

芭蕉根 HPLC 指纹图谱鉴别研究

王祥培* 孙宜春 靳凤云 许士娜 吴红梅 黄婕
(贵阳中医学院,贵阳 550002)

[摘要] 目的:建立芭蕉根的 HPLC 指纹图谱鉴别方法。方法:采用 RP-HPLC-DAD 法,以 Diamonsil-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,流动相乙腈-0.05% 磷酸水,采用梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,310 nm 波长下测定芭蕉根、香蕉根及美人蕉根的指纹图谱,并作相似度比较分析。结果:建立了芭蕉根药材 HPLC-UV 指纹图谱,20 个共有峰被标定,并对芭蕉根、香蕉根及美人蕉根药材的 HPLC 指纹图谱进行相似度比较,结果差异明显。结论:HPLC 指纹图谱具有重复性好,特征性强,方法简便等特点,可用于芭蕉根药材的鉴别。

[关键词] 芭蕉根;鉴别;HPLC 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)12-0030-04

Identification of *Musa basjoo* by HPLC Fingerprint

WANG Xiang-pei*, SUN Yi-chun, JIN Feng-yun, XU Shi-na, WU Hong-mei, HUANG Jie
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC fingerprint for the identification of *Musa basjoo*. **Method:** The analysis was carried out on a Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of acetonitrile-0.05% phosphoric acid, gradient eluent, the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The wave length was 310 nm, data were analyzed by fingerprint similarity evaluation software to compare the similarity of samples. **Result:** The mutual mode to HPLC-UV fingerprints was established, and the 20 mutual peaks were indicated. The similarities among the of *Musa basjoo*, *Musa nana* and *Canna indica* 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] *Musa basjoo*; identification; HPLC fingerprint

芭蕉根为芭蕉科植物芭蕉 *Musa basjoo* Sied. et Zucc. 的干燥根茎,为贵州省的民族习用药材^[1-2]。主要含有皂苷、香豆素、蒽醌、黄酮、多糖等化学成分^[3],为 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》收载品种,具有清热解毒、止渴、利尿之功效,主治天行热病、消渴、烦闷、水肿、黄疸及痈肿疮疖

等^[1]。在标准中只对芭蕉根的药材性状和显微特征进行了规定,缺乏明确的定量检测指标。这些控制方法很难鉴别及固定原料来源、提高并稳定产品质量,而中药指纹图谱技术能够标示其特征的共有峰的图谱,借以辨别真伪、评价原料药材、半成品以及成品质量的均一性和稳定性^[4]。因此,本文采用 HPLC 对 10 批芭蕉根及其易混淆品香蕉根和美人蕉根药材的指纹图谱进行测试,并作指纹图谱的相似度分析,以期为芭蕉根药材鉴别和质量控制提供一些依据。

1 仪器与试剂

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

[收稿日期] 20100429(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860387);贵州省科学技术基金(J20072138)

[通讯作者] * 王祥培,博士,副教授,主要从事中药及民族药品种品质与资源开发研究, Tel: 13809494182, E-mail: wxp0123@126.com

似度评价系统 A 版》(国家药典委员会);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸馏水。

芭蕉根药材分别采集于贵州各地,共 10 份样品,经笔者鉴定为芭蕉科植物芭蕉 *M. basjoo* 的干燥根茎;香蕉根采集于广东、海南,经笔者鉴定为芭蕉科植物香蕉 *M. nana* Lour. 的干燥根茎;美人蕉根采集于贵州天柱盆处、贵阳,经笔者鉴定为美人蕉科植物美人蕉 *Canna indica* L. 的干燥根茎。见表 1。

表 1 芭蕉根及其混淆品的相似度

No.	样品	产地	采收时间	相似度
S1	芭蕉根	贵州贵阳	2007-11	0.968
S2	芭蕉根	贵州思南	2007-04	0.978
S3	芭蕉根	贵州赤水	2008-02	0.970
S4	芭蕉根	贵州锦屏	2008-02	0.963
S5	芭蕉根	贵州盘县	2008-02	0.964
S6	芭蕉根	贵州荔波	2008-02	0.975
S7	芭蕉根	贵州天柱盆处	2007-08	0.952
S8	芭蕉根	贵州天柱盆处	2008-04	0.973
S9	芭蕉根	贵州天柱远口	2008-02	0.965
S10	芭蕉根	贵州凯里	2008-04	0.964
S11	香蕉根	广东广州	2008-02	0.774
S12	香蕉根	海南海口	2008-02	0.691
S13	美人蕉根	贵州天柱盆处	2008-02	0.475
S14	美人蕉根	贵州贵阳	2007-12	0.418

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Dikma 公司 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸(B) 进行线性梯度洗脱, 0 ~ 15 min, 10% A ~ 10% A, 15 ~ 50 min, 10% A ~ 40% A, 50 ~ 65 min, 40% A ~ 40% A, 65 ~ 105 min, 40% A ~ 70% A, 105 ~ 110 min, 70% A ~ 100% A; 体积流量 1.0 mL · min⁻¹; 柱温 25 °C; 检测波长 310 nm; 运行时间 110 min。

2.2 供试品溶液的制备 取药材粉末(3号筛)3.0 g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 加甲醇 50 mL, 加热回流 1.5 h, 滤过, 药渣加甲醇 50 mL, 回流提取 1.5 h, 滤过, 合并滤液。滤液置蒸发皿中挥干, 残渣加甲醇溶解并定容至 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 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别在 0.03% ~ 1.25% 和 0.51% ~ 2.16%, 表明该方法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 6, 12, 18, 24, 36, 48 h 检测, 测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别在 0.17% ~ 1.95% 和 0.65% ~ 2.79%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取同一批芭蕉根药材分别提取制备 6 份供试品, 进行检测, 测得各共有峰的相对保留时间和相对峰面积比值的 RSD 分别在 0.28% ~ 1.86% 和 0.97% ~ 2.85%, 表明该方法重复性良好。

2.4 指纹图谱建立^[7-8] 精密吸取供试品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 按 2.1 项下的色谱条件, 进行检测。同一试验条件下, 测定所有供试品 HPLC 色谱图。根据不同供试品测定结果所给出的峰数、积分值和相对保留时间等相关参数进行分析、比较, 制定优化的指纹图谱(图 1~2)。

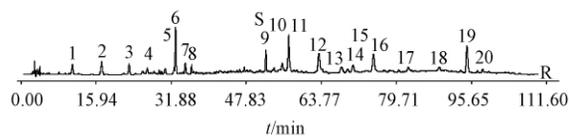


图 1 芭蕉根药材 HPLC 指纹图谱

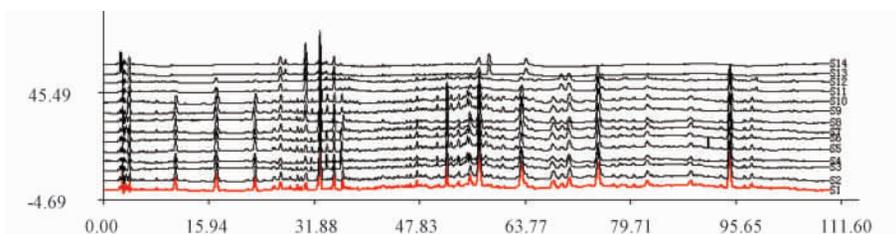


图 2 10 批芭蕉根药材及其易混淆品的 HPLC 指纹图谱

2.5 指纹图谱分析^[5]

2.5.1 芭蕉根指纹图谱相似度评价 分别将采集于贵州贵阳、思南、赤水、锦屏、盘县、荔波、天柱

盆处、天柱远口、凯里共 10 批芭蕉根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 版相似度软件, 进行相似度的评价。结果

见表 1。

药材的指纹图谱进行考察,确定了 20 个共有峰(图

2.5.2 芭蕉根共有指纹峰的确立 以保留时间约为 54.98 min 的 9 号峰作为参照峰,对 10 批芭蕉根

1,表 2~3)。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)。

表 2 10 批芭蕉根药材 HPLC 指纹图谱的相对保留时间

No.	t_k									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.209 0	0.208 5	0.208 4	0.208 6	0.208 8	0.209 6	0.209 5	0.208 5	0.208 0	0.208 3
2	0.329 4	0.327 6	0.328 4	0.328 2	0.328 6	0.327 6	0.329 0	0.327 4	0.329 5	0.328 0
3	0.441 2	0.441 4	0.441 0	0.441 2	0.441 4	0.441 6	0.432 7	0.441 0	0.441 0	0.441 3
4	0.507 0	0.510 5	0.515 3	0.514 5	0.514 1	0.515 7	0.516 3	0.508 0	0.508 8	0.511 3
5	0.588 5	0.588 0	0.587 3	0.589 0	0.587 8	0.588 4	0.588 5	0.587 7	0.589 0	0.588 9
6	0.629 5	0.632 7	0.630 0	0.631 0	0.629 8	0.630 6	0.629 6	0.628 3	0.628 7	0.633 7
7	0.670 2	0.671 4	0.670 0	0.671 6	0.670 5	0.671 0	0.670 5	0.671 1	0.671 0	0.670 8
8	0.695 4	0.694 8	0.697 1	0.693 3	0.694 2	0.694 2	0.695 2	0.693 4	0.694 4	0.694 8
9(S)	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
10	1.067 7	1.066 6	1.068 3	1.067 0	1.067 4	1.066 9	1.067 9	1.067 6	1.067 2	1.066 4
11	1.091 9	1.092 0	1.093 7	1.093 3	1.093 2	1.092 5	1.093 7	1.092 2	1.093 1	1.091 5
12	1.219 1	1.217 3	1.217 6	1.218 1	1.219 3	1.217 9	1.217 2	1.217 4	1.215 1	1.217 3
13	1.306 9	1.307 4	1.307 7	1.307 9	1.308 1	1.308 6	1.307 8	1.307 8	1.307 0	1.308 8
14	1.332 1	1.334 5	1.334 3	1.332 5	1.332 9	1.333 9	1.333 6	1.333 2	1.333 6	1.333 6
15	1.354 1	1.351 8	1.353 8	1.357 8	1.355 5	1.355 7	1.355 9	1.355 7	1.356 4	1.357 0
16	1.441 0	1.440 3	1.440 5	1.441 0	1.440 4	1.441 6	1.439 9	1.439 9	1.441 4	1.440 2
17	1.583 6	1.582 1	1.584 9	1.584 6	1.583 4	1.580 8	1.578 9	1.587 8	1.584 0	1.582 1
18	1.702 6	1.709 0	1.708 8	1.711 6	1.701 4	1.704 7	1.700 1	1.702 4	1.712 2	1.697 6
19	1.814 8	1.823 5	1.822 1	1.828 6	1.823 5	1.824 2	1.823 4	1.823 5	1.823 7	1.824 6
20	1.889 2	1.890 2	1.887 4	1.887 7	1.888 2	1.889 3	1.888 7	1.888 8	1.888 0	1.888 3

表 3 10 批芭蕉根药材 HPLC 指纹图谱的相对峰面积的变化

No.	相对峰面积									
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.561 0	0.540 9	0.416 6	0.492 0	0.424 4	0.597 2	0.490 1	0.578 1	0.560 7	0.263 2
2	0.833 8	0.783 2	0.900 9	0.953 1	0.762 3	1.022 7	0.888 1	0.917 0	0.986 1	0.478 7
3	0.561 1	0.533 5	0.430 1	0.522 5	0.481 7	0.641 9	0.597 5	0.616 7	0.567 3	0.281 2
4	0.381 8	0.397 9	0.408 7	0.439 7	0.365 7	0.311 4	0.511 3	0.425 8	0.283 9	0.154 2
5	0.296 1	0.283 2	0.586 0	0.465 6	0.229 4	0.523 4	0.596 6	0.309 9	0.425 3	0.095 2
6	1.846 3	1.847 1	1.953 8	1.914 0	1.435 7	1.879 9	1.757 2	2.176 6	1.848 4	1.319 5
7	0.454 8	0.478 8	0.397 0	0.287 0	0.252 7	0.411 5	0.481 6	0.614 0	0.416 6	0.275 9
8	0.239 3	0.278 7	0.315 7	0.258 8	0.263 7	0.526 8	0.289 6	0.414 0	0.614 4	0.394 7
9(S)	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
10	0.886 3	0.972 6	0.812 4	0.575 9	0.752 0	0.778 1	0.760 7	1.060 8	0.679 0	0.693 5
11	2.547 9	2.414 2	1.813 9	1.687 9	1.567 2	2.257 3	2.399 7	2.770 2	2.147 3	1.735 9
12	1.718 4	1.680 4	1.373 7	1.035 0	1.140 5	1.601 8	2.459 7	1.979 7	1.284 0	1.379 6
13	0.480 4	0.533 5	0.465 6	0.547 9	0.371 7	0.650 4	0.674 1	0.624 3	0.632 2	0.386 1
14	0.235 8	0.239 1	0.265 7	0.252 9	0.181 6	0.312 5	0.211 9	0.286 5	0.307 2	0.210 2
15	0.446 3	0.552 5	0.764 3	0.822 9	0.586 4	0.948 7	0.523 8	0.670 6	0.937 7	0.587 6
16	1.443 6	1.375 7	1.583 0	1.529 9	1.149 2	2.002 0	1.708 3	1.561 6	1.976 2	0.876 9
17	0.326 4	0.348 5	0.382 8	0.622 6	0.325 4	0.542 6	0.469 8	0.441 4	0.476 2	0.247 9
18	0.372 0	0.364 9	0.339 1	0.273 6	0.225 8	0.284 1	0.416 0	0.391 6	0.252 2	0.185 2
19	1.646 5	1.692 3	1.964 0	1.951 7	1.445 1	2.720 2	1.802 1	2.009 1	2.667 8	1.540 4
20	0.269 5	0.285 5	0.273 2	0.257 5	0.223 6	0.328 7	0.540 8	0.285 7	0.328 9	0.165 7

2.5.3 芭蕉根与香蕉根、美人蕉根的指纹图谱比较

从芭蕉根与香蕉根、美人蕉根的指纹图谱中,可以直观地看出各自的色谱指纹图谱明显不同,其特征峰数目、位置(相对保留时间)、积分值均有差异,香蕉根、美人蕉根与芭蕉根指纹图谱相比,相似度结果见表 1。

3 讨论

在色谱分离过程中考察了甲醇-水,乙腈-水,甲醇-磷酸水溶液,乙腈-磷酸水溶液等系统^[9-10],结果显示乙腈-0.05%磷酸溶液系统的分离度高,峰形对称,基线稳定;对不同检测波长进行考察,结果在 310 nm 检测波长下,芭蕉根色谱中色谱峰较多,信息丰富。

曾采用乙醇和甲醇分别进行提取比较,在 310 nm 检测波长下,以甲醇提取的色谱峰较多,信息丰富。并对回流提取法和超声提取法进行比较,回流提取法比超声提取法的提取效率高且色谱峰较多。还对回流提取中不同提取时间,不同提取次数进行比较,结果表明甲醇提取 2 次,每次 1.5 h 后提取基本完全。故拟定上述供试品的制备方法。

相似度分析结果表明,不同产地、不同采收期芭蕉根指纹图谱相似度较好,而芭蕉根与香蕉根、美人蕉根指纹图谱相似度有明显差异,说明本文建立的指纹图谱专属性强,可用于芭蕉根药材的识别。同时芭蕉根与同科同属植物香蕉根的相似度较美人蕉科植物美人蕉根相似度高,可能是与亲缘关系相近

的植物具有类似的化学成分有关。

[参考文献]

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准 [M]. 贵阳:贵州科技出版社, 2003:346.

[2] 包骏,冉懋雄. 贵州苗族医药研究与开发 [M]. 贵阳:贵州科技出版社, 1999:153.

[3] 孙宜春,王祥培,靳风云,等. 芭蕉根有效成分的初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2):360.

[4] 付玲,李茜,姜淑芬. 浅述色谱指纹图谱在中药鉴别与质量控制中的作用 [J]. 新疆中医药, 2007, 26(6):50.

[5] 殷放宙,陆兔林,蔡宝昌,等. 铁皮石斛药材 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2008, 39(3):433.

[6] 许士娜,王祥培,孙宜春,等. 天胡荽类药材及其混淆品 HPLC 指纹图谱鉴别研究 [J]. 中成药, 2010, 32(2):173.

[7] 吴红梅,王祥培,贺祝英,等. 热淋清颗粒 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 中成药, 2009, 31(4):496.

[8] 刘训红,陈斌,蔡宝昌,等. 赤首乌和白首乌的 HPLC 指纹图谱鉴定研究 [J]. 中草药, 2005, 36(11):1704.

[9] 蒋珍藕,饶伟源,陈秋虹,等. 穿心莲药材的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3):6.

[10] 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]

(上接第 29 页)

表 2 11 批地黄样品有机氯浓度残留量测定 $\times 10^{-6}$

No.	六六六	滴滴涕	五氯硝基苯 (PCNB)
1	0.013 0	<0.002	<0.001
2	<0.001	<0.002	<0.001
3	<0.001	<0.002	<0.001
4	<0.001	0.014 0	<0.001
5	<0.001	<0.002	<0.001
6	0.014 0	<0.002	0.012 0
7	<0.001	<0.002	<0.001
8	<0.001	0.024 0	<0.001
9	<0.001	<0.002	<0.001
10	0.017 0	<0.002	<0.001
11	<0.001	0.013 0	<0.001

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部 [S]. 2005:附录 53.

[2] 赵燕燕,孙启时. 中药中重金属和农药残留的研究 [J]. 药学实践杂志, 2000, 18(5):272.

[3] 石世学,聂万达,潘力佳. 中药中农药、重金属残留的分析方法概述 [J]. 中草药, 2007, 38(2):310.

[责任编辑 顾雪竹]