

# 竹节蓼药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析<sup>Δ</sup>

黎理<sup>1,2\*</sup>, 曾祥燕<sup>1</sup>, 谢凤凤<sup>1</sup>, 蔡毅<sup>1#</sup>(1.广西中医药大学药学院, 南宁 530001; 2.成都中医药大学药学院, 成都 611137)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)12-1640-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.12.13

**摘要** 目的 建立竹节蓼药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并进行聚类分析。方法:采用HPLC法。色谱柱为Ultimate C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.5 mL/min,检测波长为360 nm,柱温为28 ℃,进样量为10 μL。以槲皮苷为参照,绘制13批药材样品的HPLC图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行相似度评价,确定共有峰,并对其聚类分析。结果:13批药材样品的HPLC图谱有12个共有峰,相似度均大于0.90;经验证,13批药材样品的HPLC图谱与对照指纹图谱具有较好的一致性。13批药材样品可聚为两大类,S4、S6、S10聚为一类,其余聚为一类。结论:该研究所建指纹图谱和聚类分析结果可为竹节蓼药材的质量评价及进一步开发利用提供参考。

**关键词** 竹节蓼;高效液相色谱法;指纹图谱;聚类分析

## Establishment of HPLC Fingerprint of *Homalocladium platycladum* and Cluster Analysis

LI Li<sup>1, 2</sup>, ZENG Xiangyan<sup>1</sup>, XIE Fengfeng<sup>1</sup>, CAI Yi<sup>1</sup> (1. School of Pharmacy, Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China; 2. School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of *Homalocladium platycladum*, and to carry on the cluster analysis. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Ultimate C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.5 mL/min. The detection wavelength was set at 360 nm, and column temperature was 28 ℃. The sample size was 10 μL. Using quercetin as reference substance, HPLC chromatograms of 13 batches of samples were determined. The similarity evaluation was carried out by using Similarity Evaluation System for TCM Chromatographic Fingerprint (2012 edition) to determine common peak. Cluster analysis were also conducted. RESULTS: A total of 12 common peaks were established in HPLC fingerprints of 13 batches of samples. The similarity was higher than 0.90. After validation, HPLC chromatograms of 13 batches of sample were in good agreement with control fingerprint. 13 batches of medicinal materials were clustered into 2 categories; S4, S6 and S10 were clustered into one category, and the rest were a category. CONCLUSIONS: Established fingerprint and cluster analysis results can provide reference for quality evaluation of *H. platycladum* and its exploitation and utilization.

**KEYWORDS** *Homalocladium platycladum*; HPLC; Fingerprint; Cluster analysis

竹节蓼又名观音竹、飞天蜈蚣、扁竹<sup>[1-2]</sup>,其味甘、淡,性平,归肝、肺经,具有清热解毒、去瘀消肿之功效,主治痈疮肿毒、跌打损伤等症<sup>[3]</sup>。壮医认为其味甘、酸,性微寒,具有清热解毒、活血止血的功效,临床主要用于扁桃体炎、支气管炎、尿路炎症及崩漏带下、痈疮肿毒、跌打损伤、蛇虫咬伤等病症的治疗<sup>[4]</sup>。目前,竹节蓼的研究主要集中在抗肿瘤<sup>[5-7]</sup>、抗菌<sup>[8-9]</sup>作用和活性组分等方面,而

在质量评价方面研究较少。本课题组前期已通过高效液相色谱法(HPLC)测定了其中槲皮苷的含量<sup>[10]</sup>,在此基础上,本试验采用HPLC法对广西5个不同产地13批竹节蓼药材展开指纹图谱研究,并进行聚类分析,以期为其质量评价及进一步开发利用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括G-1314A单波长检测器、G-1311A高压四元泵、G-1379A在线真空脱气机、G-1316A智能化柱温箱、G-1311A标准自动进样器、1100 Series色谱工作站(美国Agilent公司);FA1104型上皿天平(上海精密科学仪器有限公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DHG-9070A型电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);HH-S6型电热恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);

Δ 基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目(No.桂科重1598005-10);广西高校中青年骨干教师基础能力提升项目(No.桂教科研[2016]3号-KY2016YB231);壮瑶药协同创新中心项目(No.桂教科研[2013]20号);广西壮瑶药重点实验室项目(No.桂科基字[2014]32号);广西教育厅重点学科项目(No.桂教科研[2013]16号);广西壮族八桂学者项目(No.J13162)

\* 讲师,硕士。研究方向:中药及民族药品种鉴定与开发利用。E-mail:136067251@qq.com

# 通信作者:教授。研究方向:中药及民族药生药。E-mail: Caiyi118@163.com

TGT-16G型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

## 1.2 试剂

槲皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111538-200504,供含量测定用);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 1.3 药材

竹节蓼药材采自广西河池等地,详见表1(以S13为对照药材)。所有药材样品经广西中医药大学药学院蔡毅教授鉴定为真品。

表1 竹节蓼药材样品来源

Tab 1 Source of *H. platycladum*

编号	采集时间	季节	药用部位	产地/采集地点
S1	20140528	春季	地上部分	岑溪市归义镇
S2	20131119	秋季	地上部分	岑溪市归义镇
S3	20140105	冬季	地上部分	河池市宜州区三合乡
S4	20140410	春季	地上部分	河池市大化县岩滩镇
S5	20140506	春季	地上部分	桂平市紫荆镇
S6	20140704	夏季	地上部分	河池市大化县岩滩镇
S7	20140715	夏季	地上部分	桂平市紫荆镇
S8	20140724	夏季	地上部分	河池市宜州区三合乡
S9	20151013	秋季	地上部分	桂平市紫荆镇
S10	20151013	秋季	地上部分	河池市大化县岩滩镇
S11	20151020	秋季	地上部分	河池市宜州区三合乡
S12	20151218	冬季	地上部分	玉林市北流市六麻镇
S13	20160318	春季	地上部分	玉林市北流市六麻镇

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~23 min, 14%→14.5% A; 23~55 min, 14.5%→15% A; 55~60 min, 15%→18% A; 60~68 min, 18%→20% A; 68~75 min, 20%→23% A);流速:0.5 mL/min;检测波长:360 nm;柱温:28℃;进样量:10 μL<sup>[11-12]</sup>。

### 2.2 溶液的准备

2.2.1 对照品溶液 取槲皮苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成槲皮苷质量浓度为0.344 mg/mL的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取药材样品粉末约1 g,精密加入70%甲醇溶液20 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)提取30 min,放冷至室温,用70%甲醇溶液补足减失的质量,滤过,取续滤液,以半径5 cm、13 000 r/min离心10 min,取上清液,即得。

### 2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S1)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以槲皮苷峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明本方

法精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液(编号:S1)6份,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以槲皮苷峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取药材样品(编号:S1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以槲皮苷峰的保留时间和峰面积为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,12个共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明本方法重复性良好。

### 2.4 HPLC指纹图谱的生成与相似度、共有峰的相关分析

2.4.1 HPLC指纹图谱的生成 取13批药材样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对13批药材样品的HPLC图谱进行评价分析,得HPLC指纹图谱,详见图1、图2。

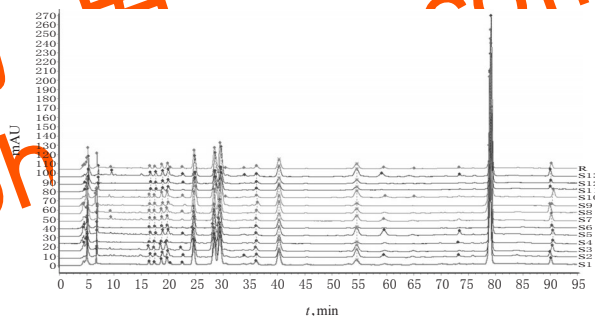


图1 13批药材样品HPLC叠加指纹图谱

Fig 1 HPLC superimposed fingerprints of 13 batches of samples

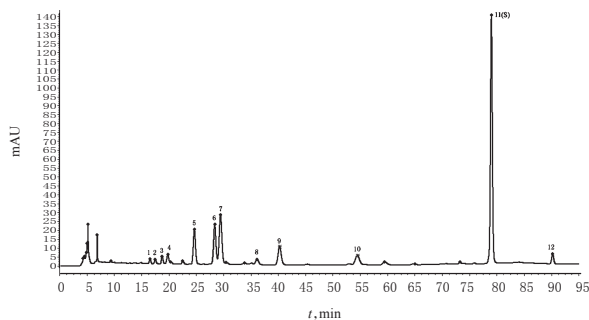


图2 药材样品的HPLC对照指纹图谱

Fig 2 HPLC control fingerprint of samples

2.4.2 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版),以药材样品HPLC对照指纹图谱为参照,进行整体相似度评价。结果显示,13批药材样品相似度为0.925~0.999,表明药材样品批间差异较小,质

量稳定性良好,详见表2。

2.4.3 共有峰的指认及相关分析 13批药材样品有12个共有峰,通过与对照品比对指认11号峰为槲皮苷,由

于其分离良好,峰面积较大,且为所有药材样品共有,故设定其为参照峰(S);计算其他峰相对于11号峰的相对保留时间、相对峰面积,详见表3、表4。

表2 13批药材样品相似度评价结果

Tab 2 Similarity evaluation results of 13 batches of samples

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	对照
S1	1	0.990	0.997	0.991	0.993	0.969	0.989	0.997	0.999	0.994	0.997	0.999	0.999	0.999
S2	0.990	1	0.998	0.971	0.999	0.926	1	0.993	0.990	0.969	0.998	0.991	0.995	0.995
S3	0.997	0.998	1	0.982	0.999	0.948	0.997	0.997	0.997	0.983	1	0.997	0.999	0.999
S4	0.991	0.971	0.982	1	0.979	0.987	0.970	0.992	0.994	0.996	0.982	0.993	0.990	0.990
S5	0.993	0.999	0.999	0.979	1	0.937	0.999	0.997	0.993	0.975	0.998	0.994	0.997	0.997
S6	0.969	0.926	0.948	0.987	0.937	1	0.925	0.961	0.970	0.989	0.947	0.967	0.959	0.960
S7	0.989	1	0.997	0.970	0.999	0.925	1	0.993	0.989	0.968	0.997	0.991	0.994	0.994
S8	0.997	0.993	0.997	0.992	0.997	0.961	0.993	1	0.999	0.988	0.997	0.999	0.999	0.999
S9	0.999	0.990	0.997	0.994	0.993	0.970	0.989	0.999	1	0.994	0.997	1	0.999	0.999
S10	0.994	0.969	0.983	0.996	0.975	0.989	0.968	0.988	0.994	1	0.983	0.992	0.989	0.989
S11	0.997	0.998	1	0.982	0.998	0.947	0.997	0.997	0.997	0.983	1	0.997	0.999	0.999
S12	0.999	0.991	0.997	0.993	0.994	0.967	0.991	0.999	1	0.992	0.997	1	1	0.999
S13	0.999	0.995	0.999	0.990	0.997	0.959	0.994	0.999	0.999	0.989	0.999	1	1	0.999
对照	0.999	0.995	0.999	0.990	0.997	0.959	0.994	0.999	0.999	0.989	0.999	1	1	1

表3 13批药材样品HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 3 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of 13 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
1	0.211 2	0.211 3	0.207 0	0.210 6	0.210 5	0.208 5	0.207 1	0.208 7	0.219 5	0.211 9	0.205 3	0.205 6	0.205 6
2	0.223 6	0.223 1	0.219 0	0.222 6	0.222 4	0.221 0	0.218 6	0.220 8	0.231 7	0.224 2	0.217 5	0.217 4	0.217 6
3	0.240 3	0.239 7	0.235 0	0.238 7	0.238 4	0.237 2	0.234 5	0.236 9	0.250 6	0.241 1	0.232 8	0.232 9	0.233 0
4	0.253 5	0.252 6	0.247 7	0.251 8	0.251 0	0.250 0	0.247 1	0.249 9	0.264 5	0.264 3	0.245 4	0.245 6	0.245 7
5	0.316 3	0.314 4	0.309 2	0.314 0	0.310 9	0.311 6	0.307 6	0.311 7	0.330 6	0.316 6	0.305 1	0.305 7	0.305 9
6	0.364 3	0.361 5	0.356 8	0.362 0	0.357 1	0.358 3	0.354 3	0.359 6	0.380 4	0.364 8	0.350 5	0.351 2	0.351 7
7	0.377 9	0.374 6	0.370 3	0.375 6	0.370 3	0.371 7	0.367 6	0.373 1	0.393 5	0.378 2	0.363 6	0.364 4	0.364 9
8	0.463 7	0.458 8	0.456 3	0.462 2	0.454 5	0.456 2	0.450 8	0.458 9	0.481 9	0.465 8	0.443 9	0.444 7	0.445 3
9	0.517 4	0.511 3	0.510 8	0.514 5	0.507 6	0.509 1	0.503 2	0.510 8	0.533 8	0.518 5	0.494 4	0.495 1	0.496 0
10	0.696 8	0.690 6	0.695 7	0.695 7	0.688 2	0.689 8	0.689 5	0.691 5	0.705 9	0.699 8	0.672 5	0.672 6	0.672 7
11(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1.139 0	1.139 8	1.140 8	1.143 6	1.143 5	1.141 2	1.141 2	1.139 3	1.140 1	1.140 8	1.144 1	1.144 7	1.143 5

表4 13批药材样品HPLC图谱共有峰的相对峰面积

Tab 4 Relative peak area of common peaks in HPLC chromatograms of 13 batches of samples

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
1	0.015 9	0.014 4	0.017 1	0.023 0	0.010 6	0.017 6	0.015 6	0.015 7	0.038 3	0.016 7	0.019 6	0.018 4	0.015 8
2	0.015 3	0.014 3	0.013 7	0.018 4	0.010 9	0.028 7	0.019 6	0.018 4	0.038 9	0.016 5	0.016 9	0.016 0	0.020 1
3	0.028 9	0.022 6	0.029 4	0.028 3	0.021 3	0.028 6	0.024 7	0.025 3	0.049 9	0.027 8	0.028 6	0.028 1	0.026 4
4	0.043 0	0.045 8	0.044 7	0.013 5	0.029 8	0.043 0	0.035 2	0.038 0	0.100 6	0.031 8	0.040 8	0.056 6	0.035 5
5	0.164 1	0.105 4	0.140 4	0.223 1	0.109 3	0.309 1	0.151 6	0.181 1	0.406 1	0.161 6	0.181 0	0.162 3	0.136 8
6	0.213 6	0.135 8	0.181 9	0.287 9	0.153 7	0.385 9	0.190 5	0.218 4	0.480 6	0.200 2	0.209 0	0.188 1	0.172 8
7	0.289 6	0.196 2	0.249 7	0.423 2	0.205 7	0.521 7	0.265 3	0.289 6	0.699 5	0.268 5	0.295 0	0.2682	0.238 7
8	0.037 2	0.037 3	0.030 3	0.048 8	0.020 5	0.054 9	0.029 0	0.028 8	0.122 7	0.018 9	0.039 3	0.036 4	0.033 7
9	0.127 2	0.081 1	0.113 7	0.170 7	0.086 5	0.244 7	0.116 3	0.145 2	0.307 0	0.132 2	0.137 9	0.122 7	0.105 2
10	0.081 8	0.093 8	0.077 9	0.052 8	0.092 4	0.056 8	0.114 6	0.072 7	0.086 3	0.059 2	0.082 9	0.091 9	0.098 6
11(S)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	0.040 9	0.029 4	0.036 3	0.053 5	0.028 2	0.047 5	0.079 4	0.073 1	0.034 1	0.054 1	0.038 5	0.035 8	0.047 1

## 2.5 聚类分析

以13批药材样品12个共有峰的相对峰面积为原始数据,应用SPSS 20.0软件,采用组间平均数联结法进行聚类分析<sup>[13-14]</sup>,结果见图3。由图3可知,13批药材

样品可聚为两大类:S4、S6、S10聚为第一类;其余聚为第二类。

## 3 讨论

指纹图谱研究结果表明,13批药材样品图谱的相似

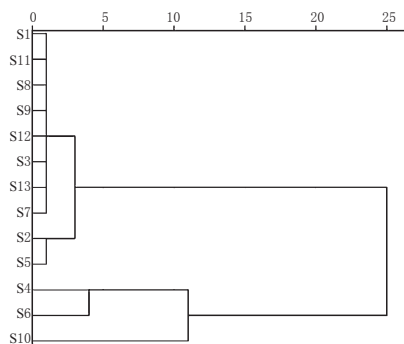


图3 13批药材样品聚类分析树状图

Fig 3 Dendrogram of cluster analysis of 13 batches of samples

度均大于0.90,表明不同产地的竹节蓼药材样品质量相对稳定,没有太大差异,所构建的HPLC指纹图谱可以作为其质量评价的依据。各共有峰相对保留时间差异较小,表明不同产地的药材样品所含化学成分基本相似;但相对峰面积差异较大,表明不同产地的药材样品中各成分间的含量比例相差较大,而这可能是由于不同的地理位置(土质、水质、日照)所导致的,其原因有待进一步探究<sup>[15-16]</sup>。

聚类分析结果表明,13批药材样品可聚为两大类。岑溪市归义镇、河池市宜州区三合乡、桂平市紫荆镇、玉林市北流市六麻镇所产竹节蓼药材聚为一类,说明这四个产地药材生长环境相近。河池市大化县岩滩镇所产竹节蓼药材单独聚为一类。

综上所述,该研究所建指纹图谱和聚类分析结果可为竹节蓼药材质量评价及进一步开发利用提供参考。

#### 参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编写委员会. 中华本草: 第二册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1999: 636.  
 [2] 颜萍花, 唐玉荣, 曾祥燕, 等. 竹节蓼生药学鉴别研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(11): 2682-2684.  
 [3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编: 下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 740.  
 [4] 梁启成, 钟鸣. 中国壮药学[M]. 南宁: 广西民族出版社,

2005: 172.

[5] 方春生, 杨燕军, 宋卉, 等. 竹节蓼不同提取部位体外抗肿瘤活性的研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(12): 2865-2868.  
 [6] 方春生, 杨燕军, 宋卉, 等. 竹节蓼石油醚部位抗肿瘤活性组分的筛选[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(7): 1071-1077.  
 [7] 方春生, 杨燕军, 王如意, 等. 竹节蓼石油醚部位抗肿瘤活性组分研究及其成分GC-MS分析[J]. 今日药学, 2016, 26(8): 538-540, 544.  
 [8] HANIYEHK, SEYYEDMS, HUSSEIN M. Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran) [J]. *Asianpac J Trop Med*, 2010, 3(3): 180.  
 [9] 曹伟国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2241-2247.  
 [10] 曾祥燕, 唐玉荣, 颜萍花, 等. 壮药竹节蓼的质量标准研究[J]. 中国药房, 2017, 28(21): 2989-2991.  
 [11] 印晓红, 金汉台, 谭林威, 等. 不同产地鱼腥草中槲皮苷含量测定[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(12): 78-80.  
 [12] 李志强, 王静仪. 猴耳环消炎胶囊中没食子酸、槲皮苷的含量测定[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(4): 400-402.  
 [13] 王元清, 韩彬, 向荣, 等. 总量统计矩结合聚类分析与主成分分析评价虎杖饮片一致性与差异性[J]. 中草药, 2015, 46(19): 2863-2869.  
 [14] 张洪峰, 张学强, 于丽霞, 等. 基于HPLC指纹图谱与聚类分析对不同产地连翘质量评价[J]. 江苏中医药, 2018, 50(4): 78-80.  
 [15] 李小亭, 李瑞盈, 相海恩, 等. 基于HPLC指纹图谱及聚类分析对不同产地枸杞质量评价研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(9): 1251-1253, 1261.  
 [16] 曹爱华. 影响山西恒山蒙古黄芪药材中无机元素含量的环境因素分析[J]. 中医学报, 2018, 33(1): 111-114.

(收稿日期: 2017-07-23 修回日期: 2017-08-12)

(编辑: 张静)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊, 欢迎投稿、订阅