1	0.939	0.890	0.809	0.659	0.733	0.684	0.890	0.675	0.929
S3	0.939	0.939	1	0.928	0.889	0.683	0.721	0.693	0.928	0.678	0.944
S4	0.890	0.890	0.928	1	0.966	0.725	0.735	0.729	0.986	0.701	0.962
S5	0.809	0.809	0.889	0.966	1	0.738	0.702	0.728	0.966	0.687	0.929
S6	0.659	0.659	0.683	0.725	0.738	1	0.847	0.806	0.725	0.794	0.919
S7	0.733	0.733	0.721	0.735	0.702	0.847	1	0.922	0.735	0.912	0.901
S8	0.684	0.684	0.693	0.729	0.728	0.806	0.922	1	0.729	0.952	0.911
S9	0.890	0.890	0.928	0.986	0.966	0.725	0.735	0.729	1	0.701	0.962
S10	0.675	0.675	0.678	0.701	0.687	0.794	0.912	0.952	0.701	1	0.904
SR	0.901	0.929	0.944	0.962	0.929	0.919	0.901	0.911	0.962	0.904	1

注：SR—由软件生成的对照指纹图谱。

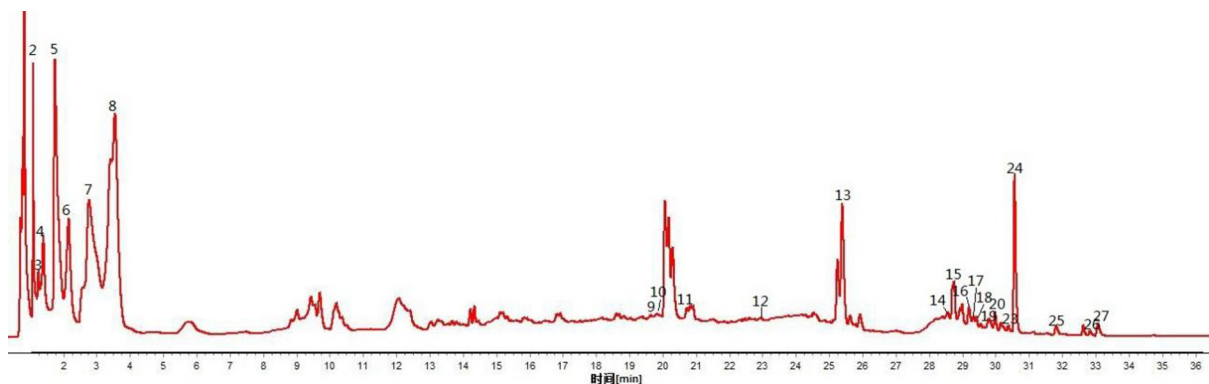


图3 共有模式建立对照指纹图谱

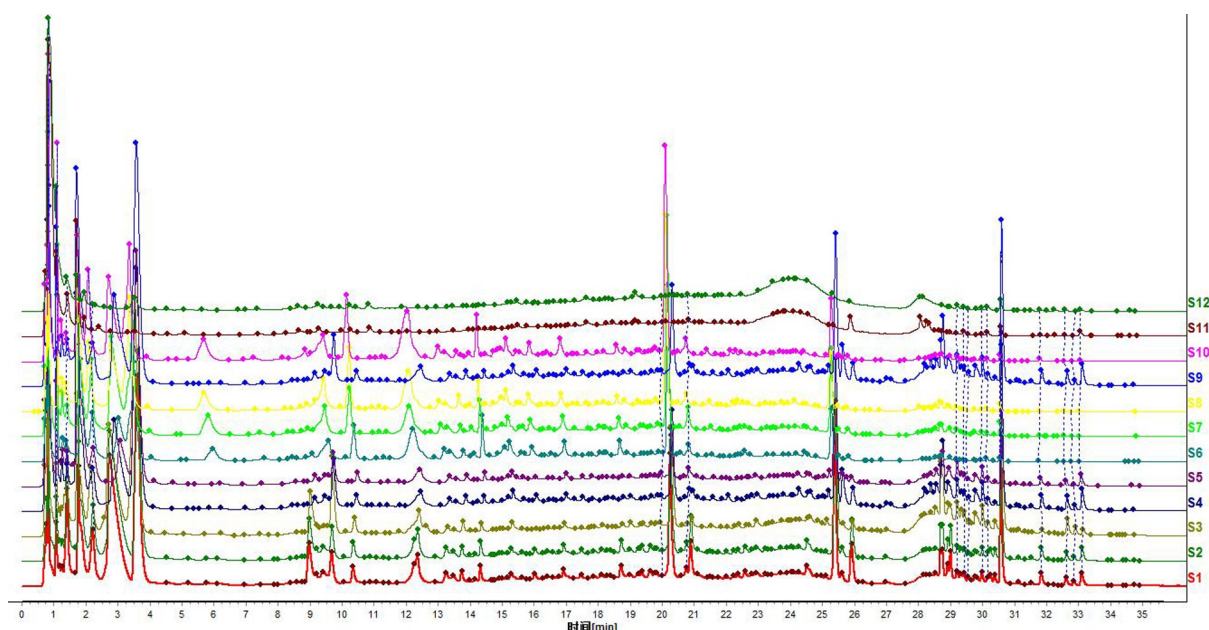


图4 10批山豆根(S1-S10)和2批北豆根(S11-S12)UPLC叠加色谱

实验的创新之处:本文运用了目前分离效率和效果较高的超高效液相色谱技术,与传统的高效液相色谱比较,其在分离效率和分析能力上均有较大的进步,为首次使用 UPLC 对不同产地的山豆根指纹图谱进行了研究。同时,该研究对于中药材等复杂样品的成分分析与质量控制,具有很好的适用性和优势。同时本文从色谱指纹图谱的角度为分析山豆根与北豆根区别提供了思路,有一定实用价值。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2005.
- [2] 李可强,刘威,张振秋. HPLC 法测定北豆根药材中粉防己碱和青藤碱[J]. 中草药,2008,39(4):607-609.
- [3] 周友红,呼海涛. 山豆根不可与北豆根混用[J]. 中国民族民间

医药,2008,17(2):55-56.

- [4] 孙蓉,王晨. 北豆根毒性研究进展[J]. 中国药物警戒,2009,6(9):546-549.
- [5] 李妃,李成平,付晖,等. 山豆根研究进展及毒性成分检测方法补充报道[J]. 药物分析,2013,33(8):1453-1463.
- [6] 刘芷,贾英,赵旭,等. 五味子的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2014,45(11):1631-1633.
- [7] 刘吉成,卢森华,谢巍,等. 广西多叶越南槐 HPLC 指纹图谱的建立及与山豆根 HPLC 指纹图谱一致性比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(23):89-94.
- [8] 黄亚非,黄际薇,陶玲,等. 广西不同产地山豆根的指纹图谱特征研究[J]. 中药材,2005,28(1):21.
- [9] 黄颖,王乃平,陈勇. 广西产山豆根 HPLC 指纹图谱测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):66.

(收稿日期:2016-12-04)

(本文编辑:王馨瑶)