

芭蕉根的 UPLC 指纹图谱研究

徐锋, 杨焯, 舒秋娥, 王远敏, 王祥培*
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 建立芭蕉根的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱分析方法, 为其质量控制提供参考。方法: 采用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 0.1% 乙酸水-乙腈洗脱系统梯度洗脱, 检测波长 290 nm, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C。测定 15 批芭蕉根药材的指纹图谱, 并对不同产地的芭蕉根进行系统聚类分析和相似度比较。结果: 建立了芭蕉根药材的 UPLC 指纹图谱, 确立了 16 个共有峰, 系统聚类分析可将不同产地的芭蕉根分为 3 大类, 结合相似度分析结果说明不同产地样品的化学组分的含量差异较大。结论: 该方法快速、准确、重复性好, 可用于芭蕉根药材的质量控制。

[关键词] 芭蕉根; 超高效液相色谱; 聚类分析; 指纹图谱; 质量控制

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0111-04

[doi] 10.11653/syjf2013150111

UPLC Fingerprint Research of *Musa basjoo*

XU Feng, YANG Ye, SHU Qiu-e, WANG Yuan-min, WANG Xiang-pei*
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the UPLC fingerprint analysis method of *Musa basjoo*, for its quality control. **Method:** Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) column was used, the mobile phase was composed 0.1% acetic acid water-acetonitrile with gradient elution, detection wavelength was set at 290 nm, the flow rate was 0.2 mL·min⁻¹, column temperature was 35 °C. Determination of fingerprint of *Musa basjoo*, the system cluster and similarity comparison was used to analysis the different origin *M. basjoo* herbs. **Result:** The UPLC fingerprint of *M. basjoo* was established and calibration of 16 common peaks, *M. basjoo* herbs can be divided into three categories by hierarchical cluster analysis, combined with the similarity analysis results indicate that the different origin of the *M. basjoo* had difference content of chemical composition. **Conclusion:** The method is simple, rapid, accurate, reproducible, so it can be used for quality control of the *M. basjoo* herbs.

[Key words] *Musa basjoo*; UPLC; clustering analysis; fingerprinting; quality control

芭蕉根为芭蕉科植物的干燥根茎, 为贵州省的民族习用药材^[1-2], 具有清热解毒、止渴、利尿之功

效, 现代研究表明芭蕉根还具有抗菌、α-葡萄糖苷酶抑制、降血糖和镇痛抗炎等药理作用^[3-6]。芭蕉根主要含有酚类、强心苷、香豆素、萜醌、挥发油、甾体等化学成分^[7-11]。目前, 以芭蕉根为原料的制剂有骨康胶囊、骨康片、肿痛舒喷雾剂等。控制原料的质量对制造合格的药物制剂具有巨大的现实意义^[12], 在 2003 年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》中只对芭蕉根的药材性状和显微特征进行了规定, 并不能对芭蕉根质量进行较为整体、全面的控制。

文献报道了不同产地和采收期芭蕉根中多糖和总皂苷的含量有显著差异^[13-14], 但单一地测定药材中一个或者几个成分的含量并不能真正反映中药材

[收稿日期] 20121231(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860387); 贵州省中药现代化公关计划项目[黔科合 ZY(2012)3016]

[第一作者] 徐锋, 研究生, 从事中药、民族药的品种鉴定与质量控制, Tel: 18286036768, E-mail: 810230331@qq.com

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

的质量^[15]。中药指纹图谱是一种多指标的质量控制模式,可以比较全面的反映所含化学成分的种类和数量,能够更加有效地体现出中药成分的整体性和综合作用,从而更好地评价中药及其制剂的质量^[16]。虽然课题组进行了芭蕉根的 HPLC 指纹图谱鉴别研究^[17],但分离效率和灵敏度不够满意,未能很好的达到快速、准确的对芭蕉根药材进行质量评价。因此,本文采用 UPLC 新型色谱分析技术^[18],对 15 批不同产地、不同海拔的芭蕉根药材进行测试,以期能为芭蕉根药材的质量控制提供更加快速、准确的方法。

1 仪器、试剂与药材

Agilent1290 型超高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器、四元泵溶剂洗脱系统、柱温箱、自动进样器),HS-10260T 型超声波清洗机(天津市恒奥科技发展有限公司),HH-6 型数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯(美国, TEDIA 公司),其余均为分析纯,水为娃哈哈纯净水;芭蕉根药材经贵阳中医学院王祥培教授鉴定为芭蕉科植物 *Musa basjoo* Sied. et Zucc. 的干燥根茎,密封保存于阴凉干燥处,芭蕉根药材来源见表 1。

表 1 芭蕉根药材来源

No.	产地	产地海拔/m	采收时间	相似度
S1	四川省内江市资中县球溪镇大黑山子村	413. 10	2012-08-31	0. 929
S2	贵州省龙里县湾寨乡中学	1 000. 56	2012-07-19	0. 901
S3	四川省成都市新都区	502. 10	2012-07-24	0. 913
S4	贵州省印江县天堂镇	600. 25	2012-07-12	0. 943
S5	贵州省贞丰县龙场镇	1 143. 58	2012-07-14	0. 951
S6	贵州省贵阳市贵阳中医学院	1 078. 20	2012-07-17	0. 895
S7	四川省乐至县天池镇	350. 65	2012-07-21	0. 880
S8	贵州省剑河县革东镇小犄午村	541. 60	2012-07-30	0. 938
S9	贵州省金沙县源村	800. 79	2012-08-19	0. 815
S10	贵州省锦屏县茅坪镇水大渠村	319. 35	2012-07-21	0. 781
S11	西藏墨脱县墨脱镇	1 357. 82	2012-07-15	0. 887
S12	贵州省麻江县黄秧坝	891. 80	2012-07-24	0. 859
S13	贵州省天柱县瓮处镇大冲村	298. 52	2012-07-21	0. 934
S14	贵州省天柱县瓮处镇清浪村	300. 46	2012-07-22	0. 885
S15	贵州省安顺市平坝县	836. 24	2012-07-28	0. 696

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱;流动相乙腈(A)-0.1% 醋酸水溶液(B)梯度洗脱(0~3 min, 5%~15% A; 3~7 min, 15%~18% A; 7~10 min, 18%~29% A; 10~17 min, 29%~40% A; 17~21 min, 40%~50% A; 21~25 min, 50%~70% A; 25~27 min, 70%~100% A; 27~30 min, 100%~100% A), 流速 0.2 mL·min⁻¹, 检测波长 290 nm, 柱温 35 ℃, 进样量 0.6 μL。

2.2 供试品溶液的制备 精确称取芭蕉根样品粉末 1.0 g, 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, 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(0.22 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取芭蕉根(S1) 供试品溶液, 按 2.1 项下给出的色谱方法连续进样 6 次, 记录色谱图, 以 6 号峰为参照, 测得共有峰与参比峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密吸取芭蕉根(S1) 供试品溶液, 按 2.1 项下方法分别在 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 进样测定, 其各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.3 重复性试验 取四川省成都市新都区产的芭蕉根药材 6 份, 按 2.2 项下操作制备供试品溶液, 进样分析, 记录色谱图, 测得其各共有峰与参比峰的

相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 $< 3.0\%$, 表明该方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立及相似度评价

2.4.1 指纹图谱的建立 按 2.1 项下色谱条件测定 15 批样品, 根据检测结果建立芭蕉根药材的 UPLC 指纹图谱 (图 1~2)。以保留时间约 6.143 min 的 6 号峰作为参照峰 S, 共确立了 16 个共有峰。并对各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积进行了计算, 见表 2~3。

2.4.2 相似度评价 将收集于贵州、四川和西藏的芭蕉根药材的图谱导入《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, 具体数据见表 1。

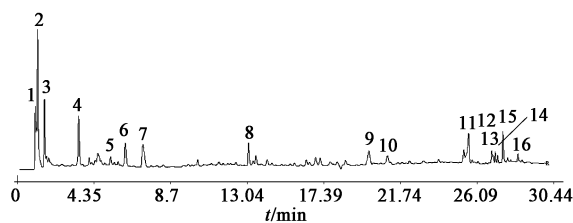


图 1 芭蕉根的 UPLC 指纹

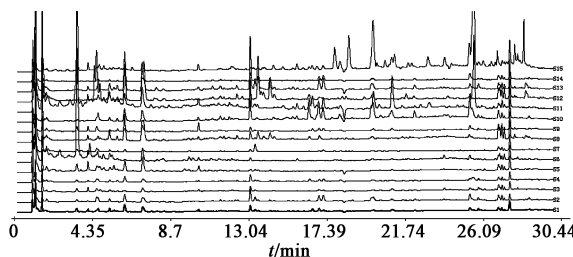


图 2 15 批芭蕉根药材的 UPLC 指纹

表 2 15 批药材 UPLC 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	S12	S13	S14	S15
1	0.165 6	0.165 9	0.165 9	0.165 9	0.165 2	0.166 3	0.165 8	0.168 1	0.168 1	0.175 9	0.167 4	0.170 8	0.168 5	0.166 3	0.168 3
2	0.188 3	0.188 7	0.188 0	0.188 0	0.188 5	0.188 3	0.188 1	0.190 0	0.188 2	0.189 8	0.189 3	0.189 1	0.189 5	0.188 3	0.190 1
3	0.250 5	0.251 5	0.250 7	0.250 7	0.251 0	0.251 5	0.250 9	0.252 7	0.251 2	0.252 8	0.251 7	0.252 0	0.251 5	0.251 3	0.252 7
4	0.666 6	0.665 9	0.666 0	0.666 0	0.665 4	0.664 0	0.665 6	0.666 0	0.666 0	0.664 7	0.665 5	0.666 2	0.666 3	0.667 5	0.667 7
5	0.863 4	0.863 1	0.863 3	0.863 3	0.863 8	0.861 4	0.863 7	0.862 8	0.863 1	0.863 3	0.858 2	0.862 2	0.863 2	0.852 9	0.863 6
6(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	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
7	1.163 6	1.162 5	1.161 8	1.161 8	1.162 9	1.158 6	1.162 7	1.161 7	1.162 1	1.160 5	1.160 6	1.174 7	1.160 0	1.162 2	1.160 1
8	2.138 0	2.140 0	2.138 6	2.138 6	2.137 9	2.134 6	2.137 2	2.145 8	2.138 0	2.140 5	2.141 8	2.140 6	2.139 8	2.140 2	2.172 2
9	3.247 6	3.247 5	3.248 4	3.241 5	3.247 1	3.241 6	3.244 5	3.242 6	3.246 2	3.249 3	3.246 7	3.246 7	3.246 1	3.244 2	3.246 9
10	3.418 9	3.414 5	3.411 3	3.416 5	3.414 7	3.413 5	3.413 7	3.418 4	3.414 6	3.416 3	3.415 6	3.412 1	3.413 2	3.418 4	3.412 7
11	4.201 7	4.201 8	4.196 7	4.199 8	4.201 5	4.201 4	4.209 2	4.206 4	4.206 2	4.203 1	4.201 7	4.202 1	4.203 6	4.203 8	4.205 6
12	4.383 7	4.393 1	4.388 7	4.388 7	4.383 0	4.381 5	4.260 1	4.269 1	4.260 8	4.269 1	4.271 2	4.261 5	4.264 4	4.259 9	4.256 1
13	4.415 3	4.424 5	4.419 8	4.419 8	4.414 4	4.412 6	4.418 0	4.433 4	4.418 9	4.429 4	4.431 7	4.424 1	4.424 2	4.421 8	4.427 8
14	4.436 8	4.446 2	4.441 3	4.441 3	4.435 9	4.434 3	4.439 5	4.455 3	4.440 5	4.450 8	4.452 5	4.445 8	4.445 9	4.443 5	4.448 2
15	4.487 5	4.495 6	4.490 7	4.490 7	4.485 5	4.483 4	4.488 5	4.504 7	4.489 2	4.500 1	4.501 8	4.494 8	4.494 7	4.492 3	4.497 1
16	4.662 9	4.671 6	4.666 2	4.666 2	4.661 6	4.658 5	4.665 4	4.680 7	4.666 0	4.675 5	4.678 0	4.671 5	4.670 2	4.669 3	4.674 7

表 3 15 批药材 UPLC 指纹图谱的相对保留峰面积

共有峰	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
1	1.003 3	1.335 5	32.341 0	1.603 9	28.789 0	58.191 0	2.477 3	11.208 0	2.694 2	0.354 4	0.558 0	0.631 8	0.898 3	0.819 2	3.437 9
2	2.561 5	2.285 7	15.195 0	3.159 4	24.684 0	85.620 0	10.818 0	17.160 0	2.371 9	1.670 2	15.350 0	1.204 7	0.986 3	2.760 1	7.241 8
3	0.853 8	0.647 8	8.658 5	1.241 5	11.579 0	55.872 0	3.670 5	4.783 0	2.107 4	0.682 5	5.828 0	0.390 1	0.250 3	1.040 6	2.503 3
4	0.249 2	0.096 3	2.634 1	0.227 1	6.078 9	3.510 6	0.306 8	1.000 0	1.239 7	0.042 1	0.588 0	0.020 5	0.071 8	0.191 9	1.222 2
5	0.375 4	0.328 9	1.682 9	0.318 8	3.868 4	4.723 4	0.647 7	3.367 9	0.314 0	0.243 9	1.212 0	0.183 4	0.157 3	0.110 7	0.352 9
6(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	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0
7	0.946 8	1.010 0	5.024 4	0.932 4	10.895 0	13.234 0	1.500 0	0.339 6	2.049 6	1.038 6	1.962 0	1.914 4	0.953 8	0.804 4	1.673 2
8	0.657 8	1.402 0	3.463 4	1.014 5	16.632 0	2.361 7	0.829 5	10.387 0	1.074 4	1.338 6	1.944 0	0.125 3	1.111 1	0.966 8	0.333 3
9	0.255 9	0.597 2	0.922 9	0.167 7	0.859 5	0.547 4	1.903 6	1.137 6	0.191 0	0.263 2	0.174 9	0.535 8	0.520 5	1.282 5	17.137 7
10	0.324 8	0.250 6	3.632 0	0.066 0	2.135 5	0.717 2	0.450 2	1.320 0	2.236 4	0.109 0	0.096 6	0.394 5	0.968 1	0.127 7	3.429 1
11	0.463 4	0.967 9	1.502 7	0.401 2	0.933 7	0.475 3	2.002 4	2.393 3	1.898 8	0.525 9	0.275 0	0.621 9	0.295 9	0.484 8	5.988 0
12	0.355 5	0.624 6	0.951 2	0.555 6	0.552 6	2.340 4	0.193 2	6.245 3	0.256 2	0.033 3	0.116 0	0.017 8	0.015 0	0.568 3	1.790 8
13	0.209 3	0.412 0	5.146 3	0.347 8	4.026 3	1.829 8	0.784 1	1.169 8	0.603 3	0.263 2	0.370 0	0.154 0	0.090 5	0.365 3	0.758 2
14	0.083 1	0.169 4	2.902 4	0.140 1	3.210 5	2.957 4	0.397 7	2.311 3	0.297 5	0.103 5	0.186 0	0.165 0	0.063 0	0.177 1	0.679 7
15	1.066 4	0.578 1	1.585 4	1.029 0	2.236 8	8.702 1	4.863 6	0.377 4	4.124 0	0.882 5	1.154 0	0.415 5	0.366 4	1.889 3	4.535 9
16	0.099 7	0.318 9	5.414 6	0.140 1	10.211 0	1.170 2	0.284 1	1.575 5	0.256 2	0.180 7	0.080 0	0.026 0	0.031 2	0.147 6	0.326 8

2.5 系统聚类分析 将不同产地的 15 批芭蕉根的

UPLC 图谱中 16 个共有峰的峰面积值标准化组成

15 × 16 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 20.0 软件对其进行系统聚类分析,采用组间连接法,利用欧式距离(Euclidean)作为样品的测度。根据 15 个样品之间相关系数由大到小的顺序合并,样品中 S1, S2, S3, S4, S5, S7, S8, S9, S10, S14, S15 聚为 I 类, S12, S13 聚为 II 类, S6, S11 聚为 III 类(图 3)。

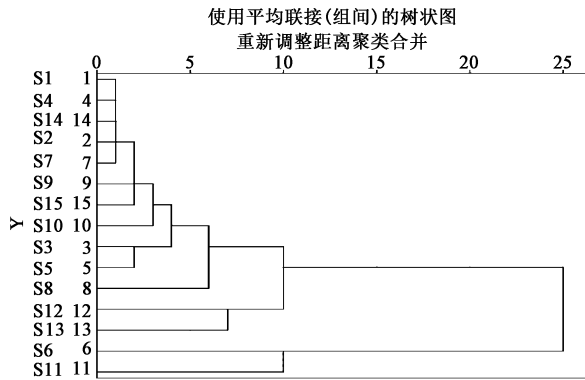


图 3 15 批芭蕉根指纹图谱聚类分析

3 讨论

对提取溶剂的考察结果表明,在比较的甲醇, 50% 甲醇, 乙醇, 50% 乙醇等提取溶剂中,以甲醇提取的样品色谱峰个数较多,峰面积较大,故提取溶剂选择甲醇。对超声、回流 2 种不同提取方法的考察结果表明,回流提取效率优于超声,信息量较完整,故选择回流提取。

在色谱分离过程中考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-醋酸水、乙腈-醋酸水、甲醇:乙腈(1:1)-醋酸水等流动相系统,结果发现本文采用的流动相系统,各峰的分离度较好,且基线平稳,有利于 UPLC 指纹图谱的分析。通过 Agilent DAD 多通道波长检测,结果表明 290 nm 检测波长信息量丰富,特征峰较明显,故选择 290 nm 作为本文的检测波长。

本文建立芭蕉根药材的 UPLC 指纹图谱分析方法并进行相似度比较,发现同是贵州和四川采收的样品之间的相似度差异却较大,说明药材质量优劣有别。通过系统聚类分析,可以将不同产地的芭蕉根药材分为 3 类,发现海拔 300 m 左右(四川省乐至县、贵州省锦屏县和贵州省天柱县)和海拔 800 m 左右(贵州省金沙县、贵州省麻江县和贵州省安顺市)的芭蕉根药材质量差异较大。而海拔高度相差 300 m 以上的贵州省麻江县和贵州省天柱县、贵州省贵阳市和西藏墨脱县的芭蕉根药材两两产地之间芭蕉根品质却较统一,表明芭蕉根药材质量与海拔高度未呈现一定的相关性。同时 15 批样品间个别特征峰的峰面积相差较大,说明样品间色谱峰所对

应的化学成分含量存在较大差异。芭蕉根药材质量差异,可能是受生长环境、生长年限及采收时间等因素综合作用的结果。

[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[S]. 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] 钱海兵,孙宜春,黄婕,等. 芭蕉根不同提取物的抗炎镇痛作用研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(4):780.
- [4] 魏金凤,张倩,赵琳,等. 苗药芭蕉体外抗菌活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):69.
- [5] 张倩,常星,康文艺. 芭蕉的 α -葡萄糖苷酶抑制活性[J]. 食品工业科技,2010,31(2):125.
- [6] 钱海兵,郝俊杰,王祥培. 芭蕉根有效部位对小鼠血糖及糖耐量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):187.
- [7] 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.
- [8] 张倩,康文艺. 芭蕉根活性成分研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(18):2424.
- [9] 王祥培,许士娜,吴红梅,等. 鲜、干品芭蕉根挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):82.
- [10] 王祥培,孙宜春,靳风云,等. 芭蕉根的氨基酸成分分析[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2428.
- [11] 王祥培,郝俊杰,许士娜,等. 芭蕉根醋酸乙酯部位的化学成分研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(3):515.
- [12] 张晓东,邓英贤,徐超斗,等. 申请注册已有国家标准化学药品制剂中容易忽视的几个问题[J]. 解放军药学学报,2005,22(2):159.
- [13] 王祥培,孙宜春,靳风云,等. 不同产地和采收期芭蕉根中多糖的含量测定[J]. 华西药学杂志,2010,25(2):175.
- [14] 陈晓兰,王祥培,孙宜春,等. 贵州不同产地不同采收期芭蕉根中总皂苷含量分析[J]. 时珍国医国药,2009,20(8):1850.
- [15] 刘江,陈兴福,杨文钰,等. 川麦冬野生种质资源色谱特征图谱的建立及其系统聚类分析[J]. 中国中药杂志,2010,35(20):2726.
- [16] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用[J]. 中国中药杂志,2001,26(10):653.
- [17] 王祥培,孙宜春,靳风云,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.
- [18] 金高娃,章飞芳,薛兴亚,等. 超高效液相色谱在复杂体系中药物分离分析中的应用[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2006,8(3):106.

[责任编辑 邹晓翠]