

· 药材 ·

## 广藿香裂解色谱指纹图谱及其聚类分析

张铭光<sup>1</sup>,袁敏<sup>2</sup>,袁鹏<sup>3</sup>,曾志<sup>2</sup>,颜春兰<sup>3</sup>,黄晓玲<sup>4\*</sup>

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631; 2. 华南师范大学分析测定中心, 广东 广州 510631; 3. 华南理工大学自动化科学与工程学院, 广东 广州 510640; 4. 广州香雪制药股份有限公司, 广东 广州 510000)

**摘要:**目的 研究比较各地广藿香的指纹图谱,并考察了裂解温度、裂解时间对指纹图谱的影响。方法 采用裂解色谱法(PGC)测定,模糊聚类法分析。结果 不同产地样品的指纹图谱既有相似性,也有特征性,谱图的重现性好,其RSD均 $\leq 2.75\%$ 。结论 此方法具有快速、简便、准确等特点,裂解温度、裂解时间对实验起着重要作用。

**关键词:** 广藿香; 指纹图谱; 裂解色谱; 模糊聚类

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)08-0749-04

### Fingerprint of *Pogostemon cablin* by pyrolysis-gas chromatography and its fuzzy cluster analysis

ZHANG Ming-guang<sup>1</sup>, YUAN Min<sup>2</sup>, YUAN Peng<sup>3</sup>, ZENG Zhi<sup>2</sup>, YAN Chun-lan<sup>3</sup>, HUANG Xiao-ling<sup>4</sup>

(1. College of Life Science; 2. Center of Analysis &amp; Test, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

3. College of Automation and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 000000, China;

4. Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 000000, China)

**Abstract Object** To study comparatively the fingerprint of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. in different producing area and investigate the effect of pyrolysis temperature and pyrolysis time on the fingerprint. **Methods** Pyrolysis-gas chromatography (PGC) and fuzzy cluster analysis were used. **Results** Both similarity and characteristics were found in the fingerprint of *P. cablin* in different producing area. The methodological evaluation showed that this method had a good reproducibility,  $RSD \leq 2.75\%$ . **Conclusion** This method is simple, rapid and accurate. It is suitable for the quality control of the Chinese materia medica with the important role of pyrolysis temperature and pyrolysis time.

**Key words** *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.; fingerprint; pyrolysis-gas chromatography (PGC); fuzzy cluster

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为唇形科刺蕊草属植物,原产东南亚等国,引种我国后,主产于广东。药理作用主要表现在抑菌、抗螺旋体、促进消化功能、缓解胃肠损害、抑制呼吸道病原体等方面。其具有芳香油性质,挥发油主要成分是广藿香醇、广藿香酮、 $\alpha$ -愈创木烯、反式-丁香烯、反式-法醛、 $\alpha$ -广藿香烯等。气质联用技术已广泛应用于广藿香挥发油的分析中<sup>[1]</sup>。广藿香醇、广藿香酮是其主要有效成分,并作为质量控制的主要指标,但从中医辩证的角度去看,某种有效成分不能反映中医用药所体现的整体疗效。综合分析 with 整体分析已成为分

析化学发展的趋势。色谱指纹图谱具有综合、宏观、“模糊”的非线性特征,可能更适应中医传统理论的需要<sup>[2]</sup>。曾采用气相色谱技术、液相色谱技术分别研究连翘、郁金、板蓝根、地黄等一些中药材的色谱指纹图谱<sup>[3-5]</sup>。中药材除了含有挥发油外,大部分是一些大分子化合物,这些大分子化合物,气相色谱难以测定,液相色谱容易污染色谱柱。裂解色谱(PGC)是热裂解和气相色谱两种技术的结合,也就是将样品置于裂解装置内,在一定的条件下加热使之迅速裂解成可挥发性小分子产物,然后用气相色谱进行分析。本实验选用裂解色谱法,测定不同产地的广藿香

\* 收稿日期: 2002-10-29

基金项目: 广东省科技计划重大专项及重点项目(A301020101); 广东省自然科学基金项目(011442); 广东省教育厅高校自然科学基金研究项目(0124); 广东省中医药局科研项目(401039)

作者简介: 张铭光(1956-),男,广东南海人,副教授,主要从事植物研究工作。

\* 通讯作者: Tel (020) 85211543 E-mail yshmin@21cn.com

药材指纹图谱,用模糊聚类法分析图谱数据<sup>[6,7]</sup>,具有快速、准确、重现性好的特点,并与用气相色谱法测定挥发油的指纹图谱比较,得出的结果较吻合。

## 1 实验部分

1.1 仪器与试剂: 色谱仪: GC-16A 气相色谱仪,氢火焰检测器(FID), PRY-2A 裂解装置(日本岛津) 色谱柱: 25 m× 0.32 mm ZYT-1 石英毛细管柱 样品: 13 种不同产地的广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth., 由香雪制药股份有限公司鉴定提供

1.2 测试条件: 柱温:  $T_c = 50^\circ\text{C}$  (5 min)  $\underline{5^\circ\text{C}} / \text{min}$  210 $^\circ\text{C}$ , 检测器温度  $T_D = 250^\circ\text{C}$ , 进样器温度  $T_I = 230^\circ\text{C}$ ; 裂解温度: 450 $^\circ\text{C}$ ; 裂解时间: 20 s; 进样量: 10 mg

1.3 样品制备: 分别取不同产地的广藿香(茎和叶混合) 10 g, 研磨粉碎, 备用 13 种样品来源与编号如表 1

表 1 样品来源  
Table 1 Source of samples

编号	来源	得油率 %	采收季节
1	湛江	0.36	2000-05
2	徐闻	0.36	2000-05
3	电白	0.60	2000-05
4	遂溪	0.46	1999秋
5	化州	0.37	1999秋
6	信宜	0.39	车间领
7	花都	0.36	2000-05
8	信宜	0.38	车间领
9	GAP基地	0.16	2000-01
10	GAP基地	0.15	2000-01
11	GAP基地	0.14	2000-01
12	GAP基地	0.12	2000-01
13	GAP基地	0.10	2000-01

## 2 结果与分析

2.1 指纹图谱的建立: 由于样品裂解后, 其组分已受到破坏, 其反映的是样品的特征性, 所以裂解指纹图谱是在样品质量有保障的基础上建立的。我们在上述条件下测定 13 种经厂家根据药理作用和活性成分筛选过质量较好的广藿香药材。从实验结果可看到, 13 个样品的图谱既有相似性也有特殊性, 广藿香的裂解峰有近 35 个色谱峰, 13 种药材的共有峰占 90% 以上, 选择  $S_r$  (各组分峰面积与共有峰面积之和的比值)  $> 1\%$  的共有峰进行比较, 发现不同产地的广藿香其指纹图谱主要变化是组分间峰值强度的改变, 选择 5 号峰为参照峰, 此峰是 13 种样品广藿香所共有, 且峰值比较稳定, 设定其  $\alpha$  为 1, 然后分别求出各组分的  $\alpha$  值 (各组分的调整保留值与峰 5 的调整保留值的比值) 和  $S_r$  值制成各样品的 PGC-FPS 表<sup>[8]</sup>, 见表 2

2.2 指纹图谱的聚类分析: 根据 PGC-FPS 表中的

数据, 选用算术平均最小法 (利用最小值和算术平均值的比值组成矩阵) 对 13 张图谱进行聚类分析, 结果见图 1, 图中 Y 轴表示相关系数, 数值越大, 表示图谱越相似, X 轴表示样品号。从图中可以看到: 6, 8, 11 号样品可归为一类时, 相关系数为 0.93; 10, 13 号样品归为一类时, 相关系数为 0.92; 6, 8, 11, 10, 13 号样品归为一类时, 相关系数为 0.91; 以此类推, 我们可以把 6, 8, 11, 10, 13, 12, 9 号样品归为一大类, 此时其相关系数为 0.85 也就是说, 当相关系数在一定范围内, 我们可把产品归为一类。9~13 号样品是在同一基地生产的, 9 号样品可能是因为取样引起误差, 与其他基地产品的差别稍大些, 信宜的产品与基地的产品较相似。4, 5, 1, 2, 7, 3 是来自不同产地, 在图中也反映出其相关系数较小。相关系数为 0.88 时, 4, 5 号样品可归为一类; 相关系数为 0.87 时, 1, 2 号样品可归为一类; 3, 7 号图谱与其他样品差异最大。总的来说, 这些产品与基地及信宜的产品在相关系数为 0.80 时才归为一类。我们同时也做了水蒸汽提取挥发油, 用气相色谱法测定其指纹图谱, 并进行聚类分析, 结果较一致。另外, 从挥发油提取的情况来看 (表 1), 基地生产的广藿香含挥发油较少。广藿香裂解指纹图谱见图 2, 测试条件: 柱温  $T_c = 50^\circ\text{C}$  (5 min)  $\underline{30^\circ\text{C}} / \text{min}$  210 $^\circ\text{C}$ , 其他同前。这 13 张图谱既具有广藿香裂解指纹图谱的特征, 又有一些因产地不同引起的差异。

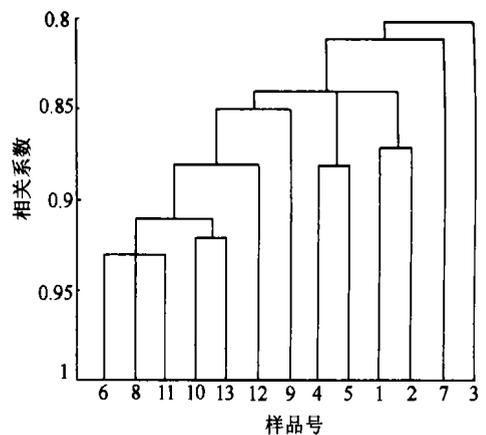


图 1 样品的聚类分析图

Fig. 1 Fuzzy cluster analysis of samples

2.3 重现性试验: 取 9 号样品 5 份, 在同一条件下测定, 考察色谱峰调整保留时间的一致性, 可见各色谱峰调整保留时间相对标准偏差的  $RSR$  均  $\leq 2.75\%$ 。

2.4 裂解温度对实验的影响: 在裂解色谱实验中, 裂解温度 ( $T_p$ ) 对实验的成败起着重要的作用,  $T_p$  过高, 样品的初级反应加剧, 使二次反应大大增加;  $T_p$

表 2 13种广藿香的 PGC-FPS

Table 2 PGC-FPS of 13 kinds of plants of *P. cablin*

峰号	$\alpha$ 值	各样品的 Sr%												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.55	17.67	14.59	12.27	15.12	18.85	34.73	8.27	32.71	15.82	26.00	32.99	23.10	28.70
2	0.62	17.04	12.65	11.17	15.33	16.19	22.06	19.78	21.19	15.45	18.18	24.60	16.00	20.00
3	0.91	2.23	3.15	6.79	2.87	2.72	2.52	0.52	2.94	1.40	2.27	3.12	3.55	2.33
4	0.97	0.73	2.51	4.19	2.12	1.07	1.20	4.20	1.73	3.08	1.97	1.79	2.24	1.91
5	1.00	11.16	17.03	11.07	8.93	7.66	5.30	22.39	7.46	18.51	12.17	10.22	9.58	10.57
6	1.11	1.87	4.34	5.11	1.95	2.57	2.52	4.24	2.93	5.40	3.24	2.09	3.30	2.48
7	1.16	4.45	4.22	5.05	3.42	3.84	5.35	4.48	3.43	3.08	3.71	3.72	4.55	4.23
8	1.21	9.82	10.99	9.35	9.83	7.32	9.15	16.76	11.38	12.81	15.37	10.17	12.68	13.56
9	1.38	3.26	3.50	3.07	3.28	4.20	2.59	3.43	2.30	3.00	2.42	2.57	2.15	2.19
10	1.49	15.77	15.81	6.61	3.48	4.66	1.16	7.65	1.77	3.82	1.52	1.42	2.80	1.31
11	1.61	2.09	0.36	1.35	1.29	1.61	1.51	0.50	1.37	1.43	1.51	0.91	1.74	0.79
12	1.68	2.73	2.45	4.63	1.90	3.86	1.91	0.25	2.24	1.85	1.84	1.15	2.80	1.19
13	1.75	1.21	1.42	2.75	1.35	1.17	1.11	1.88	1.09	2.07	1.58	1.17	1.37	1.09
14	1.79	0.20	0.92	2.46	1.31	1.13	1.07	0.84	1.22	1.58	1.36	0.51	1.84	0.72
15	1.82	0.67	0.49	2.48	1.21	1.34	0.97	0.36	0.79	1.61	0.66	0.25	1.28	0.62
16	1.91	1.07	0.89	1.25	2.06	1.38	0.96	0.64	1.05	1.43	1.47	0.77	1.25	0.84
17	1.99	0.84	0.53	2.24	1.54	0.96	0.95	0.89	0.77	1.21	0.90	0.18	1.27	0.77
18	2.05	0.79	0.46	1.33	1.06	1.35	0.98	0.52	1.08	1.17	1.60	1.04	0.85	0.94
19	2.57	1.75	0.83	2.78	5.24	4.54	1.11	0.52	0.68	1.11	0.35	0.43	2.94	0.53
20	2.70	1.58	0.93	1.09	5.05	2.70	0.86	0.51	0.54	1.27	0.68	0.26	1.29	1.13
21	2.77	1.00	0.87	0.96	4.40	3.59	0.58	0.40	0.38	0.98	0.25	0.13	1.04	0.76
22	2.79	1.28	0.57	0.91	4.72	3.72	1.00	0.68	0.66	0.98	0.61	0.32	1.37	1.83
23	2.89	0.80	0.49	1.08	2.54	3.67	0.38	0.31	0.29	0.94	0.31	0.17	1.04	0.87
共有峰%		97.38	95.01	97.23	99.46	99.08	93.99	94.84	97.24	90.87	96.86	98.57	96.49	9973
非共有峰%		2.62	4.99	2.77	0.54	0.92	6.01	5.16	2.76	9.13	3.14	1.43	3.51	0.27

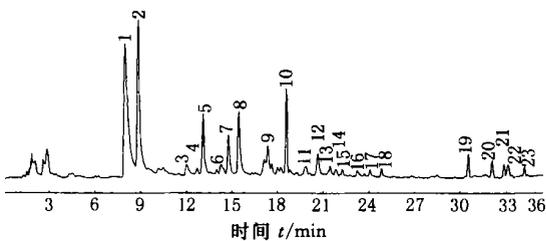


图 2 广藿香裂解色谱图

Fig. 2 PGC of *P. cablin*

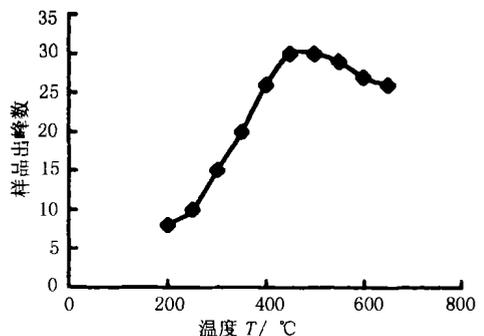


图 3 裂解温度对出峰数的影响

Fig. 3 Effect of pyrolysis temperature on peak number  
 变裂解时间,其他测试条件不变,测定不同裂解时间对出峰数的影响,结果见图 4 从图中可看到,裂解时间 < 20 s时,出峰数较少,裂解时间 > 30 s时,出峰数减少,而且有些峰型改变,出现一些不能完全分开的双峰,这可能是由于裂解时间较长,引起二级反应所至,裂解时间在 20~ 30 s时,出峰数较理想,综合考虑,选择裂解时间 20 s较好。

过低,样品裂解不完全,合适的  $T_p$  应该使裂解过程的初级反应为主 尤其在药材中,裂解反应主要是碳化反应,大部分产物都一样,只是各产物间含量有差异,因此不同的药材需要不同的裂解温度 在实验中我们选择不同的裂解温度,其他条件不变,做出不同裂解温度对裂解峰数的关系图,见图 3 从图中可看到,温度低于 450°C时,裂解不完全,温度高于 550°C时,样品出峰数下降,重复性不好,有些峰分解,所以选择 450°C裂解比较合适

2.5 裂解时间对样品出峰的影响: 选择 1号样品,改

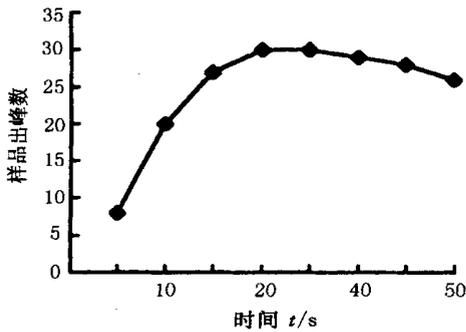


图 4 裂解时间与出峰数的关系

Fig. 4 Effect of pyrolysis time on peak number

### 3 结论

3.1 裂解色谱法用于中药材指纹图谱测定具有快速、灵敏度高、操作简单、重现性好的优点,尤其是样品不需要进行复杂的前处理过程,只要样品来源稳定,用这种方法测定指纹图谱是比较稳定的。同时还可以减少提取过程造成的测试误差,提高工作效率和减少因使用溶剂萃取时造成环境污染

3.2 结合先进的数据处理手段——模糊聚类分析,能比较全面、综合地反映不同产地药材裂解指纹图谱的关系,从而选出比较有代表性的图谱

3.3 裂解色谱法适用面广,对一些不能直接用气相色谱测定的药材如板蓝根、地黄、芦根等也能用裂解色谱测定,这样给中药材品质鉴定带来很大的方便

3.4 裂解温度、裂解时间是实验是否获得成功的关键,不同的药材,要求不同的裂解温度与时间

3.5 在一定条件下,特定的样品有其特征的裂解行为,如特征裂解产物和产物的含量。中药材裂解指纹图谱的特点主要是产物的含量的变化,如果能结合色谱联用,对所测定药材所含的组分有更深入的了解,采用裂解色谱指纹图谱判断药材的质量将会更全面些

3.6 不同来源的广藿香指纹图谱既具有相似性,但又不完全相同,裂解色谱指纹图谱与水提挥发油测定指纹图谱的方法比较,结果比较一致。

### References

- [1] Liu T L, Qiu Q, Zhao Y. *et al.* Analyzed the volatile oil of *Pogostemon cablin* by GC-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, (30) 12: 903-904.
- [2] Xie P S. On the feasibility of application of chromatographic fingerprint identification to herbal medication [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, (22) 6: 391-394.
- [3] Xu Z Y. Lecture on pyrolysis gas chromatography part 4 biomedical and other application [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1990, (8) 1: 21-24.
- [4] Fu R N, Liu H W. *High Resolution Gas Chromatography and Pyrolysis Gas Chromatography* [M]. Beijing: Beijing Institute of Technology Publishing House, 1992.
- [5] Zeng Z, Yang D G, Song L F. *et al.* The identification of *Isatis indigotica* Fort. by high performance liquid chromatographic fingerprint [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2002, (30) 7: 849-852.
- [6] Guo A L, Fang C X, Zhang L Z. *et al.* Cluster analysis based on pyrolysis gas chromatography of whole cell of bacillus [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 1999, (18) 6: 30-32.
- [7] Liang X Y, Lu C X, Li X L. *et al.* Fuzzy cluster analysis evaluating the reproducibility of pyrolysis gas chromatography of carbon fibers [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 1998, (16) 5: 439-441.
- [8] Zhang C, Wang Z H, Jin D Z. Comparative study on HPLC-FPS of Chinese red ginseng and Korean ginseng [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, (23) 3: 160-163.

## HPLC法测定地黄中地黄苷 D含量

李更生,王慧森\*

(河南省中医药研究院中药研究所,河南 郑州 450004)

摘要:目的 建立地黄中地黄苷 D 的 HPLC测定方法,提出地黄苷 D 的含量限度。方法 Hypersil C<sub>18</sub>分析柱 (250 mm×4.6 mm, 5μm),流动相为乙腈-水 (4:96),流速为 1 mL/min,柱温为室温,检测波长为 205 nm。结果地黄苷 D 回收率为 100.6%,RSD 为 2.1%,8个产地的 16份完整药材中地黄苷 D 的含量为 0.13%~0.69%。结论 方法快速、简便、准确,可用于地黄质量控制,建议地黄苷 D 的含量应不低于 0.15%。

关键词:地黄;地黄苷 D; HPLC

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)09-0000-00

\* 收稿日期: 2002-10-27

基金项目:“九五”国家攻关课题 (No. 969030204); 国家中医药局青年基金课题 (95Y 3411, 95C018)

作者简介:李更生 (1962-)男,河南信阳市人,硕士,副研究员,1994年获北京医科大学硕士学位,主要从事天然药物化学、中药分析的研究,主持和参加多项国家局、省自然科学基金项目,获国家中医药管理局科技进步二等奖 1项,省科技进步二等奖 2项,省中医药科技进步一等奖 2项,发表学术论文 26篇。Tel 0371-6336574 E-mail lgshr@sohu.com