

假马齿苋 HPLC 指纹图谱研究

崔雨晴^{1,2}, 吴飞^{1,2}, 阮克锋^{1,2*}, 张继全^{1,2*}¹上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程研究中心; ²上海张江中药现代制剂技术工程研究中心, 上海 201203

摘要: 采用 HPLC 法建立假马齿苋药材的指纹图谱, SPSS 软件对数据进行统计分析, 结果生成假马齿苋药材 HPLC 指纹图谱共有模式, 并使用聚类分析对指纹图谱进行了模式识别, 有 7 批药材相似度在 0.9 以上, 3 批未达到 0.9, 相似度以及聚类分析结果与药材生长环境密切相关, 指纹图谱和模式识别结合进行中药材质量控制, 较全面的反应假马齿苋药材中的化学成分信息, 可为评价假马齿苋药材提供了科学实验依据。

关键词: 假马齿苋; 指纹图谱; 高效液相色谱; 聚类分析

中图分类号: R284; Q917

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.S.015

Study on HPLC Fingerprint of *Bacopa monnieri*CUI Yu-qing^{1,2}, WU Fei^{1,2}, RUAN Ke-feng^{1,2*}, ZHANG Ji-quan^{1,2*}

¹Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine; ²Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine of Zhangjiang, Shanghai 201203, China

Abstract: To establish an HPLC fingerprint of *Bacopa monnieri*. And all data was analyzed by the SPSS statistical software. The common mode of HPLC fingerprint was established, and the cluster analysis was applied to study the HPLC fingerprint and Chemical pattern recognition. Similarity of 7 batches of *Bacopa monnieri* was more than 0.9, and similarity of 3 batches was below 0.9, similarity and the result of cluster analysis had a certain relationship with collecting zone environment of *Bacopa monnieri*. The combination of fingerprint and chemical pattern recognition is an effective method for the quality control of traditional Chinese medicinal materials and can reflect the comprehensive information of *Bacopa monnieri* and provide the scientific experimental basis for evaluating *Bacopa monnieri*.

Key words: *Bacopa monnieri*; fingerprint; HPLC; cluster analysis

假马齿苋系玄参科植物假马齿苋 *Bacopa monnieri* (L.) Wettst 的全草, 又名白花猪母菜, 白线草, 蛇鳞菜, 主要分布在台湾、福建、云南、广东等省区。味微甘、淡, 性寒, 具有清热凉血, 解毒消肿之功效^[1]。主治痢疾, 目刺肿痛, 丹毒, 痔疮肿痛; 外用治疗象皮肿。其在印度阿育吠陀医药体系 (Ayurvedic system of medicine) 中已有 3000 年以上的用药历史, 被认为具有增强智力和改善记忆, 延缓衰老、预防痴呆, 镇静、催眠, 抗抑郁之功效^[2]。国外研究的焦点主要集中在具有促智活性总皂苷以及皂苷成分的神药活性上^[3-8], 已有相关制剂上市辅助治疗老年痴呆^[9]。国内对其研究报道较少。

假马齿苋药材在质量控制方面的研究基础较弱, 无相关报道。在缺乏系统化学成分研究的前提下, 本研究所建立的假马齿苋药材的高效液相色谱指纹图谱是评价不同生长环境假马齿苋药材质量的有效手段, 为假马齿苋药材的规范种植和新药开发提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (四元泵、ALS、TCC、VWD 和 Chemstation 工作站), 分析天平 (FA2104N 型, 0.1 mg, 上海精密科学仪器有限公司)

1.2 试剂

木樨草甘 (批号: 111720-201307, 中国食品药品检定研究院), 槲皮素 (批号: 100081-2004, 中国食品药品检定研究院), 芹菜素 (批号: 111901-201003, 中

收稿日期: 2016-03-21 接受日期: 2016-05-31

基金项目: 上海市卫计委项目资助 (ZY3-CCCX-3-5001) 上海市科委平台资助 (15DZ2292000); 上海市科委科技支撑项目 (15401902100)

* 通讯作者 Tel: 86-21-51322493; E-mail: ruankf@126.com; jiquan007@139.com

国食品药品检定研究院), Bacopaside I (批号 ASB-00002002, 纯度 87.7%, 购自上海迈瑞尔化学技术有限公司), Bacopaside II、Bacopasaponin C、Bacopasaponin C isomer 及 Bacoside A₃ 对照品均为实验室自制, 无水乙醇、甲醇、磷酸(均为分析纯, 均购自国药集团化学试剂有限公司), 乙腈(色谱纯, 购

自上海星可生化有限公司)。

1.3 药材

10 批假马齿苋药材采集于福建漳州各地(时间均为 2014 年 12 月), 经第二军医大学药学院生药教研室张汉明教授鉴定为玄参科假马齿苋, 药材来源及采集地环境见表 1。

表 1 10 批假马齿苋药材来源及采集地环境

Table 1 Origins and collecting zone environment for ten batches of *Bacopa monnieri*

编号 No.	产地 Origin	环境 Environment	编号 No.	产地 Origin	环境 Environment	
1	诏安寻寮村	湿地	6	云霄山前村	潮湿	潮湿
2	漳浦下崎村	湿地	7	云霄山下	潮湿	潮湿
3	云霄船场村	潮湿	8	云霄阳下村	潮湿	潮湿
4	漳浦白衣村	旱地	9	云霄礁美村	旱地	旱地
5	漳浦北旗村	湿地	10	诏安东梧村	潮湿	潮湿

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agela Promosil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 20 min, 5% A → 15% A; 20 ~ 37 min, 15% A; 37 ~ 65 min, 15% A → 25% A; 65 ~ 77 min, 25% A → 35% A; 77 ~ 90 min, 35% A → 37% A; 90 ~ 95 min, 37% A → 60% A; 95 ~ 105 min, 60% A → 80% A); 检测波长: 205 nm; 柱温: 40 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 5 μL。

2.2 对照品溶液制备

取各对照品(木樨草甘、芹菜素、槲皮素、Bacopaside I、Bacopaside II、Bacopasaponin C、Bacopasaponin C isomer 及 Bacoside A₃)各约 6 ~ 10 mg, 精密称定, 各置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解, 超声放冷, 定容至刻度, 摇匀即得。

2.3 供试品溶液制备

取剪碎药材约 1 g, 精密称定, 精密加入 80% 乙醇溶液 25 mL, 称重, 加热回流 60 min, 放冷, 称重, 补足, 混匀, 过 0.45 μm 滤膜, 续滤液即为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验

取 3 号剪碎药材(见表 1, 下同)约 1 g, 精密称定, 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 考察仪器的精

密度。结果各色谱峰相对保留时间的 RSD 均在 0.2% 以内; 相对峰面积的 RSD 在 2.9% 以内, 仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取 3 号剪碎药材 6 份, 每份约 1 g, 精密称定, 制备供试品溶液并测定, 考察方法重复性。结果各色谱峰相对保留时间的 RSD 在 0.2% 以内; 相对峰面积的 RSD 在 2.8% 以内, 重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取重复性试验项下供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 时进样检测, 考察供试品溶液稳定性。结果各色谱峰相对保留时间 RSD 在 0.3% 以内; 相对峰面积 RSD 在 2.8% 以内, 供试品溶液在 24h 内相对稳定。

2.5 假马齿苋指纹图谱的建立^[10-13]

2.5.1 各产地假马齿苋药材的指纹图谱采集及共有峰的标定

取 10 批假马齿苋药材制备供试品溶液并测定, 记录 HPLC 色谱图, 采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价体系(2004A 版)”对 10 批次药材的色谱图对应峰进行多点校对和色谱峰匹配, 确定 26 个共有峰, 选择色谱图中的主要峰 12 和 18 为校正点, 建立假马齿苋药材标准指纹谱图(见图 1)和指纹图谱(见图 2)。计算各特征共有峰的相对保留时间与相对峰面积, 以峰 12 为参照峰(S)计算, 结果见表 2。

表 2 10 批假马齿苋药材共有峰相对保留时间和峰面积

Table 2 Relative retention time and relative areas of common peaks for ten batches of *B. monnieri* in fingerprints

峰号 No.	平均相保留时间 Relative retention time	相对峰面积 Relative peak area										$\bar{x} \pm s$
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
1	0.151	0.204	0.128	0.107	0.054	0.193	0.071	0.055	0.098	0.153	0.105	0.117 ± 0.053
2	0.249	0.067	0.377	0.063	0.080	0.247	0.146	0.157	0.216	0.115	0.128	0.160 ± 0.097
3	0.262	0.107	0.154	0.073	0.044	0.163	0.048	0.046	0.054	0.082	0.105	0.088 ± 0.044
4	0.588	0.106	0.090	0.061	0.024	0.248	0.038	0.020	0.092	0.047	0.063	0.079 ± 0.066
5	0.622	0.091	0.298	0.060	0.046	0.213	0.027	0.033	0.066	0.044	0.084	0.096 ± 0.089
6	0.700	0.067	0.239	0.090	0.127	0.148	0.426	0.374	0.532	0.307	0.143	0.245 ± 0.158
7	0.725	0.107	0.098	0.081	0.130	0.084	0.184	0.117	0.042	0.176	0.160	0.118 ± 0.045
8	0.808	0.708	3.390	1.116	1.904	2.038	4.220	3.883	3.482	2.887	2.307	2.594 ± 1.175
9	0.844	0.422	0.167	0.292	0.182	0.598	0.345	0.140	0.262	0.284	0.260	0.295 ± 0.136
10	0.895	0.759	0.413	0.489	0.304	1.085	0.444	0.268	0.616	0.441	0.464	0.528 ± 0.241
11	0.952	0.200	0.202	0.150	0.070	0.208	0.094	0.059	0.099	0.119	0.095	0.130 ± 0.057
12(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1
13	1.048	0.643	2.162	0.455	0.471	1.211	0.442	0.558	0.643	0.714	1.023	0.832 ± 0.531
14	1.121	0.405	1.440	0.375	0.269	0.912	0.213	0.232	0.225	0.451	0.467	0.499 ± 0.389
15	1.279	0.319	0.691	0.206	0.241	0.398	0.312	0.269	0.283	0.367	0.416	0.350 ± 0.137
16	1.368	0.122	0.103	0.151	0.334	0.149	0.327	0.493	1.185	0.147	0.383	0.339 ± 0.325
17	1.734	0.108	0.278	0.026	0.033	0.075	0.026	0.047	0.100	0.052	0.135	0.088 ± 0.077
18	1.770	0.368	2.515	0.344	0.129	2.170	0.034	0.023	0.202	0.036	0.460	0.628 ± 0.920
19	2.010	0.109	0.923	0.115	0.079	0.878	0.045	0.036	0.313	0.032	0.327	0.286 ± 0.341
20	2.287	0.362	0.805	0.258	0.145	0.659	0.156	0.154	0.371	0.179	0.314	0.340 ± 0.226
21	2.313	0.152	0.452	0.115	0.081	0.355	0.068	0.093	0.145	0.061	0.172	0.170 ± 0.131
22	2.326	0.247	0.838	0.221	0.179	0.760	0.140	0.157	0.445	0.127	0.323	0.344 ± 0.259
23	2.370	0.096	0.057	0.053	0.064	0.053	0.119	0.097	0.087	0.158	0.105	0.089 ± 0.034
24	2.391	0.188	0.396	0.131	0.060	0.344	0.048	0.077	0.084	0.081	0.120	0.153 ± 0.122
25	2.418	0.225	0.395	0.172	0.167	0.468	0.190	0.220	0.259	0.220	0.220	0.253 ± 0.099
26	2.701	0.083	0.218	0.049	0.045	0.164	0.050	0.044	0.163	0.043	0.104	0.096 ± 0.064

2.5.2 共有峰的指认

取木樨草苷、槲皮素、芹菜素、Bacopaside I、Bacopaside A₃、Bacopaside II、Bacopasaponin C、Bacopasaponin C isomer 的对照品溶液分别稀释至适量浓度，

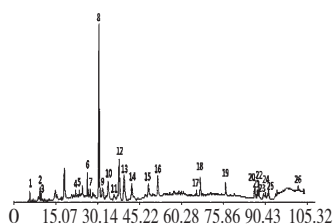


图 1 假马齿苋药材标准指纹图谱

Fig. 1 The typical fingerprint of *B. monnieri*

进样 5 μL ，记录各对照品色谱峰的保留时间分别与药材标准指纹谱上各色谱峰比对，初步确定峰 12 (S) 为木樨草苷，峰 18 为槲皮素，峰 19 为芹菜素，

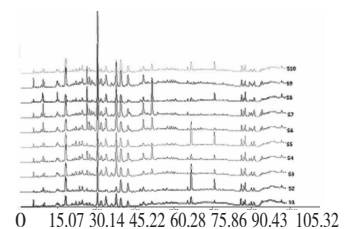


图 2 10 批不同产地假马齿苋药材叠加图谱

Fig. 2 HPLC overlapping chromatograms for ten beaches of *B. monnieri*

峰 20 为 Bacopaside I, 峰 21 为 Bacoside A₃, 峰 22 为 Bacopaside II, 峰 24 为 Bacopasaponin C, 峰 25 为 Bacopasaponin C isomer。

2.5.3 假马齿苋药材相似度评价

采用相似度软件《中药色谱指纹图谱相似度评

价系统 2004 A 版》计算不同批次药材相似度,以平均值法生成对照图谱,时间窗设置为 0.3 min,选择色谱图中的峰 12 和峰 18 进行多点校正。假马齿苋药材 HPLC 指纹图谱相似度计算结果见表 3。

表 3 假马齿苋药材 HPLC 指纹图谱相似度计算结果

Table 3 Results of similarity analysis in fingerprints for ten batches of *B. monnieri*

编号 No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S 对照
S1	1	0.778	0.949	0.794	0.857	0.626	0.626	0.702	0.743	0.842	0.773
S2	0.778	1	0.844	0.805	0.952	0.734	0.747	0.778	0.798	0.905	0.843
S3	0.949	0.844	1	0.934	0.87	0.814	0.817	0.855	0.89	0.943	0.916
S4	0.794	0.805	0.934	1	0.754	0.955	0.963	0.961	0.981	0.972	0.99
S5	0.857	0.952	0.87	0.754	1	0.653	0.653	0.725	0.723	0.855	0.787
S6	0.626	0.734	0.814	0.955	0.653	1	0.996	0.958	0.98	0.912	0.973
S7	0.626	0.747	0.817	0.963	0.653	0.996	1	0.968	0.98	0.922	0.976
S8	0.702	0.778	0.855	0.961	0.725	0.958	0.968	1	0.952	0.943	0.973
S9	0.743	0.798	0.89	0.981	0.723	0.98	0.98	0.952	1	0.96	0.991
S10	0.842	0.905	0.943	0.972	0.855	0.912	0.922	0.943	0.96	1	0.98
S 对照	0.773	0.843	0.916	0.99	0.787	0.973	0.976	0.973	0.991	0.98	1

由表 3 可知,10 批药材中有 7 批药材的相似度大于 0.9,相似度较低的 S1、S2、S5 批药材均产自含水量较多的湿地,可见不同的生长环境对药材影响较大。

2.5.4 系统聚类分析

将各色谱峰相对于参照色谱峰的峰面积量化,运用“SPSS21.0 统计分析软件”,采用欧氏距离作为样品的测度对其进行系统聚类分析,得到聚类树状图,见图 3。结果 10 批样品可分为 3 类,样品 4、8、9 为一类;样品 6、7 为一类;其余样品为另一类。

聚类分析结果与药材生长环境分类的相关性较大,采用聚类分析,S4、S8、S9 为一类,此类中药材多生长在旱地;S6、S7 为一类,两批药材均产自云霄山前村,地理位置和生长环境相近,药材质量较为一致;其余批药材为另一类,此类中药材均生长在湿地

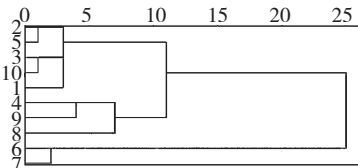


图 3 假马齿苋样品聚类分析

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of *B. monnieri* samples

和潮湿地带,此类中也包含着相似度较低的 S1、S2、S5 批药材,这类药材与旱地所产药材差别较大。

3 讨论

本实验分别比较水、30% 乙醇、50% 乙醇、80% 乙醇、无水乙醇对假马齿苋药材的提取效果,结果 80% 乙醇的供试品峰数目较多且峰形较好,含量较均匀,因此选择 80% 乙醇为提取溶剂;分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-水-磷酸、乙腈-水-甲酸、乙腈-水-醋酸等多种流动相系统,结果乙腈-0.2% 磷酸流动相系统,基线最为平稳,峰形较好。

本文建立假马齿苋药材的 HPLC 指纹图谱,通过对 10 批药材的分析标定了 26 个共有峰,相对保留时间 RSD 在 0.2% 以内,表明 10 批药材的化学成分一致性较好;而相对峰面积 RSD 较大,不同批次间各成分含量差别较大;10 批药材中 7 批药材相似度大于 0.9,而相似度小于 0.9 的 3 批药材均生长在含水量较多的湿地环境,说明产地含水量对药材质量影响较大。假马齿苋药材中黄酮类成分,在不同的生长环境下含量差别较大,其中木樨草甘(峰 12)在旱地生长的 S4、S9 批药材中含量最高;槲皮素(峰 18)、芹菜素(峰 19)在湿地生长 S1、S2、S5 批

药材中含量是其他批次药材的2~8倍;假马齿苋中的三萜皂苷类成分(Bacopaside I, Bacoside A₃, Bacopaside II, Bacopasaponin C, Bacopasaponin C isomer),在不同生长环境下含量差别不大。聚类分析分类结果与药材生长环境分类密切相关。

假马齿苋药材指纹图谱方法的建立,有助于假马齿苋药材的标准化研究和质量控制,采用指纹图谱与聚类分析相结合,可以弥补单纯用相似度评价指纹图谱的不足,更为客观和直观地评价药材的真伪和优劣。此次研究主要采集福建不同生长环境种植的假马齿苋药材,通过指纹图谱中不同化学成分含量初步比较以及药材相似度结果,初步选定药材质量较为一致,黄酮类成分较少的潮湿地药材进行下一步假马齿苋皂苷类新药的研发。由于样品批次较少,缺乏野生假马齿苋药材样品,栽培假马齿苋特征图谱规律性以及野生与栽培假马齿苋的差异性还需进一步研究及证实。目前研究结果推测假马齿苋药材的质量与生长环境的含水量具有一定相关性,而不同批次药材的差异性可能还受气候、土壤类型、光照等因素影响,也需进一步实验考证。

参考文献

- Zhou Y(周耘). Active constituents of *Bacopa monniera*. Shanghai:Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry(上海医药工业研究院),PhD. 2005.
- Gu GY(顾关云),Jiang Y(蒋昱). Chemical composition, pharmacological effects and clinical application of improved cognitive function of *Bacopa monniera*. *World Notes: Plant Med*(国外医药:植物药分册),2005,20(1):6-10.
- Liu XJ(刘晓军). Study on the efficacy and mechanism of bacopaside I on antidepressant and anti-dementia. Shanghai: The Second Military Medical University(第二军医大学), MSc. 2012.
- Huang YX(黄云秀),Yang MF(阳明福). Chemical constituents and pharmacological activities of *Bacopa monniera*. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志),2006,15:683-687.
- Xoan TL, Hang TN P, Tai VN, et al. Protective effects of *Bacopa monnieri* on ischemia-induced cognitive deficits in mice: The possible contribution of bacopaside I and mechanism. *J Ethnopharmacol*,2015,164:37-45.
- Siddique YH, Faiz S Faisal MM, et al. The effect of *Bacopa monnieri* leaf extract on dietary supplementation in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Eur J Integr Med*, 2014,6:571-580.
- Jadiya P, Khan A, Sammi SR, et al. Anti-Parkinsonian effects of *Bacopa monnieri*: Insights from transgenic and pharmacological *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. *Biochem Biophysical Res Commun*,2011,413:605-610.
- Bahu PJ, Sharma P, Saranya S, et al. Synthesis of gold nanoparticles using ethonolic leaf extract of *Bacopa monnieri* and UV irradiation. *Materials Lett*,2013,93:431-434.
- Zhang DQ(张嫡群),Mei HS(梅和珊),Shi XW(石晓伟). Biological activity and clinical research of *Bacopa monniera*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2007,19:524-528.
- Liu JC(刘吉成),Chen DJ(陈大健). HPLC fingerprint study of the herb of *Buchnera cruciate*. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志),2013,33:424-428.
- Song X(宋潇),Xie SM(谢绍明),Huang D(黄丹), et al. HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Poria*. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2015,21(17):36-39.
- Liu S(刘爽),Wang PL(王佩龙),Hu YJ(胡益杰), et al. Study on HPLC fingerprint of *Rhodiola crenulata*. *J Southwest Univ*(西南大学学报),2014,36:215-221.
- Wei G(魏刚),Shun QS(顺庆生),Dai YF(戴亚峰), et al. Study on HPLC fingerprint of *Dendrobium huoshanense*. *Chin Tradit Pat Med*(中成药),2014,36:2642-2644.