

草珊瑚的 HPLC 指纹图谱研究

陈根顺^{1,3}, 徐丽芳², 李 鹏³

1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330004

2. 江西中医学院附属医院, 江西 南昌 330004

3. 江西中医学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 建立草珊瑚的 HPLC 指纹图谱并对其进行化学模式识别。方法 采用 HPLC 法对 19 批草珊瑚药材进行指纹图谱构建, 运用指纹图谱参数共有峰、n 强峰和相似度进行分析, 并对图谱进行聚类分析和主成分分析。结果 建立了草珊瑚的 HPLC 指纹图谱, 得到了 13 个共有峰, 建立了 8 强峰, 相似度在 0.82~0.98, 19 批药材聚成 4 类。结论 草珊瑚的 HPLC 指纹图谱的构建和化学模式的识别为药材质量控制提供更全面的参考。

关键词: 草珊瑚; 指纹图谱; 化学模式识别; 聚类分析; HPLC

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0293-04

HPLC fingerprint for whole herb of *Sarcandra glabra*

CHEN Gen-shun^{1,3}, XU Li-fang², LI Peng³

1. National Pharmaceutical Engineering Center for Manufacturing Solid Preparation of Chinese Materia Medica, Nanchang 330004, China

2. Affiliated Hospital, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Key words: whole herb of *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai; fingerprint; chemical pattern recognition; cluster analysis; HPLC

草珊瑚为金粟兰科草珊瑚属草珊瑚 *Sarcandra glabra*(Thunb.)Nakai 的干燥全草。本品性平, 味苦、辛; 归心、肝经。具有清热凉血, 活血消斑, 祛热通络的功效。用于治疗血热紫斑、紫癜, 风湿麻痹, 跌打损伤等症^[1]。草珊瑚中所含化学成分主要为香豆素类、倍半萜类、内酯类、黄酮类和有机酸类^[2]。近年来, HPLC 指纹图谱以其快速准确的特点被广泛应用于中药分析鉴定等方面^[3-4]。综合运用相似度评价、系统聚类 and 主成分分析等模式识别技术, 对草珊瑚药材水溶性成分进行 HPLC 指纹图谱研究, 为药材质量控制提供更全面的参考。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪四元梯度泵、在脱气机、柱温箱、VWD 检测器、ChemStation 控制系统)。异秦皮啉对照品 (批号 110837-200304); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为超纯水。

1.2 材料

本实验所用材料均采自江西、广西、重庆、广东、福建和浙江, 经笔者鉴定为金粟兰科药材草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的全草, 见表 1。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密称取草珊瑚 0.3 g, 水浴回流提取 3 次, 第 1 次加水 20 mL 回流 2 h, 第 2 次加水 20 mL 回流 1 h, 第 3 次加水 10 mL 回流 1 h, 滤过后合并滤液, 浓缩蒸干, 0.1%醋酸定容到 10 mL 量瓶, 过微孔滤膜后备用。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取异秦皮啉对照品适量, 配制成 0.01 mg/mL 的溶液, 避光保存, 作为对照品溶液。

2.3 色谱条件

采用色谱柱 Eclipse XD B-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.1%醋酸水(B),

收稿日期: 2010-04-15

作者简介: 陈根顺 (1951—), 男, 江西东乡人, 教授, 硕士研究生导师, 长期从事中药学的教学、科研工作, 研究方向为中药有效成分的研究与开发利用。Tel: (0791)7118743

表 1 19 批草珊瑚的相似度
Table. 1 Similarities of 19 batches of whole herb
of *S. glabra*

编号	采收地点	相似度	
		平均数	中位数
1	江西省新干县板埠村	0.890	0.889
2	江西省井冈山	0.872	0.934
3	江西省崇义县乐洞乡	0.894	0.921
4	江西省余都县盘古山镇	0.981	0.984
5	江西省宜丰县袁坑口	0.894	0.899
6	江西省宜丰县逍遥村	0.965	0.924
7	江西省抚州市茅排乡	0.938	0.960
8	广西省荔浦市	0.926	0.941
9	广西省南宁市老虎岭	0.909	0.821
10	广西省来宾市金绣县	0.981	0.968
11	重庆市缙云山杉木园	0.945	0.869
12	重庆市缙云山青龙寨	0.947	0.873
13	福州永泰县天门山天门桥	0.924	0.955
14	福州永泰县天门山飞石瀑布	0.928	0.948
15	福州北峰寿山瀑布	0.818	0.895
16	浙江龙泉	0.918	0.946
17	浙江庆元	0.865	0.932
18	浙江景宁	0.984	0.984
19	广州修正堂药业基地	0.876	0.880

从 18%A 线性梯度洗脱到 54.5%A, 运行时间为 60 min; 柱温 40 ℃; 检测波长为 340 nm。

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 6 次, 检测指纹图谱, 计算主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果表明各色谱峰相对保留时间的 RSD<0.2%, 相对峰面积的 RSD<1.7%, 符合指纹图谱的要求。

2.4.2 稳定性试验 取同一批供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 检测指纹图谱, 计算主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果表明各色谱峰的相对保留时间的 RSD<0.2%, 相对峰面积的 RSD<3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.3 重现性试验 取同一批供试品 6 份, 按“2.1”项下的制备方法, 分别制成供试品溶液进行分析, 检测指纹图谱, 计算主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果表明各色谱峰的相对保留时间的 RSD<0.2%, 相对峰面积的 RSD<4.0%,

表明分析方法重现性良好。

2.5 指纹图谱的构建和解析

2.5.1 共有峰的标记 对 19 批草珊瑚进行指纹图谱分析, 以异秦皮啶作为参考峰, 以峰的共有率大于 80% 为依据, 标定了 13 个共有峰, 分别是 1 号 (10.076 min)、2 号 (14.807 min)、3 号 (16.176 min)、4 号 (17.500 min)、5 号 (20.131 min)、6 号 (20.963 min)、7 号 (23.423 min)、8 号 (29.506 min)、9 号 (34.110 min)、10 号 (36.509 min)、11 号 (38.785 min)、12 号 (45.917 min) 和 13 号 (52.445 min), 8 号峰为异秦皮啶, 见图 1。19 批草珊瑚的 13 个共有峰相对保留时间的 RSD<2%, 相对峰面积的 RSD 在 3.4%~7.6%。

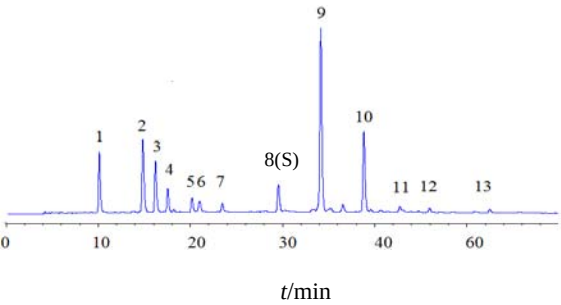


图 1 样品的 HPLC 色谱图 (S-异秦皮啶)

Fig. 1 HPLC chromatogram of sample (S-isofraxidin)

2.5.2 *n* 强峰标定 把 19 批药材的色谱图与生成的对照图谱进行比较, 发现 18 号药材与之相似度最高, 于是把 18 号药材作为标准药材。

通过峰面积的比较, 选取峰面积较大且稳定的图谱共有峰, 得到 8 个强峰, 分别为共有峰 1 号 (12.002 3%), 2 号 (15.617 7%), 3 号 (10.596 0%), 4 号 (1.707 1%), 5 号 (3.386 2%), 8 号 (4.179 6%), 9 号 (9.405 9%), 11 号 (26.252 8%), 其峰面积之和占总峰面积的 70% 以上。这 8 强峰都是共有峰, 可反映草珊瑚内在特征, 用来鉴别草珊瑚药材。

2.5.3 相似度计算 运用国家药典委员会制定的用于生成共有模式的《中药指纹图谱相似度计算软件 A 版》, 将 19 批次草珊瑚图谱数据导入, 生成对照图谱, 经多点校正, 及色谱峰匹配, 得出 19 批草珊瑚的相似度, 见表 1, 19 批草珊瑚的色谱图见图 2。

在相似度计算结果中, 平均数相似度和中位数相似度均在 0.820~0.984, 但在同一样品中这两者得出的值不完全一样, 如 12 号样品平均数相似度值

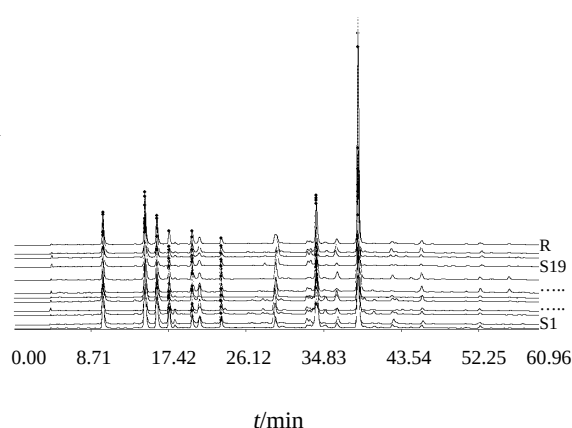


图 2 19 批草珊瑚的色谱图
Fig. 2 HPLC chromatogram of 19 batches of whole herb of *S. glabra*

为 0.947, 而中位数相似度值为 0.873, 说明这两种计算方法的侧重点不一样, 所以应综合考虑。选取两者结果均较高的 4、7、10 和 18 号样品, 结合色谱图观察, 这 4 批药材的绝对峰面积均较大, 暂且认为其质量较好。此外, 19 批药材的相似度都在 0.82 以上, 反映了药材在化学成分的组成上基本一样, 但在组分的量上存在一定的差异。

2.5.4 聚类分析 采用 SPSS 数据统计软件, 将 19 个样品的共有峰面积数据, 选用组间对比 (between-groups linkage) 进行聚类, 用余弦法 (cosine) 计算样品相似性程度, 聚类结果见图 3。从树状聚类图中看到, 19 个样品大体上聚为 2 类, 12, 11, 9 和 6 为一类, 其余为第二类。结合色谱图观察, 样品 11 号 (重庆杉木园)、12 号 (重庆青龙寨) 和 9 号 (广西金绣县) 药材的第 11 号峰是 19 批药材中最高, 其峰面积是其他色谱峰的 4~6 倍。同时, 12 号峰面积均较大, 因此聚为一类。结合中位数相似度来

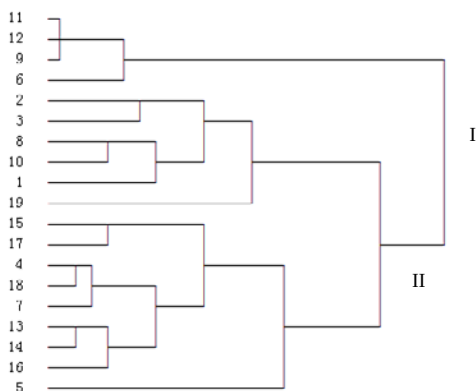


图 3 19 批草珊瑚药材的聚类分析图

Fig. 3 Dendrogram of 19 batches of whole herb of *S. glabra*

看, 9, 11 和 12 号样品的相似度为所有中最低, 也表明了他们与其他样品的差异。样品 6 号 (江西逍遥村) 色谱图中 11、12 号峰面积也较大, 1、2、3、4、5 号峰的变化和相对峰面积与 9、11 和 12 一致, 所以聚为一大类。但 7 号样品的 11 号和 12 号峰面积均与 6 号相似, 却没有聚为一类, 分析原因, 可能是 7 号样品中 1、2、3 号峰丰度较大, 4 号峰面积太小, 相对峰面积大不一样, 从而造成 7 号未与之聚为一类。其余样品第 11 号峰与其他色谱的丰度相差不是很大, 13 号峰面积较小, 所以聚为一大类。此外, 还可从聚类图中看出, 第一级聚类基本还是相同产地的药材聚为一类, 如 11 号和 12 号均为重庆的样品聚为一类, 2 号和 3 号均为江西赣州地区的样品, 13 号和 14 号均为福建福州的样品, 8 号和 10 号均为广西样品。同时, 一级聚类与样品间的相似度值是一致的。

2.5.5 样品主成分分析 (CPA) 把 19 批样品数据导入 SPSS 软件, 进行主成分分析, 分别取第 1 主成分, 第 2 主成分和第 3 主成分作图, 得投影图 4。根据投影图可见, 19 批样品分成四类, 9, 11, 12 和 6 为第一类, 7, 4, 1 和 2 为第二类, 10, 18 和 3 为第三类, 其余的为第四类。结合色谱图观察, 第一类样品中 11 号峰很大, 其余峰大小中等, 这与聚类结果一致。第二类样品中 1、2、3 号峰很大。第三类样品除 18 外, 1、2、3 号峰中等大小, 后面的峰与之差不多大小。第四类样品整体峰较小。此分类结果与聚类分析的结果有一定差异, 可能原因是聚类分析主要是以相对峰面积为主, 而主成分分析以绝对峰面积为主, 因此, 综合这两者的结果, 根据绝对峰面积和相对峰面积, 则可将这 19 批药材分为四类, 第一类为样品 9, 11, 12 和 6, 第二类

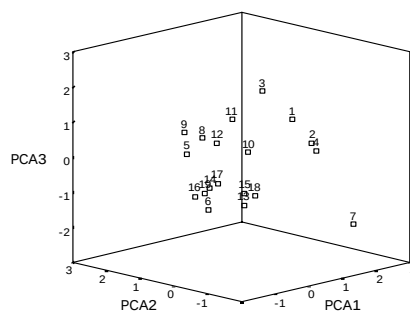


图 4 19 批草珊瑚药材主成分投影图

Fig. 4 Principal component projection for 19 batches of whole herb of *S. glabra*

为样品 1, 4, 2, 7 和 18, 第三类为样品 10 和 3, 第四类为样品 5, 8, 13, 14, 15, 16, 17 和 19。第一类和第二类是质量较好的, 第三类是质量中等的, 第四类是质量较差的。

3 小结与讨论

3.1 提取方法的考察

考察了回流法、超声提取法、索氏提取法和煎煮法, 结果发现: 煎煮法的可控性很差, 超声提取和索氏提取均没有水浴回流提取的收率高; 同时对提取溶剂甲醇、乙醇和水也进行了考察, 发现以水为提取溶剂的回流法收率最高。

3.2 色谱条件的优化

尝试多种流动相体系, 甲醇-水, 甲醇-醋酸水, 乙腈-水, 乙腈-磷酸水体系, 结果表明, 甲醇-0.1%醋酸水体系分离的效果较好。分析时采用梯度洗脱, A 相为甲醇, B 相为 0.1%醋酸水, 经比较洗脱条件, 最后确定程序为: 0~50 min 从 18% A 线形梯度洗脱至 54.5% A, 50~60 min 保持 54.5% A。每次运行之后平衡色谱柱 10 min。在此条件下, 各个色谱峰分离度较好, 保留时间适中。

本实验对 19 批草珊瑚进行了 HPLC 指纹图谱

构建和解析, 标定了 13 个共有峰, 建立 8 强峰, 这 8 强峰能代表 19 批草珊瑚中主要成分及其量; 计算了平均数相似度和中位数相似度, 发现两者结果不完全相同, 所以仅以单一相似度并不能完全对药材质量做出评价。对 19 批药材进行了系统聚类分析和主成分分析, 把这 19 批药材分为四类, 草珊瑚质量最佳的产地有重庆两地, 广西老虎岭和江西宜丰逍遙村, 其次是江西新干、盘古山、井冈山、茅排和浙江景宁, 再次是江西乐洞乡和广西金绣县, 其余的质量最次。本实验对草珊瑚的 HPLC 指纹图谱进行多方面的比较考察, 得到结果可靠, 可用于草珊瑚药材质量控制。

参考文献

- [3] 中国药典 [S]. 第一部. 2005.
- [4] 段营辉, 戴毅, 高昊, 等. 草珊瑚的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 29-32.
- [5] 覃洁萍, 冯旭, 邓家刚, 等. 杠果叶 HPLC 指纹图谱共有模式的建立及在近缘品种扁桃叶鉴别中的应用 [J]. 中草药, 2010, 41(9): 1543-1546.
- [6] 谢普, 毕开顺, 俞悦, 等. 泽泻的双波长 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1712-1715