

HPLC 指纹图谱结合共有模式识别评价重庆市售青蒿饮片质量的一致性^Δ

贾成友^{1,2*}, 赵凤平¹, 李 微¹, 陈 娇¹, 杨荣平^{1,2#}, 王云红²(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.重庆市中药研究院, 重庆 400065)

中图分类号 R284.1; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3828-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.30

摘要 目的:建立青蒿指纹图谱并对其共有模式进行识别,评价重庆市售青蒿饮片质量的一致性。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters XTerra C₁₈, 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(梯度洗脱),柱温为 30 ℃,流速为 1.0 ml/min,检测波长为 220 nm,进样量为 10 μl。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版)对 12 批样品的相似度进行评价,并通过主成分分析、系统聚类分析对其进行共有模式识别。结果:筛选出 11 批样品,建立了指纹图谱共有模式,并标定了 16 个共有特征峰。经对照,指出东莨菪内酯、青蒿素、青蒿酸 3 种主要成分;精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均 ≤ 2.53%。11 批样品与对照图谱相似度 > 0.990。结论:该方法稳定、易操作,可为科学评价和控制青蒿药材的质量提供参考依据。重庆市售青蒿饮片质量整体较好,尚有少量批次质量欠佳,应加强青蒿饮片规范化生产和监督。

关键词 青蒿; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析

Evaluation of Quality Coherence of Commercially Available *Artemisia apiacea* Decoration Pieces in Chongqing by HPLC Fingerprint Combined with Common Model Recognition

JIA Cheng-you^{1,2}, ZHAO Feng-ping¹, LI Wei¹, CHEN Jiao¹, YANG Rong-ping^{1,2}, WANG Yun-hong²(1.College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2.Chongqing Academy of Chinese Traditional Materia Medica, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of *Artemisia apiacea* to identify common model and evaluate the quality coherence of the commercially available *A. apiacea* decoration pieces in Chongqing. METHODS: HPLC method was performed on the column of Waters XTerra C₁₈ with the mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was 220 nm, column temperature was 30 ℃ and the sample size was 10 μl. The similarity of 12 batches of samples was evaluated by TCM Chromatogram Fingerprint Similarity Evaluation System (2004A edition); a common model of fingerprints was identified by principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA). RESULTS: Totally 11 batches of samples were screened to establish common model of fingerprints and 16 common peaks were obtained, among which, 3 common components were identified; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.53%. The similarity of 11 batches of *A. apiacea* and reference chromatogram was more than 0.990. CONCLUSIONS: The method is stable and easy, and can provide reference for the scientific quality evaluation and control of *A. apiacea*; the quality of commercially available *A. apiacea* decoration pieces is generally good, however, there is still a little number of batches with poor quality. The production procedures and supervision of *A. apiacea* decoration pieces should be strengthened.

KEYWORDS *Artemisia apiacea*; HPLC; Fingerprint; Principal component analysis; Cluster analysis

青蒿 (*Artemisia apiacea*) 系菊科植物黄花蒿 (*Artemisia annua* L.) 的干燥地上部分,具有清热、解暑、除蒸、截疟的功

效,主治暑热、暑湿、湿温、阴虚发热、疟疾、黄疸等证^[1]。现代药理研究表明,青蒿在抗疟、抗肿瘤、抗菌杀虫、抑制免疫功能

格-4 有效部位中山素和高良姜素的含量[J].内蒙古医学院学报,2011,33(3):225.

[4] 马强,贾鑫,董玉.高效液相色谱法同时测定蒙药复方达格-4 中 3 种黄酮类成分的含量[J].内蒙古大学学报:自然科学版,2010,41(6):665.

Δ 基金项目:国家科技支撑计划课题(No.2011BAI13B03)

* 硕士研究生。研究方向:中药新剂型、新技术及中药制剂分析。E-mail:zzchengyou0302@sina.cn

通信作者:研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中药新剂型、新技术及中药制剂分析。E-mail:yangrp@cqacmm.com

[5] 罗京超,冯毅凡,吉星.天然线性二苯基庚烷类化合物的研究进展[J].中草药,2008,39(12):1912.

[6] 郭晓玲,孟青,冯毅凡,等.GC 法测定高良姜醇提取物中两个二苯基庚烷类化合物[J].中草药,2011,42(8):1554.

[7] 李洪福,李永辉,王勇,等.高良姜化学成分及药理活性的研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(7):236.

(收稿日期:2014-12-15 修回日期:2015-06-27)

(编辑:余庆华)

亢进、抗心律失常、抗孕、抗单纯疱疹病毒等方面作用明显,同时可用于红斑狼疮的治疗及降低机体本身对类风湿性关节炎的过度免疫^[2-3]。从青蒿中提取分离出的青蒿素,具有抗疟、抗菌、抗肿瘤、解热、增强免疫等药理活性,尤其适宜于恶性疟疾、脑型疟疾的治疗,是世界卫生组织推荐的治疗疟疾的首选药物^[4-5]。目前,国内有关青蒿质量评价的研究多以青蒿素、青蒿酸等指标性成分为主。本研究采用高效液相色谱(HPLC)指纹图谱对不同批次的青蒿的相似度进行评价,并采用主成分分析、聚类分析相结合的方法对指纹图谱进行共有模式识别,探讨饮片质量的差异性,以为客观评价青蒿饮片质量提供参考。

1 材料

20A系列HPLC仪,配有二元泵、在线脱气、二极管阵列检测器、自动进样器、柱温箱(日本岛津公司);AUW-220型万分之一电子天平(日本岛津公司);CPA225D型十万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];SY2000型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SB-5200DT超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率:300 W,频率:50 kHz)。

东莨菪内酯、青蒿素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110768-200504、100202-201004);青蒿酸对照品(四川生物试剂有限公司,批号:120628);甲醇(安徽时联特种溶剂股份有限公司,色谱纯),磷酸(重庆申渝化学试剂厂,分析纯),95%乙醇[重庆川东化工(集团)有限公司,分析纯],水为自制超纯水。

青蒿饮片(批次:S1~S12)购自重庆市各大药店,经重庆市中药研究院李隆云研究员鉴定为菊科植物黄花蒿 *A. annua* L.的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters XTerra C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相A为甲醇,流动相B为0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;检测波长:220 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %	时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	15	85	60	60	40
5	25	75	70	69	31
10	27	73	75	80	20
20	35	65	85	95	5
42	37	63			

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取青蒿素、青蒿酸、东莨菪内酯对照品各适量,精密称定,分别加入甲醇制成每1 ml含青蒿素、青蒿酸、东莨菪内酯0.300、0.096、0.030 mg的单一对照品溶液,经微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得。

2.2.2 供试品溶液 取青蒿药材粉末(过40目筛)2.5 g,精密称定,置于250 ml圆底烧瓶中,加入95%乙醇150 ml,加热回流2 h,冷却,分取乙醇液,续滤液经旋转蒸发器回收溶剂,残渣加甲醇溶解并移至50 ml量瓶中,定容,摇匀,经微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液10 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次。结果,青蒿素、青蒿酸、

东莨菪内酯峰面积的RSD分别为0.81%、0.73%、0.69%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密称取药材粉末(S3)约2.5 g,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,以东莨菪内酯为内参峰。结果,各主要共有峰相对保留时间的RSD为0.11%~2.04%,相对峰面积的RSD为0.15%~2.47%,相似度>0.99,表明供试品溶液在24 h内较稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取药材粉末(S3)约2.5 g,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以东莨菪内酯为内参峰。结果,各主要共有峰相对保留时间的RSD为0.09%~2.28%,相对峰面积的RSD为0.11%~2.53%,相似度>0.99,表明本方法重复性良好。

2.4 数据分析方法^[6-7]

利用国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)进行HPLC指纹图谱相似度分析;采用SPSS 17.0软件进行主成分分析和聚类分析。

2.5 样品测定

分别取青蒿饮片粉末(S1~S12,过40目筛)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,记录色谱,详见图1、图2。利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A版)软件,以S1为参照图谱,经多点校正,中位数法生成青蒿对照指纹图谱^[8],从中筛选出16个主要特征指纹峰,并对5、14、16号色谱峰进行指认,分别为东莨菪内酯、青蒿素、青蒿酸。

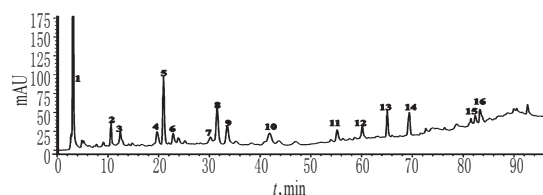


图1 青蒿样品高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of *A. apiacea* samples

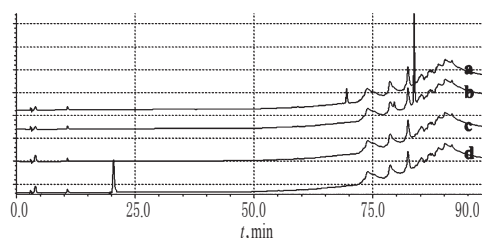


图2 对照品重叠空白甲醇色谱图

a. 青蒿素; b. 青蒿酸; c. 空白溶液; d. 东莨菪内酯

Fig 2 Overlapping chromatograms of references

a. artemisinin; b. artemisinic acid; c. blank solution; d. scopoletin

2.6 相似度计算

根据生成的对照指纹图谱,计算各批样品的相似度。结果,除S11与对照图谱相似度为0.460外,其余各批样品相似度均在0.962~0.998之间,其中S1、S6、S7、S8、S10、S12与对照图谱相似度达到0.996以上。可见,不同批次样品之间可能存在一定差异。

2.7 主成分分析和聚类分析

2.7.1 主成分分析 将12批青蒿饮片色谱数据,以各样品总

峰个数、共有峰占总峰面积比值、与对照图谱相似度及各样品3个主要特征峰(1.东莨菪内酯;2.青蒿素;3.青蒿酸)与S1中各特征峰峰面积比值为数据源,形成6个样本数据矩阵^[9],详见表2。运用SPSS 17.0软件对数据矩阵进行KMO检验和Bartlett球形检验。结果,KMO统计量(0.689)>0.5,Bartlett球形检验 $P<0.05$,表明各指标间相互独立,适用于主成分分析。取特征值较大的两个主成分(方差贡献率为91.37%),以各样品的得分建立坐标系,详见图3。由图3可知,S6、S7、S8、S5、S10、S9分散相对集中,说明S6、S7、S8之间,S5、S10、S9之间成分种类和含量相接近,而S11与其他样品距离相对较远,因此S11可排除建立共有模式所需样品之外。

表2 数据矩阵表

Tab 2 Data matrix table

编号	总峰个数	共有峰占总峰面积比值	与对照图谱相似度	特征峰1比值	特征峰2比值	特征峰3比值
S1	102	0.825	0.998	1.000	1.000	1.000
S2	94	0.781	0.962	0.852	0.828	0.892
S3	98	0.804	0.994	1.002	0.743	0.830
S4	95	0.728	0.977	0.829	0.818	0.912
S5	90	0.838	0.989	0.958	1.136	1.020
S6	86	0.831	0.998	0.893	0.983	1.029
S7	87	0.857	0.998	0.887	0.963	1.110
S8	87	0.871	0.996	0.882	0.998	1.141
S9	90	0.797	0.971	0.949	0.929	1.018
S10	90	0.857	0.998	0.935	0.975	0.922
S11	71	0.451	0.460	0.861	0.285	0.333
S12	102	0.825	0.998	1.015	0.972	0.897

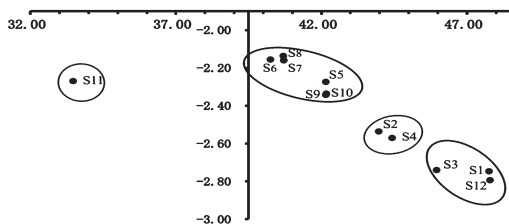


图3 青蒿样品主成分分析图

Fig 3 Principal component analysis of *A. apiacea* samples

2.7.2 聚类分析 将不同批次青蒿样品HPLC图谱中的16个共有峰的峰面积值标准化,组成 12×16 阶数据矩阵^[9],运用SPSS 17.0软件以组间联接聚类法、欧氏平方距离法^[6]作为测量的距离变量,并对其进行聚类分析,详见图4。

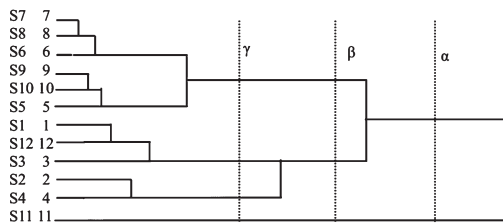


图4 青蒿样品聚类分析图

Fig 4 Cluster analysis of *A. apiacea* samples

聚类结果表明,以虚线 α 为界,可以将12批样品聚类为两大类:S11单独聚为一类,其余11批样品聚为另一类;以虚线 β 为界,可以将其聚为三大类:S11聚为一类,S1、S12、S3、S2、S4聚为一类,其余为一类;以虚线 γ 为界,可以将其聚为四大类:I

(S6、S7、S8、S5、S10、S9), II (S2、S4), III (S1、S12、S3), IV (S11)。根据以上聚类结果,样品S6、S7、S8、S5、S10、S9聚为一类,说明它们之间具有一定的统一性。其中,I类中S7、S8、S6聚为一类,S9、S10、S5聚为一类,表明同一类别中饮片又存在一定的差异性。同样,S12、S1聚为一类后又与S3聚为一类形成III,说明它们之间既存在一定的统一性又存在一定的差异性;S11单独聚为一类,说明S11与其他批次样品之间差别显著,分析原因可能与青蒿药材的栽培、饮片加工和存放等多种因素有关,或企业自身饮片生产过程不规范,存在掺假掺杂等问题。可见,不同市售饮片之间存在一定差异,聚类分析对青蒿进行化学模式识别具有一定的科学道理,与主成分分析结果相吻合。

2.8 青蒿标准HPLC指纹图谱的建立

根据相似度计算结果,参考主成分分析和聚类分析结果,将S11以外的其余11批青蒿样品AIA格式数据文件再次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)软件,以S1为参照图谱,经多点校正,中位数法生成青蒿HPLC指纹图谱和对照指纹图谱^[8],详见图5、图6。

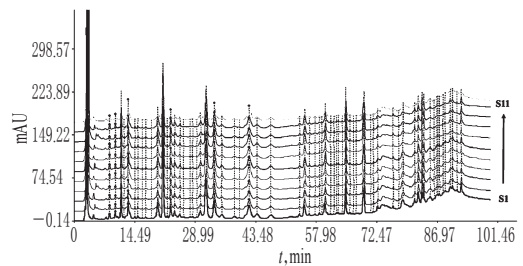


图5 11批样品的高效液相色谱指纹图谱

Fig 5 HPLC fingerprint of 11 batches of samples

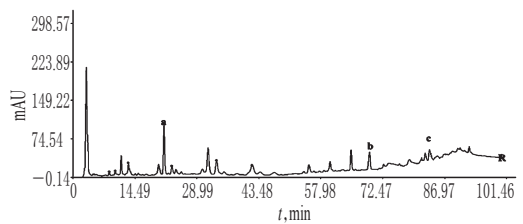


图6 对照指纹图谱

a.东莨菪内酯;b.青蒿素;c.青蒿酸

Fig 6 Reference fingerprint

a. scopoletin; b. artemisinin; c. artemisinic acid

经计算,11批样品的相似度分别为0.998、0.996、0.996、0.990、0.992、0.997、0.998、0.995、0.994、0.997、0.998,均在0.990以上,表明各批饮片之间相似性高,差异性小,间接说明重庆市售青蒿饮片质量虽然存在一定差异性,但总体质量较好。

3 讨论

3.1 提取条件的考察

本试验考察了不同提取溶剂(水、甲醇、50%乙醇和95%乙醇),比较了超声提取、加热回流、冷浸等不同提取方法,结果表明,以95%乙醇回流提取法2h提取率较高。

3.2 色谱条件的优化

笔者尝试了分别以甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-水等为流动相的分离效果,结果以甲醇-0.1%磷酸水溶液为流动相进行全波长扫描,在220 nm波长处色谱峰数目较多,经梯度洗脱程序洗脱后,峰形、出峰时间和分离效果相对较好。

京大戟中大戟二烯醇对照品的制备研究[△]

葛秀允*, 孙立立#, 张乐林(山东省中医药研究院/国家中医药管理局中药蜜制和制炭炮制技术与原理重点实验室, 济南 250014)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)27-3831-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.27.31

摘要 目的:研究制备京大戟中大戟二烯醇对照品的分离方法。方法:取京大戟药材醇提浸膏的石油醚萃取部分,用硅胶柱色谱分离,以石油醚-乙酸乙酯(95:5~70:30, V/V) 梯度洗脱,收集大戟二烯醇富集流份,以甲醇反复重结晶,通过核磁共振、质谱等波谱方法鉴定化合物结构,采用薄层鉴别、紫外鉴别、高效液相色谱和液质联用等技术进行质量分数检测。结果:从京大戟中制备分离的大戟二烯醇对照品,质量分数>99%。结论:该方法得到的大戟二烯醇对照品符合中药新药质量标准含量测定用对照品的相关技术要求,可作为京大戟药材和含京大戟的成方制剂的质量控制及药效物质基础研究中的对照品。

关键词 京大戟;大戟二烯醇;对照品;制备

Study on the Preparation of Euphol Reference Substance in *Euphorbia pekinensis*

GE Xiu-yun, SUN Li-li, ZHANG Le-lin(Shandong Provincial Academy of Chinese Medicine/State Key Laboratory of Processing Technology and Principle of Honey and Charcoal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a preparative separation method for euphol reference substance in *Euphorbia pekinensis*. METHODS: Parts of petroleum ether extraction from *E. pekinensis* ethanol extract were separated by silica gel column chromatography with petroleum ether-ethyl acetate(95:5-70:30, V/V) by gradient elution. The enriched fractions of euphol were collected. With the methanol repeated recrystallization, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) method, mass spectrometry (MS) method and other spectroscopic methods were used to identify the chemical structures, and thin layer chromatography (TLC), UV, HPLC-UV, HPLC-MS were combined to detect the mass fraction. RESULTS: The mass fraction of euphol reference substance separated from *E. pekinensis* was >99%. CONCLUSIONS: The reference substance of euphol acquired by this method meet the relative requirements of the chemical reference substance in the content determination of TCM new drug quality standard. It provides chemical reference substance for the quality control of *E. pekinensis* and prescription preparations containing *E. pekinensis* and the basic research of effective substances.

KEYWORDS *Euphorbia pekinensis*; Euphol; Reference substance; Preparation

3.3 12批饮片的质量评价

根据相似度计算结果,12批青蒿饮片中有1批相似度过低,该分析结果与主成分分析和聚类分析结果相同,其余11批饮片之间相似性较高、差异性较小,化学成分种类和含量接近,间接说明重庆市售青蒿饮片质量总体较好。个别样品存在质量问题,这可能与青蒿药材的栽培、饮片加工和存放等多种因素有关,也不排除不法商贩以假充真,以次充好的可能性,具体原因有待深入研究。为解决此问题,相关部门仍应着重加大对青蒿药材种植,饮片加工、贮存方式的监督管理,以保证良好的药材、饮片供应。

(致谢:重庆市中药研究院中药种植研究所李隆云研究员对青蒿饮片进行了鉴别)

参考文献

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上

△ 基金项目:国家中医药局公益性行业科研专项经费项目(No.200807039)

* 博士, 副研究员。研究方向:中药炮制原理。电话:0531-82949829。E-mail:xiuyunge@163.com

通信作者:研究员。研究方向:中药炮制原理与中药新药。电话:0531-82949829。E-mail:xingerx@163.com

海:上海科学技术出版社,1999:658-661.

- [2] 金美花.青蒿的药理作用与临床新用[J].现代医药卫生,2009,25(15):2352.
- [3] 丁小芬,胡红.青蒿治疗类风湿性关节炎的免疫药理作用[J].中国中医基础医学杂志,2006,12(1):75.
- [4] 呼文亮,姚丽,谢红,等.青蒿素抗肿瘤作用机制研究[J].中国药房,2008,19(36):2804.
- [5] 杨忠顺,李英.与青蒿素相关的1,2,4-三噁烷及臭氧化物的研究进展[J].药学报,2005,40(12):1057.
- [6] 尹海波,王吉华,涂秀文,等.老鹳草的HPLC指纹图谱及模式识别研究[J].中国药房,2014,25(27):2538.
- [7] 刘永锁,孟庆华,蒋淑敏,等.相似系统理论用于中药色谱指纹图谱的相似度评价[J].色谱,2005,23(2):158.
- [8] 白根本,王敏,彭玉帅,等.市售青蒿饮片的质量一致性的高效液相色谱指纹图谱法分析[J].时珍国医国药,2013,24(9):2283.
- [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:2015-01-07 修回日期:2015-04-12)

(编辑:余庆华)