

基于 HPLC-ELSD 指纹图谱和多成分定量的浙贝母与湖北贝母质量差异研究

梁月仪^{1,2}, 李振雨^{1,2*}, 吕渭升^{1,2},
卢晓莹^{1,2}, 杨洁^{1,2}, 刘晓霞^{1,2}, 位翠杰^{1,2}, 孙冬梅^{1,2}

¹广东一方制药有限公司; ²广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244

摘要: 建立浙贝母、湖北贝母 HPLC-ELSD 指纹图谱, 结合多成分定量分析, 比较两种贝母属药材的差异。采用 Waters ACQUITY HSS T3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 三乙胺溶液为流动相, 流速为 1.1 mL/min, 梯度洗脱; 柱温为 38 °C; 蒸发光散射检测; 建立浙贝母和湖北贝母 HPLC-ELSD 指纹图谱, 通过化学计量学方法和 5 种生物碱类成分的含量测定比较浙贝母和湖北贝母的差异。结果显示, 浙贝母指纹图谱标定 7 个共有峰, 而湖北贝母有 8 个; 指出其中 6 个峰, 分别为伊贝辛、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙、异贝母甲素、湖北贝母素, 其中湖北贝母素为湖北贝母的专属性成分; HCA 和 PCA 均能很好地区分浙贝母和湖北贝母, OPLS-DA 共找到 4 个差异性标志物, 含测结果显示, 浙贝母中贝母素甲的含量明显高于湖北贝母, 而贝母辛、贝母素乙和异贝母甲素的含量则明显低于湖北贝母。该方法可以有效鉴别浙贝母和湖北贝母质量的差异性, 为其质量控制提供参考。

关键词: 浙贝母; 湖北贝母; HPLC-ELSD 指纹图谱; 多成分含量测定

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)7-1101-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.7.001

Quality difference between *Fritillariae Thunbergii* Bulbus and *Fritillariae Hupehensis* Bulbus based on HPLC-ELSD fingerprints and multi-component quantitative analysis

LIANG Yue-yi^{1,2}, LI Zhen-yu^{1,2*}, LYU Wei-sheng^{1,2},
LU Xiao-ying^{1,2}, YANG Jie^{1,2}, LIU Xiao-xia^{1,2}, WEI Cui-jie^{1,2}, SUN Dong-mei^{1,2}

¹Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd.; ²Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China

Abstract: The HPLC-ELSD fingerprints of *Fritillariae Thunbergii* Bulbus (FTB) and *Fritillariae Hupehensis* Bulbus (FHB) were established to compare the differences between the two herbs combined with multi-component quantitative analysis. The chromatographic column was Waters ACQUITY HSS T3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The gradient elution was performed at a flow rate of 1.1 mL/min with acetonitrile-0.1% triethylamine solution as the mobile phase. The column temperature was 38 °C. Evaporative light scattering detection was used. The HPLC-ELSD fingerprints of FTB and FHB were established. The differences between FTB and FHB were compared by chemometrics methods and simultaneous determination of five alkaloid components. The results showed that the fingerprints of FTB had seven common peaks and the fingerprints of FHB had eight peaks. Six peaks were identified, namely yibeissine, peimisine, peimine, peiminine, isofritillarine and hupehenine. Among the above ingredients, hupehenine was the specific component of FHB. Both HCA and PCA could distinguish FTB and FHB well. OPLS-DA found four different markers. The content determination results showed that the content of peimine in FTB was significantly higher than that in FHB, while the contents of peimisine, peiminine and isofritillarine were significantly lower than

收稿日期: 2023-01-17 接受日期: 2023-06-08

基金项目: 佛山市应急科技攻关专项(2020001000206); 国家工业和信息化部 2019 年产业技术基础公共服务平台项目(2019-00902-1-2)

* 通信作者 Tel: 86-757-85128602; E-mail: lzy1083656123@126.com

that in FHB. This method can effectively identify the quality differences between FTB and FHB, and provide reference for their quality control.

Key words: *Fritillariae Thunbergii* Bulbus; *Fritillaria Hupehensis* Bulbus; HPLC-ELSD fingerprint; multi-component determination

浙贝母被列为“浙八味”之首,历版《中华人民共和国药典》(后文简称《中国药典》)均有收载,为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 的干燥鳞茎,在初夏植株枯萎时采挖,洗净,润透,切厚片,干燥;习称“浙贝片”。浙贝母具清热化痰止咳、解毒散结、消痈之功,临床用于治疗风热、痰火咳嗽、肺痈、乳痈、疮毒等症^[1]。

湖北贝母为百合科植物湖北贝母 *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia 的干燥鳞茎,主要功效是清热化痰、止咳、散结,临床多用于治疗肺热咳嗽、热痰咳嗽等症^[2]。浙贝母与湖北贝母同属贝母属,均可作中药材贝母入药^[3];二者有效成分均为生物碱类物质,但其种类不同。浙贝母的主要有效成分包括贝母素甲、贝母素乙、异贝母甲素等^[4,5],湖北贝母主要有效成分包括贝母素甲、贝母素乙、湖贝甲素、湖贝乙素、湖贝辛等^[6];故浙贝母与湖北贝母的药理作用也存在一定不同^[7]。2020年《中国药典》一部药材项下将浙贝母和湖北贝母分别单列,表明两种药材存在一定的差异。

由于市场上贝母类品种多而杂,且价格差别大,浙贝母、湖北贝母存在互相代替或者以伪替真的现象。由于性状、显微和理化鉴别的局限性,无法将两种药材质量的异同点,进行很好的展现,故需建立一种专属性、准确度更好的方法将两者进行有效的区分与鉴别。

2020年版《中国药典》浙贝母含量测定指标为贝母素甲和贝母素乙,而湖北贝母含量测定指标选择了贝母素乙,且湖北贝母贝母素乙的含量限度明显高于浙贝母中贝母素甲和贝母素乙的总量限度,为浙贝母的掺假使用提供了客观的条件。面对中药复杂的化学成分体系,采用单一的定量模式已经无

法满足现代中药的质量控制需求。目前,针对两种贝母有效成分的含量差异鲜有报道。因此,本研究采用 HPLC-ELSD 法分别建立浙贝母 *Fritillariae Thunbergii* Bulbus (FTB) 和湖北贝母 *Fritillariae Hupehensis* Bulbus (FHB) 的指纹图谱,并同时对其其中 5 种相同的生物碱类成分进行测定,从定性和定量两个方面对浙贝母药材和湖北贝母药材进行综合对比研究,为两种药材的鉴别和质量评价提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 超高效液相色谱仪(1290型,美国安捷伦有限公司); ACQUITY HPLC HSS T3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 百万分之一天平 (XP26, 梅特勒托利多仪器有限公司)。

1.2 试剂与试剂

色谱级甲醇和乙腈(默克股份有限公司); 色谱级三乙胺(天津市科密欧化学试剂有限公司); 分析级三氯甲烷和甲醇(天津市富宇精细化工有限公司); Milli-Q 级超纯水。贝母素甲(批号: 110750-201913, 含量: 98.40%)、贝母素乙(批号: 110751-201712, 含量: 97.70%) 对照品(中国食品药品检定研究院); 伊贝辛(批号: 20082106, 含量: 98.34%, 成都格利普生物技术有限公司); 贝母辛(批号: DSTDB001301, 含量: 99.78%, 德斯特生物科技有限公司); 异贝母甲素(批号: 20201025, 含量: 99.81%, 四川省维克奇生物技术有限公司)。本次研究各采集 9 批浙贝母和 9 批湖北贝母药材, 经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定, 分别为百合科植物浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq. 和湖北贝母 *Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia 的干燥鳞茎, 产地信息见表 1 所示。

表 1 浙贝母与湖北贝母样品信息

Table 1 Sample information of FTB and FHB

浙贝母编号 Number of FTB	产地来源 Origin	湖北贝母编号 Number of FHB	产地来源 Origin
FTB01	江苏省南通市	FHB01	湖北省恩施自治州
FTB02	浙江省宁波市	FHB02	湖北省恩施自治州
FTB03	江苏省泰州市	FHB03	湖北省恩施自治州

续表 1 (Continued Tab. 1)

浙贝母编号 Number of FTB	产地来源 Origin	湖北贝母编号 Number of FHB	产地来源 Origin
FTB04	浙江省台州市	FHB04	湖北省恩施自治州
FTB05	浙江省金华市	FHB05	湖北省宜昌自治州
FTB06	浙江省金华市	FHB06	湖北省恩施自治州
FTB07	浙江省台州市	FHB07	湖北省恩施自治州
FTB08	浙江省金华市	FHB08	湖北省恩施自治州
FTB09	浙江省金华市	FHB09	湖北省恩施自治州

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件

采用 ACQUITY UPLC HSS T3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;以乙腈为流动相 A, 0.1% 三乙胺溶液为流动相 B, 梯度洗脱 (0 ~ 12 min, 5% → 30% A; 12 ~ 30 min, 30% → 60% A; 30 ~ 45 min, 60% → 74% A; 45 ~ 55 min, 74% → 90%);流速为 1.1 mL/min;柱温为 38 °C;指纹图谱进样量为 15 μL、含量测定对照品溶液进样量分别为 10 μL 和 20 μL, 供试品溶液为 10 μL;检测器为蒸发光散射检测器, 漂移管温度为 113 °C, 载气流速为 3.1 L/min。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取伊贝辛、贝母辛和异贝母甲素适量, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 含伊贝辛 80 μg、贝母辛 70 μg、贝母素甲 360 μg、贝母素乙 240 μg、异贝母甲素各 160 μg 的混合溶液, 作为对照品溶液;另精密称取湖贝甲素对照品适量, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇制成每 1 mL 约含湖贝甲素 200 μg 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

取浙贝母药材粉末(过四号筛)约 1.0 g, 精密称定, 置烧瓶中, 加浓氨试液 2 mL 浸润 1 h, 精密加入三氯甲烷-甲醇(4:1)的混合溶液 25 mL, 称定重量, 混匀, 置 80 °C 水浴中加热回流 1 h, 取出, 放冷, 再称定重量, 加上上述混合溶液补足减失的重量, 滤过, 移取续滤液 20 mL, 置蒸发皿中蒸干, 残渣加甲醇使溶解并转移至 2 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 精密度试验

取同一份浙贝母供试品溶液 (FTB01) 连续测定 6 次, 色谱条件同“2.1.1”, 以贝母素乙色谱峰为参照峰 S, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD

值在 0.09% ~ 0.58%, 相对峰面积 RSD 值在 0.33% ~ 1.13%, 均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.1.4.2 重复性试验

取同一批浙贝母药材粉末 (FTB01), 按“2.1.3”项下方法分别制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 以贝母素乙色谱峰为参照峰 S, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.23% ~ 0.72% 范围内, 相对峰面积 RSD 值在 0.52% ~ 1.24%, 均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.1.4.3 稳定性试验

取“2.1.4.2 重复性试验”项下同一份供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10、24 h 进行测定, 以贝母素乙色谱峰为参照峰 S, 计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.31% ~ 0.82%, 相对峰面积 RSD 值在 0.63% ~ 1.89%, 均小于 3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 相似度评价

分别取 9 批浙贝母药材和 9 批湖北贝母药材, 按“2.1.3”项下供试品溶液方法和“2.1.1”项下色谱条件进行样品指纹图谱测定, 并导出 Empower 3.0 色谱软件, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)”进行共有峰的匹配和多点校正, 生成浙贝母药材指纹图谱共有模式和湖北贝母药材指纹图谱共有模式。浙贝母指纹图谱标定 7 个共有峰, 而湖北贝母标定了 8 个共有峰, 湖北贝母比浙贝母多出峰 8, 作为与浙贝母的定性鉴别点, 能够作为浙贝母和湖北贝母的差异性标志物。9 批浙贝母、9 批湖北贝母药材指纹图谱叠加如图 1, 分别计算样品指纹图谱与对照指纹图谱的相似度, 结果见表 2, 9 批浙贝母和 9 批湖北贝母的相似度均在 0.95 以上, 表明浙贝母、湖北贝母指纹图谱的整体相似度较高, 可作为共性质量特征, 用于浙贝母和湖北贝母的鉴别和质量控制。

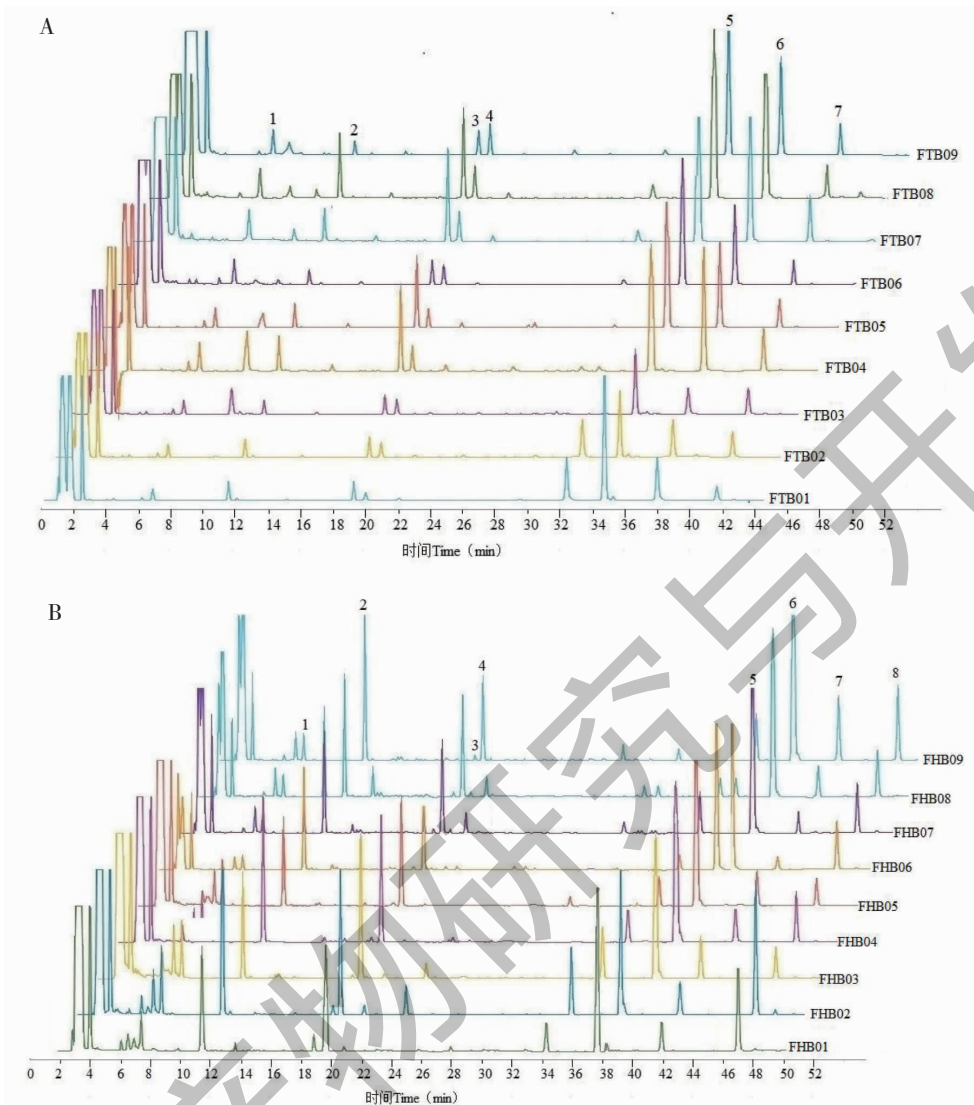


图1 不同批次的浙贝母和湖北贝母药材指纹图谱叠加图

Fig. 1 The overlapping fingerprints of different batches of FTB and FHB

A: 浙贝母指纹图谱; B: 湖北贝母指纹图谱. Note: A: Fingerprints of FTB; B: Fingerprints of FHB.

表2 相似度计算结果

Table 2 Similarity calculation results

浙贝母编号 Number of FTB	相似度 Similarity	湖北贝母编号 Number of FHB	相似度 Similarity
FTB01	0.990	FHB01	0.995
FTB02	0.992	FHB02	0.982
FTB03	0.995	FHB03	0.999
FTB04	0.996	FHB04	0.997
FTB05	0.989	FHB05	0.990
FTB06	0.997	FHB06	0.992
FTB07	0.987	FHB07	0.994
FTB08	0.985	FHB08	0.985
FTB09	0.989	FHB09	0.987

2.1.6 共有峰的确证

取浙贝母、湖北贝母药材供试品溶液,“2.1.2”项下对照品溶液进行测定,经与对照品保留时间比对,结合文献报道^[8,9],确认峰1为伊贝辛、峰2为贝母辛、峰5为贝母素甲、峰6为贝母素乙、峰7为异贝母甲素、峰8为湖贝甲素,结果见图2。

2.2 化学模式识别

2.2.1 聚类分析(HCA)

使用 SPSS20.0 软件,以指纹图谱共有峰的峰面积为变量,经 Z 得分法标准化处理,以组间联接法对 9 批浙贝母药材和 9 批湖北贝母药材进行系统聚类分析,结果见图 3 所示,18 批样品被分成 2 类,

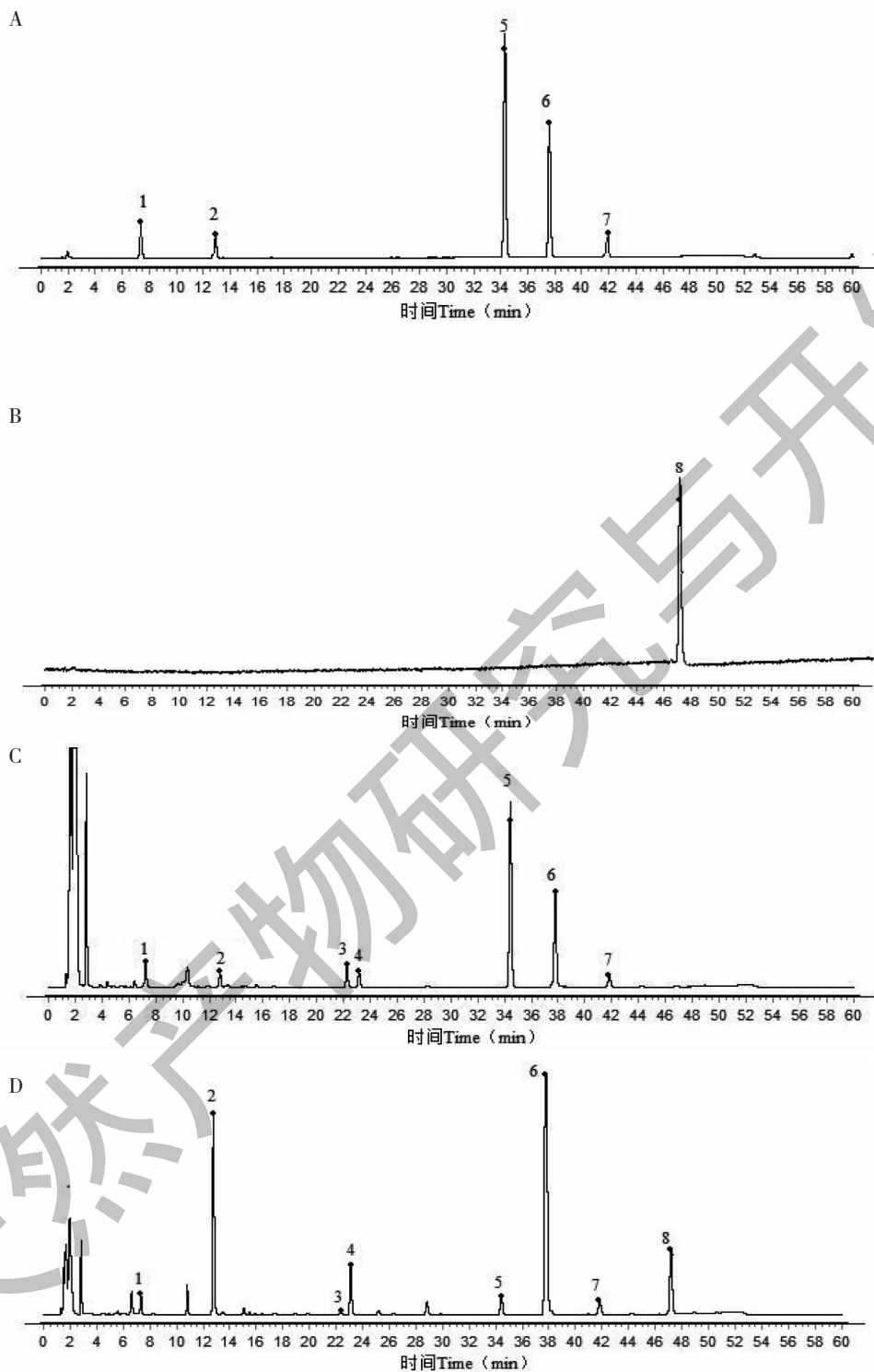


图2 浙贝母和湖北贝母药材指纹图谱峰指认

Fig. 2 The fingerprints peak identification of different specifications of FTB and FHB

注:A:混合对照品图谱;B:湖北贝母对照品图谱;C:浙贝母对照指纹图谱;D:湖北贝母对照指纹图谱。1:伊贝辛;2:贝母辛;5:贝母素甲;6:贝母素乙;7:异贝母素。Note:A:Chromatogram of mixed reference substance;B:Chromatogram of hupehenine reference substance; C:Control fingerprint of FTB;D:Control fingerprint of FHB. 1: Yibeissine;2: Peimisine;4: Peimine;6: Peiminine;7: Isofritillarine.

其中9批浙贝母(FTB01~FTB09)归为一类,9批湖北贝母(FHB01~FHB09)归为另一类,聚类分析能

够很好区分和鉴别同一贝母属两种贝母药材。

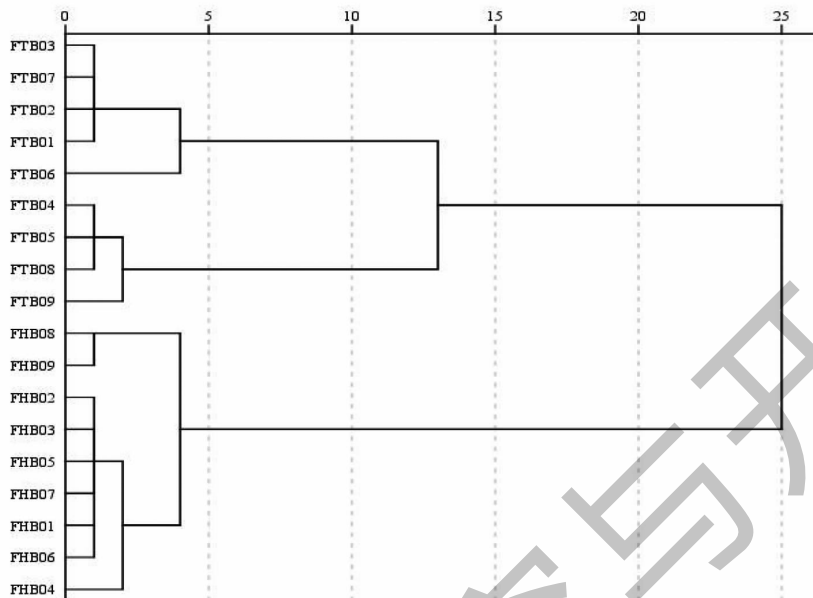


图3 系统聚类树状图

Fig. 3 Systematic clustering dendrogram

2.2.2 主成分分析(PCA)

采用SIMCA14.1软件,以9批浙贝母药材和9批湖北贝母药材的8个共有指纹峰(其中浙贝母缺少峰8,峰面积为0)的峰面积为变量进行PCA分析,共生成3个主成分,累计贡献率达到96.7%, Q^2 为0.73,证明模型有效。采用SIMCA14.1软件,以前两个主成分的得分值生成主成分得分图(见图4)和峰面积变量载荷图(见图5),结果显示,9批浙贝母药材和9批湖北贝母药材可明显分为两类,分类结果与药材生物碱成分差异相关性较大。根据变量

离原点的距离判断变量对主成分的影响权重,距离原点越远,变量对主成分的影响权重越大,分析变量对主成分的影响权重,大小依次为贝母辛、峰4、湖北贝母甲素、贝母素乙、异贝母甲素、贝母素甲、伊贝辛和峰3。其中浙贝母药材FTB01和FTB08两批样品峰3峰面积与其他批次浙贝母样品相差较大,导致上述两批浙贝母与其他批次样品离散程度较高,可能与上述两批浙贝母药材的产地加工方式和生产年限的不同有关。

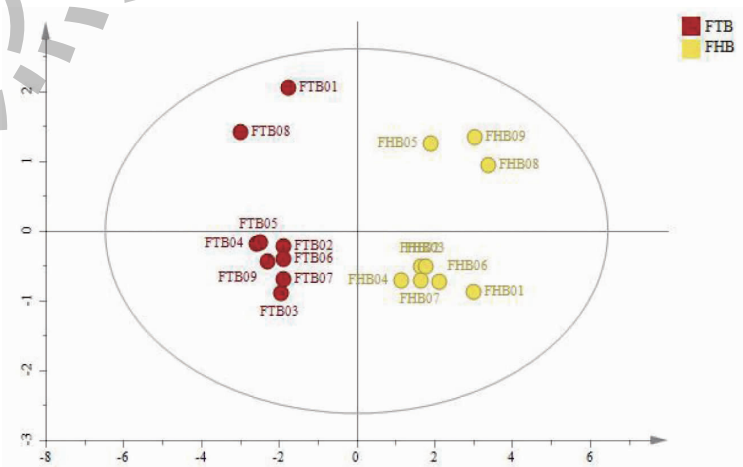


图4 PCA得分图

Fig. 4 PCA score plot

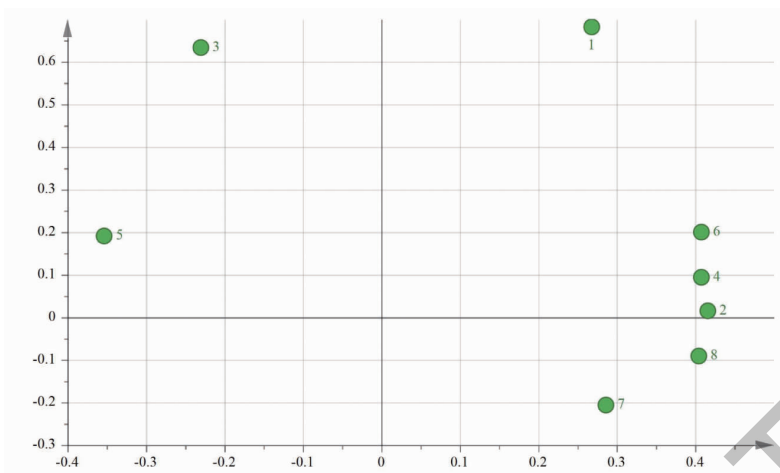


图5 变量载荷图

Fig. 5 Variable loading diagram

2.2.3 正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA)

采用 SIMCA14.1 软件,以共有峰的峰面积为变量进行 OPLS-DA 分析,所建立的模型 $R^2X = 0.852$, $R^2Y = 0.973$, $Q^2 = 0.936 > 0.5$,表明模型有效。图 6 显示,浙贝母、湖北贝母明显分为两类;VIP 图(见图 7)显示,变量对分类的影响,贝母辛 > 峰 4 > 湖贝甲

素 > 贝母素乙 > 异贝母甲素 > 贝母素甲 > 伊贝辛 > 峰 3。以 VIP 值 > 1.0 为显著影响,共找到 4 个差异标志物,分别为贝母辛、峰 4、湖贝甲素、贝母素乙。为比较上述成分在浙贝母和湖北贝母中的差异,有必要对浙贝母和湖北贝母的生物碱类成分的含量进行进一步的研究和分析。

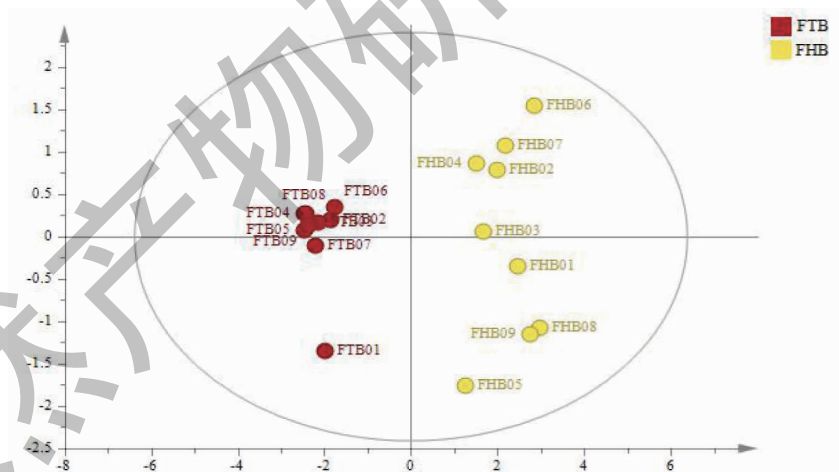


图6 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA score plot

2.3 含量测定

2.3.1 精密度的试验

取“2.1.2”项下混合对照品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件重复进样 6 次,计算伊贝辛、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和异贝母甲素峰面积 RSD 值在 0.12% ~ 0.69%,均小于 3%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 线性关系考察

分别精密称取伊贝辛对照品 3.001 mg、贝母辛对照品 6.585 mg、贝母素甲对照品 15.539 mg、贝母素乙对照品 15.412 mg 和异贝母甲素对照品 4.789 mg,置 20 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成每 1 mL 含伊贝辛 147.559 μg 、贝母辛 323.784 μg 、贝母素甲 764.053 μg 、贝母素乙 757.808 μg 和异贝

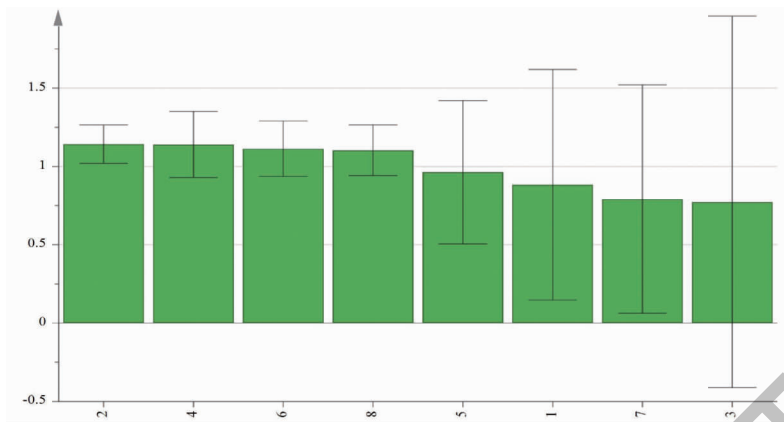


图7 OPLS-DA 模型 VIP 图

Fig. 7 VIP diagram of OPLS-DA

母甲素 235.475 μg 的对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液 5、2、1、0.5、0.2 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 制成系列浓度对照品应用液, 依次精密吸取上述混合对照品贮备液和应用液各 10 μL , 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,

以峰面积(Y)为纵坐标, 以对照品进样量(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 3 所示, 结果显示, 各成分在规定的进样量范围内, 峰面积与对照品的进样量线性关系良好。

表3 含量测定线性考察结果

Table 3 Results of linear inspection of content determination

指标成分 Index component	进样量 Injection volume(μg)	峰面积 Peak area	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient(r)
伊贝辛 Yibeissine	0.030 ~ 1.476	59.84 ~ 2493.12	$Y = 0.9589X + 3.2440$	0.9996
贝母辛 Peimisine	0.065 ~ 3.238	17.23 ~ 956.48	$Y = 1.0208X + 2.8796$	0.9993
贝母素甲 Peimine	0.153 ~ 7.641	261.37 ~ 45406.82	$Y = 1.3060X + 3.7760$	0.9991
贝母素 Peiminine	0.152 ~ 7.578	250.27 ~ 8244.84	$Y = 0.8893X + 3.4808$	0.9997
异贝母甲素 Isofritillarine	0.047 ~ 2.355	35.36 ~ 395.75	$Y = 0.6221X + 2.5076$	0.9990

2.3.3 重复性试验

取浙贝母药材粉末(批号:FTB01), 精密成定, 平行 6 份, 按“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液, 采用“2.1.1”项下色谱条件测定, 浙贝母药材中伊贝辛、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和异贝母甲素的平均含量分别为 0.18、0.21、0.99、0.64、1.35 mg/g, RSD 值分别为 0.27%、0.59%、1.02%、0.99% 和 0.61%, 均小于 3%, 说明该方法重复性良好。

2.3.4 加样回收率试验

称取浙贝母药材粉末(批号:FTB01)约 0.5 g, 精密称定, 平行 6 份, 按样品与对照品含量比为 1:1

的比例, 加入伊贝辛、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和异贝母甲素对照品, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 计算伊贝辛、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和异贝母甲素的加样回收率范围分别为 94.52% ~ 100.58%、95.72% ~ 102.72%、98.96% ~ 104.06%、95.39% ~ 100.92%、98.08% ~ 103.24%; 伊贝辛、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和异贝母甲素的加样回收率平均值分别为 98.17%、98.38%、102.01%、98.72%、100.34%; RSD 值分别为 1.65%、2.57%、2.31%、2.26% 和 1.98%; 均小于 3.0%, 表明该分析方法准确度良好, 结果见表 4 所示。

表 4 含量测定加样回收考察结果

Table 4 Results of recovery rate of content determination

指标成分 Index component	回收率均值 Average recovery rate(%)	RSD(%)
伊贝辛 Yibeissine	98.17	1.65
贝母辛 Peimisine	98.38	2.57
贝母素甲 Peimine	102.01	2.31
贝母素 Peiminine	98.72	2.26
异贝母素甲 Isofritillarine	100.34	1.98

2.3.5 稳定性试验

取“2.3.3 重复性试验”项下供试品溶液,分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定,计算不同时间点伊贝辛、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和异贝母甲素的峰面积 RSD 值为 0.61% ~ 1.23%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 样品测定

取 9 批浙贝母和 9 批湖北贝母样品,按

“2.1.3”项下方法分别制备供试品溶液,每批样品平行两份,并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,外标两点法对数方程计算伊贝辛、贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和异贝母甲素的含量,结果见表 5、图 8。结果显示,浙贝母贝母素甲的含量明显高于湖北贝母,而贝母辛、贝母素乙、异贝母甲素的含量明显低于湖北贝母,两种贝母的伊贝辛的含量总体上较为接近。

表 5 含量测定结果

Table 5 Content determination results

编号 No.	含量 Content(mg/g)				
	伊贝辛 Yibeissine	贝母辛 Peimisine	贝母素甲 Peimine	贝母素乙 Peiminine	异浙贝甲素 Isofritillarine
FHB01	0.175	0.657	0.361	1.150	0.499
FHB02	0.160	0.545	0.211	1.082	0.278
FHB03	0.173	0.486	0.335	1.089	0.242
FHB04	0.136	0.487	0.178	0.912	0.223
FHB05	0.262	0.454	0.278	1.111	0.274
FHB06	0.134	0.680	0.262	1.211	0.225
FHB07	0.142	0.512	0.376	1.140	0.255
FHB08	0.235	0.687	0.458	1.517	0.147
FHB09	0.255	0.625	1.144	1.367	0.264
FTB01	0.182	0.213	0.986	0.645	0.435
FTB02	0.134	0.102	0.863	0.596	0.140
FTB03	0.133	0.092	0.968	0.456	0.110
FTB04	0.131	0.067	1.527	0.492	0.147
FTB05	0.138	0.067	1.439	0.407	0.148
FTB06	0.134	0.036	0.536	0.367	0.117
FTB07	0.147	0.034	0.890	0.470	0.123
FTB08	0.142	0.144	1.525	0.665	0.383
FTB09	0.126	0.102	1.355	0.625	0.133
SD _{FTB}	0.051	0.092	0.292	0.175	0.096

续表 5 (Continued Tab. 5)

编号 No.	含量 Content (mg/g)				
	伊贝辛 Yibeissine	贝母辛 Peimisine	贝母素甲 Peimine	贝母素乙 Peiminine	异浙贝甲素 Isofritillarine
SD_{FHB}	0.017	0.056	0.351	0.110	0.124
t_{FTB}	0.186	0.570	0.400	1.175	0.267
t_{FHB}	0.141	0.081	1.137	0.510	0.189
F	2.507	13.174	4.759	9.244	1.421
P	0.231	0.001	0.002	0.001	0.175

注: $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义; t 为含量均值; SD 为标准偏差。

Note: $P < 0.05$ indicates that the difference was statistically significant; t represents the average content, SD represents the standard deviation.

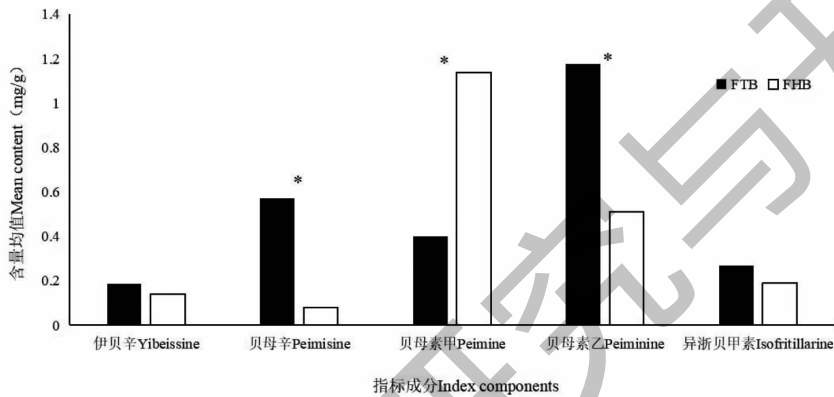


图 8 浙贝母和湖北贝母药材多指标成分含量均值对比图

Fig. 8 Comparison of the mean content of multiple index components in FTB and FHB

注: * 该成分含量在两种药材中具有显著性差异 Note: * This component has significant difference in two medicinal herbs.

3 讨论与结论

在指纹图谱的建立和应用上,针对浙贝母和湖北贝母生物碱类成分的特点,通过色谱条件优化和供试品溶液考察建立浙贝母和湖北贝母 HPLC-ELSD 指纹图谱,相似度评价结果显示,同一种贝母指纹图谱相似度较高,因此,指纹图谱可作为共性特征,用于浙贝母和湖北贝母的质量控制研究。而对比两种贝母指纹图谱的差异可知,浙贝母指纹图谱明显缺少湖贝甲素色谱峰或者湖贝甲素含量极低,在浙贝母中不易检出。因此,湖贝甲素可以作为两种贝母的差异性标志物,用于浙贝母和湖北贝母的区别和鉴别。

以共有峰的峰面积为变量,分别进行 HCA、PCA 和 OPLS-DA 分析, HCA 和 PCA 结果均能将浙贝母和湖北贝母进行有效地区分和鉴别,表明采用指纹图谱、HCA 或 PCA 相结合的方式,是鉴定浙贝母和湖北贝母的有效手段,为进一步阐明两种贝母在化学成分上的差异,采用 OPLS-DA 分析共找到 4 个差异标志物,根据差异显著性排序,分别为贝母辛 > 峰

4 > 湖贝甲素 > 贝母素乙,说明两种贝母在上述成分的含量上存在较大的差异,这种差异一方面由药材本身的基原不同导致,也可能与药材的种植环境、生长周期等因素密切相关^[8]。

含量测定指标的选择方面,浙贝母与湖北贝母中含有的生物碱类主要分为异甾类生物碱和甾体类生物碱。研究发现,生物碱类成分具有祛痰、止咳、平喘、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性^[9-12],与浙贝母、湖北贝母功能主治^[13,14]相一致。从浙贝母、湖北贝母 HPLC-ELSD 指纹图谱中指认了 5 种相同的生物碱类,含量测定结果表明,两种贝母中除伊贝辛成分含量差异较小,其余 4 个成分贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和异贝母甲素含量均差异较大,其中浙贝母中贝母素甲的含量明显高于湖北贝母,而贝母辛、贝母素乙、异贝母甲素的含量明显低于湖北贝母,因此,通过测定贝母辛、贝母素甲、贝母素乙和异贝母甲素的含量也能区分浙贝母和湖北贝母,含量测定的研究结果基本与 OPLS-DA 分析结果基本一致。有文献报道,生物碱类成分的含量和比例的不同,可

能是导致两种贝母止咳化痰、抑菌、抗炎药效差异的重要因素^[15-18],通过对多种生物碱的同时测定,对于以临床为导向的中药浙贝母和湖北贝母的质量控制和评价具有重要意义,因此,建议在浙贝母和湖北贝母药材质量控制中增加贝母辛、异贝母甲素的测定。

综上所述,本研究建立了浙贝母、湖北贝母 HPLC-ELSD 指纹图谱方法,并同时测定 5 种生物碱类成分含量,可为浙贝母和湖北贝母药材的鉴别和质量控制提供重要参考。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 304-305.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 363-364.
- 3 Xu LX, Fan LZ, Jiang S, et al. Recent progress of chemical constituents and pharmacological effects of *Fritillaria* [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2022, 32: 61-73.
- 4 Huang XL, He XF, Zhou NF, et al. Fingerprint establishment and content determination of 3 components in *Fritillaria thunbergii* formula granules [J]. China Pharm(中国药房), 2021, 32: 2473-2478.
- 5 Luo YY, Cui MC, Wang HH. Analysis of chemical composition in different parts of *Fritillaria thunbergii* using UHPLC-QTOF-MS/MS [J]. Chin Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2022, 39: 1984-1991.
- 6 Zhang X, Li WT, Duan BZ, et al. Study on classification *Fritillaria* based on quality characteristic [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49: 2140-2146.
- 7 Chen XH. Research progress of *Fritillaria* [J]. Gansu Med J(甘肃医药), 2021, 40: 777-779.
- 8 Liu XH, Liu M, Liu YR, et al. Study on isosteroidal alkaloid constituents from the bulbs of *Fritillaria hupehensis* [J]. West Chin J Pharm Sci(华西药学杂志), 2022, 37: 233-235.
- 9 Jin X, Li CN, Zhang H. Research progress on chemical components of alkaloids and their pharmacological activities in fritillary medicinal materials [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2022, 45: 2262-2268.
- 10 Feng YB, Zhuang XC, Shen XX, et al. Pharmacological effects and synthetic pathways of medicinal plant steroid alkaloids [J]. Chin Biotechnol(中国生物工程杂志), 2016, 36: 101-107.
- 11 Bai YJ, Yu M, Zhao SW, et al. Pharmacological effects and mechanisms of alkaloids [J]. J Harbin Com Univ(哈尔滨商业大学学报), 2013, 29: 8-11.
- 12 Wang AW, Liu YM. Research progress of Isosteroidal alkaloids and their pharmacological activities [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2022, 34: 164-175.
- 13 Xiao Q, Chen JJ, Yu C, et al. Research progress on classification and identification methods of *Fritillaria* [J]. Glob Tradit Chin Med(环球中医药), 2014, 7: 308-312.
- 14 Jin LX, Geng Z, Gou Y, et al. Determination of six alkaloid components in *Fritillaria hupehensis* by UPLC-MS/MS [J]. West Chin J Pharm Sci(华西药学杂志), 2020, 35: 428-431.
- 15 Ding H, Yan BH, Liu SS, et al. A multi-center randomized double-blind controlled trial on the functional difference between *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia and *Fritillaria delavayi* Franch in relieving acute bronchitis (heat phlegm cough) [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2010, 15: 524-529.
- 16 Zhou Y, Ji H, Li P, et al. Antagonism of five fritillary alkaloids on isolated tracheal stripe M receptors in guinea pigs [J]. J Chin Pharm Univ(中国药科大学学报), 2003, 34: 58-60.
- 17 Chen HZ, Zhang SY, Huang YB, et al. Comparative study on the content determination and the anti-tussive and anti-inflammatory effects of the total alkaloids of Pingbeimu and Chuanbeimu [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2017, 38: 63-67.
- 18 Zhao W, Jiang H, Wang ZB, et al. Review on in pharmacological effects of *Fritillaria* [J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2018, 52: 97-100.