

# 不同产地茯苓药材高效液相色谱指纹图谱的实验研究

段 启<sup>1,2</sup>, 王跃生<sup>1\*</sup>, 王少军<sup>1</sup>, 李霞兰<sup>1</sup>, 龚千锋<sup>2</sup>, 杨世林<sup>1</sup>

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330077; 2. 江西中医学院, 江西 南昌 330006)

[摘要] 目的: 建立茯苓药材的 HPLC 指纹图谱。方法: 以甲醇超声法制备供试液, 采用 HPLC 法, 乙腈和 0.5% 磷酸水为流动相梯度洗脱, 紫外检测波长: 242nm, 柱温: 30℃; 流速: 1.0mL/min。结果: 分析了 10 批不同产地的茯苓药材, 采用计算机辅助相似性评价系统进行了评价, 建立了共有模式, 并以 10 批茯苓指纹向量与共有模式向量间的相关系数和相合系数为测度评价指纹的相似性。结论: 所建立的指纹图谱具有稳定、重现的特点可用于茯苓药材的质量控制。

[关键词] 茯苓; 高效液相色谱; 指纹图谱

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)07-0011-03

## Study on HPLC Fingerprint of *Poria* Grew in the Different Places

DUAN Qi<sup>1,2</sup>, WANG Yue-sheng<sup>1\*</sup>, WANG Shao-jun<sup>1</sup>, LI Xia-lan<sup>1</sup>, GONG Qian-feng<sup>2</sup>, YANG Shi-lin<sup>1</sup>

(1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330077, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the HPLC fingerprint of *Poria* and establish a effective method for controlling the quality. **Methods:** The samples were extracted with methanol and separated on a column with the mobile phase of acetonitrile - 0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in gradient mode, and the flow rate was 1.0mL/min, The detection wavelength was 242nm and the temperature of column was 30℃. **Results:** The batches of *Poria* grew in the different places were measured. The common model was established. The correlation coefficient and  $\cos \theta$  between every batch vector and the total standard model vector were used to define the similarity. **Conclusion:** The method of fingerprint by HPLC is established and the method is stable and reproducible. It was used for quality evaluation, of the crud drug of *Poria*.

[Key words] *Poria*; HPLC; Fingerprint

茯苓为多孔菌科植物真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核。具有利水渗湿、健脾安神的作用, 用于小便不利, 水肿, 脾虚便溏, 心悸失眠。主要含有多糖、三萜酸类如茯苓酸等有效成分<sup>[1,2]</sup>。茯苓主产于云南、安徽, 分别称为云苓和安苓<sup>[3]</sup>。现发展人工栽培以来, 安徽、湖北等省成为茯苓主产区, 如湖北的罗田县已建成茯苓 GAP 基地。不同产地(野生与栽培)茯苓药材间的质量异同值得研究。中药指纹图谱分析是对中药及其制剂进行综合分析的可行手段之一。因此, 本文对云南、安徽和湖北三

省的 10 批茯苓药材进行了 HPLC 指纹图谱方法学研究, 以期通过建立茯苓药材 HPLC 指纹图谱的质量评价方法。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** Aglient 1100 高相液相色谱仪, VWD 检测器, 色谱在线真空脱气机、四元梯度泵、柱温箱。Agilent 化学色谱工作站。超声波清洗仪。试剂: 甲醇、磷酸、乙腈为分析纯, 水为双蒸馏水。

**1.2 试剂** 茯苓药材由本课题组采集, 经江西中医学院中药鉴定室刘贤旺教授鉴定, 均为多孔菌科植物真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 共 10 批, 见表 1。

[收稿日期] 2005-10-24

[通讯作者] 王跃生, Tel: (0791) 7128658

表 1 产地及编号

编号	样品产地	采收时间
1	湖北罗田县九资河镇九资河村南朝北山坡	2003. 10. 31
2	九资河村村东面山坡	2003. 10. 31
3	九资河村村朝南坐北山坡	2003. 10. 31
4	烂泥畈村	2003. 09. 25
5	云南武定县万德乡马德坪村北山坡	2003. 10. 25
6	马德坪村南山坡	2003. 10. 25
7	马德坪村东山坡	2003. 10. 25
8	安徽金寨县桃岭乡桐岗村村东山坡	2003. 11. 07
9	桐岗村村西山坡	2003. 11. 07
10	桐岗村村南山坡	2003. 11. 07

## 2 方法与结果

**2.1 色谱分析条件** 色谱柱: 色谱柱为 Hypersil ODS 25 $\mu$ m C<sub>18</sub> 柱(250 $\times$ 4.6mm, 5 $\mu$ m); 乙腈和 0.5% 磷酸水为流动相梯度洗脱, 梯度洗脱条件见表 2; 检测波长为 242nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 流速为 1.0mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>。进样量 10 $\mu$ L, 记录时间 60min。

表 2 梯度洗脱程序

时间(min)	水(0.5% 磷酸水) v/v	乙腈(%) v/v
0~ 35	50 $\rightarrow$ 15	50 $\rightarrow$ 85
36~ 50	15 $\rightarrow$ 5	85 $\rightarrow$ 95
51~ 55	5 $\rightarrow$ 0	95 $\rightarrow$ 100
56~ 60	0 $\rightarrow$ 50	100 $\rightarrow$ 50

**2.2 供试品溶液的制备** 取茯苓药材粉末(60目)约 3.0g, 精密称定, 置于 25mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 称定重量, 超声处理 30min, 放至室温, 称重, 补足重量, 摇匀。HPLC 分析前用 0.45 $\mu$ m 滤膜滤过即得。

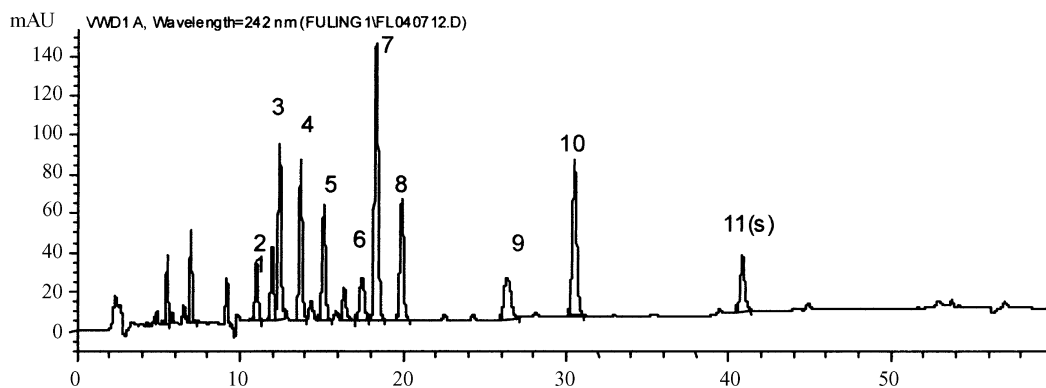


图 1 茯苓三萜酸类成分的指纹图谱

按照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》(暂行)的要求, 初步得到茯苓药材的指纹图谱的技术参数, 见表 3。

## 2.3 方法学考察

**2.3.1 稳定性试验** 精密称取编号 10 茯苓药材, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液。按上述色谱条件, 24h 内连续进样 6 次, 记录各共有色谱峰保留时间和峰面积。以 11(S) 号峰的保留时间和积分峰面积为参照, 各共有峰的相对保留时间的 RSD < 0.5%, 各共有相对峰面积 RSD < 2.3%, 结果表明常温下茯苓药材的供试品溶液 24h 内稳定性良好。

**2.3.2 精密度试验** 取 2.3.1 项下供试品溶液, 按上述色谱条件, 连续进样 6 次, 各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.2%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD < 1.5%, 结果表明仪器系统精密度良好。

**2.3.3 重现性试验** 精密称取编号 10 茯苓药材 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液 6 份, 按上述色谱条件依次进样, 结果显示, 各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.5%, 各共有峰面积 RSD < 3%, 表明重现性良好。

**2.3.4 茯苓药材 HPLC 指纹图谱及技术参数** 依上述方法测定了 10 批不同产地茯苓药材的指纹图谱, 共获得 11 个色谱峰, 典型色谱图见图 1, 不同批号的茯苓药材色谱叠加图见图 2。从指纹图谱中可以看出 11 号峰(保留时间 RT  $\cong$  40.932, 峰面积百分比 A%  $\cong$  7%) 积分百分比比较大, 分离度及峰形很好, 为使相对保留时间数值正负的一致性, 因此选择 11 号峰为参考峰, 记为 S。计算各特征峰的相对保留时间和相对峰面积, 各特征指纹峰的相对峰面积、相对保留时间均具有较好的重现性, 特征指纹峰的相对保留时间 RSD < 1%。

## 3 结论与讨论

**3.1** 本实验考察了甲醇、乙腈、氯仿 3 种溶媒的提取效果, 结果发现用甲醇提取的样品, 色谱峰较多且

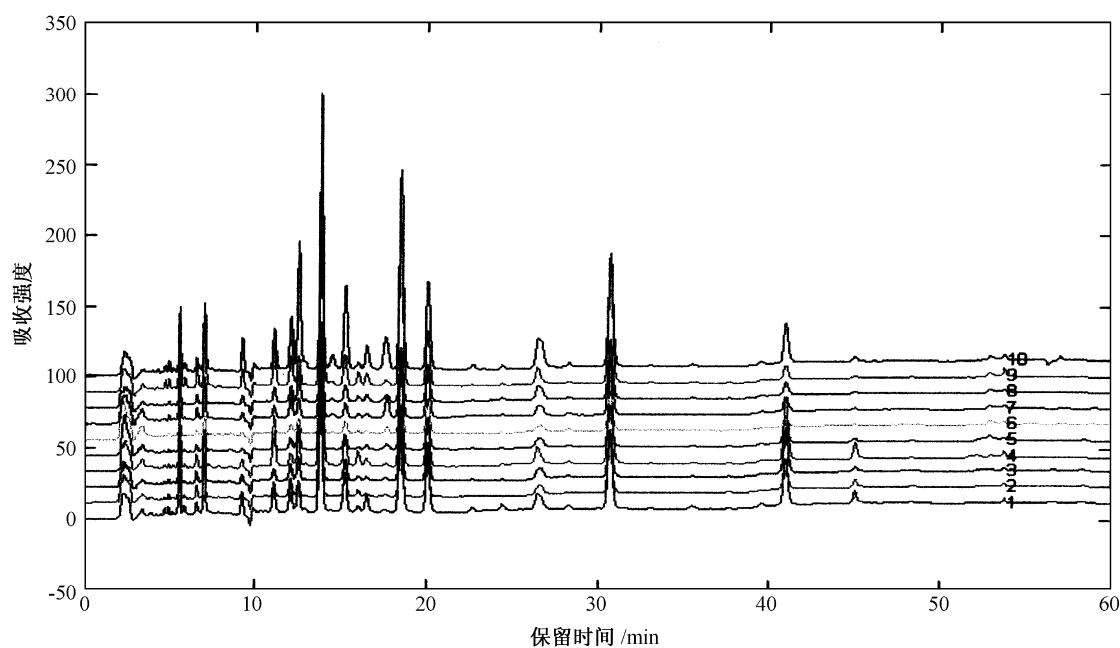


图 2 10 批药材重叠图

表 3 指纹图谱技术参数

峰号	相对保留时间/范围	相对保留峰面积/范围
1	0.1356 ± 0.0004	0.4306 ± 2.3717
2	0.1712 ± 0.0007	0.3104 ± 2.6831
3	0.2697 ± 0.0010	0.1600 ± 1.1963
4	0.3044 ± 0.0002	0.2347 ± 3.6190
5	0.3357 ± 0.0020	0.3516 ± 1.3432
6	0.3711 ± 0.0020	0.4589 ± 2.3819
7	0.4498 ± 0.0020	0.8756 ± 3.8172
8	0.4882 ± 0.0020	0.5753 ± 2.7099
9	0.6473 ± 0.0030	1.6502 ± 9.4119
10	0.7477 ± 0.0020	0.4778 ± 2.0172
11	参照峰(S)	参照峰(S)

吸收值较高。考察了超声提取法、加热回流法、索式提取法三种提取方法及不同提取时间的效果,结果表明超声提取 30min 效果最好。

**3.2** 进行了不同色谱柱的重现性考察,结果显示,同一样品在两根 Hypersil 色谱柱上的色谱行为有较好的一致性。

**3.3** 经测定,茯苓药材供试品溶液分别在紫外波长 210nm 和 242nm 处有最大吸收,在这两种波长下检

测, HPLC 图谱中均有多个色谱峰。但检测波长为 242nm 时色谱峰较多,且峰形较好。综合考虑,选定 242nm 为测定波长。

**3.4** 从上述对 3 省 10 批茯苓药材的分析结果看,其共有峰数一致性强,且相对保留时间一致,说明不同产地茯苓间的质量差异在指纹图谱方面显示不明显。用药典委员会推荐的中南大学中药现代化研究中心梁逸曾研究的计算机辅助相似性评价系统对 10 批样品进行数据处理,得到了茯苓的指纹图谱(11 号峰的相对保留时间及范围),且 10 批样品共有峰的相对保留时间 RSD < 1.0%,完全符合中药指纹图谱的要求。结果表明,本法简便、稳定、信号峰较多、重现性好,可以作为茯苓药材质量评价的一种方法。

#### [参考文献]

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 第 1 卷, 上海: 上海科学技术出版社, 1999. 555.
- [2] 丁岗, 王振中, 章晨峰, 等. 茯苓中三萜酸类成分 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 10(10): 27.
- [3] 胡世林. 中国道地药材原色图说[M]. 山东: 山东科学技术出版社, 1998. 366.