

栀子多波长 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究

苗琦, 罗光明*, 罗扬婧, 葛菲, 朱玉野, 付小梅, 胡生福, 朱继孝, 董艳凯, 张兰

江西中医药大学 江西省中药种质资源工程技术研究中心, 江西 南昌 330004

摘要:目的 采用多波长 HPLC 法研究 67 批栀子药材, 对不同产地的栀子采用指纹图谱相似度评价及聚类分析和主成分分析(PCA)等化学模式识别技术进行研究, 以为栀子药材品质评控和生产区划提供参考。方法 色谱条件为 Durashell C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min, 检测波长 238、330、440 nm, 进样量 10 μL, 柱温 30 ℃。结果 67 批样品有 16 个共有峰, 共有峰保留时间的 RSD<1%, 峰面积的 RSD 比较大。各批次药材化学成分组成及量均存在一定差异。采用聚类分析及 PCA 从化学成分上揭示了 67 批样品的相似性及差异性。结论 以指纹图谱数据为基础, 将聚类分析与 PCA 结合起来, 不仅可以进行栀子药材的质量控制, 还可以为下一步栀子全国生产区划研究提供理论支持。

关键词: 栀子; 化学模式识别; 质量控制与评价; 聚类分析; 生产区划

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)21-3159-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.022

Multiple wavelength HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Gardeniae Fructus*

MIAO Qi, LUO Guang-ming, LUO Yang-jing, GE Fei, ZHU Yu-ye, FU Xiao-mei, HU Sheng-fu, ZHU Ji-xiao, DONG Yan-kai, ZHANG Lan

Chinese Medicine Germplasm Resource Engineering Technology Research Center of Jiangxi Province, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To establish a method of multiple wavelength HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Gardeniae Fructus*. **Methods** The chromatographic separation was performed on a C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was a mixture of acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous solution in gradient elution. The flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelengths were 238, 330, and 440 nm, the injection volume was 10 μL, and the column temperature was 30 ℃. Then, the data from HPLC fingerprint were analyzed by similarity evaluation, principle component analysis, and system cluster analysis. **Results** The HPLC fingerprint of 67 batches of *Gardeniae Fructus* from different habitats and varieties were set up and 16 common peaks were obtained. The RSD of the relative retention time of the common peaks was below 1%. The RSD of the relative peak area was relative bigger. **Conclusion** The combination of clustering analysis and principle component analysis could be used for the quality control and provide the theoretical support for the further regionalization of *Gardeniae Fructus* all over China.

Key words: *Gardeniae Fructus*; chemical pattern recognition; quality control and assessment; clustering analysis; production; regionalization

栀子 *Gardeniae Fructus* 为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实^[1], 具有泻火除烦、清热利湿、凉血解毒等功效。栀子果实的化学成分主要包括环烯醚萜苷类、二萜类(西红花苷类)、有机酸酯类以及其他类化学成分^[2]。其中栀

子苷具有抗炎、解热、利胆和轻泻作用; 京尼平苷酸具有抗肿瘤和抗氧化的作用; 京尼平 1-β-D-龙胆二糖苷有文献报道其能改善戊巴比妥钠引起的心力衰竭; 绿原酸为栀子中主要有机酸酯类成分, 具有显著的抗癌作用及保肝利胆作用; 西红花苷-I 和西红

收稿日期: 2014-05-23

基金项目: 国家科技部“十二五”科技支撑计划课题——栀子的规范化种植及开发利用研究(2011BAI04B01); 中央本级重大增减支项目——栀子质量特征和商品规格研究(20603020110); 中央本级重大增减支项目——栀子全国生产区划研究(20603020213); 江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目——大宗药材栀子全国生产区划研究(JZYC14C09)

作者简介: 苗琦(1989—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药资源的开发与应用。E-mail: miaoqi6213963@126.com

***通信作者** 罗光明(1957—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源的开发与应用研究。Tel: (0791)7118982 E-mail: jzlgm11@163.com

花昔-II 是西红花、栀子中共有的色素类成分,具有去黄疸、利胆及明显的降血脂作用^[3]。近年来,化学模式识别已广泛应用于中药材的质量控制与品质评价^[4-6]。

目前已有一些关于栀子指纹图谱化学模式识别方面的研究报道,但应用多波长指纹图谱化学模式识别方面的研究依然少见。本实验研究不同产地的 67 批栀子药材的多波长指纹图谱,并基于指纹图谱信息采用系统聚类、主成分分析(PCA)等化学模式识别方法进行研究,为下一步栀子全国生产区划研究提供理论支持。

1 材料与仪器

1.1 材料

本实验采集了江西、湖南、湖北、四川、重庆、

广西、福建、浙江、贵州、河南、陕西、安徽等地共 67 批栀子药材,经江西中医药大学药学院葛菲教授鉴定为栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实,采集的栀子放烘箱 60 °C 烘干,放入自封袋中保存备用。样品来源见表 1。

1.2 仪器

Waters 2695 separations module 高效液相色谱仪(Waters 2996 Photodiode Array Detector 检测器、Waters Empower 化学工作站,美国 Waters 公司);BP224S 型万分之一电子天平(Sartorius 公司);KQ—300E 超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

表 1 样品来源

Table 1 Sample sources

编号	采收地点	编号	采收地点
1	江西省九江市湖口县武山镇何家埂	35	浙江省杭州市临安县於潜镇建新村/龙池里
2	江西省九江市湖口县武山镇塘落村	36	湖南省浏阳市沙市镇东门村野鸡冲
3	江西省吉安市新干县界埠镇南排镇	37	湖南省宁乡县青山桥镇柳家塘村
4	江西省吉安市新干县界埠镇胡家老村	38	湖南省永州市零陵区邮亭圩镇毛坪村
5	江西省宜春市樟树市临江镇黄土岗村	39	湖南省武冈市邓家铺镇东风村
6	江西省宜春市樟树市义城镇罗岗村	40	湖南省衡阳县演陂镇欧泉塘村
7	江西省宜春市丰城市隍城镇南田村	41	湖南省隆回县吴家冲镇
8	江西省南昌市进贤县张公镇渣兰村	42	湖南省邵东县杨桥镇两顺村
9	江西省抚州市金溪县双塘镇竹桥村	43	湖南省邵东县牛马司镇光华村
10	江西省抚州市金溪县秀谷镇	44	湖南省张家界市武陵源区协合乡插旗峪村
11	江西省抚州市金溪县双塘镇竹桥村	45	湖南省慈利县零阳镇柳林村杨湾
12	福建省宁德市福鼎市贯岭镇茗洋村	46	湖北省武汉市黄陂区木兰乡梳店村
13	福建省宁德市福鼎市分水关	47	湖北省大悟县新城镇段家畈/江冲村
14	福建省龙岩市小池镇	48	湖北省孝昌县花园镇龙井村左家河
15	福建省宁德市霞浦县东安	49	湖北省孝感市孝南区西河镇安平庙林果场
16	重庆市南川县三泉镇	50	湖北省蕲春县漕河镇清水河林场
17	四川省内江市资中县	51	湖北省英山县南河镇界碑石村
18	四川省资阳市雁江区	52	湖北省英山县杨柳镇水口桥村冷水塘组
19	四川省广元市青川县	53	湖北省长阳土家族自治县都镇湾镇金福村
20	四川省绵阳市柏林镇	54	贵州省铜仁市德江县青龙镇
21	四川省万源市中坪乡	55	浙江省永嘉
22	四川省南充市西充县	56	福建省福州
23	四川省达州市达县	57	河南省唐河县马扶乡(蒸晒)
24	广西南宁市四塘镇那垌村	58	河南省唐河县马扶乡(晒干)
25	广西南宁市隆安县	59	安徽省霍山县漫水河镇
26	广西南宁市武鸣县	60	安徽省青阳县西华乡
27	广西南宁市邕宁县	61	贵州省贵阳
28	广西省玉林市兴业县城隍镇	62	陕西省汉中西乡县
29	广西省崇左市扶绥县东罗镇	63	河南省唐河
30	浙江省温州市永嘉县下桥镇吴垌村	64	福建省龙岩
31	浙江省温州市平阳县昆阳镇莲花山	65	四川省广安
32	浙江省温州市文成县金星乡	66	广西贵港
33	浙江省丽水市景宁县澄照乡三石村	67	江西省婺源
34	浙江省杭州市淳安县枫树岭		

1.3 试剂

甲醇（色谱纯，美国 TEDIA）；乙腈（色谱纯，美国 ACS）；甲醇（分析纯，西陇化工股份有限公司）；水为娃哈哈纯净水；京尼平苷酸（批号 111828-201102，质量分数 96.0%）、绿原酸（批号 110753-201314，质量分数 96.6%）、槲子苷（批号 110749-201316，质量分数 97.5%）、西红花苷-I（批号 111588-201202，质量分数 91.1%）、西红花苷-II（批号 111589-201304，质量分数 92.4%）购于中国食品药品检定研究院，京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷（批号为 ZM0501BA14，质量分数 >98.0%）购于上海源叶生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

称取本品粉末（过四号筛）约 0.1 g，置具塞锥形瓶中，精密加入 75% 甲醇 25 mL，称定质量，超声处理 40 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过。精密量取续滤液 10 mL，置 25 mL 量瓶中，加 75% 甲醇至刻度，摇匀，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定各对照品适量，分别置于 50 mL 棕色

量瓶中，用适量 75% 甲醇溶液溶解并定容至刻度，分别制成含京尼平苷酸 10.176 μg/mL、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷 201.292 μg/mL、绿原酸 4.443 6 μg/mL、槲子苷 311.61 μg/mL、西红花苷-I 175.276 4 μg/mL、西红花苷-II 17.371 2 μg/mL 的对照品储备液，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过即得。

2.3 色谱条件

Durashell C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱；流动相：乙腈（A）-0.1% 磷酸水（B）；梯度洗脱：0~18 min, 8%~15% A；18~25 min, 15%~23% A；25~40 min, 23%~35% A；40~50 min, 35%~50% A；检测波长 238、330、440 nm；柱温 30 ℃；体积流量 0.8 mL/min；进样量：10 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 将“2.2”项下混合对照品储备液，分别用 75% 甲醇稀释 2、4、8、16、32、64 倍，按“2.3”项下的色谱条件测定，进样 10 μL，以进样量 10 μL 中对照品质量（μg）为横坐标，最佳检测波长下的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表 2。

2.4.2 精密度试验 取稀释 2 倍的混合对照品溶液

表 2 线性关系

Table 2 Linear relationship

对照品	标准曲线	<i>r</i>	线性范围 / μg
京尼平苷酸	$Y=1\ 610\ 765\ X-95$	0.999 9	0.101 76~0.001 59
京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷	$Y=1\ 144\ 290\ X-1\ 123$	0.999 9	2.012 92~0.031 45
绿原酸	$Y=4\ 025\ 629\ X+744$	0.999 7	0.044 44~0.000 69
槲子苷	$Y=1\ 859\ 824\ X+117$	0.999 9	3.116 10~0.048 68
西红花苷-I	$Y=7\ 633\ 873\ X+10\ 739$	0.999 9	1.752 76~0.027 38
西红花苷-II	$Y=8\ 706\ 055\ X-576$	0.999 9	0.173 71~0.002 71

10 μL，按“2.3”项色谱条件下，连续进样 5 次，测定峰面积。槲子苷、西红花苷-I、西红花苷-II、绿原酸、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷、京尼平苷酸峰面积的 RSD 分别为 0.55%、0.50%、0.41%、0.48%、0.49%、0.54%，表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取稀释 2 倍的供试品溶液，分别于样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样 10 μL，测峰面积，槲子苷、西红花苷-I、西红花苷-II、绿原酸、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷、京尼平苷酸的 RSD 分别为 1.21%、1.33%、0.97%、1.74%、1.51%、1.82%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

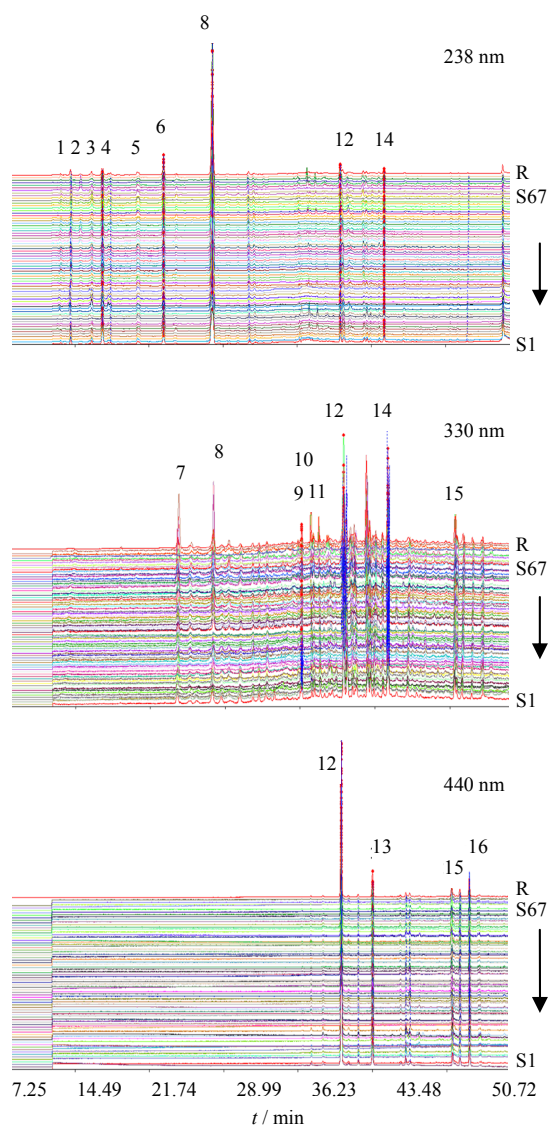
2.4.4 重复性试验 取同一药材，按“2.1”项平行处理 5 份，同法制成供试品溶液，测峰面积，结果槲子苷、西红花苷-I、西红花苷-II、绿原酸、京尼平 1-β-D 龙胆二糖苷、京尼平苷酸峰面积的 RSD 分别为 1.36%、1.89%、0.59%、1.30%、0.77%、1.43%，表明此法重复性良好。

3 结果与分析

3.1 共有峰及 6 种对照品峰的标定

取槲子样品按照“2.1”项制成供试品溶液，按“2.3”项色谱条件进样分析，得到各样品的 HPLC 指纹图谱。利用 2004A 版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》计算软件确定了 16 个共有峰。同时精

密吸取混合对照品溶液适量,按“2.3”项色谱条件进样 10 μ L,参照 6 个对照品的色谱行为及其 DAD 检测紫外光谱图,在样品色谱图上对其峰进行指认,确认了 6 个成分,其中 2 号峰为京尼平苷酸,6 号峰为京尼平-1- β -D 龙胆二糖苷,7 号峰为绿原酸,8 号峰为栀子苷,12 号峰为西红花苷-I,13 号峰为西红花苷-II,结果见图 1。



2-京尼平苷酸 6-京尼平-1- β -D 龙胆二糖苷 7-绿原酸 8-栀子苷
12-西红花苷-I 13-西红花苷-II
S1~S67-1~67 号样品 R-共有指纹图谱
2-geniposidic acid 6-genipin-1- β -D-gentiobioside 7-chlorogenic acid
8-gardenoside 12-crocin-I 13-crocin-II
S1-S67-1-67 samples R-common HPLC fingerprint

图 1 67 批栀子药材指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 67 batches of *Gardeniae Fructus* samples

3.2 栀子多波长中药材指纹图谱相似度计算

利用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A)”设置 S1 为参照指纹图谱,时间窗宽度为 0.1,剪切前 5 min 溶剂峰后,采用多点校正后进行自动匹配,得到 67 批栀子药材在 238、330、440 nm 下的共有指纹图谱 R(图 1)和指纹图谱相似度结果。根据软件计算结果确认 67 批样品中有 16 个共有峰,保留时间的 RSD 均 <1%、同一成分峰面积的 RSD 比较大,各样品 238、330、440 nm 图谱相对于对照图谱的相似度均 >89%,数据表明栀子药材的化学成分组成较为相似,但各批次药材相同分量差异较大,可见品质存在较大的差异,如要更为客观地反映栀子药材的内在品质需要进一步进行分析。

3.3 聚类分析

利用 SPSS 19.0 数据分析软件,将 67 批样品的 16 个共有峰峰面积数据进行 Z 标准化后,选用组间联接(Between-groups linkage)聚类方法,采取欧氏距离(Euclidean distance)度量标准,计算样品的相似性程度,聚类结果见图 2。从聚类图结果可将 67 批样品聚类为 3 类,样品 1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、14、16、17、25、26、27、28、32、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、62、67 为一类,样品 18、19、20、21、22、23、24、29、45、46、60、61、63、64、65、66 为一类,样品 9、12、13、15、30、31、33 为一类。根据综合主成分值判断前 2 类栀子药材质量较优。即江西、四川、广西、湖南、湖北、安徽产栀子质量普遍较优,其余产地质量较为一般。

3.4 PCA

PCA 也称主分量分析,它在尽可能保留原有信息的基础上将高维空间中的样本映射到较低维的主成分空间中,使数据矩阵简化,降低维数,寻找少数几个由原始变量线性组合的主成分(也称潜变量),以揭示数据结构特征,提取化学信息,已经广泛应用于中药材的品质综合评价与分类^[7]。本实验将 67 批样品 16 个共有峰峰面积导入 SPSS 19.0 软件,进行 PCA。对栀子共有峰峰面积 Z 标准化处理后,进行了相关系数矩阵、方差分解主成分提取分析和初始因子载荷矩阵的计算,由方差分解主成分提取结果可知,共有 3 个主成分特征值大于 1,故提取 3 个主成分,且 3 个主成分的累积方差贡献率

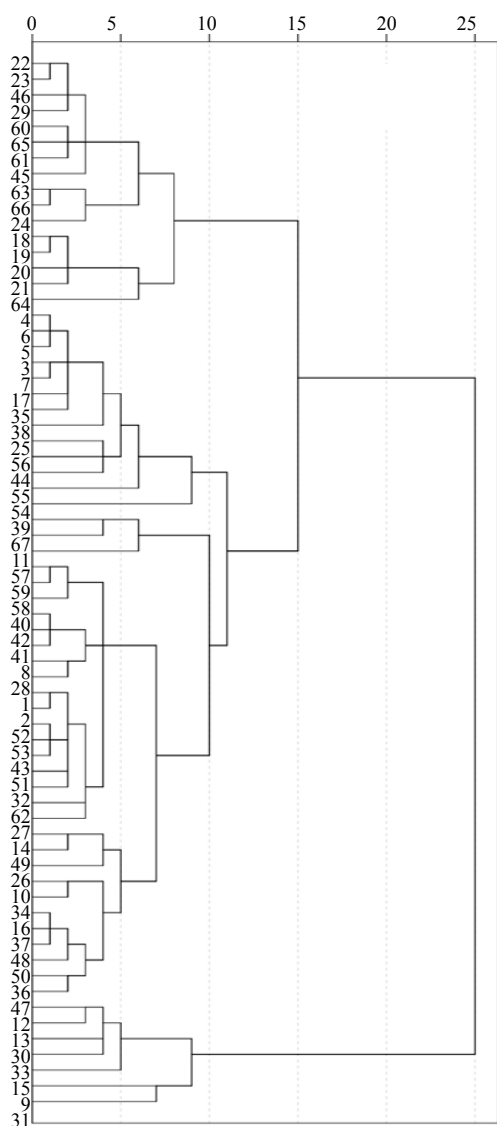


图 2 聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis of *Gardeniae Fructus*

大于 85.6%，所以提取的 3 个主成分足以评价栀子的品质。将得到的特征向量与标准化后的数据相乘，得到主成分表达式，再以每个主成分所对应的特征值占提取主成分总的特征值之和的比例作为权重得到了主成分综合模型，根据主成分综合模型计算 67 批样品的综合主成分值，并按综合主成分值进行系统聚类，综合主成分值聚类结果见图 3。从聚类图结果可将 67 批样品聚为 3 类，样品 1、2、3、4、5、6、7、8、10、16、17、18、19、20、21、22、23、28、29、32、34、35、37、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、55、57、58、59、60、61、62、64 为一类，样品 12、13、14、24、25、26、27、30、31、33、36、38、39、54、

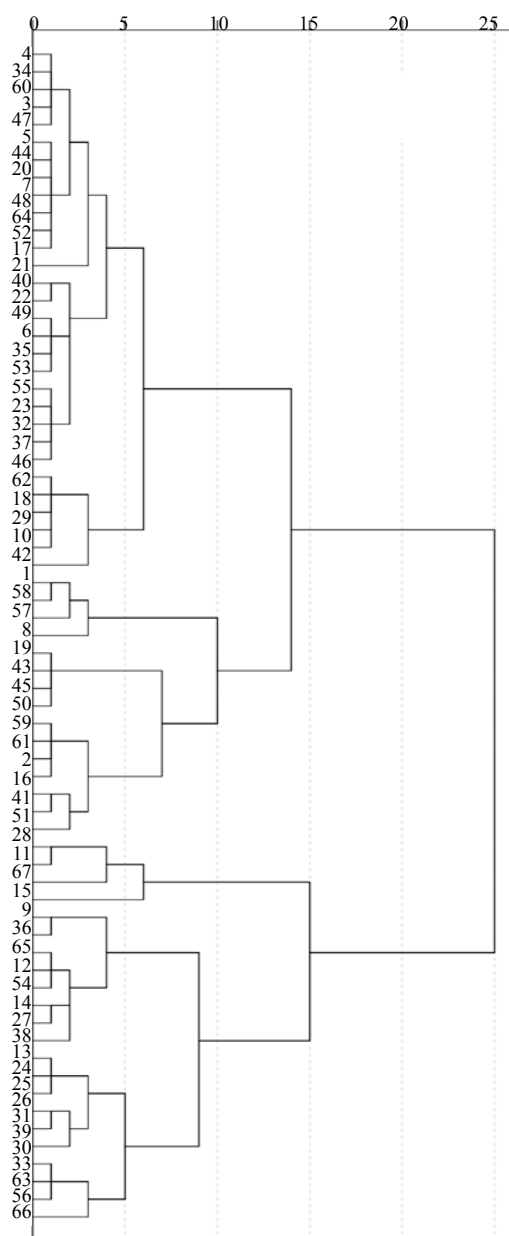


图 3 综合主成分值聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis of principal component values

56、63、65、66 为一类，样品 9、11、15、67 为一类。根据综合主成分值判断，前 2 类栀子药材质量较优。即江西、四川、广西、浙江、湖南、湖北、安徽产栀子质量普遍较优，其余产地质量较为一般。栀子质量栀子的主成分分析结果与聚类结果类似，但仍存在一定的差异。

4 讨论

4.1 检测波长的选择

从以往的栀子指纹图谱研究文献可以发现，大多采用 254 nm 或者其他单一波长作为栀子成分的检测波长，由于中药成分复杂，采取单一检测波长

会出现峰组成单一、峰面积普遍偏小以及特征峰数量少等情况,后续的栀子指纹图谱相似度的计算也无法客观地反映栀子药材的成分体系,也就无法客观地对栀子品质进行评价。栀子中主要含有环烯醚萜苷类、有机酸类、西红花苷等类型化合物,本实验使用 DAD 检测器对样品进行 190~500 nm 全波长扫描,并对各波长下的色谱进行分析比较。结果发现 3 类化合物的最佳检测波长分别是 238、330、440 nm,由于中药成分的复杂性决定了单一成分或指标难以客观评价中药质量,如果只选取单一波长进行检测,可能造成峰面积信息的丢失或残缺,所以本实验选择 238、330、440 nm 为检测波长,各峰分离良好,特征峰明显且峰形较好,3 波长图谱最大可能地获取了色谱组分信息以反映栀子化学成分组成的全貌。

4.2 化学模式结果讨论

比较相似度评价、聚类分析和 PCA 方法发现其结果不完全相同。分析原因可能是中药本身是个多成分复杂体系,在进行中药指纹相似度计算时,由于人工的多点矫正,可能会出现特征峰矫正不完全导致信息缺失,再者由于采用了夹角余弦和相关系数法来计算指纹图谱相似度,无法检测峰面积的线性波动,而聚类分析和 PCA 就是在峰面积信息的基础上进行计算的。另外,聚类分析和 PCA 的结果也存在差异,其原因可能是在 PCA 时只提取了特征值大于 1 的 3 个主成分,虽然 3 个主成分的累计方差贡献率 $\geq 85.6\%$,但被忽略的特征值小于 1 的成分仍然会对聚类结果有贡献,所以势必会出现聚类分析和主成分分析结果有差异的情况。

从栀子指纹图谱相似度结果可以看出,各样品 238、330、440 nm 图谱相对于对照图谱的相似度均 $>89\%$,聚类分析与 PCA 结果也将 67 批药材归

为不同的 3 类,数据表明栀子药材的化学成分组成较为相似,但各批次药材仍存在差异,表现为不同批次药材化学组成和同一成分不同批次之间存在差异,分析原因可能是不同地区的土壤、气候、水分、矿物质分布情况、药材的采收期及药材种源等,都对中药材的质量产生一定的影响。自然生态环境与中药资源的质量(有效成分的形成和积累)、数量密切相关,是其生态适宜性评价的客观基础,也是药材生产区划的关键所在;同时本实验还进一步发现,不同产地的栀子样品仍能部分聚成一类。这说明栀子药材具有一定的产地适应性。综上所述,将聚类分析与 PCA 相结合评价栀子指纹图谱的差异性及相似性,不仅可以进行栀子药材质量控制,还可以为下一步栀子全国生产区划研究提供理论支持。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 杨全军, 范明松, 孙兆林, 等. 栀子化学成分、药理作用及体内过程研究进展 [J]. 中国现代中药, 2010, 9(12): 7-12.
- [3] 孟祥乐, 李红伟, 李 颜, 等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(11): 959-967.
- [4] 黄 洋, 邵慧凯, 路 丽, 等. 不同采收期小叶榕叶 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 271-275.
- [5] 曹建军, 梁宗锁, 杨东风, 等. 地黄 HPLC-DAD 多波长指纹图谱的建立及其在熟地黄炮制中的应用 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 265-270.
- [6] 王 燕, 鲍家科, 金 杨, 等. 西南鬼灯檠的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 54.
- [7] 卢小泉. 化学计量学研究方法 [M]. 北京: 科学出版社, 2013.