

吴茱萸水溶性成分 HPLC 指纹图谱与化学模式识别研究

魏娟, 曾金祥*, 毕莹, 张寿文, 张忠立, 吴波, 韦国兵

江西中医药大学 江西省中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 研究吴茱萸药材水溶性化学成分的 HPLC 指纹图谱, 并应用系统聚类分析和主成分分析建立吴茱萸药材的化学模式识别方法, 以期对吴茱萸药材质量控制与品质评价提供参考。方法 色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (150.0 mm×4.6 mm, 3 μm); 流动相为乙腈-水 (含 0.5%醋酸和 0.04%磷酸) 混合溶液, 梯度洗脱; 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长为 327 nm; 进样量 10 μL; 柱温: 25 °C。结果 34 批吴茱萸药材有 27 个共有峰, 相似度在 0.945~0.997。聚类分析能对《中国药典》2010 年版规定的 3 种吴茱萸药材进行有效识别, 并且从水溶性化学成分上揭示吴茱萸药材的种质远近关系, 主成分分析结果与聚类分析结果类似。结论 建立的方法能够成功应用于吴茱萸药材的质量评价与控制及品种识别, 可为制定吴茱萸质量评价与控制模式提供新的参考依据。

关键词: 吴茱萸; 化学模式识别; 品质评价; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)23-3400-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.025

HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of water soluble components from *Evodiae Fructus*

WEI Juan, ZENG Jin-xiang, BI Ying, ZHANG Shou-wen, ZHANG Zhong-li, WU Bo, WEI Guo-bing

Germplasm Resource Engineering Technology Center of Jiangxi Province, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To establish a method for HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of the water soluble component from *Evodiae Fructus*, so as to provide the reference for the quality evaluation of *Evodiae Fructus*. **Methods** The chromatographic separation was performed on a C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 3 μm). The mobile phase was a mixture of acetonitrile-0.5% acetic acid and 0.04% phosphoric acid aqueous solution in gradient elution. The flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 327 nm, the injection volume was 10 μL, and the column temperature was 25 °C. **Results** The HPLC fingerprint of 34 batches of *Evodiae Fructus* was set up and 27 common peaks were obtained. The similarity was between 0.945 and 0.997. The three species of *Evodiae Fructus* in *Chinese Pharmacopeia 2010* could be completely discriminated by cluster analysis for the first time. The relationship among the different species of *Evodiae Fructus* were investigated from the water soluble components. The results of the principal component analysis were similar with the cluster analysis. **Conclusion** The cluster analysis method could be used for the quality control and comprehensive evaluation of *Evodiae Fructus*.

Key words: *Evodiae Fructus*; chemical pattern recognition; quality evaluation; cluster analysis; principal component analysis

吴茱萸 *Evodiae Fructus* 为芸香科 (Rutaceae) 植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实。具

有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻功能^[1], 以中药成方“吴茱萸汤”和“左金丸”效果最为显著^[2]。现代药理研究表明, 在治疗和预防心血管疾病、抗菌抗炎、抗病毒、抗过敏、抗肿瘤、收缩血管等方面有显著疗效^[3-6]。

收稿日期: 2013-04-04

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划资助项目 (2011BAI04B04); 江西中医药大学校级中医药课题 (ZX1013)

作者简介: 魏娟 (1988—), 女, 硕士研究生, 从事中药种质资源与品质评价研究。E-mail: 247314073@qq.com

*通信作者 曾金祥 (1974—), 男, 湖南隆回人, 硕士生导师, 主要从事中药资源与中药生物传感研究。E-mail: zjinxang@163.com

目前,国内外对吴茱萸药材的需求量很大,因而导致大量品质低劣产品流入市场。另外,由于《中国药典》2010 年版所载 3 种吴茱萸药材的化学成分极为相近,因此很难对其进行快速准确鉴别,也很难对其内在品质进行客观评价。因此吴茱萸药材的品质评价与质量控制仍是一个亟待解决的问题。近年来,化学识别模式已广泛应用于中药材的质量控制与品质评价^[7-9]。已有报道对吴茱萸进行了指纹图谱研究^[10],但关于吴茱萸的化学模式识别的研究尚未见报道。另外中药材大都以水煎煮液入药,因此以药材水溶性化学成分进行质量控制与品质评价更具有实际意义。本实验采用高效液相色谱法对吴茱萸进行水溶性化学成分指纹图谱分析,并采用聚类分析及主成分分析方法对指纹图谱信息进行化学模

式识别研究,以期建立吴茱萸品质评价与质量控制体系,为吴茱萸药材的科学、合理使用提供新的参考依据。

1 材料

1.1 样品来源

吴茱萸药材分别采自江西、湖北、湖南、贵州等地,经江西中医药大学药学院刘勇副教授比对《中国植物志》第 43 (2) 卷并结合显微特征,鉴定为吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 和疏毛吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang, 采集的吴茱萸果实放烘箱 50 ℃ 烘干,放入干燥器中保存备用。药材来源与鉴定结果见表 1。

表 1 样品来源

Table 1 Sample sources

编号	产 地	原植物	编号	产 地	原植物
1	贵州省余庆县红军村	吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i>	18	贵州省松桃县正大乡	疏毛吴茱萸 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>bodinieri</i>
2	贵州省余庆县葛麻坪		19	江西省樟树市昌傅镇	
3	贵州省余庆县苏羊村		20	江西省樟树市临江镇	
4	贵州省余庆县芝州村		21	江西省新干县三湖镇	
5	贵州省石阡县白沙镇		22	江西省瑞昌市林业局林场	
6	贵州省镇远县药材市场		23	江西省瑞昌市熊家村	
7	贵州省余庆县平场村		24	江西省樟树市药材市场	
8	贵州省松桃县正大乡		25	贵州省余庆县红军村	
9	贵州省松桃县正光村		26	贵州省余庆县葛麻坪	
10	贵州省余庆县药材市场		27	贵州省余庆县苏羊村	
11	贵州省印江县药材市场		28	贵州省余庆县芝州村	
12	贵州省余庆县龙溪镇	石虎 <i>E. rutaecarpa</i> var. <i>officinalis</i>	29	贵州省松桃县正光村	
13	贵州省石阡县白沙镇		30	贵州省松桃县新桥村	
14	贵州省石阡县白沙镇		31	湖南省新晃县黄雷乡	
15	湖北省阳新县塆上村		32	贵州省玉屏县药材市场	
16	江西省樟树市吴城镇		33	贵州省思南县药材市场	
17	湖南省新晃县黄雷乡		34	贵州省铜仁市药材市场	

1.2 仪器

Waters 2695 Separations Module 高效液相色谱仪, 包括 Waters 2996 Photodiode Array Detector 检测器、Waters Empower 化学工作站 (美国 Waters 公司); BP211D 万分之一电子天平 (Sartorius 公司); KQ5200 超声波清洗器 (昆山超声仪器厂); 高速中药粉碎机 (瑞安市环球药械厂)。

1.3 试剂

乙腈为市售色谱纯, 水为娃哈哈纯净水, 其余试剂为市售分析纯。对照品吴茱萸碱、去氢吴茱萸碱、绿原酸、芦丁购自中国药品生物制品检定所。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

将吴茱萸药材粉碎, 过 60 目筛。精密称取粉末约 0.5 g, 置 50 mL 锥形瓶中, 加入 15 mL 纯净水, 称质量, 沸水浴加热 1 h, 放冷补足质量, 加入 15 mL 无水乙醇, 滤过, 取续滤液, 定容, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取各对照品适量, 分别加甲醇制成质量浓度为 290 μg/mL 的吴茱萸碱、150 μg/mL 的去氢吴茱萸碱、150 μg/mL 的绿原酸、370 μg/mL 的芦丁

的对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 3 μm) (Welch Materials. Inc 公司); 流动相: 乙腈 (A) -含 0.5%醋酸和 0.04%磷酸混合水溶液 (B), 进行二元梯度洗脱; 流动相梯度条件: 0~15 min, 10%~25%A; 15~20 min, 25%~46%A; 20~23 min, 46%~100%A; 23~28 min, 100%A。体积流量 0.8 mL/min; 检测波长为 327 nm; 进样量 10 μL; 柱温: 25 ℃。所有成分在 28 min 内全部出峰。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批供试品溶液, 按照 2.3 的色谱条件, 连续进样 6 次, 检测指纹图谱, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD, 结果各色谱峰相对保留时间的 RSD<0.4%, 相对峰面积的 RSD<2.5%, 符合指纹图谱的要求。

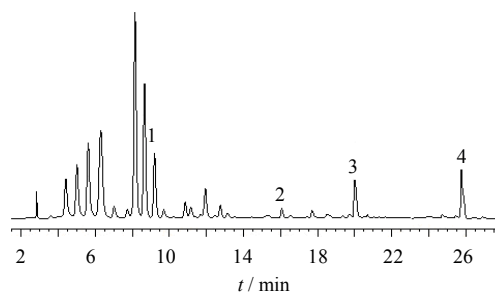
2.4.2 稳定性试验 取同一批供试品溶液, 按照“2.3”项的色谱条件, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 检测指纹图谱, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各色谱峰的相对保留时间的 RSD<0.6%, 相对峰面积的 RSD<1.9%。

2.4.3 重复性试验 取同一批供试品溶液, 按照“2.3”项的色谱条件, 分别检测指纹图谱, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果各色谱峰的相对保留时间的 RSD<0.5%, 相对峰面积的 RSD<3.0%, 表明分析方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立及标定成分的测定

取吴茱萸样品按照“2.1”项方法制成供试品溶液, 按“2.3”项色谱条件进样分析, 得到各样品的 HPLC 指纹图谱。参照 4 个对照品的色谱行为及其 DAD 紫外检测光谱图, 结果见图 1。

为分析各药材标定成分的质量分数分布, 对各标定成分进行线性回归分析。将绿原酸储备液 (150 μg/mL) 稀释成 75 μg/mL 的对照品溶液, 分别取 1、5、10、15、20 μL 按“2.3”项下色谱条件进样。精密吸取芦丁储备液 (370 μg/mL) 0.5



1-绿原酸 2-芦丁 3-去氢吴茱萸碱 4-吴茱萸碱
1-chlorogenic acid 2-rutin 3-dehydroevodiamine 4-evodiamine

图1 吴茱萸药材样品 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC fingerprint of *Evodiae Fructus* sample

mL, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 稀释成 37 μg/mL 的对照品溶液, 分别取 1、5、10、15、20 μL 按“2.3”项下色谱条件进样。取吴茱萸碱的储备液 (290 μg/mL), 分别取 1、10、20、30、40 μL 按“2.3”项下色谱条件进样。精密吸取去氢吴茱萸碱储备液 (150 μg/mL) 1 mL, 置 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 稀释成 30 μg/mL 的对照品溶液, 分别取 10、15、20、25、30、35 μL 按“2.3”项下色谱条件进样。以质量 (μg) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标进行线性回归, 各成分回归方程分析参数见表 2。

3 结果与分析

3.1 吴茱萸药材中标定成分的测定结果

根据回归方程计算 34 批吴茱萸药材中吴茱萸碱、去氢吴茱萸碱、绿原酸和芦丁的量并按供试品制备用吴茱萸药材量折算成各成分的质量分数, 结果见表 3。

3.2 吴茱萸药材指纹图谱相似度计算

中药指纹图谱相似度软件大都采用相关系数或向量余弦法, 数据处理过程简便快速, 自动化程度高^[11]。利用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A)”设置 S1 为参照指纹图谱, 采用多点校正后进行自动匹配, 得到 34 批吴茱萸药材的共有指纹图谱 R, 结果见图 2。34 批样品有 27

表2 标定成分的线性回归分析参数

Table 2 Linear regression analysis parameters of marker components in *Evodiae Fructus*

标定成分	线性回归方程	线性范围 / μg	r
绿原酸	$Y=4 \times 10^6 X - 20\,799$	0.075~1.500	0.999 5
芦丁	$Y=1 \times 10^6 X - 3\,311.7$	0.037~0.740	0.999 8
吴茱萸碱	$Y=298\,260 X - 17\,424$	0.290~1.600	0.999 7
去氢吴茱萸碱	$Y=1 \times 10^6 X - 37\,054$	0.300~1.050	0.999 0

表3 样品测定结果
Table 3 Results of samples

编号	质量分数 / %				编号	质量分数 / %			
	绿原酸	芦丁	吴茱萸碱	去氢吴茱萸碱		绿原酸	芦丁	吴茱萸碱	去氢吴茱萸碱
1	0.194 3	0.126 0	2.485 2	0.489 6	18	0.463 9	0.319 3	4.514 9	1.292 1
2	0.217 2	0.143 6	2.820 3	0.591 6	19	0.130 0	0.089 3	1.723 3	0.417 7
3	0.416 6	0.283 5	5.537 1	1.080 6	20	0.337 2	0.210 9	4.730 6	1.122 9
4	0.419 8	0.250 4	4.585 0	0.950 4	21	0.236 7	0.150 3	3.294 9	0.787 2
5	0.278 0	0.164 3	3.560 4	0.690 5	22	0.190 1	0.114 1	3.042 9	0.729 1
6	0.340 6	0.211 7	4.762 4	0.908 1	23	0.230 3	0.152 2	2.774 1	0.725 6
7	0.325 1	0.210 8	4.800 1	0.850 9	24	0.172 2	0.116 6	2.592 2	0.664 2
8	0.216 2	0.136 3	3.238 7	0.584 5	25	0.108 1	0.063 5	1.118 5	0.327 3
9	0.185 7	0.106 5	2.611 4	0.463 7	26	0.292 4	0.182 8	4.390 3	1.006 3
10	0.232 8	0.130 4	2.832 6	0.537 4	27	0.233 6	0.146 8	3.255 5	0.775 5
11	0.186 3	0.105 1	1.238 2	0.348 3	28	0.267 2	0.166 4	3.519 2	0.883 1
12	0.346 0	0.193 4	3.628 4	0.899 9	29	0.269 6	0.171 4	4.278 0	1.018 1
13	0.314 3	0.212 7	4.337 6	1.030 1	30	0.223 3	0.137 3	3.238 5	0.785 0
14	0.211 7	0.131 5	2.152 8	0.622 9	31	0.234 5	0.140 0	2.173 6	0.665 8
15	0.538 0	0.356 8	5.231 2	1.432 8	32	0.229 3	0.134 8	3.066 6	0.720 6
16	0.239 5	0.156 9	3.512 9	0.842 3	33	0.205 3	0.129 3	2.966 4	0.684 4
17	0.312 4	0.204 8	4.031 4	1.093 7	34	0.220 5	0.108 5	1.497 7	0.536 2

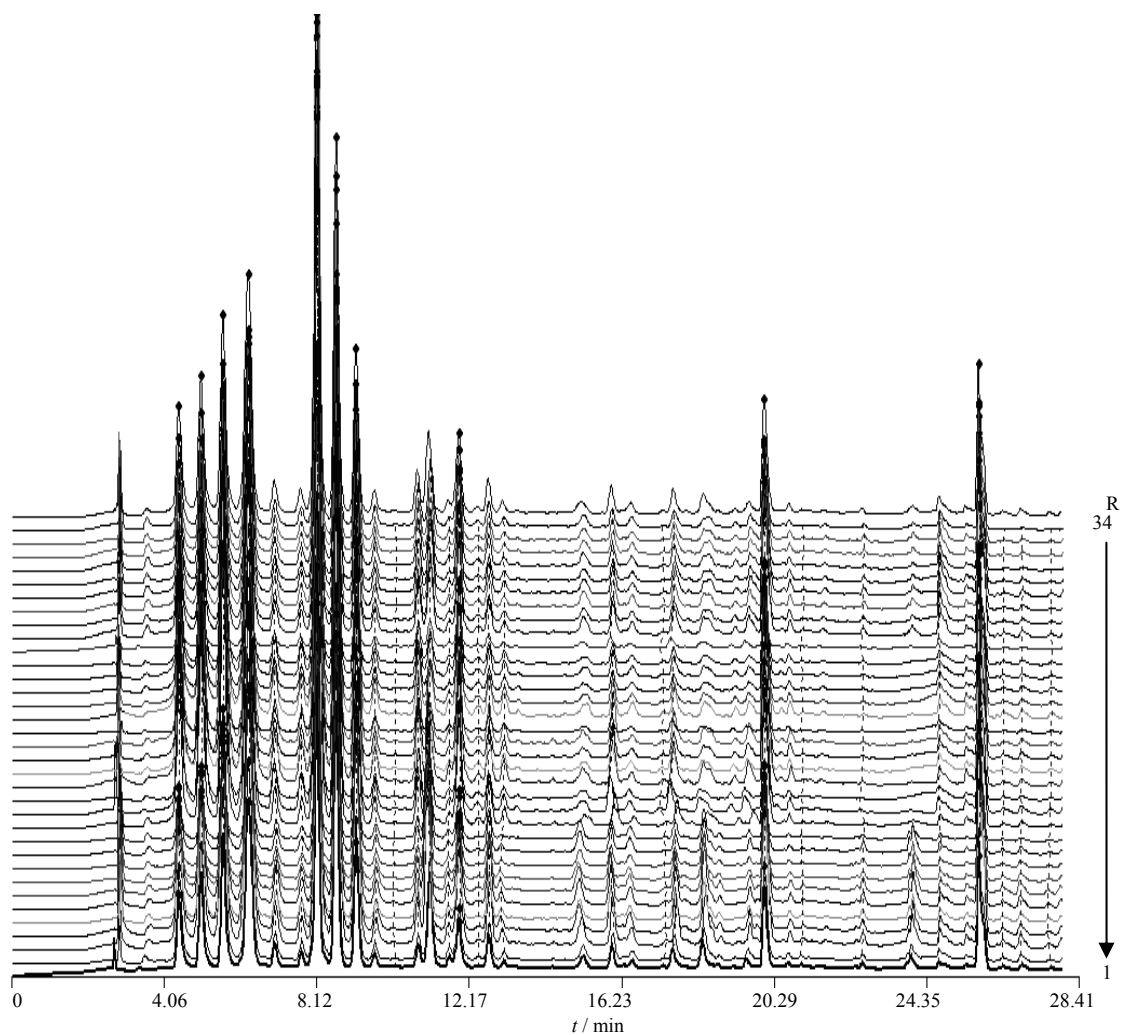


图2 34批吴茱萸药材 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprint for 34 batches of *Evodiae Fructus* samples

个共有峰,在相似度计算结果中,在同一样品中平均数相似度和中位数得出的值不完全一样。说明这2种计算方法的侧重点不一样,所以应综合考虑。各样品图谱相对于对照图谱的相似度分别是0.971、0.972、0.974、0.975、0.973、0.961、0.956、0.962、0.950、0.951、0.945、0.996、0.993、0.990、0.994、0.992、0.997、0.996、0.991、0.993、0.993、0.991、0.992、0.993、0.996、0.996、0.997、0.996、0.995、0.996、0.994、0.996、0.996、0.992,这表明《中国药典》2010版规定的3种吴茱萸的水溶性化学成分HPLC指纹图谱相似度较高,药材品质较为一致,但仍存在一定的差异。34批吴茱萸药材的绿原酸、芦丁、吴茱萸碱及去氢吴茱萸碱的测定结果表明不同吴茱萸药材水溶性化学成分在量上存在较大的分布范围,也同样说明其品质具有一定差异。因此,如需更为客观地反映吴茱萸药材的内在品质则需要进一步分析。

3.3 聚类分析

在27个共有峰中选择色谱峰面积最大的峰作为参考峰,计算出34个样品的共有峰相对峰面积数据。采用SPSS 19.0数据统计软件,将34个样品的共有峰相对峰面积数据,选用组间对比(between group comparisons)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,当类间距离介于5~10时,吴茱萸药材可以聚为三类,1~11(吴茱萸)为一类,12~24(石虎)为一类,25~34(疏毛吴茱萸)为一类(图3)。当类间距离介于10~15时,34个样品可以聚为二类,石虎和疏毛吴茱萸进一步聚为一类,表明石虎和疏毛吴茱萸这2个品种的吴茱萸中药材在种质上更为接近,而吴茱萸与前两者在种质上差异相对较大,从而揭示了《中国药典》2010年版规定的3种不同品种的吴茱萸在种质上的远近关系。

3.4 主成分分析

主成分分析(PCA)是将原来众多具有一定相关性的指标重新组合成一组新的相互无关的综合指标来代替原来指标的统计方法,也是数学上处理降维的一种方法^[12],已经广泛应用于中药材品质的综合评价与分类鉴别^[13-15]。本实验将34批样品27个共有峰绝对峰面积导入SPSS软件,进行主成分分析。对吴茱萸共有峰面积进行标准化处理,计算相关系数矩阵、特征值和方差贡献率。结果发现第1、2、3主成分的累积方差贡献率大于92.9%,所以选

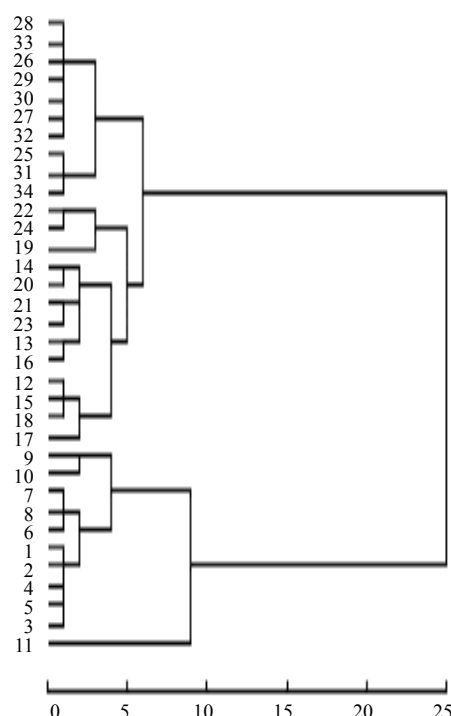


图3 吴茱萸药材聚类分析结果

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis of *Evodiae Fructus*

择前3个主成分就足以评价吴茱萸的品质。取第1、2、3主成分作图,得投影图见图4。根据投影图可见,34批样品分成4类,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11(吴茱萸)归为一类,12、13、14、16、17、18、19、20、21、22、23、24(石虎)归为一类,25、26、27、28、29、30、31、32、33、34(疏毛吴茱萸)归为一类,石虎品种中的15号药材归为一类。从主成分分析结果可以看出,主成分分析结果与聚类分析结果基本一致,但也有一定的差异。结合色谱图观察,15号样品的共有峰峰面积普遍比其他样品峰面积大,表明了15号样品与其他样品的差异。

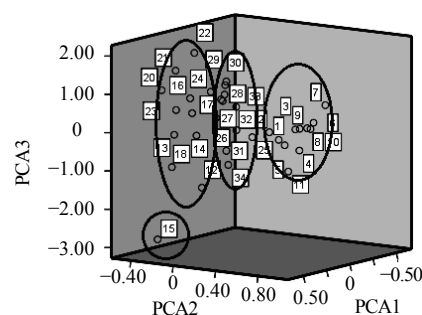


图4 吴茱萸药材主成分分析投影图

Fig. 4 Axonometrical drawing of principal component analysis in *Evodiae Fructus*

4 讨论

比较沸水浴和超声2种提取方法提取吴茱萸样品,从分离度、峰形、峰的数目和面积等各方面综合比较其色谱图,发现沸水浴提取得到的样品的色谱峰数及分离状况令人满意。比较了Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Ultimate XB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3 μm); Venusil MP-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)和大连依利特公司产的Hypersil ODS₂ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 4根色谱柱在选定相同的色谱条件下进行测定。结果表明Ultimate XB-C₁₈色谱柱分离效果最好,柱效最高。这可能是Ultimate XB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 3 μm)色谱柱填料粒径小,相对表面积较大,可以改善样品的分离状况。

聚类分析能够对3种吴茱萸进行有效识别,并首次从水溶性化学成分上揭示了不同品种吴茱萸药材之间种质的远近关系,客观地反映了吴茱萸药材内在质量的真实性与一致性。因此,聚类分析可以进行吴茱萸药材的质量控制乃至品种识别,能为制定吴茱萸质量控制与品质评价模式提供新的参考依据。

主成分分析与聚类分析结果基本一致,但仍存在一定的差异。这可能是本实验中的吴茱萸药材相似度较高,主成分分析法所提取的主要因素并不能完全反映药材的全部信息,因此导致2种化学模式识别结果之间的差异。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 朱 瑄. 吴茱萸现代药理研究 [J]. 光明中医, 2011, 26(6): 1282-1283.
- [3] 张 璐, 冯育林, 王跃生, 等. 吴茱萸现代研究概况 [J]. 江西中医学院学报, 2010, 22(2): 78-82.
- [4] Wang X K, Wang Y G, Zhan H L, *et al.* Comprehensive study of *Evodia rutaecarpa*-induced contraction on blood vascular *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(1): 65-73.
- [5] 韩 莹. 吴茱萸的中药新用途 [J]. 中外健康文摘, 2012, 9(20): 450-451.
- [6] Xu H Y, Zhang T J, Xiao X F, *et al.* Simultaneous analysis of 13 major bioactive components in *Evodiae rutaecarpa* by HPLC-DAD-MS [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 112-117.
- [7] 刘 江, 陈兴福, 杨文钰, 等. 川产麦冬野生资源 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1875-1881.
- [8] 王文清, 彭 静, 万 进, 等. 不同产地大青叶质量的化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2007, 38(6): 921-925.
- [9] 刘 欢, 何忠俊, 梁社往, 等. 不同产地滇重楼 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(1): 88-95.
- [10] 卢永飞, 杨 健, 孙吉慧, 等. 不同产地吴茱萸有效成分指纹图谱研究 [J]. 种子, 2010, 29(8): 94-98.
- [11] 张丽艳, 罗 君, 李 健, 等. 吴茱萸药材薄层色谱指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 72-75.
- [12] 张 洁, 段继诚, 梁 振, 等. 六味地黄丸的精细指纹图谱分析及模式识别分类研究 [J]. 分析化学研究简报, 2006, 34(10): 1423-1425.
- [13] 许 禄. 化学计量学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [14] 赵旭升, 李西辉. 主成分分析用于中药黄连中微量元素含量的研究 [J]. 微量元素与健康研究, 2007, 24(3): 25-26.
- [15] 陈军辉, 谢明勇, 王远兴. 主成分分析法用于西洋参样品分类研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 193-197.
- [16] 邓洁薇, 张翠仙, 李 娜, 等. 邓老凉茶颗粒的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2231-2234.