

决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

王文燕¹, 赵强², 张铁军^{1*}, 朱宏吉², 黎阳³

(1. 天津药物研究院, 天津 300193; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072; 3. 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要:目的 研究决明子药材的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱法建立了决明子药材的 HPLC 的指纹图谱, 收集了 32 批样品进行测定, 并使用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行了模式识别研究。结果 建立了决明子药材的指纹图谱。结论 方法可用于决明子质量控制及综合评价。

关键词:决明子; 指纹图谱; 主成分分析

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)10-1638-04

HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition of Semen Cassiae

WANG Wen-yan¹, ZHAO Qiang², ZHANG Tie-jun¹, ZHU Hong-ji², LI Yang³

(1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract : Objective To establish a method for the quality control of *Semen Cassiae*. **Methods** A high performance liquid chromatographic method was developed to establish the fingerprint of *Semen Cassiae*, and 32 samples from various batches of *Semen Cassiae* were analyzed. Cluster analysis and principal component analysis were applied to study HPLC fingerprint and chemical pattern recognition. **Results** The fingerprint of *Semen Cassiae* was set up. **Conclusion** The method could be used for the quality control and comprehensive evaluation of *Semen Cassiae*.

Key words : *Semen Cassiae*; fingerprint; principal component analysis (PCA)

决明子为豆科决明属植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *C. tora* L. 的成熟种子^[1]。目前, 多用大黄酚这单一成分作为决明子的质控指标, 但难于全面地控制决明子的内在质量, 不能对其真伪优劣做出判断^[1-5]。本实验通过采用 HPLC 方法建立决明子的指纹图谱, 并将聚类分析和相似度分析的数据分析技术应用于决明子的指纹图谱, 分析、比较不同产地的决明子药材指纹图谱, 对所得图谱进行分析、解析, 建立决明子指纹图谱的指标参数评判标准, 为全面控制决明子的质量提供了方法。

1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 996 型 PDA 检测器, 电热恒温水浴锅 (江苏省医疗器械厂), HS3120 超声波 (海卓康生物科技有限公司), METTLER TOLEDO PB303-N 电子天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

甲醇、乙腈色谱纯, 乙醇 (95%)、三氯甲烷、盐

酸、磷酸、甲酸、乙酸、无水乙醇、丙酮均为分析纯。大黄酚、大黄素、大黄素甲醚 (中国药品生物制品检定所)。所用决明子药材均为决明 *C. obtusifolia* L. 干燥种子, 见表 1, 药材均由天津药物研究院张铁军研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Suntek Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长为 254 nm; 柱温: 25 °C。体积流量: 1.0 mL/min; 流动相: 甲醇-0.1% 磷酸; 梯度洗脱: 0 ~ 20 min, 61% A; 20 ~ 25 min, 61% ~ 70% A; 25 ~ 45 min, 70% ~ 85% A; 45 ~ 55 min, 85% A; 55 ~ 60 min, 85% ~ 100% A; 60 ~ 65 min, 100% A。进样量: 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备: 称取大黄酚对照品适量, 置于 50 mL 量瓶中, 用无水乙醇-醋酸乙酯 (2:1) 溶解, 稀释至刻度。摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 备用。同法制得大黄素、大黄素甲醚对照品溶液。

* 收稿日期: 2008-12-15
基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAI06A01-02)
* 通讯作者 张铁军

表 1 决明子药材产地及来源

Table 1 Origin and source of Semen Cassiae

批号	来源	批号	来源
J1	河北安国	J17	天津源盈药店
J2	河北安国	J18	天津协和药店
J3	达仁堂药业	J19	天津华丰药店
J4	天津协和鞍山道店	J20	天津世纪三潭药店
J5	天津华丰药店	J21	天津本草堂
J6	天津协和万德庄店	J22	天津胜利药店
J7	丽江	J23	河南安阳
J8	天津源盈药店	J24	河北邢台
J9	天津汇仁堂药店	J25	江苏
J10	天津杏春州药店	J26	河北怀鹿
J11	天津平湖药店	J27	河北平安
J12	天津和平药店	J28	赞皇
J13	天津桐君阁药店	J29	山东菏泽
J14	吉林	J30	山东
J15	天津福瑞祥药店	J31	洛阳
J16	天津华济堂药店	J32	石家庄

2.3 供试品溶液的制备:精密称取决明子药材粉末 0.5 g,置于圆底烧瓶中,加甲醇 50 mL,称定质量。置水浴上加热回流 30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足,摇匀滤过。精密量取续滤液 25 mL,蒸干,加入 10% 盐酸溶液 30 mL 置水浴上水解 1 h,立即冷却。用三氯甲烷萃取 4 次,每次 30 mL,合并三氯甲烷液,回收溶剂,挥干。残渣用无水乙醇-醋酸乙酯(2:1)溶解,转移至 10 mL 量瓶中定容。摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜,备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取同一批供试品溶液,连续进样 5 次,各色谱峰的相对保留时间和单峰面积大于或等于 5% 的色谱峰的比值基本一致(RSD 在 3.0% 以下),符合指纹图谱的要求。

2.4.2 稳定性试验:取同一批号的供试品溶液,分别在 0、6、9、12、24 h 进样,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均不大于 2.98%,符合指纹图谱的要求(不大于 3%)。

2.4.3 重现性试验:取同一批号的供试品溶液 5 份,进行测定,各共有峰的相对保留时间和单峰面积占总峰面积大于或等于 5% 的色谱峰面积比值基本一致(RSD 在 3.0% 以下),符合指纹图谱要求。

2.5 样品测定:测定不同批次和产地决明子样品,共获得 10 个色谱峰。其中 7 号峰为大黄素(42.5 min 出峰),8 号峰为大黄酚(47.5 min 出峰),9 号峰为大黄素甲醚(55.7 min 出峰)。确定 8 号峰大黄酚为决明子主要指标成分,将其作为内参比峰(代表性色谱图见图 1)。各色谱峰对内参比峰的相对保留时间定性,计算各色谱峰相对于其内参比峰的峰

面积比。若某一指纹图谱在某相对保留时间处无峰,相对峰面积为零,仍给相应的编号,以保证各色谱指纹图谱都有相同的色谱峰数。

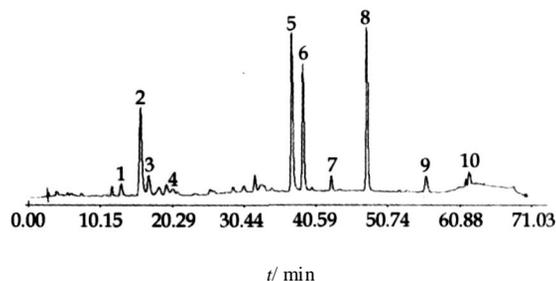


图 1 决明子液相色谱图及主要特征峰

Fig 1 HPLC Chromatogram and main characteristic peaks of Semen Cassiae

2.6 相似度评价:利用 2004A 版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》计算软件,对 32 批样品进行相似度评价,以 J32 批决明子药材色谱图作为参照图谱,利用中位数法进行多点校正生成对照图谱,计算决明子药材的相似度。由相似度评价结果可以看出,各批决明子药材与对照指纹图谱间的相似度为 0.994 ~ 0.814,大部分样品相似度较高,但仍不能直接建立决明子药材指纹图谱的共有模式。需对决明子各药材进行进一步的评价样品间差异,进行图谱模式识别分类,以便最终能够建立真实可靠的决明子药材标准指纹图谱。

2.7 主成分分析:各决明子样本经过上述实验方法获得各自的色谱数据,通过色谱工作站将图谱进行积分后以保留时间和色谱峰面积作为数据的信息,一个样本的数据为一个数据向量生成样本数据,32 个样本数据组成样本指纹数据矩阵。对数据矩阵进行主成分分析(PCA)后,分别以其第一、第二主成分建立坐标系,进行投影即可得到所有样本的 PCA 平面投影图,样本间内在的相互关系即可较好地表现出来进而实现样本之间的分类。决明子数据进行的 PCA 平面投影分析见图 2。

2.8 系统聚类分析:使用了欧氏距离这一化学计量方法,分别对决明子色谱数据进行聚类分析(图 3)。PCA 投影中所组织数据集对其进行系统聚类分析,采用类内平均锁链法(average linkage)、欧氏距离法作为样品的测度。

2.9 决明子药材标准指纹图谱的建立:经上述分析,参考主成分分析和系统聚类分析结果,取其中 10 批投影距离最近的决明子药材建立决明子药材的标准指纹图谱,10 批决明子批号为:J7、J13、J15、J18、J23、J26、J29、J30、J31、J32。

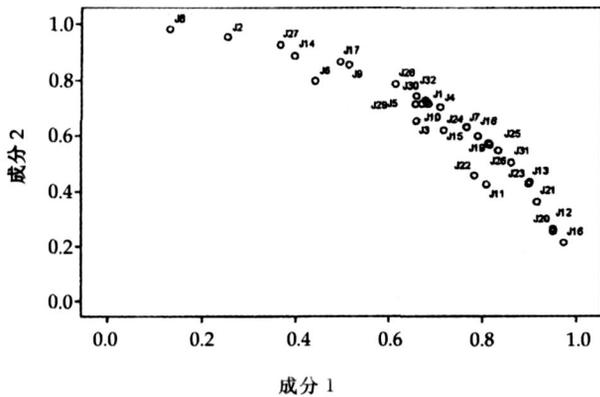


图 2 样品主成分得分图

Fig. 2 PCA Score figure of samples

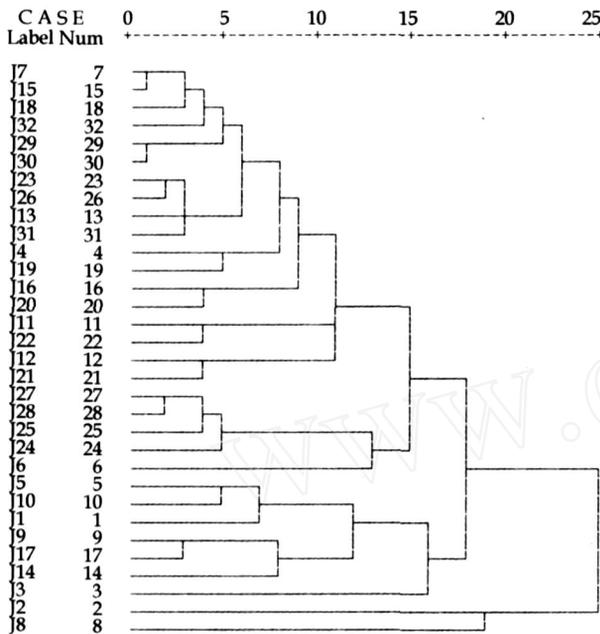


图 3 决明子药材聚类分析

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of Semen Cassiae

将上述 10 批样品数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版), 经选峰, 设定 J7 批决明子药材色谱图作为参照图谱匹配模板, 将谱峰自动匹配; 然后设定标准模板, 利用中位数法进行多点校正生成对照图谱 (图 4), 进行谱峰差异性评价和整体相似性评价, 得出决明子指纹图谱的共有模式见图 5, 相似度计算结果见表 2。

相似度计算结果表明, 10 批样品均在 0.980 以上, 符合国家药典委员会的要求。可为决明子药材的品质评价、质量标准的制定提供科学依据。

3 讨论

3.1 流动相的选定: 经比较, 甲醇和 0.1% 磷酸水溶液一起组成流动相进行梯度洗脱分离效果较好, 能较好地使样品中各色谱峰分离且出峰最多。试验后得到的最合适梯度下全部物质在 70 min 内被洗

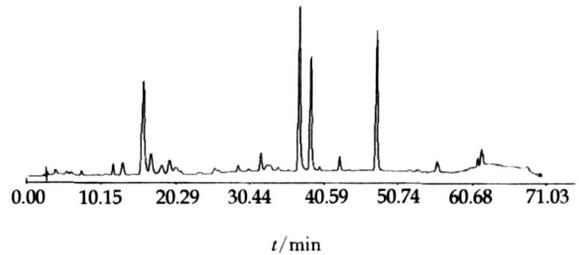


图 4 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 4 Compared fingerprints by HPLC

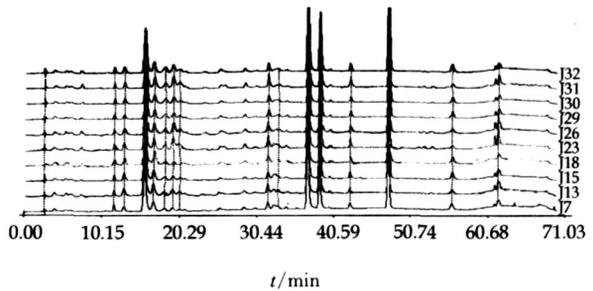


图 5 10 批样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 5 HPLC Fingerprints for ten batches of samples

表 2 10 批样品相似度评价结果

Table 2 Similarities for ten batches of samples

批号	参照图谱	对照图谱	批号	参照图谱	对照图谱
J7	1.000	0.996	J26	0.986	0.996
J13	0.981	0.988	J29	0.991	0.992
J15	0.999	0.998	J30	0.991	0.992
J18	0.998	0.997	J31	0.976	0.990
J23	0.974	0.986	J32	0.991	0.991

脱完毕, 检测出 10 种主要物质色谱峰, 其中大黄素 42.5 min 出峰, 大黄酚 47.5 min 出峰, 大黄素甲醚 55.7 min 出峰, 芦荟大黄素、大黄酸未被检出。各物质分离良好, 并且在图谱中分布较均匀。

3.2 检测波长的选择: 取供试品溶液, 进样 5 μ L, 进行 200 ~ 400 nm 的全波长扫描, 并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明, 检测波长过低, 产生紫外末端吸收, 检测波长过高, 不能有效检出色谱峰, 在 254 nm 下, 各峰分离良好, 特征峰明显且峰型较好, 从图谱中可以尽可能地获取色谱组分信息以反映体系组成的全貌, 因此选定 254 nm 为指纹图谱测定波长。

3.3 聚类分析与主成分分析: 应用了 PCA 投影法和系统聚类分析法两种化学计量学方法对决明子色谱积分数据进行了模式识别的初探。从整体分类效果上来看, PCA 投影法更为直观, 能一目了然地看出各个决明子药材分类样本之间的聚类关系。决明子色谱数据的 PCA 投影没有十分明显的区分, 各样品分布均匀, 不能明确地分类, 说明各决明子之间既存在明显的差异又存在一定程度的相关性。在

PCA 投影分析中,以数据所做的投影图基本没有达到分类的效果,并且 PCA 投影图也未能全面体现出决明子样本之间内在的联系。采用聚类分析方法,结果表明决明子样品确实存在差异,但分类并不明显。

参考文献:

[1] 中国药典[S].一部.2005.

- [2] 王清华,纪玲,丛保忠.高效液相色谱法测定决明子中大黄酚的含量[J].中医药学报,1996,20(5):48-49.
- [3] 冯晓冰.决明子药材中大黄酚含量的反向 HPLC 法测定[J].分析测试学报,1999,18(4):80.
- [4] 裴妙荣,贾宏伟,王世民.生、炒决明子蒽醌含量比较[J].中国中药杂志,1990,15(8):29.
- [5] 张启伟,阴健,张俊.生、炒决明子及其煎剂中部分活性成分的比较[J].中草药,1996,27(2):79-81.

不同产地巴戟天中糖类成分 HPLC-ELSD 指纹图谱研究

刘晓涵,陈永刚,林励*,肖凤霞,刘征,赵红英

(广州中医药大学中药学院,广东 广州 510006)

摘要:目的 建立巴戟天中糖类化学成分 HPLC 指纹图谱的分析方法,研究不同产地的巴戟天药材的质量。方法 采用 HPLC 法。色谱柱为 Inertsil NH₂ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水梯度洗脱;柱温:室温;体积流量:1.2 mL/min,以蒸发光散射检测器(ELSD)检测,检测条件:漂移管温度 100 °C;N₂ 气流速度 2.2 L/min;He 在线脱气,气流速度 20 mL/min。使用计算机辅助相似度评价软件进行数据处理。对不同产地的巴戟天药材指纹图谱的相似度进行比较分析。结果 除两批外,其余 8 批巴戟天与系统生成对照指纹图谱的相似度均在 0.94 以上,归纳出巴戟天 13 个共有峰。通过与对照品的保留时间比较,1、2 号峰分别为 D-果糖、蔗糖。不同产地巴戟天药材中糖类化合物化学组成相似,但相对比例有明显的差异。结论 所用方法稳定、重现性好,可突出巴戟天药材的内在质量特征,为更好地控制巴戟天的内在质量提供了科学依据。

关键词:巴戟天;糖类成分;指纹图谱;HPLC-ELSD

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)10-1641-03

HPLC-ELSD Fingerprint of carbohydrate constituents in *Morinda officinalis* from different habitats

LIU Xiao-han, CHEN Yong-gang, LIN Li, XIAO Feng-xia, LIU Zheng, ZHAO Hong-ying

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: **Objective** To establish HPLC fingerprint analysis method of carbohydrate constituents in *Morinda officinalis* collected from different habitats. **Methods** HPLC Method was employed and a Columns Inertsil NH₂ (250 mm ×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-water as mobile phase by gradient elution was used, the flow rate was 1.2 mL/min, column temperature was room temperature. Detector was ELSD and the temperature of drift tube was 100 °C. The flow rate of N₂ was 2.2 L/min, Helium degasification on-line with flow rate was 20 mL/min. The fingerprints evaluating software by computer-assisted for the similarity was used to process the experiment data and compare the similarity of HPLC fingerprint of *M. officinalis* from different habitats. **Results** Except for two batches, the fingerprint similarity value of other eight batches of herbs was above 0.94 compared with system generation spectrum and 13 common characteristic peaks were demonstrated. The first and second peaks were D-fructose and sucrose, respectively compared with the retention time of standard sample. The results showed that the carbohydrate constituents of *M. officinalis* were similar among herbs from different habitats, but their relative ratios are significantly different. **Conclusion** The method in this experiment is stable and reproducible, which could

* 收稿日期:2008-12-12

作者简介:刘晓涵(1982—),女,湖南省永州市人,广州中医药大学博士生,研究方向为中药资源开发利用与新药研究。

Tel:(020)39356148 E-mail:liuxia98@163.com

*通讯作者 林励 Tel:(020)39358270 E-mail:lwyll@gzhtcm.edu.cn