

# 土知母药材及其混淆品 HPLC 指纹图谱研究

冯华<sup>1</sup>, 聂明华<sup>1</sup>, 罗秀琼<sup>1</sup>, 王祥培<sup>2\*</sup>

(1. 遵义市食品药品检验所, 贵州 遵义 563002; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

**[摘要]** 目的: 研究并建立土知母药材的指纹图谱。方法: 采用高效液相色谱法, Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 乙腈-0.2 磷酸溶液进行梯度洗脱, 检测波长 275 nm, 柱温 30 °C, 对 19 个不同来源的药材进行了检测。结果: 建立了土知母药材 HPLC 指纹图谱共有模式, 15 个共有峰被标定, 对 19 批土知母及混淆品进行了相似度比较。12 批土知母药材的相似度均 > 0.90, 7 批混淆品均 < 0.65。结论: HPLC 指纹图谱鉴别土知母及混淆品具有重复性好、特征性强、方法简便等特点, 可作为土知母药材鉴别方法。

**[关键词]** 土知母; 混淆品; 高效液相色谱; 指纹图谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0067-03

**[doi]** 10.11653/syfyj2014060067

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfyj.000005.html>

**[网络出版时间]** 2014-01-06 11:28

## HPLC Fingerprints of *Iris tectorum* and its Adulterants from Different Places

FENG Hua<sup>1</sup>, NIE Ming-hua<sup>1</sup>, LOU Xiu-qiong<sup>1</sup>, WANG Xiang-pei<sup>2\*</sup>

(1. Zunyi Institute for Food & Drug Control, Zunyi 563002, China;

2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study and establish the fingerprints of *Iris tectorum* by HPLC. **Method:** The fingerprints of *I. tectorum* was built by using Diamonsil<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> (4.6 mm × 200 mm, 5 μm) as analytical column and acetonitrile-0.2% phosphoric acid as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. Detecting wavelength was set at 275 nm. The temperature of column was at 30 °C. Total 19 batches of *I. tectorum* samples and common peaks were pinpointed analyzed. **Result:** The mutual mode to HPLC fingerprints was set up, and the 15 sources were obtained. The similarities in 12 batches of *I. tectorum* samples were all above 0.90 and those of 7 batches of adulterants were below 0.65. **Conclusion:** The method is simple, stable and reproductible, which can be used to identify *I. tectorum* and its adulterants.

**[Key words]** *Iris tectorum* Maxim; adulterants; HPLC; fingerprints

土知母为鸢尾科植物鸢尾的干燥膨大根茎(别名扁竹根、鸭儿参、铁扁担)<sup>[1-3]</sup>, 本品也作为少数民

族用药, 具有消积、泻热、利咽、通便功效, 用于食积饱胀、便秘、喉痛、牙龈肿痛。近年来, 人们以射干、白射干、蝴蝶花、粗根鸢尾等冒充土知母药材。射干、白射干、蝴蝶花与土知母药材属同科植物, 外形相似极易混淆, 故在使用中经常发生混淆。土知母药材中主要含射干苷、鸢尾苷(I)、鸢尾苷元(II)、鸢尾新苷 A(III)、鸢尾甲黄素 A(IV)、鸢尾新苷 B(V)和 5,7,4'-三羟基-6,3'-二甲氧基异黄酮(VI)、鼠李素等有效成分, 主要检测成分为射干苷。本试验对土知母药材进行 HPLC 指纹图谱进行研究,

**[收稿日期]** 20130813(011)

**[基金项目]** 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目(黔科合中药字[2010]5028号)

**[第一作者]** 冯华, 主管药师, 从事药品检验及新药研究, Tel: 0852-8928059, 15085016387, E-mail: fenghua781014@163.com

**[通讯作者]** \*王祥培, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事新药研究及药物鉴定研究, Tel: 13809494182

获得对照指纹图谱,建立土知母 HPLC 指纹图谱的共有模式,作为与混淆品区别的标准模式,以避免同科植物品种的伪充。同时对 19 种不同产地土知母药材及混淆品进行了相似度比较,为药材的质量控制建立了新的分析方法。

### 1 仪器与试剂

美国 Agilent LC-1260 型高效液相色谱仪(包括四元泵,二极管矩阵检测器,柱温箱,自动进样器,工作站),Diamonsil C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm); AB204-S 型梅特勒电子天平, KQ-500DV 型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)。中药粉碎机(上海海久中药机械制造有限公司)。乙腈(色谱醇),水为娃娃哈纯净水,其余试剂为分析醇。

射干苷对照品(供含量测定用,批号 111632-200501 购于中国食品药品检定研究院);本试验收集 19 种不同产地的土知母药材及其混淆品(经贵阳中医学院王祥培教授鉴定),来源见表 1。将上述药材粉碎成粗粉(过 60 目筛),备用。

表 1 土知母及混淆品收集情况

No.	样品来源	学名
1	遵义正安	土知母 <i>Iris tectorum</i> Maxim
2	贵州安顺	土知母 <i>I. tectorum</i>
3	贵州安顺市场	土知母 <i>I. tectorum</i>
4	贵州毕节	土知母 <i>I. tectorum</i>
5	贵州都匀	土知母 <i>I. tectorum</i>
6	贵阳	土知母 <i>I. tectorum</i>
7	贵阳市场	土知母 <i>I. tectorum</i>
8	贵州凯里	土知母 <i>I. tectorum</i>
9	贵州铜仁沿河	土知母 <i>I. tectorum</i>
10	贵州兴义	土知母 <i>I. tectorum</i>
11	贵州遵义县	土知母 <i>I. tectorum</i>
12	贵遵义市市场	土知母 <i>I. tectorum</i>
13	四川	射干 <i>Belamcanda chinensis</i> (L.) dc.
14	四川市场	射干 <i>B. chinensis</i>
15	贵州铜仁印江	射干 <i>B. chinensis</i>
16	贵州铜仁沿河	射干 <i>B. chinensis</i>
17	贵州遵义县	射干 <i>B. chinensis</i>
18	贵州遵义市场	射干 <i>B. chinensis</i>
19	云南	射干 <i>B. chinensis</i>

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件**<sup>[4-10]</sup> Diamonsil™ C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 × 200 mm),流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~8 min, 10%~18% A, 8~25 min, 18%~30% A; 25~50 min, 30%~45% A; 50~60 min, 45%~10% A)。检测波长 275 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 取射干苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释制成 1 mL 含 0.2 mg 的

溶液,即得。

**2.3 供试品溶液制备** 取土知母药材粗粉(过 60 目筛)1.2 g,精密称定,置具塞瓶中精密加入甲醇 50 mL,称重,超声 40 min。放至室温,用甲醇补足质量,摇匀。微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

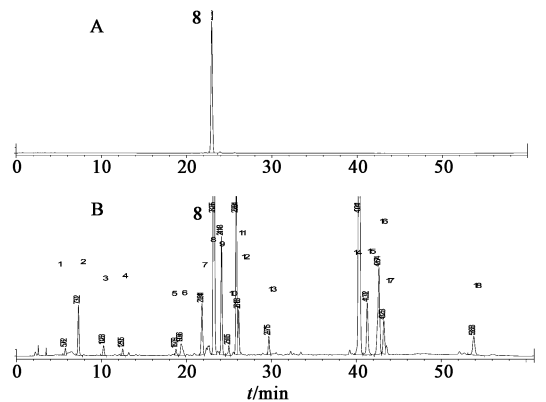
**2.4 精密度试验** 取 1 号土知母样品粗粉,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,重复进样 6 次,记录指纹图谱。将指纹图谱信号数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A),计算 6 次进样所得指纹图谱的相似度。结果表明,6 次进样所得指纹图谱的相似度均 > 0.90,符合指纹图谱测定要求,精密度良好。

**2.5 重复性试验** 取 1 号土知母样品粗粉 6 份,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别进样,记录指纹图谱。计算 6 份样品所得指纹图谱的相似度均 > 0.97。符合指纹图谱测定要求,重复性好。

**2.6 稳定性试验** 取 1 号土知母样品粗粉,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样测定,计算指纹图谱的相似度。结果表明在 24 h 内指纹图谱的相似度均 > 0.90,符合指纹图谱测定要求,稳定性良好。

### 3 结果

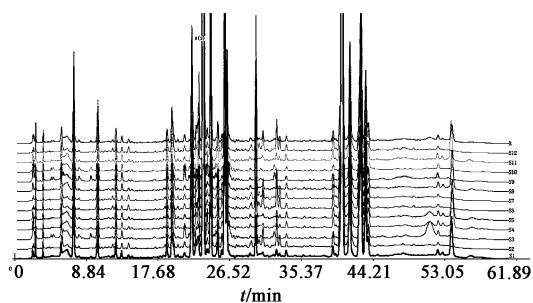
**3.1 不同产地土知母药材指纹图谱建立** 取 1~12 号土知母药材样品,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,进样,记录各样品在 60 min 内指纹图谱,15 个共有峰被标定,见图 1,12 批不同来源土知母药材的指纹图谱匹配后的图谱见图 2,取混淆品(13~19 号样品),同法制备供试品溶液,进样,获得 7 批不同来源混淆品药材的指纹图谱,见图 3。



A. 对照品; B. 样品; 8. 射干苷(参照峰)

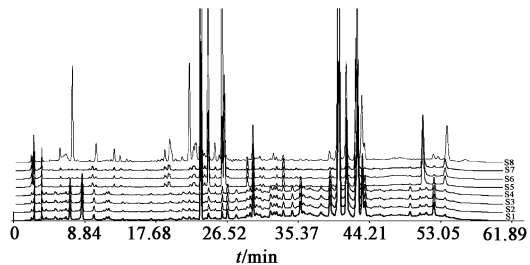
图 1 土知母药材提取物的 HPLC

**3.2 相似度分析** 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件对从各地采集的土知母



S1 ~ S12. 1 ~ 12 号样品; R. 共有模式

图2 12批不同来源的土知母药材指纹图谱



S1 ~ S7. 13 ~ 19 号样品; S8. 共有模式

图3 5批混淆品的指纹图谱

药材的指纹图谱进行数据处理,生成对照指纹图谱的对照图谱,计算各样品图谱与对照图谱的相似度。相似度计算结果见表2。根据相似度分析结果,12个土知母药材的相似度均 $>0.98$ 。

表2 不同来源土知母药材的相似度评价

No.	相似度	No.	相似度	No.	相似度
1	0.917	8	0.932	14	0.642
2	0.923	9	0.952	15	0.615
3	0.903	10	0.942	16	0.624
4	0.947	11	0.956	17	0.611
5	0.911	12	0.908	18	0.616
6	0.920	13	0.625	19	0.604
7	0.906				

#### 4 讨论

射干苷是土知母中主要成分之一,出峰保留时间约23 min,梯度洗脱位置适中,因此选择射干苷为参照峰。由图1可见,标定了15个共有峰,8号峰为参照物射干苷。由表2可见,12批土知母药材相似度均 $>0.90$ 。结果表明,各样品中主要的色谱峰基本一致,但各峰面积差异较大。可见不同产地土知母各含量有一定的差异,可能是生长环境和成熟程度影响,也说明了中药材成分的复杂性。

本实验收集的混淆品的相似度均 $<0.65$ ,相似度虽然较高,可能混淆品与土知母药材同属同科植物,通过对照指纹图谱分析,土知母药材指纹图谱峰数明显多于混淆品指纹图谱峰数目,也能很好区别

土知母药材和混淆品。本试验收集到的药材有限,对土知母药材其他混淆品的指纹图谱有待进一步研究。

本实验对提取溶剂进行考察,比较了不同浓度甲醇,以纯甲醇提取液的出峰个数较多,且基线较平整,故提取溶剂选择纯甲醇。对超声、浸渍、回流提取3种不同提取方法考察,浸渍和超声提取方法提取率没有差异,超声操作省时,操作较方便,故选择超声提取。对不同提取时间的考察结果表明40 min后各时间提取率基本一致,故选择超声时间为40 min。所以确定用纯甲醇超声40 min为提取方法。

对甲醇-水、乙腈-磷酸溶液、甲醇-乙腈-水、乙腈-水4个流动相考察,结果发现乙腈-磷酸溶液梯度洗脱效果最好。同时采用DAD检测器进行紫外区全波长扫描,在265 nm波长下有最大吸收,在265 nm下色谱峰数目较少,丰度较高,考虑兼顾各组分的检测信号强度和检测灵敏度,通过摸索,在275 nm波长下色谱图基线噪音较低,峰的数目多,丰度降低,各峰的保留时间适中,分离度较好,且基线稳定,有利于指纹图谱分析,因此选择275 nm为本实验的检测波长。

#### [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,2010:38.
- [2] 贵州省药品监督管理局.《贵州省中药材、民族药材质量标准》. 2003版[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:27.
- [3] 中国高等植物编写组.《中国高等植物图鉴》. 第5册[S]. 北京:科学出版社,1985:573.
- [4] 中药注射剂指纹图谱研究技术(暂定)[S]. 2001.
- [5] 陈香爱,袁志芳,刘伟娜,等. 不同产地半枝莲药材及混淆品 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2007,29(10):1412.
- [6] 杨云,许小华,刘富岗,等. 盐胡芦巴 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2009,31(11):1641.
- [7] 孙国祥,侯志飞,宋文璟. 栀子 HPLC 数字化指纹图谱及其统一化研究[J]. 中成药,2007,29(1):1561.
- [8] 曹进,徐燕,张永知,等. 栀子药材指纹图谱整体性分析[J]. 分析化学,2004,32(7):875.
- [9] 李鹏,赵学龙,张丽,等. 丹参炭 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(19):2463.
- [10] 孙国祥,慕喜莹,张飞,等. 连翘的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2007,29(2):161.

[责任编辑 顾雪竹]