

- 北植物学报, 2006, 26(10): 2011-2017.
- [8] 孙伟, 李敬, 马淑坤. 东北地区栽种黄独技术要点[J]. 特种经济动植物, 2007, 4: 41.
- [9] Narula A, Kumar S, Srivastava P S. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(4): 250-254.
- [10] Chu E P, de C'assia R, Ribeiro L F. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2002, 70(3): 241-249.
- [11] 吴志明, 时星, 谢晓亮, 等. 河北省马铃薯Y病毒株系分子鉴定及其RT-PCR检测[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(3): 54-59.
- [12] 张志良主编. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [13] 柏新富, 蒋小满, 毕可华, 等. 芋脱毒苗的组培快繁及田间试验[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(1): 52-55.
- [14] 洪森荣, 尹明华, 赵美娜. 黄独带芽茎段增殖和生根的初步研究[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1556-1560.
- [15] 洪森荣, 尹明华, 邵兴华. 野葛高频植株再生体系相关因子的优化[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(1): 29-32.
- [16] 廖飞雄, 潘瑞炽, 何晓明. 菜薹茎尖培养中的激素与热激调控[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 224-226.
- [17] Chenevard D, Jay-Allemand C, Gendraud M, et al. The effect of sucrose on the development of hybrid walnut microcuttings (*Juglans nigra* × *Juglans regia*). Consequences on their survival during acclimatization [J]. *Ann Sci For*, 1995, 52: 147-156.
- [18] 贾洪涛, 党金鼎, 刘风莲. 植物生长延缓剂多效唑的生理作用机理及应用[J]. 安徽农业科学, 2003, 31: 323-324.
- [19] 李明军, 张嘉宝, 张海波. 怀山药零余子愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20: 772-777.
- [20] 邱运亮. PP<sub>333</sub>对八仙花试管快繁的影响研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 56-58.
- [21] 王慧娟, 孟月娥, 赵秀山, 等. 樱花组培苗的移栽技术研究[J]. 河南农业科学, 2006, 11: 99-101.
- [22] 何欢乐, 阳静, 蔡润, 等. 草莓茎尖培养快繁体研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2003, 21(增刊): 61-65.

## 川芎药材的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

王文燕<sup>1</sup>, 赵强<sup>2</sup>, 张铁军<sup>1</sup>, 朱宏吉<sup>2</sup>, 黎阳<sup>3</sup>

(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 研究川芎药材的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱建立了川芎药材的 HPLC 的指纹图谱, 收集了不同批次的 23 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 建立川芎药材的指纹图谱。结论 该方法可用于川芎质量控制及综合评价。

**关键词:** 川芎药材; 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)12-1980-05

### HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition method of *Rhizoma Chuanxiong*

WANG Wen-yan<sup>1</sup>, ZHAO Qiang<sup>2</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>1</sup>, ZHU Hong-ji<sup>2</sup>, LI Yang<sup>3</sup>

(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 quality control of *Rhizoma Chuanxiong*. **Methods** A high performance liquid chromatographic method was developed to establish the fingerprint of *Rhizoma Chuanxiong*, and 23 samples from various batches were analyzed. Cluster analysis and principal component analysis were applied to studying HPLC fingerprint and chemical pattern recognition. **Results** The fingerprint of *Rhizoma Chuanxiong* was set up. **Conclusion** The method provides an academic reference for controlling the quality of *Rhizoma Chuanxiong*.

**Key words:** *Rhizoma Chuanxiong*; fingerprint; principal component analysis

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎<sup>[1]</sup>。具有活血化瘀、理气定痛、养心安神之功效。目前, 多用盐酸川芎嗪这单一成分作为川芎的质控指标, 难于全面地控制川芎的内在

质量, 不能对其真伪优劣做出判断<sup>[1~5]</sup>。通过 HPLC 方法建立药材的指纹图谱, 并将聚类分析和相似度分析的数据分析技术应用于药材的指纹图谱已有少量报道<sup>[6,7]</sup>, 本实验通过此法分析、比较不同

产地的川芎药材指纹图谱,对所得图谱进行分析、解析,建立川芎指纹图谱的指标参数评判标准,为全面控制川芎的质量提供了方法。

1 实验仪器与材料

2695 高效液相色谱仪 Waters, 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、乙腈为色谱纯,乙醇(95%)、三氯甲烷、盐酸、磷酸、甲酸、醋酸、无水乙醇、丙酮均为分析纯。藁本内酯(实验室自制,质量分数大于 98%)、阿魏酸(中国药品生物制品检定所)。所用决明子药材见表 1(药材鉴定人为天津药物研究院张铁军研究员)。

表 1 川芎药材产地及来源

Table 1 Origins and sources of Rhizoma Chuanxiong

| 批号  | 产地 | 来源     | 状态  | 批号  | 产地 | 来源      | 状态 |
|-----|----|--------|-----|-----|----|---------|----|
| C1  | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C13 | 四川 | 天津汇仁堂药店 | 饮片 |
| C2  | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C14 | 四川 | 四川      | 饮片 |
| C3  | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C15 | 四川 | 天津协和药店  | 饮片 |
| C4  | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C16 | 四川 | 天津杏春州药店 | 饮片 |
| C5  | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C17 | 四川 | 天津平潮药店  | 饮片 |
| C6  | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C18 | 四川 | 天津和平药店  | 饮片 |
| C7  | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C19 | 四川 | 天津桐君阁药店 | 饮片 |
| C8  | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C20 | 四川 | 吉林      | 饮片 |
| C9  | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C21 | 四川 | 天津福瑞祥药店 | 饮片 |
| C10 | 四川 | 达仁堂制药厂 | 原药材 | C22 | 四川 | 天津敬一堂药店 | 饮片 |
| C11 | 四川 | 天津源盈药店 | 饮片  | C23 | 四川 | 天津华丰药店  | 饮片 |
| C12 | 云南 | 丽江     | 饮片  |     |    |         |    |

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 suntik C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长:270 nm;柱温:35 ℃;体积流量:0.8 mL/min;流动相 A:甲醇,B:0.1% 磷酸;洗脱梯度:0~10 min,15%~30% A,10~20 min,30%~50% A,20~40 min,50%~70% A,40~45 min,70% A,45~55 min,70%~100% A,50~

60 min,100% A;进样量:5 μL。

2.2 对照品溶液的制备:取阿魏酸对照品适量,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,超声 20 min,冷却后补足体积,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,得到阿魏酸对照品溶液。相同方法制得藁本内酯对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:将川芎药材粉碎过 40 目筛,精密称取川芎粉末 2 g,加入 50% 乙醇 40 mL 置圆底烧瓶中,回流提取 2 h,滤过,旋转蒸发回收溶剂,残渣用甲醇溶解至 10 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验:取供试品溶液,连续进样 5 次,考察结果显示各色谱峰的相对保留时间及峰面积的比值基本没有明显变化,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 值均小于 3%,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、3、6、9、12、24 h 进样,考察结果显示各色谱峰的相对保留时间及峰面积的比值基本没有明显变化,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3%,符合指纹图谱的要求。

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,考察结果显示各色谱峰的相对保留时间及峰面积的比值基本没有明显变化,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 值均小于 3%,符合指纹图谱要求。

2.5 样品测定:实验测定了不同产地和不同批次川芎样品,详细比较多次样品的液相色谱图,确定了 10 个主要的色谱特征峰,构成川芎的指纹图谱。其中 5 号峰阿魏酸为川芎主要指标成分,将其作为内参比峰,10 号峰为藁本内酯(代表性色谱图见图 1)。

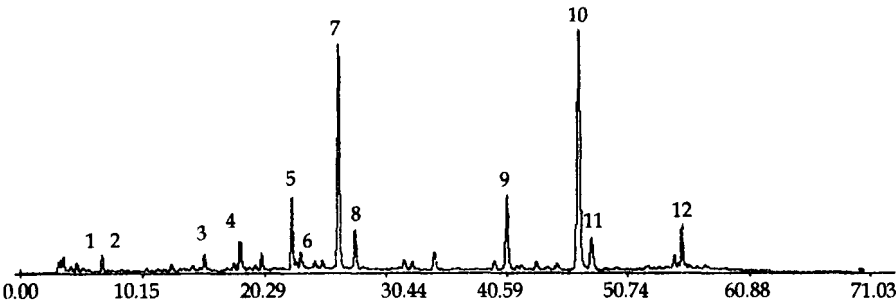


图 1 川芎液相色谱图及主要特征峰

Fig. 1 HPLC Chromatogram and main characteristic peaks of Rhizoma Chuanxiong

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,对上述 23 批样品进行相似度评价,以 C1 批川芎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 R,计算川芎药材的相似度。由相似度评价结果可以看出,川芎药材相似度都在 0.900 以上可直接建立川芎药材指纹图谱共有模式。为对川芎各药材进一步评价样品间差异,进行图谱模式识别分类,以便建立更加真实可靠的川芎药材标准指纹图谱。

2.7 主成分分析:各川芎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,一个川芎样本的数据为一个数据向量生成样本数据,23 个样本数据组成川芎样本指纹数据矩阵。图 2 是川芎数据进行的 PCA 平面投影分类图。

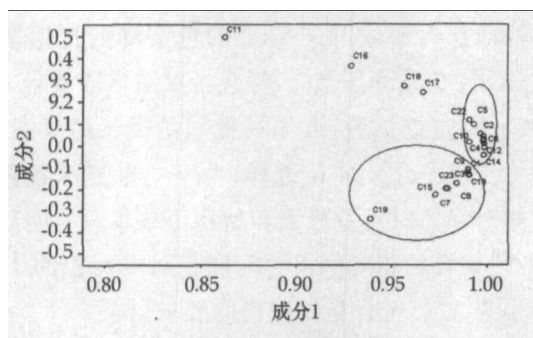


图 2 样品主成分得分图

Fig. 2 Principal component analysis of Chuanxiong samples

2.8 系统聚类分析:在 PCA 投影分析中,以色谱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川芎样本之间内在的联系。为了进一步解决上述问题,尝试使用了欧氏距离这一化学计量学方法,分别对川芎色谱数据

进行聚类分析。进行系统聚类分析,采用类内平均锁链法 (Average Linkage), 欧氏距离平方 (Cosine) 法作为样品的测度。进行欧氏距离计算,计算所有 23 个川芎样本间的欧氏距离,经过优化最终得到如图 3 所示的聚类分析结果。

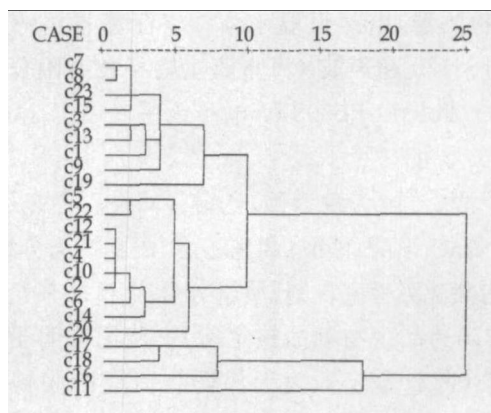


图 3 川芎样品聚类分析

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of Chuanxiong samples

2.9 川芎药材标准指纹图谱的建立:为全面地对川芎药材质量进行评价,由上述实验分析结果选取达仁堂提供的 C1~C10 10 批川芎药材样品进行相似度评价建立川芎标准指纹图谱(见图 4)。将数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版),经选峰,设定 C1 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 R,进行谱峰差异性评价和整体相似性评价,得出川芎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,符合国家药典委的要求,可为川芎药材的品质评价、质量标准的制定提供科学依据。

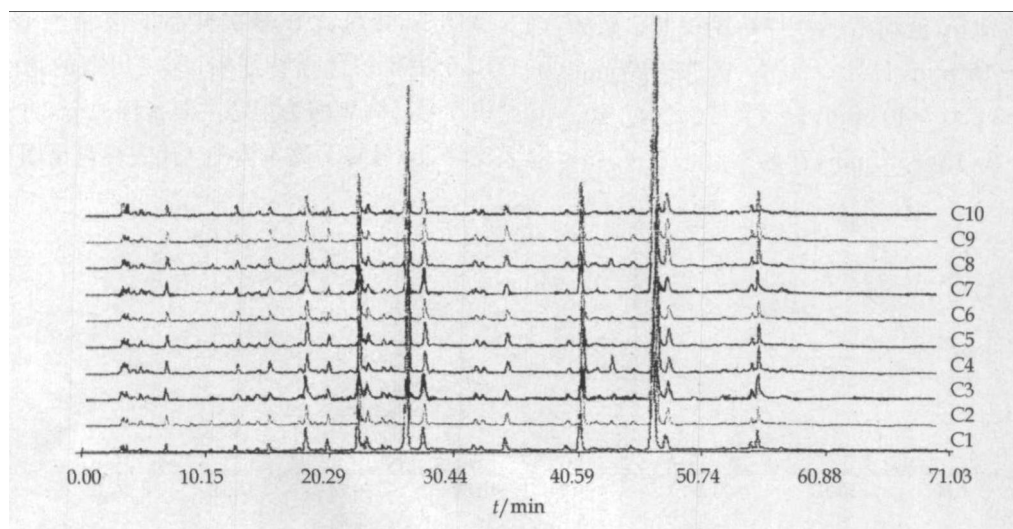


图 4 10 批样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 4 HPLC Fingerprints for ten batches of samples

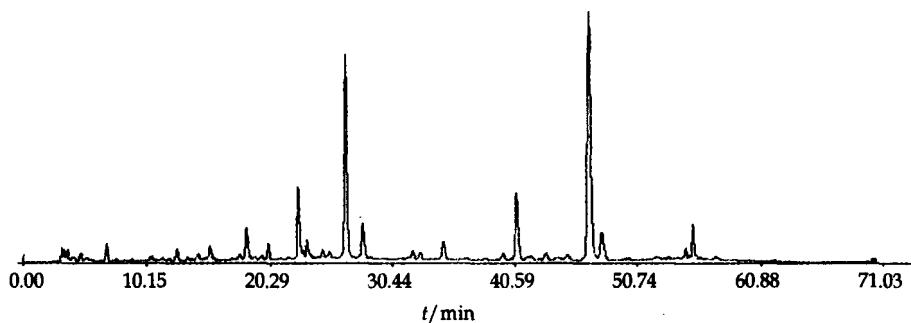


图 5 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 5 Compared fingerprints by HPLC

表 2 10 批样品相似度评价结果

Table 2 Similarities for ten batches of samples

| 批号 | 相似度   |       | 批号  | 相似度   |       |
|----|-------|-------|-----|-------|-------|
|    | 参照图谱  | 对照图谱  |     | 参照图谱  | 对照图谱  |
| C1 | 1.000 | 0.992 | C6  | 0.992 | 0.999 |
| C2 | 0.986 | 0.998 | C7  | 0.992 | 0.982 |
| C3 | 0.994 | 0.989 | C8  | 0.993 | 0.983 |
| C4 | 0.990 | 0.999 | C9  | 0.990 | 0.993 |
| C5 | 0.983 | 0.996 | C10 | 0.989 | 0.999 |

3 讨论

3.1 流动相的选定:最合适梯度下全部物质在 65 min 内被洗脱完毕,盐酸川芎嗪未检出,阿魏酸在 22.6 min 出峰,检测出 12 种主要物质,各物质分离良好,基线平稳并且各色谱峰在图谱中分布均匀。

3.2 检测波长的选择:取供试品溶液,进样 5  $\mu$ L,进行 200~400 nm 的全波长扫描,并各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,在吸收波长小于 240 nm,会产生紫外末端吸收,在 270 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 230 nm 为指纹图谱测定波长。

3.3 色谱柱的选择:其他条件同 3 根色谱柱,相比较 3 根色谱保留时间一致,但 Dikma C<sub>18</sub>(200 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 较 suntik C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Accurasil suntik C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 色谱柱出峰少,分离度低,故考虑使用后两者,本实验使用的色谱柱为 suntik C<sub>18</sub>(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m)。

3.4 供试品溶液制备:相同提取溶剂下条件回流提取方式较超声提取方式提取效果更完全。对水、

50% 乙醇、95% 乙醇和甲醇回流提取结果进行比较,发现各提取容积之间 50% 乙醇出峰峰数较其他各方法多,故采用 50% 乙醇作为提取溶剂进行回流提取 2 h。

3.5 聚类分析与主成分分析:对数据矩阵进行主成分分析(PCA)后,分别以其第一、第二、第三主成分建立坐标系,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。图 2 是川芎数据进行的 PCA 平面投影分类图。图中可以看出对川芎色谱数据的 PCA 投影没有明显的区分,除个别样品距离较远,如 C11,其他距离较集中。

由聚类分析的分类树状图可以看出所分析的 23 个川芎样本被分成三类,第一类:C1、C3、C7、C8、C9、C13、C14、C15、C19、C23,第二类:C2、C4、C5、C6、C10、C12、C20、C22、C21,第三类 C17、C18、C16、C11,其中 C12 川芎产于云南但与其他四川产川芎差异不明显。表明川芎药材内在质量相对一致,药材产区及炮制过程对其质量变化影响不显著。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. 一部. 2005.  
[2] 范永春, 杨光明, 潘 扬, 等. 川芎及其制剂质量控制的研究概况[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(9): 574-575.  
[3] 李秋怡, 干国平, 刘焱文. 川芎的化学成分及药理研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(7): 1298-1299.  
[4] 王文祥, 顾 明, 蒋小岗, 等. 川药化学成分的研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 4.  
[5] 肖永庆, 李 丽, 游晓琳, 等. 川芎化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(7): 519-522.  
[6] 王文燕, 赵 强, 张铁军, 等. 决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1638-1641.  
[7] 王文燕, 赵 强, 张铁军, 等. 白芍的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药, 2009, 40(11): 1810-1814.