

邓老凉茶颗粒的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

邓洁薇¹, 张翠仙², 李娜¹, 杨运云^{1*}

1. 中国广州分析测试中心 广东省分析测试技术公共实验室, 广东 广州 510070

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究邓老凉茶颗粒的质量控制方法。方法 采用 HPLC 法建立了邓老凉茶颗粒甲醇提取液的 HPLC 指纹图谱, 收集了不同批次的 11 批产品进行测定, 并使用主成分分析法对指纹图谱进行了模式识别研究。结果 11 批邓老凉茶颗粒指纹图谱相似度达到 0.95 以上; 经主成分分析, 16 个共有峰可综合为 3 个主成分, 其累积贡献率达 91.89%, 异绿原酸 B 的相对峰面积为邓老凉茶颗粒指纹图谱中影响最大的指标。结论 该方法稳定可靠, 可以有效地用于邓老凉茶颗粒的质量评价和质量控制。

关键词: 邓老凉茶颗粒; 指纹图谱; 主成分分析; 质量控制; 异绿原酸 B; HPLC

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2231-04

HPLC fingerprint and pattern recognition of Deng's Herbal Tea Granula

DENG Jie-wei¹, ZHANG Cui-xian², LI Na¹, YANG Yun-yun¹

1. Guangdong Provincial Public Laboratory of Analysis and Testing Technology, China National Analytical Center of Guangzhou, Guangzhou 510070, China

2. School of Chinese Meteria Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To establish a method for the quality control of Deng's Herbal Tea Granula. **Methods** An HPLC method was developed to establish the fingerprint of Deng's Herbal Tea Granula methanol extract and 11 samples from various batches were analyzed. Furthermore, principal component analysis (PCA) was used to investigate pattern recognition. **Results** The similarity among 11 batches of samples was no less than 0.95. The PCA showed that 16 common peaks were integrated into three principal components and their accumulation contributing rate amounted to 91.89%. The relative peak area of isochlorogenic acid B was the most effective index in fingerprint of Deng's Herbal Tea Granula. **Conclusion** This method is available for the quality evaluation and quality control of Deng's Herbal Tea Granula.

Key words: Deng's Herbal Tea Granula; fingerprint; principal component analysis (PCA); quality control; isochlorogenic acid B; HPLC

广东凉茶是岭南人民根据本地的气候和水土特性, 在长期预防疾病与保健过程中以中医养生理论为指导, 以中药为基础, 研制总结出来的具有清热解毒、生津止渴等功效的一类植物饮料^[1-2]。邓老凉茶是著名的广东凉茶之一, 由金银花、菊花、白茅根、桑叶、蒲公英和甘草 6 味药材组成, 具有清热解毒、凉血排毒等功效。2006 年国务院批准凉茶为国家级非物质文化遗产^[1], 凉茶产业迅速发展, 并开始走向国际化。随着凉茶走向国际化市场, 建立统一的质量标准势在必行。凉茶大多以大组方的形

式组成, 要确保其统一的质量标准, 必须借助于现代分析技术。指纹图谱是目前中药或中药制剂质量控制的有效手段^[3-9], 高效液相色谱法 (HPLC) 是目前最为成熟的指纹图谱技术。本实验对邓老凉茶颗粒的指纹图谱进行了研究, 建立了邓老凉茶颗粒甲醇提取液的 HPLC 指纹图谱, 同时结合主成分分析, 为广东凉茶质量标准的建立提供了技术依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱系统, 配备自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、ChemStation 色谱

收稿日期: 2011-03-30

基金项目: 广东省科技计划重点项目 (2010A030100013)

作者简介: 邓洁薇 (1984—), 女, 广东广州人, 研究实习员, 主要从事中药与天然药物的分析研究。

Tel: (020)37656885-823 13760626933 E-mail: jwdeng@126.com

*通讯作者 杨运云 Tel: (020)37656885-823 Fax: (020)87686511 E-mail: james_yyy@163.com

工作站。甲醇和乙腈均为色谱纯(美国 Burdick & Jackson 公司),实验用水为超纯水,由超纯水设备(美国 Milipore 公司)制备;磷酸(分析纯,广州化学试剂厂);绿原酸(ps08072303)、异绿原酸 B(ps08103102)对照品(成都普思生物科技有限公司,质量分数>98%);邓老凉茶颗粒(批号 D10909、D11002、D11009、D11011、D11013、D11014、D21006、D21007、D21008、D21009、D21010,分别编号 S1~S11)购自广州养和医药科技有限公司,其中样品 S10(批号 D21009)用于方法学考察。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm);流动相为 0.5%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~3 min, 5% B; 3~9 min, 5%~20% B; 9~13 min, 20% B; 13~20 min, 20%~95% B;体积流量 0.5 mL/min;进样量 1.0 μL;柱温 25 °C;检测波长 254 nm。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 绿原酸对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品 5.06 mg, 甲醇溶解后转移至 25 mL 棕色量瓶中, 甲醇定容, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.2.2 异绿原酸 B 对照品溶液的制备 精密称取异绿原酸 B 对照品 5.28 mg, 甲醇溶解后转移至 25 mL 棕色量瓶中, 甲醇定容, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 分别吸取 1.00 mL 绿原酸和异绿原酸 B 对照品溶液, 组成混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取邓老凉茶颗粒 5.00 g, 用滤纸包好, 置索氏提取器中, 加入甲醇 150 mL, 索氏提取 1.5 h, 提取液旋转蒸馏浓缩至 10 mL, 转移至 25 mL 量瓶中, 甲醇定容, 过 0.45 μm 滤膜, 作为供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适应性试验 取样品 S10 的供试品溶液, 连续进样 5 次, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性, 结果显示各共有峰相对保留时间的 RSD 值在 0.03%~0.79%, 相对峰面积的 RSD 值在 0.61%~2.67%, 均小于 5%, 表明仪器分析精密度良好, 分析结果有保障。

2.4.2 重现性试验 取同一批号样品(S10) 6 份, 分别配制供试品溶液进行测定, 平行 6 份, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的重复性, 结

果显示相对保留时间的 RSD 值在 0.03%~0.40%, 相对峰面积的 RSD 值在 1.95%~4.24%, 二者均小于 5%, 表明该方法的重现性良好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批号样品(S10) 的供试品溶液, 分别在 0、3、6、9、12、24 h 进样, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的一致性, 结果显示相对保留时间的 RSD 值在 0.06%~0.96%, 相对峰面积的 RSD 值在 1.27%~3.74%, 二者均小于 5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 HPLC 指纹图谱分析

取不同批次的 11 批样品分别制备供试品溶液, 测定, 确定 16 个主要色谱峰为共有峰。用《中药色谱图的指纹图谱评价系统》软件(2004 A) 进行色谱峰的匹配, 对照品色谱图见图 1, 以绿原酸(S) 为参照物的标准指纹图谱见图 2, 11 批样品的叠加图见图 3, 其中 R 为生成的对照图谱。以批号为 S1 的样品图谱为参照图谱, 采用均值法进行多点校正生成 11 批邓老凉茶颗粒的对照指纹图谱, 计算邓老凉茶颗粒的相似度。与对照指纹图谱比较, 11 批邓老凉茶颗粒的相似度分别为 0.978、0.979、0.992、0.988、0.981、0.986、0.990、0.971、0.971、0.986、0.991。相似度评价结果显示, 11 批邓老凉茶颗粒指纹图谱相似度均大于 0.95, 说明工艺稳定, 用该方法对邓老凉茶颗粒进行质量控制较可靠。

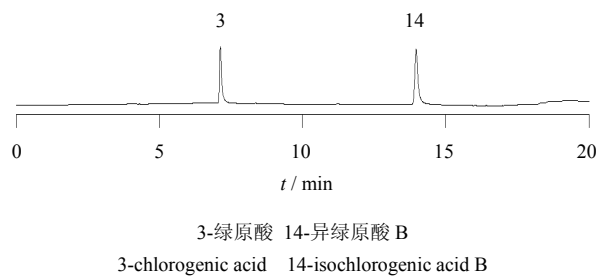


图 1 对照品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substances

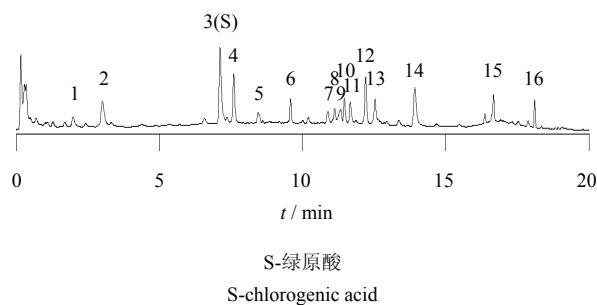


图 2 邓老凉茶颗粒的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of Deng's Herbal Tea Granula

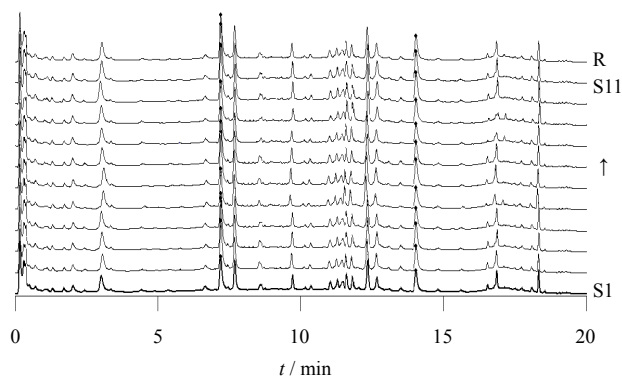


图 3 11 批样品 HPLC 色谱叠加图
Fig. 3 HPLC chromatographic overlap of 11 batches of samples

2.6 主成分分析

主成分分析是利用降维的思想，在损失很少信息的前提下把多个指标转化为几个综合指标的多元统计方法^[10]。本实验采用 SPSS 13.0 统计分析软件对 11 个样本进行了主成分分析，即将它们投影至低维空间来看它们之间的细微差别。将 11×16 的原始数据矩阵经标准化处理，再对其进行运算，主成分个数提取原则为主成分对应的特征值大于 1 的前 *m* 个主成分。从方差贡献率来看， $\lambda_1=9.271$ ，贡献率为 57.94%，贡献率最大，包含的信息最多； $\lambda_2=3.612$ ，贡献率为 22.57%； $\lambda_3=1.820$ ，贡献率为 11.38%。结果前 3 个主成分的累计贡献率就达到 91.892%，对前 3 个主成分分析已经能反映邓老凉茶颗粒的基本特征。分别以第一、第二、第三主成分来建立坐标系，进行投影即可得到所有样本的 PCA 三维投影图，见图 4。图中每个点对应 1 个共有峰，16 个共有峰分为 3 类。

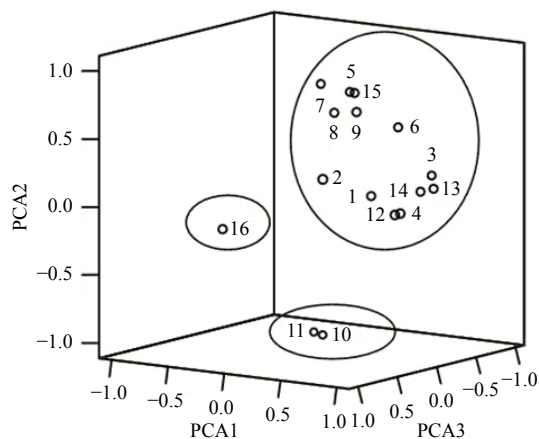


图 4 主成分得分图
Fig. 4 PCA score figure

表 1 为旋转后的公共因子载荷矩阵，每一个载荷量表示主成分与对应变量的相关系数，经计算可得主成分的模型为：

$$F_1=0.2467 X_1+0.2251 X_2+0.3578 X_3+0.3585 X_4+0.1247 X_5+0.2931 X_6+0.0996 X_7+0.1738 X_8+0.2228 X_9+0.0992 X_{10}+0.0479 X_{11}+0.3635 X_{12}+0.3562 X_{13}+0.3711 X_{14}+0.1741 X_{15}-0.0414 X_{16}$$

$$F_2=0.0514 X_1+0.1325 X_2+0.1057 X_3+0.0134 X_4+0.3464 X_5+0.2578 X_6+0.3848 X_7+0.3113 X_8+0.3125 X_9-0.3873 X_{10}-0.3894 X_{11}+0.0150 X_{12}+0.0635 X_{13}+0.0694 X_{14}+0.3568 X_{15}-0.0334 X_{16}$$

$$F_3=0.1199 X_1+0.4909 X_2-0.1248 X_3+0.2050 X_4-0.0112 X_5+0.0028 X_6+0.1806 X_7+0.2559 X_8+0.1869 X_9+0.1618 X_{10}+0.1053 X_{11}+0.1673 X_{12}-0.1450 X_{13}+0.0091 X_{14}+0.0767 X_{15}+0.6798 X_{16}$$

F_1 、 F_2 、 F_3 分别表示 3 个主成分， X_1 、 X_2 …… X_{16} 分别表示各个色谱峰的相对峰面积经标准化后的数据。

表 1 旋转后的公共因子载荷矩阵

Table 1 Loading matrix of postrotational common factors

峰号	主成分			峰号	主成分		
	1	2	3		1	2	3
1	0.649	0.123	0.172	9	0.586	0.748	0.268
2	0.592	0.317	0.704	10	0.261	-0.927	0.232
3	0.941	0.253	-0.179	11	0.126	-0.932	0.151
4	0.943	0.032	0.294	12	0.956	0.036	0.240
5	0.328	0.829	-0.016	13	0.937	0.152	-0.208
6	0.771	0.617	0.004	14	0.976	0.166	0.013
7	0.262	0.921	0.259	15	0.458	0.854	0.110
8	0.457	0.745	0.367	16	-0.109	-0.080	0.975

3 个主成分中， F_1 是特征值最大的，即是“信息最多”的指标，而第一主成分中系数最大的为 X_{14} ，为 0.371 1，从对照品色谱图可知，峰 14 为异绿原酸 B，表明异绿原酸 B 在邓老凉茶颗粒的质量控制中起着相对比较重要的作用。另外，绿原酸的系数也达到 0.357 8，也起着比较重要的作用。

3 讨论

3.1 流动相的选择

选用不同比例的甲醇-0.5%磷酸水溶液、乙腈-0.5%磷酸水溶液、甲醇-0.5%甲酸水溶液和乙腈-0.5%甲酸水溶液等流动相体系进行试验对比，以确定最佳流动相的组成及洗脱梯度程序。结果表明，

使用乙腈-0.5%磷酸水溶液系统时,各组分均达到基线分离,流动相中的磷酸明显降低绿原酸的拖尾现象,故选择乙腈-水-磷酸系统为流动相。

3.2 检测波长的选择

取供试品溶液,进样 1.0 μL ,进行 210~400 nm 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,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,因此选择 254 nm 作为指纹图谱检测波长。

3.3 提取方式的选择

比较水及 50%、70%、90%、100% 甲醇提取效果,结果表明甲醇比其他几种溶剂提取的成分多,故选用甲醇作为提取溶剂。另外,比较了超声提取与索氏回流提取,发现索氏回流提取出的峰较多,提取率较高,因此,样品采用回流提取。

3.4 色谱柱的选择

选用内径为 2.7 μm 表面多孔壳填料高效分离色谱柱,分离时间仅为常规 5 μm 内径色谱柱的 25%,并且具有更高的灵敏度,能够使复杂组分实现快速有效的分离,在指纹图谱研究方面比传统的常规分析柱更具优势。

参考文献

- [1] 王 萍,肖更生,张友胜,等. 广式凉茶研究进展 [J]. 食品科技, 2010, 35(2): 77-80.
- [2] 何蓉蓉,姚新生,栗原博. 广东凉茶的“泻火”作用与物质基础研究 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2009, 11(6): 834-839.
- [3] 赵渤海,于宗渊,丁晓彦,等. 黄芩质量评价谱-效相关模式的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 380-383.
- [4] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
- [5] 王 倩,王建新,于治国,等. 金银花药材高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2005, 27(7): 751-754.
- [6] 张铁军,韩世柳,田成旺,等. 清咽滴丸极性成分的高效液相指纹图谱及其模式识别的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1282-1285.
- [7] 祝 明,张 鹏,唐登峰,等. 莪术油的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 81-84.
- [8] 房敏德. 中药指纹图谱技术的研究与应用 [J]. 中草药, 2005, 36(4): 632-634.
- [9] 刘 毅,刘素香,龚苏晓,等. 当归药材 HPLC 指纹图谱及其液相色谱-质谱联用分析 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 259-262.
- [10] 何晓群. 多元统计分析 [M]. 北京: 中国人民大学出版社, 2004.

《现代药物与临床》杂志征稿与征订启事

《现代药物与临床》杂志 (CN12-1407/R, ISSN 1674-5515) 是国家级医药科技期刊,天津市一级期刊,2009 年 1 月由《国外医药·植物药分册》更名为《现代药物与临床》,并被美国《化学文摘》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国《乌里希期刊指南》(Ulrich's Periodicals Directory)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、英国《全球健康》(Global Health)、CNKI 中国期刊全文数据库、中国核心期刊(遴选)数据库等刊载。为了进一步提高期刊质量,2010 年出版的《现代药物与临床》全新改版,更加突出创新性与实用性,紧跟国内外药理学发展趋势,适时追踪热点,从栏目内容、文章质量,到封面版式、装帧印刷都得到了全面的提升与改进。

办刊宗旨: 报道国内外药物研究的新进展与新技术,以及药物在临床应用方面的最新动态,为新药研发、生产人员以及临床医生与药剂师合理用药提供有益的参考。

内容与栏目: 涵盖药物的基础研究与临床研究各学科,设置“专论与综述”、“实验研究”、“临床研究”、“未来药物”、“药事管理”、“知识产权”、“药物经济学”和“市场信息”等栏目。“专论与综述”栏目除报道植物药研究的最新进展外,诚征有关药物与临床研究前沿的前瞻性文章。

读者对象: 药物研发、生产、监管人员,以及临床医生与药剂师。

《现代药物与临床》双月刊,国内外公开发行,封面铜板彩色覆膜。为扩大信息量、缩短出版周期,本刊由 64 页扩版为 80 页;为惠顾广大读者,改版不提价,每期定价仍为 15 元,全年 90 元。本刊自办发行,请直接与编辑部联系订阅。

本刊网上在线投稿、审稿、查询系统正式开通,欢迎投稿、欢迎订阅!

《现代药物与临床》编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号 (300193)

电话与传真: (022) 23006823

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com

邮箱: dc@tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行 账号: 44114010010081504 户名: 天津中草药杂志社