

老鹳草的HPLC指纹图谱及模式识别研究[△]

尹海波*,王吉华,涂秀文,朱明慧,姜海燕(辽宁中医药大学药学院,辽宁大连 116600)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2538-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.14

摘要 目的:建立老鹳草药材的指纹图谱并对其共有模式进行识别,完善老鹳草的质量评价方法。方法:采用反相高效液相色谱法获取24批不同产地老鹳草的指纹图谱:色谱柱为Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为259 nm,柱温为30 ℃;利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)对药材的相似度进行评价,并利用主成分分析(PCA)和聚类分析对指纹图谱进行共有模式识别。结果:根据PCA的3D和平面投影图并结合聚类分析结果,排除个别样品,最终筛选出18批样品建立了指纹图谱共有模式,其相似度均在0.959以上。结论:该方法稳定、易操作,可为科学评价和控制老鹳草药材的质量提供参考依据。

关键词 老鹳草;反相高效液相色谱法;指纹图谱;主成分分析;聚类分析

HPLC Fingerprint and Pattern Recognition of *Geranium wilfordii*

YIN Hai-bo, WANG Ji-hua, TU Xiu-wen, ZHU Ming-hui, JIANG Hai-yan (School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish fingerprint of *Geranium wilfordii* and identify common model of fingerprint, and to promote quality evaluation method of *G. wilfordii*. METHODS: RP-HPLC method was adopted to obtain fingerprints of 24 batches of *G. wilfordii* from different habitats. The separation was performed on Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.4% phosphoric acid (gradient elution) at flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 259 nm and column temperature was 30 ℃. The similarity of drugs was evaluated by using *TCM Fingerprints Similarity Evaluation System* (2004 A edition); common model of fingerprints was identified by principal component analysis (PCA) and cluster analysis. RESULTS: According to 3D and projected platform of PCA, combined with cluster analysis, individual samples were excluded and then 18 batches of samples were screened to establish common model of fingerprints, and the similarity of them was above 0.959. CONCLUSIONS: The method is stable and easy to operate, and can provide reference for the scientific quality evaluation and control of *G. wilfordii*.

KEYWORDS *Geranium wilfordii*; RP-HPLC; Fingerprint; Principal component analysis; Cluster analysis

老鹳草性平,味辛、苦,归肝、肾、脾经,具有祛风湿、通经络等作用,临床上用于治疗风湿痹痛、麻木拘挛、筋骨酸痛、泄泻痢疾等证^[1-2]。2010年版《中国药典》规定其主要来源为牻牛儿苗科牻牛儿苗(*Erodium stephanianum* Willd.)、老鹳草(*Geranium wilfordii* Maxim.)或野老鹳草(*G. carolinianum* L.)的干燥地上部分。老鹳草药理作用十分广泛,具有抗菌、抗病毒、抗氧化、镇痛消炎、抑制诱变等作用^[3-6]。中药指纹图谱是一种综合的、量化的鉴定手段,它是建立在中药化学成分系统研究的基础上,主要用于评价中药材以及中药制剂半成品质量的真实性、优良性和稳定性,其中高效液相色谱(HPLC)指纹图谱具有分离效率高、分析速度快、定量精密度高、稳定性好等特点,应用范围较广^[7-9]。本研究以老鹳草为主要研究对象,通过HPLC法建立药材的指纹图谱,并运用主成分分析(PCA)和聚类分析法,对所得图谱进行分析和筛选,建立合理的指纹图谱共有模式,为科学评价老鹳草药材的质量提供方法及参考依据。

[△]基金项目:辽宁省教育厅高等学校科研项目(No.2009A498);辽宁中医药大学“杏林学者青蓝工程”杰出青年基金

*教授,硕士研究生导师,博士。研究方向:中药资源及药材的品质评价。电话:0411-87586003。E-mail:yhb0528@sina.com

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,含SPD-10A紫外检测器、四元低压梯度泵、柱温箱(美国Agilent公司);KQ3200型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CP225D型电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

没食子酸、原儿茶酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110831-200302、110809-200604);柯里拉京、鞣花酸对照品(上海融禾医药科技发展有限公司,纯度均≥98%,批号分别为100526、091227);甲醇和磷酸为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

24批老鹳草于2010年6月—2011年9月采集于不同产地(具体来源见表1),由我院药用植物教研室王冰教授鉴定为老鹳草*G. wilfordii* Maxim.的干燥地上部分。其凭证标本保存于我院药用植物教研室,经前期研究表明药材存放1年,其成分及其含量变化不明显,可作为指纹图谱建立的样品来源。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent TC-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:

表1 老鹳草样品来源信息

Tab 1 The source information of *G. wilfordii* sample

编号	产地	编号	产地
S1	山东泰山	S13	吉林长白八道沟
S2	山东青岛崂山	S14	吉林延吉
S3	山东潍坊	S15	吉林通化1
S4	辽宁沈阳北陵	S16	吉林通化2
S5	辽宁沈阳东陵	S17	吉林临江
S6	辽宁铁岭开原	S18	吉林敦化
S7	辽宁丹东宽甸	S19	吉林白山
S8	辽宁本溪桓仁1	S20	湖北恩施
S9	辽宁本溪桓仁2	S21	黑龙江尚志
S10	辽宁大连1	S22	河北围场
S11	辽宁大连2	S23	河北承德
S12	辽宁鞍山千山	S24	北京延庆

甲醇(A)-0.4%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 10%→33% A; >15~30 min, 33%→40% A; >30~60 min, 40%→55% A);流速:0.8 ml/min;检测波长:259 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京对照品各适量,用甲醇溶解并定容至25 ml棕色量瓶中,制成每1 ml含没食子酸0.126 0 mg、原儿茶酸0.033 6 mg、柯里拉京0.446 0 mg的混合对照品溶液,摇匀,备用。

另精密称取鞣花酸对照品适量,置25 ml棕色量瓶中,用二甲基亚砜溶解并定容,制成每1 ml含0.340 0 mg的单一对照品溶液,摇匀,备用。

2.3 供试品溶液的制备

精密称定老鹳草药材粉末(过40目筛)2 g,用80%乙醇以料液比1:40(m/V)回流提取2次,每次2 h,合并提取液,冷却后滤过,蒸干,用甲醇定容于25 ml量瓶中,作为供试品溶液,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液(编号:S4)适量,连续进样6次,在上述色谱条件下测定,记录峰面积。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间的RSD在0.005%~0.130%之间,相对峰面积的RSD在1.23%~2.88%之间,表明仪器精密密度良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.2 重复性试验 精密称取同一批药材(编号:S4)粉末适量,共6份,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间的RSD在0.003%~0.110%之间,相对峰面积的RSD在0.31%~3.07%之间,表明本方法重复性良好,符合指纹图谱技术要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(编号:S4)适量,室温下放置,分别于0、2、4、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。结果表明,各主要色谱峰相对保留时间的RSD在0.005%~0.130%之间,相对峰面积的RSD在0.62%~2.69%之间,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.5 样品测定

按上述方法测定24批不同产地的老鹳草供试品溶液,通过色谱图上反映的信息进行比较,筛选出19个主要特征指纹峰,构建老鹳草的指纹图谱。其中对1、2、4、16号峰进行指认,分别为没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸;确定4号峰柯里拉京为参照峰(S),计算各色谱峰相对于参照峰的峰面积比值。色谱见图1。

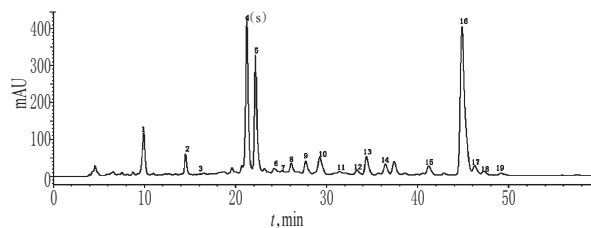


图1 老鹳草样品的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms of *G. wilfordii* sample

2.6 相似度评价

将24批老鹳草样品指纹图谱的AIA数据文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)软件,对其进行相似度评价。以编号为S1的样品图谱作为参照图谱,多点校正生成对照图谱(R),得到各样品图谱与对照图谱的相似度计算结果在0.829~0.994之间,其中编号为S2、S9、S22样品的相似度分别为0.829、0.876、0.846。为构建更加真实、准确的老鹳草药材标准指纹图谱,需要进一步评价样品之间的差异,并对老鹳草指纹图谱共有模式进行研究。

2.7 主成分分析

将不同产地老鹳草样品按上述方法获得的色谱数据,以其3个主要特征峰1、2、16号峰(没食子酸、原儿茶酸、鞣花酸)积分后的峰面积、各样品总峰个数、共有峰占总峰面积的比值、与对照图谱的相似度及参照图谱的相似度作为数据源,形成7个样本数据矩阵,详见表2。运用SPSS15.0软件对数据矩阵进行PCA,得KMO统计量为0.555>0.5, Bartlett球形检验 $P<0.05$,原指标之间相互独立,适用于主成分分析,故分别以主成分1、主成分2、主成分3建立坐标系,进行投影,即可得到所有样本PCA的3D和平面投影图,详见图2、图3。由图2、图3可知,编号为S2、S9、S22、S3、S7、S8的样品与其他样品距离较远,其中S2、S9、S22的相似度较低,可排除在建立共有模式的样品之外。

表2 数据矩阵

Tab 2 Data matrix

编号	总峰个数	共有峰占总峰面积比值	对照图谱相似度	参照图谱相似度	特征峰1	特征峰2	特征峰16
S1	66	0.761	0.992	1.000	0.277	0.130	2.581
S2	66	0.669	0.829	0.819	0.154	0.059	0.703
S3	62	0.840	0.971	0.972	0.627	0.248	5.688
S4	54	0.856	0.963	0.955	0.292	0.124	1.601
S5	70	0.737	0.990	0.978	0.091	0.031	2.176
S6	62	0.751	0.989	0.979	0.124	0.030	2.029
S7	56	0.828	0.940	0.938	0.369	0.082	13.332
S8	64	0.753	0.951	0.957	0.632	0.174	3.477
S9	55	0.712	0.876	0.886	0.440	0.113	4.087
S10	66	0.711	0.958	0.937	0.094	0.028	1.431
S11	66	0.731	0.992	0.977	0.135	0.029	2.229
S12	62	0.686	0.982	0.969	0.118	0.075	3.241
S13	45	0.878	0.980	0.978	0.188	0.032	3.486
S14	60	0.723	0.989	0.981	0.124	0.025	2.596
S15	73	0.727	0.972	0.958	0.118	0.014	1.707
S16	44	0.892	0.971	0.968	0.235	0.060	4.709
S17	65	0.824	0.974	0.972	0.211	0.044	4.591
S18	60	0.766	0.969	0.963	0.205	0.041	5.338
S19	61	0.725	0.985	0.977	0.168	0.043	3.103
S20	62	0.803	0.976	0.97	0.122	0.074	1.946
S21	59	0.815	0.994	0.986	0.117	0.028	2.430
S22	75	0.597	0.846	0.84	0.118	0.045	1.225
S23	61	0.742	0.986	0.973	0.218	0.085	3.424
S24	73	0.668	0.975	0.98	0.153	0.054	3.162

2.8 系统聚类分析

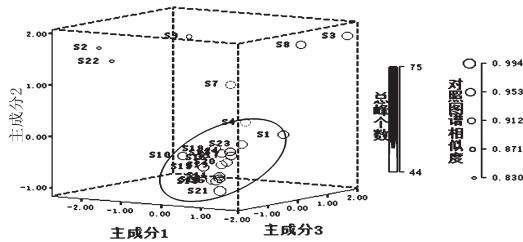


图2 PCA的3D投影图

Fig 2 3D PCA figure of samples

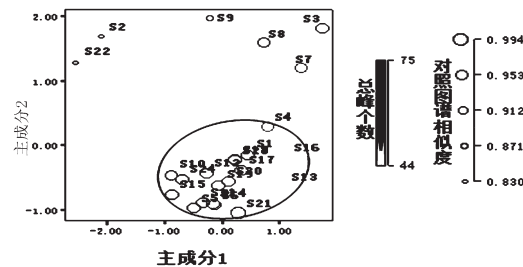


图3 PCA的平面投影图

Fig 3 PCA projected platform of samples

将不同产地老鹳草样品HPLC图谱中的18个共有峰(参照峰除外)的峰面积值标准化,组成 24×18 阶原始数据矩阵^[9],运用SPSS15.0软件对其进行系统聚类分析,采用组间距离法(Between-groups linkage)、欧氏距离平方方法(Squared Euclidean distance)作为测量的距离变量,聚类分析图见图4。由图4结果结合PCA结果,将编号为S2、S3、S7、S8、S9、S22的样品排除。

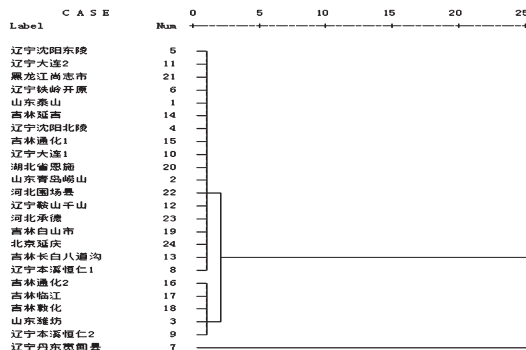


图4 老鹳草样品的聚类分析图

Fig 4 Cluster analysis of *G. wilfordii* samples

2.9 老鹳草药材标准指纹图谱的建立

根据相似度评价结果,参考PCA和系统聚类分析结果,取18批老鹳草样品建立药材的标准指纹图谱。将18批样品的AIA数据文件重新导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)软件,对其进行相似度评价,并设定S1为参照图谱,经多点校正、匹配,详见图5;所生成的对照指纹图谱见图6;相似度评价结果见表3。由表3可知,18批样品与对照图谱比较,相似度均在0.959以上,这可为老鹳草药材的品质评价提供科学依据。

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者经对多种流动相进行考察,发现使用甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相可以改善鞣花酸拖尾现象,使色谱峰分离度提

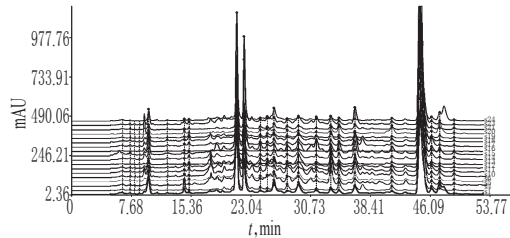


图5 18批样品的HPLC指纹图谱

Fig 5 HPLC fingerprint for 18 batches of samples

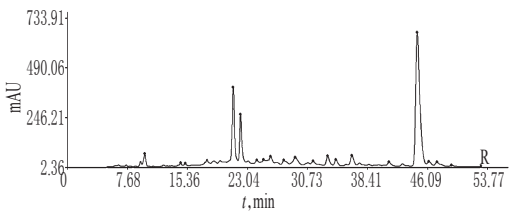


图6 对照指纹图谱

Fig 6 Reference fingerprint of *G. wilfordii*

表3 18批样品的相似度评价结果

Tab 3 Similarity evaluation of 18 batches of samples

编号	参照图谱	对照图谱	编号	参照图谱	对照图谱
S1	1.000	0.990	S15	0.958	0.973
S4	0.956	0.963	S16	0.968	0.973
S5	0.978	0.991	S17	0.973	0.977
S6	0.979	0.991	S18	0.964	0.972
S10	0.937	0.959	S19	0.977	0.987
S11	0.977	0.994	S20	0.97	0.973
S12	0.969	0.984	S21	0.986	0.995
S13	0.978	0.982	S23	0.974	0.989
S14	0.981	0.992	S24	0.98	0.972

高,而且将流速确定为0.8 ml/min时,峰形、出峰时间和分离效果相对较好,并可对没食子酸、原儿茶酸、柯里拉京、鞣花酸进行峰的指认。

3.2 检测波长的选择

本研究分别对具有特征性的4种酚酸类成分对照品溶液在紫外200~400 nm波长范围内进行扫描,发现其最大吸收波长均不同。综合考虑,选择在259 nm波长条件下对4种成分进行测定,结果较好。

3.3 PCA原指标的选择

在使用PCA的时候要注意分析指标的适用性,当设4号峰(柯里拉京)为参照峰时,以相对保留时间定位,对应共有峰峰面积积分为数据源形成的24批不同产地药材的数据矩阵通过SPSS15.0软件进行分析,其KMO统计量为 $0.470 < 0.5$,不宜进行PCA,故重新选择以药材特征峰及相似度评价软件给出的分析结果为指标形成7个数据矩阵,其KMO统计量 > 0.5 ,才可进行PCA。

本研究通过HPLC法建立老鹳草药材的指纹图谱,运用了PCA投影法和系统聚类分析法两种统计学方法对色谱数据进行模式识别的初探。根据PCA的3D和平面投影图,并结合聚类分析结果,排除了个别样品,最终确定了入选的样品目录。通过老鹳草数据矩阵的PCA投影,将相似的老鹳草药材聚在一起,只有少数药材距离较远。而通过聚类分析结果可以看出药材区域性不明显,不同产地之间亦可聚为一类;但是通过聚类顺序也可以看出同一区域不同产地的药材具有一定的相

石刁柏药材的质量标准研究[△]

刘林凤*,高淑红,李慧博,吕建军,高宝益,刘来正[#](山西药科职业学院,太原 030031)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)27-2541-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.27.15

摘要 目的:建立石刁柏药材的质量标准。方法:按2010年版《中国药典》(一部)规定对石刁柏药材进行显微和薄层色谱(TLC)鉴别,并对10批石刁柏药材的水分、灰分、酸不溶性灰分进行检查;在570 nm波长处采用紫外-可见分光光度法对石刁柏药材中的菝葜皂苷元进行含量测定。结果:确定了石刁柏药材的显微特征,建立了其TLC鉴别方法,拟定了其水分、灰分、酸不溶性灰分限量。菝葜皂苷元的进样量在0.037 3~0.111 8 mg范围内与吸光度呈良好的线性关系($r=0.999 6$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD $<2\%$;平均加样回收率为99.58%,RSD=1.81%($n=9$)。结论:所建标准可用于石刁柏药材的质量评价。

关键词 石刁柏;质量标准;薄层色谱法;紫外-可见分光光度法;菝葜皂苷元

Study on the Quality Standards of *Asparagus officinalis* Medicinal Materials

LIU Lin-feng, GAO Shu-hong, LI Hui-bo, LYU Jian-jun, GAO Bao-yi, LIU Lai-zheng (Shanxi Pharmaceutical Vocational College, Taiyan 030031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standards of *Asparagus officinalis* medicinal materials. METHODS: According to first part of *China Pharmacopoeia* (2010 edition), *A. officinalis* medicinal materials was identified by microscopic and TLC. The moisture, ash content and acid-insoluble ash content in 10 batches were determined; the content of sarsasapogenin in *A. officinalis* was determined by UV visible spectrophotometry at 570 nm. RESULTS: The microscopic characteristics of *A. officinalis* had been determined; TLC identification method had been established; the content of moisture, ash and acid-insoluble ash had been detected. The linear range of sarsasapogenin was 0.037 3-0.111 8 mg ($r=0.999 6$) with an average recovery of 99.58% (RSD=1.81%, $n=9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The established standard can be used for quality evaluation of *A. officinalis* medicinal materials.

KEYWORDS *Asparagus officinalis*; Quality standards; TLC; UV-visible spectrophotometry; Sarsasapogenin

石刁柏为百合科植物石刁柏 *Asparagus officinalis* L.的嫩茎,又名芦笋、龙须菜^[1]等,主要含有皂苷、黄酮、糖、咖啡酸及维生素等成分。用石刁柏制成的乳宁片、芦笋胶囊、芦笋口服液等具有清热利湿、活血散结等功效,可用于治疗乳房小叶增

生、乳痈、胃癌、肝炎、银屑病、高脂血症等,并对淋巴肉瘤、膀胱癌等有一定疗效^[2]。

《中国药典》各版均未收录石刁柏,地方标准中也仅有《浙江省中药材标准》有记载^[3],包含其性状鉴别、薄层色谱(TLC)

似性,而不同区域不同产地的药材之间具有一定的联系。这些结论可为今后考察老鹳草药材的产地资源分布、生长适宜性等提供一定的参考数据,也可为如何确定药材的道地性提供一定的参考信息,为科学评价老鹳草药材的质量提供方法及参考依据。

参考文献

- [1] 刘娟,王良信.老鹳草的本草考证[J].中草药,1992,23(5):276.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:113.
- [3] 吴悦涛,金哲雄.老鹳草中鞣质类化学成分及其药理活性

- 研究进展[J].黑龙江医药,2008,21(1):67.
- [4] 韩广轩,王立新,张卫东,等.中药老鹳草的研究概况[J].药学实践杂志,2001,19(1):31.
- [5] 魏群德,纳东荃,纳志云,等.老鹳草合剂治疗急性咽喉炎的疗效观察[J].中国中西医结合杂志,1998,18(2):12.
- [6] 刘岱琳,胡迎庆,刘成航,等.老鹳草粗提取物抑制大鼠巨噬细胞中一氧化氮发生的实验研究[J].武警医学,2003,14(11):18.
- [7] 罗国安,梁琼麟,王义明.中药指纹图谱:质量评价、质量控制与新药研发[M].北京:化学工业出版社,2009:14.
- [8] 孙庆文,王悦云,徐文芬,等.道地药材黔党参的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2013,24(7):628.
- [9] 雷欣潮,杨焕琪,赖茂祥,等.广西不同产区两面针HPLC指纹图谱研究[J].中草药,2012,43(5):1003.

(收稿日期:2013-07-22 修回日期:2013-10-08)

[△] 基金项目:山西省中药材、中药饮片地方标准研究项目(No.2012011A)

* 副教授。研究方向:中药鉴定。电话:0351-2215815。E-mail:xsxwllf@163.com

[#] 通信作者:副教授。研究方向:中药鉴定。电话:0351-7820668。E-mail:laizhengliu@163.com