

文章编号:1000-582X(2008)08-0951-05

半夏高效液相色谱指纹图谱鉴定

李正国^{1,2}, 殷红莲^{1,3}, 杨迎伍^{1,2}, 符勇耀^{1,2}

(1. 重庆大学 生物工程学院基因工程研究中心, 重庆 400030; 2. 重庆市高校功能基因与调控新技术重点实验室, 重庆 400030; 3. 四川警察学院, 四川 泸州 646000)

摘要:采用 Agilent C18 色谱柱, 以甲醇-水为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm 对半夏水提物进行高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测。选取乌苷峰为参照峰, 以相对保留时间和相对峰面积作为技术参数, 确定 9 个峰作为鉴别半夏药材与半夏替用品和伪品的群体特征峰, 相对保留时间分别为 1.00、1.12、1.50、1.56、1.60、1.67、1.71、1.81 和 1.87。该结果为半夏药材的鉴定提供了重要参考。

关键词:半夏; 高效液相色谱; 指纹图谱; 保留时间

中图分类号:R282.71

文献标志码:A

Identification of *Pinellia ternata* by high performance liquid chromatographic fingerprinting

LI Zheng-guo^{1,2}, YIN Hong-lian^{1,3}, YANG Ying-wu^{1,2}, FU Yong-yao^{1,2}

(1. Genetic Engineering Research Center, Bio-Engineering College, Chongqing University, Chongqing 400030, P. R. China; 2. Key Laboratory of Functional Gene and New Regulation Technologies Under the Chongqing Municipal Education Commission, Chongqing 400030, P. R. China; 3. Sichuan Police College, Luzhou 646000, P. R. China)

Abstract: The chromatographic fingerprint of *Pinellia ternata* was established by high performance liquid chromatography (HPLC) using an Agilent C18 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm) column; CH₃OH : H₂O as elution solvents; an ultraviolet detector at 254 nm; a flow rate of 1.0 mL/min. The guanosine peak was used as the reference and the relative retention value α and the relative area S_r as the parameters for the survey of the chromatographic fingerprint. Nine co-possessing peaks were selected as the characterizing fingerprint peaks to distinguish *Pinellia ternata* from false *Pinellia ternata*. The relative retention time of the 9 peaks were 1.00, 1.12, 1.50, 1.56, 1.60, 1.67, 1.71, 1.81 and 1.87, respectively. These peaks can be used to identify the quality of *Pinellia ternata*.

Key words: *Pinellia ternata*; high performance liquid chromatography; chromatographic fingerprint; retention time

半夏为《中国药典》收载的重要药材,也是临床常用的药品,配伍量大,市场供不应求,而目前中药市场

比较混乱,中国药典只收录了半夏(*P. ternata*)作为药材,*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 为半夏正品,

收稿日期:2008-03-17

基金项目:中国-希腊政府间科技合作资助项目(2003-63);重庆市科委攻关项目(03-8001)

作者简介:李正国(1964-),男,重庆大学教授,博士生导师,主要从事植物化学与分子生物学研究,(Tel)023-65120483;
(E-mail)zhengguoli@cqu.edu.cn.

欢迎访问重庆大学期刊网 <http://qks.cqu.edu.cn>

而在市场上作为半夏使用的有水半夏^[1]、掌叶半夏^[2]、山珠南星、虎掌等^[3]。中药指纹图谱是一种综合的可量化的色谱鉴别手段,借以鉴别真伪,评价中药材、半成品和成品质量的均匀性和稳定性^[4-7]。

笔者以市场上常见的半夏药材及其伪品与替用品为材料,通过半夏药材的水提取液的高效液相色谱(HPLC)比较研究,以期建立半夏的 HPLC 指纹图谱,确定半夏的特征峰群,为鉴别半夏药材质量和半夏 GAP 生产基地建设提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-10AVP 高效液相色谱仪配带紫外检测器(日本岛津公司); ZORBAX SB-C18 (5 μm,

4.6 mm×250 mm) 色谱柱(美国 Agilent 公司); UV-2401PC 型分光光度计(日本岛津公司); 超声破碎仪(美国 Coleparmer 公司); 甲醇(色谱纯,重庆化学试剂公司), 鸟苷对照品(色谱纯,美国 Amresco 0193 分装)。

1.2 供试样品及溶液制备

半夏样品及其常见替用品和伪品部分由太极集团提供,部分由笔者收集,并经鉴定,鉴定结果及样品来源见表 1。将样品置于 60 °C 烘箱干燥 2 h,经粉碎机粉碎,过 40 目筛,置瓶中密封备用。精确称取药材粉末 1.0 g,置 50 mL 具塞三角瓶中,加 20 mL 超纯水浸 0.5 h 后,超声提取 40 min,滤纸过滤,滤液冷冻干燥成粉末,用 2 mL 超纯水充分溶解,0.22 μm 微孔滤膜过滤,作为检测样品溶液。

表 1 半夏药材及替用品和伪品

编号	产地	编号	产地	编号	产地
I	重庆沙坪坝	VI	重庆垫江高安	i	水半夏
II	四川宣汉	VII	山西新降	ii	半夏伪品
III	重庆垫江沙河	VIII	四川泸州	iii	南星
IV	山东高密	IX	贵州贵阳	iv	(未鉴定)
V	四川遂宁	X	云南大理	v	组培半夏

1.3 测定波长的选择

用分光光度计测定供试品溶液最佳检测波长,检测波长范围为 200~400 nm,如图 1。从图 1 可以看出,260 nm 处附近的吸收值较高,峰阔宽,因此,确定半夏提取液的检测波长为 254 nm。

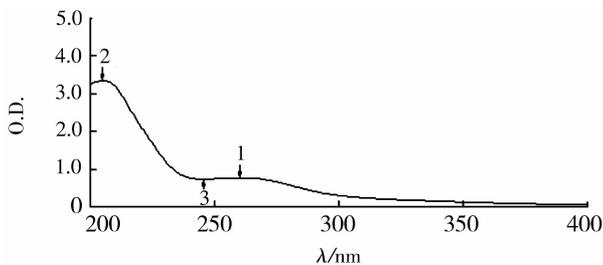


图 1 半夏水提取液的紫外扫描图

1.4 色谱条件的确定

流动相选择:以不同比例的甲醇-水进行试验,以甲醇-水进行梯度洗脱时,样品中各色谱峰分离好且出峰多;分析时间 70 min,样品 120 min 图谱显示,70 min 后无特征峰出现。色谱条件:甲醇-水线性梯度洗脱(见表 2);流速 1.0 mL/min;柱温 30 °C;检测波长 254 nm;进样量 20 μL。

表 2 梯度洗脱程序

时间/min	水/%	甲醇/%
0	100	0
5	100	0
10	98	2
30	90	10
70	0	100

1.5 标准品试验

称取鸟苷标准品 10 mg,加水溶解,定容 50 mL,配成标准品溶液。取标准品溶液 20 μL 注入高相液相色谱仪,得到鸟苷标准品色谱(见图 2),结果在 25.480 min 出现单峰,该峰为鸟苷标准品峰^[8]。将鸟苷标准品溶液与样品溶液以 1:1 的比例混合后取 20 μL,经检测,样品溶液在 25.438 min 的峰强度加强。因此,鸟苷峰在该色谱系统中的保留时间为 25.400 min。

2 结果与讨论

2.1 半夏和替用品及伪品的指纹图谱

10 处不同产地的半夏样品溶液经 HPLC 分析,

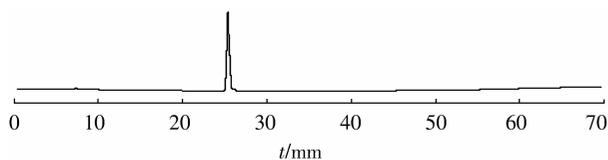


图 2 鸟苷标准品色谱图

得到半夏的指纹图谱,如图 3 所示。半夏替用品和伪品与半夏药材 I 经 HPLC 比较分析,得指纹图谱,如图 4 所示。

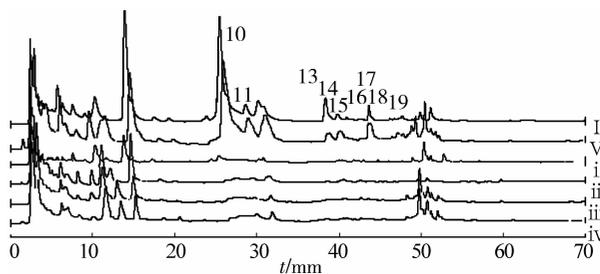


图 4 半夏替用品和伪品与半夏药材 I 的色谱峰比较

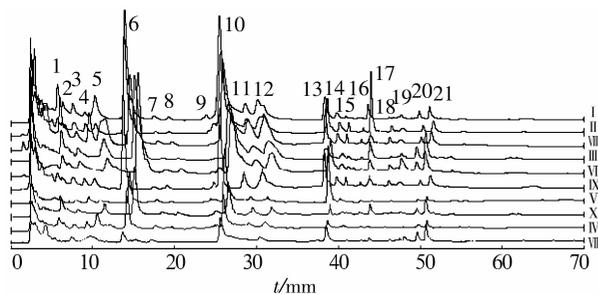


图 3 半夏药材样品 HPLC 指纹图谱

2.2 半夏指纹图谱的技术参数

2.2.1 色谱指纹图谱共有峰相对保留时间

对 10 个半夏药材样品的 HPLC 色谱图进行比较后发现共有 21 个主要的共有峰(如图 3 所示)。选择鸟苷峰为参照峰按曾志等^[9-10]的方法求出其他所有色谱峰的相对保留值(如表 3 所示)。

在可比较的 10 个样品中,21 个色谱峰中有 13 个色谱峰为半夏 10 个样品所共有;另有 2 个色谱峰为 9 个样品所共有;4 个色谱峰为 8 个样品所共有;2 个色谱峰为 7 个样品所共有。

表 3 半夏共有峰的相对保留时间

峰号	I 沙坪坝	II 宣汉	III 沙河	IV 山东	V 遂宁	VI 高安	VII 山西	VIII 泸州	IX 贵阳	X 云南	RSD/%
1	0.224	0.225	0.232	0.225	0.227	0.233	0.210	0.226	0.229	0.227	0.66
2	0.248	0.246	0.259	0.249	0.254	0.261	0.238	0.247	0.251	0.254	0.69
3	0.297	0.296	0.309	0.298	0.303	0.311	0.291	0.301	0.299	0.303	0.65
4	0.355	0.354	—	0.358	0.364	—	0.378	0.361	0.363	0.364	0.79
5	0.404	0.402	0.427	0.407	0.417	0.436	0.435	0.412	0.423	0.417	1.26
6	0.546	0.540	0.569	0.547	0.554	0.575	0.534	0.549	0.555	0.554	1.26
7	0.687	0.686	0.695	0.685	0.692	0.697	0.592	0.688	0.691	0.692	3.17
8	0.757	0.750	0.767	0.753	0.759	0.769	0.681	0.754	0.759	0.759	2.54
9	0.937	0.966	0.942	0.961	0.944	0.942	0.943	0.944	0.952	0.944	0.96
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.00
11	1.123	1.121	1.112	1.121	1.120	1.111	—	1.116	1.118	1.120	0.41
12	1.184	1.206	1.185	1.203	1.201	1.181	1.189	1.188	1.198	1.201	0.88
13	1.507	1.505	1.462	1.489	1.483	1.435	1.503	1.467	1.475	1.483	2.28
14	1.564	1.564	1.524	1.554	1.540	1.496	—	1.538	—	1.540	2.29
15	1.608	1.609	1.553	—	—	1.524	1.605	1.593	1.602	—	3.32
16	—	1.679	1.613	1.643	1.636	1.583	—	—	1.633	1.636	2.96
17	1.714	1.715	1.652	—	1.679	1.620	1.708	1.658	1.683	1.679	3.17
18	1.812	1.815	1.743	—	—	1.711	1.803	1.781	1.802	—	3.69
19	1.873	1.873	1.792	—	—	1.764	1.876	1.845	1.842	—	4.08
20	1.958	1.966	1.866	1.915	1.904	1.832	1.938	1.923	1.931	1.904	4.05
21	2.008	2.015	1.907	1.956	1.944	1.872	1.979	1.947	1.985	1.944	4.38

将半夏药材样品的 21 个峰与水半夏、南星、半夏伪品的 HPLC 色谱峰比较^[11],发现 21 个峰中有

12 个峰为半夏药材样品与水半夏、南星、半夏伪品所共有,这 12 个峰对于鉴别半夏药材与非半夏药材

的专属性不强。因此,位于色谱图中间位置的9个峰可作为鉴别半夏药材的群体特征峰,其对应的峰号为10、11、13、14、15、16、17、18、19号峰, α 值分别为1.000、1.121、1.505、1.564、1.609、1.679、1.715、1.815和1.873(图4)。而半夏药材样品与组培半夏相比,各特征峰几乎完全吻合、各峰面积大小也较接近(图4),说明组培半夏也具有较好的药

用价值。

2.2.2 色谱指纹图谱共有峰相对峰面积

以鸟苷峰为参考峰,得到半夏样品共有峰的相对峰面积如表4。半夏样品相对峰面积的相对标准差均小于5%,重现性好。其中,6号和10号峰所占比重最大,可作为半夏药材主要成分的特征峰。

表4 半夏指纹图谱共有峰相对峰面积

峰号	I 沙坪坝	II 宣汉	III 沙河	IV 山东	V 四川	VI 高安	VII 山西	VIII 泸州	IX 贵阳	X 云南	V 组培	RSD/%
1	0.175	0.110	0.207	0.705	0.075	0.170	0.196	0.179	0.186	0.175	0.246	2.67
2	0.143	0.105	0.104	0.391	0.035	0.122	0.110	0.108	0.125	0.035	0.157	3.29
3	0.129	0.115	0.146	0.274	0.042	0.232	0.337	0.183	0.169	0.142	0.198	3.56
4	0.044	0.085	—	0.376	0.094	—	0.740	0.084	0.095	0.094	0.221	2.83
5	0.193	0.126	0.233	0.909	0.049	0.176	0.190	0.206	0.187	0.149	0.436	3.36
6	0.619	0.626	0.894	1.579	0.484	0.853	0.388	0.581	0.662	0.584	0.613	2.95
7	0.025	0.018	0.029	0.265	0.027	0.029	0.150	0.028	0.031	0.027	0.053	0.91
8	0.013	0.022	0.029	0.101	0.007	0.030	0.041	0.035	0.009	0.007	0.040	2.69
9	0.034	0.072	0.025	0.052	0.014	0.060	0.009	0.036	0.018	0.014	0.007	2.24
10	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
11	0.153	0.160	0.204	0.076	0.160	0.224	—	0.212	0.188	0.160	0.279	4.01
12	0.156	0.306	0.374	0.162	0.143	0.376	0.218	0.324	0.335	0.343	0.422	3.99
13	0.123	0.135	0.060	0.219	0.677	0.170	0.418	0.274	0.164	0.277	0.063	4.88
14	0.045	0.058	0.043	0.058	0.066	0.068	—	0.059	—	0.066	0.085	1.33
15	0.013	0.030	0.025	—	—	0.036	0.021	0.028	0.035	—	—	0.81
16	—	0.015	0.028	0.026	0.013	0.023	—	—	0.028	0.013	0.045	1.05
17	0.054	0.190	0.105	—	0.007	0.102	0.086	0.103	0.104	0.007	0.108	4.87
18	0.010	0.028	0.019	—	—	0.038	0.033	0.035	0.037	—	0.063	1.56
19	0.019	0.033	0.029	—	—	0.148	0.134	0.102	0.089	—	0.030	4.67
20	0.038	0.030	0.077	0.119	0.040	0.085	0.232	0.079	0.083	0.040	0.087	3.19
21	0.062	0.062	0.162	0.186	0.056	0.166	0.455	0.156	0.138	0.156	0.183	4.45

2.3 指纹图谱的相似度分析

按文献[12]方法,根据夹角余弦计算样品图谱之间的相似性,半夏样品从I号至X样品的色谱指纹图谱相似度(%)分别为:100.00、98.28、97.19、85.14、88.71、96.96、87.80、91.25、93.68和91.71,V号组培半夏相似度为94.88%。

色谱峰的重叠率也反映了不同种之间的相似度^[13]。据公式:重叠率(%)=[2×(待测样品与标准样品共有峰)/(待测样品峰数+标准样品峰数)]×100%^[14-15],半夏样品从I至X号样品的指纹图谱重叠率(%)分别为:100.00、97.67、95.24、81.08、85.00、93.02、87.18、88.14、90.36和89.20,V号组培半夏的重叠率为93.02%,水半夏、南星、IV号样品的色谱重叠率(%)分别为:76.00、56.25和60.60。由此可知,半夏样品之间的重叠率较高,均

大于80%,而水半夏为半夏替用品,重叠率为76%,说明水半夏在一定程度上可以替代半夏使用,但其药效不如半夏药材。南星和半夏伪品的重叠率较低,均在60%以下。在半夏药材的样品中,四川宣汉、重庆垫江沙河、重庆垫江高安的重叠率较高,均为90%以上,而这3个地方均为渝东和川东地区,地域较为接近。

3 讨论

半夏水溶液提取液制作指纹图谱,样品预处理简单,色谱系统稳定,出峰多,给出的信息充分,色谱峰之间分离度较好,且基线平稳,可作为鉴定不同来源的半夏药材、鉴定半夏的真伪和指导用药的依据。笔者在收集半夏药材及其混用品、伪品过程中,在太极集团收集到的IV号样品来源和品种均不清楚。经

HPLC 色谱图分析比较后发现,其色谱图与南星的色谱图极为相似,按指纹图谱的技术参数鉴别Ⅳ号样品为南星。

笔者对组织培养半夏的块茎也进行了 HPLC 色谱分析,通过与半夏药材的色谱图比较,组培半夏具有半夏药材的绝大多数群体特征峰,其峰值水平也较高。因此,组培半夏可以代替半夏药材作为药用,半夏药材的组织培养具有较好的发展前景。

在 10 个不同产地的半夏指纹图谱中,主要峰群的整体图貌基本一致。但相对峰面积比值有所差异,同时共有峰和非共有峰峰数也略有不同。这表明:不同产地的半夏药材,其成分和相对含量存在差异。因此,在实际药品生产中,固定药材产地才可确保产品质量的稳定性和可控性。

参考文献:

[1] 黄平, KARAGIANIS G, WATERMAN G P. 水半夏化学成分研究[J]. 中药材, 2004, 27(3): 173-175.
HUANG PING, KARAGIANIS G, WATERMAN G P. Chemical constituents from typhonium flagelliforme [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2004, 27(3): 173-175.

[2] 李晓静, 李志宏, 王玉芹, 等. 掌叶半夏研究概况[J]. 中医药信息, 2004, 21(1): 16-18.
LI XIAO-JING, LI ZHI-HONG, WANG YU-QIN, et al. Study on pinellia pedatisect schott [J]. Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2004, 21(1): 16-18.

[3] 魏淑红, 彭正松. 半夏类药材研究概况[J]. 中药材, 2003, 26(11): 828-832.
WEI SHU-HONG, PENG ZHENG-SONG. Survey of pinellia ternata and its adulterant [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2003, 26(11): 828-832.

[4] QIAN G S, WANG Q, LEUNG S Y K, et al. Quality assessment of rhizomaet radix notopterygii by HPTLC and HPLC fingerprinting and HPLC quantitative analysis [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 44: 812-817.

[5] DRAŠAR P, MORAVCOVA J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 812: 3-21.

[6] CHEN J H, XIE M Y, FU Z H, et al. Development of a quality evaluation system for panax quinquefolium. L based on HPLC chromatographic fingerprinting of seven major ginsenosides [J]. Microchemical Journal, 2007, 85: 201-208.

[7] WANG S, MA H Q, SUN Y J, et al. Fingerprint quality

control of angelica sinensis (Oliv.) diels by high-performance liquid chromatography coupled with discriminant analysis [J]. Talanta, 2007, 72(2): 434-436.

[8] PERRIN C, MEYER L, MUJAHID C, et al. The analysis of 50-monomucleotides in infant formulae by HPLC [J]. Food Chemistry, 2001, 74: 245-253.

[9] 曾志, 杨东晖, 宋力飞, 等. 高效液相色谱指纹图谱应用于板蓝根的鉴定 [J]. 分析化学, 2002, 30(7): 849-852.
ZHENG ZHI, YANG DONG-HUI, SONG LI-FEI, et al. The identification of isatis indigotica fort. by high performance liquid chromatographic fingerprint [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2002, 30(7): 849-852.

[10] BOLIN C, CARDOZO-PELAEZ F. Assessing biomarkers of oxidative stress: analysis of guanosine and oxidized guanosine nucleotide triphosphates by high performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. Journal of Chromatography B, 2007, 856: 121-130.

[11] CHEN P, LI C, LIANG S P, et al. Characterization and quantification of eight water-soluble constituents in tubers of *Pinellia ternata* and in tea granules from the Chinese multiherb remedy Xiaochaihu-tang [J]. Journal of Chromatography B, 2006, 843: 183-193.

[12] 聂磊, 曹进, 罗国安, 等. 中药指纹图谱相似度评价方法的比较 [J]. 中成药, 2005, 25(3): 249-252.
NIE LEI, CAO JIN, LUO GUO-AN, et al. Comparison of different methods for evaluating the similarity of the fingerprints of traditional Chinese medicines [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2005, 25(3): 249-252.

[13] SANCHEZ-PONCE R, RUTANT S C. Steady state kinetic model constraint for multivariate curve resolution-alternating least squares analysis [J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2005, 77: 50-58.

[14] 安睿, 王新宏, 周思丽, 等. HPLC 测定不同产地丹参药材中脂溶性成分 [J]. 中成药, 2004, 26(4): 294-297.
AN RUI, WANG XIN-HONG, ZHOU SI-LI, et al. Determination of fat-soluble component in radix salviae miltiorrhizae from different sources [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2004, 26(4): 294-297.

[15] 郑清明, 泰路平, 郑汉臣, 等. 金丝桃属植物的 HPLC 指纹谱研究 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 365-367.
ZHENG QING-MING, TAI LU-PING, ZHENG HAN-CHENG, et al. Studies on HPLC chromatographic fingerprint spectrum of plants from Hypericum Linn [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003, 34(4): 365-367.