

叶下珠指纹图谱及模式识别研究

吴玲芳¹, 林琛¹, 袁永兵², 孙雪飞¹, 朱丹¹, 杨光辉¹, 邵岩岩¹, 毛鑫¹, 张兰珍^{1*}, 石任兵^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 建立叶下珠 HPLC 指纹图谱评价体系。方法 采用 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.2%冰醋酸水溶液为流动相梯度洗脱, 检测波长 270 nm, 体积流量 1.0 mL/min。测定 9 个不同产地叶下珠指纹图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版) 计算相似度, 并用对照品和液质联用技术指认色谱峰。结果 建立了叶下珠指纹图谱共有模式, 标定了 11 个共有峰, 指认了其中 8 个主要色谱峰, 用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行模式识别。结论 将指纹图谱和模式识别结合起来对叶下珠进行质量控制是一种有效的评价方法, 为叶下珠的全面质量控制提供了基础。

关键词: 叶下珠; 指纹图谱; 模式识别; HPLC; 聚类分析

中图分类号: R286.022 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)04-0572-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.04.021

Fingerprint analysis and chemical pattern recognition for whole plant of *Phyllanthus urinaria*

WU Ling-fang¹, LIN Chen¹, YUAN Yong-bing², SUN Xue-fei¹, ZHU Dan¹, YANG Guang-hui¹, SHAO Yan-yan¹, MAO Xin¹, ZHANG Lan-zhen¹, SHI Ren-bing¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint and its evaluation system for the whole plant of *Phyllanthus urinaria*. **Methods** Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile and 0.2% acetic acid solution in gradient elution mode. The detective wavelength was 270 nm and the flow rate was 1.0 mL/min. The fingerprints for the whole plant of *P. urinaria* and phenolic acids part from nine different sources were set up, the similarity assay for the whole plant of *P. urinaria* from nine different sources was carried out to evaluate their quality by Chinese material medica (CMM) fingerprint similarity evaluation system (2004A edition), and the peaks were identified by comparing the reference substance with LC-MS/MS. **Results** The common mode of HPLC fingerprints for the whole plant of *P. urinaria* were set up. There were 16 common peaks in the fingerprints and eight peaks were identified. The cluster analysis and principal component analysis were applied to studying the HPLC fingerprint and chemical pattern recognition. **Conclusion** The combination of fingerprint and chemical pattern recognition is an effective method for the quality control of the whole plant of *P. urinaria*. The study lays the foundation for the full quality evaluation for the whole plant of *P. urinaria*.

Key words: whole plant of *Phyllanthus urinaria* L.; fingerprint; pattern recognition; HPLC; cluster analysis

叶下珠为大戟科叶下珠属植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 干燥全草, 具有清热利尿、明目、消积的功效, 主要用来治疗肝炎、肠炎、痢疾、肾炎水肿。现代药理学研究表明叶下珠具有抗炎、抗癌、抗病毒等多种功效, 其抗病毒作用的强弱与产地有关^[1-2]。酚酸类成分是叶下珠的主要活性

收稿日期: 2014-10-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171197); 北京市自然科学基金项目 (7073093); 北京市教育委员会科技成果转化与产业化项目; 北京中医药大学科研创新团队 (2011-CXTD-12)

作者简介: 吴玲芳, 女, 在读博士。

*通信作者 张兰珍 Tel: (010)84738629 E-mail: zhanglanzhen01@126.com
石任兵 Tel: (010)84738601 E-mail: shirb@126.com

成分, 本课题组已经建立了叶下珠酚酸部位大孔树脂纯化制备工艺, 并测定了叶下珠中总酚酸量和 4 个单体化合物的量^[7-9]。

由于个别成分的测定不能完全代表中药质量的复杂体系, 本研究旨在建立不同产地叶下珠的 HPLC 指纹图谱, 通过与对照品对照、液质联用技术、相似度评价、主成分分析、聚类分析等识别技术, 对所收集的 9 个不同产地叶下珠药材进行分析归类, 以便更加全面地体现不同产地药材之间的质量差异, 为制定全面而的叶下珠质量控制方法提供实验依据。

1 仪器与材料

Waters1525 型高效液相色谱仪; PAD 检测器; Empower 软件; 25 μ L 可调进样器; KQ-00DE 超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。

自制没食子酸、柯里拉京、老鹳草素、短叶苏木酚酸对照品, 经 HPLC 检测质量分数均大于 98.5%。乙腈 (Sigma-aldrich 公司) 色谱纯; 屈臣氏纯净水; 其他试剂均为分析纯。

产地为陕西安康、商洛的叶下珠药材经陕西中医研究院郭五保副研究员鉴定为大戟科植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 的干燥全草; 其他叶下珠药材产自安徽、福建、河南、广东、广西等地, 由北京中医药大学刘春生教授鉴定为大戟科植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L., 样品保存于北京中医药大学中药化学系, 具体产地见表 1。

表 1 药材产地信息

Table 1 Information on habitat of medicinal materials

编号	产地	编号	产地
S1	陕西商洛	S6	广西
S2	安徽	S7	河南
S3	陕西安康	S8	四川
S4	福建	S9	安徽 (同仁堂)
S5	广东		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 270 nm; 流动相为乙腈(A)-0.2%冰醋酸水溶液(B), 梯度洗脱, 洗脱程序见表 2。

2.2 供试品溶液的制备

称取不同产地叶下珠药材粉末 (过 50 目筛) 约 300 mg, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 加入 50%

表 2 流动相梯度程序

Table 2 Gradient of mobile phase

时间/min	A/%	B/%
0	5	95
10	15	85
15	25	75
30	30	70
50	60	40
55	90	10
62	90	10

甲醇 50 mL, 称定质量, 100 MHz 超声 60 min, 放冷后补足质量, 滤过, 进样前经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取没食子酸、柯里拉京、老鹳草素、短叶苏木酚酸各适量, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度。摇匀, 各溶液再精密移取 1 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度。得到没食子酸、柯里拉京、老鹳草素、短叶苏木酚酸的质量浓度分别为 31.1、65.2、123.2、32.5 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.4 不同产地叶下珠指纹图谱的建立及相似度分析

分别取 9 个不同产地的叶下珠药材, 按“2.2”项方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项色谱条件分别测定, 得到 9 个不同产地的叶下珠药材 HPLC 指纹图谱。使用《中药色谱特征图谱相似度评价系统软件》(2004 版 A) 对 9 个不同产地叶下珠药材的实验数据进行相似度计算, 对照图谱采用“平均数”法生成, 得到 9 批叶下珠药材特征图谱, 相似度计算生成叶下珠共有模式的对照指纹图谱, 相对保留时间及相对峰面积见表 3、4, 不同产地叶下珠药材共有色谱峰 11 个, 见图 1。

结果表明, 9 个不同产地叶下珠药材各色谱峰相似度在 0.983~0.705, 其中安徽、安康、广西、广东、河南、商洛 6 个产地叶下珠相似度在 0.9 以上, 安徽 (同仁堂)、四川、福建的药材相似度在 0.9 以下。9 个不同产地药材与对照谱之间的相似度结果见表 5。

2.5 叶下珠 HPLC 指纹图谱主要色谱峰指认

2.5.1 HPLC-MS 色谱条件 1100 LC-MSD-Trap-XCT_plus 型液质联用仪 (美国 Agilent 公司); HPLC 色谱条件同“2.1”项。质谱条件: ESI 离子源; 离子源温度为 350 $^{\circ}$ C; 负离子检出模式; 雾化气压力: 413.7 kPa; 干燥气氮气; 体积流量 12 L/min; 扫描范围 m/z 50~2 200。

表 3 9 批样品共有峰相对保留时间

Table 3 Relative retention time of common peaks for nine batches of samples

样品	相对保留时间										
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11
S1	3.316	7.919	10.207	14.880	16.100	23.059	29.272	31.837	34.217	44.054	52.642
S2	3.238	7.974	10.346	14.585	16.814	23.568	29.242	31.893	34.999	44.145	52.558
S3	3.235	7.968	10.119	14.608	16.773	23.516	29.388	31.989	34.100	44.805	52.419
S4	3.251	7.955	10.352	14.854	16.811	23.562	29.417	31.837	34.953	44.149	52.549
S5	3.251	7.955	10.352	14.623	16.811	23.562	29.417	31.837	34.953	44.149	52.549
S6	3.252	7.978	10.366	14.717	16.824	23.575	29.275	31.800	34.972	44.133	52.560
S7	3.251	7.955	10.352	14.623	16.811	23.562	29.417	31.837	34.953	44.149	52.549
S8	3.254	7.938	10.539	14.68	16.861	23.564	29.383	31.84	34.146	44.247	52.678
S9	3.239	7.940	10.294	14.587	16.799	23.654	29.285	31.814	34.733	44.118	52.537
平均值	3.245	7.954	10.330	14.672	16.734	23.513	29.344	31.854	34.67	44.127	52.560
RSD/%	0.75	0.24	1.12	0.76	1.42	0.74	0.25	0.18	1.14	0.51	0.14

表 4 9 批样品共有峰相对峰面积

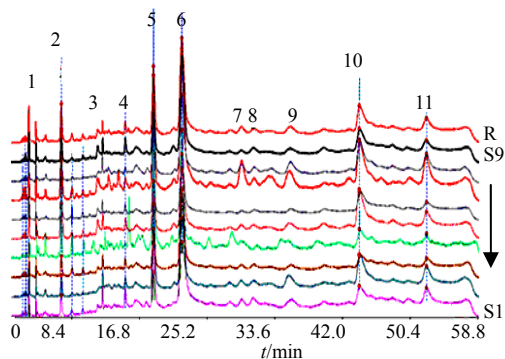
Table 4 Relative peak areas of common peaks for nine batches of samples

样品	相对峰面积										
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10	峰 11
S1	141 128	594 125	75 747	62 783	660 450	182 632	40 131	70 037	42 570	12 334	12 112
S2	77 574	175 866	47 419	70 048	382 208	1 470 491	27 908	273 109	17 424	99 902	28 735
S3	52 650	86 406	74 527	22 710	443 037	1 932 896	39 637	216 404	3 439	21 119	18 032
S4	92 572	109 780	13 001	24 437	732 277	928 340	61 866	538 530	4 790	224 124	33 613
S5	92 572	109 780	13 001	11 288	732 277	928 340	61 866	538 530	4 790	224 124	33 613
S6	56 448	101 364	44 573	31 930	312 086	1 015 517	9 461	39 836	28 415	17 010	13 997
S7	109 780	33 613	13 001	11 288	732 277	928 340	61 866	538 530	4 790	224 124	33 613
S8	115 179	20 173	11 930	20 171	562 293	1 172 977	8 776	514 424	10 388	221 899	20 173
S9	136 433	24 025	21 579	60 425	419 476	1 383 252	18 591	295 217	23 526	226 830	24 025
平均值	97 148	139 459	34 975	35 008	552 931	1 104 754	36 678	336 068	15 570	141 274	24 212
RSD/%	32.59	127.47	75.87	65.94	30.34	43.57	59.79	60.73	87.46	71.94	78.29

表 5 叶下珠指纹图谱相似度

Table 5 Similarity evaluation on whole plant of *P. urinaria*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.972	S6	0.957
S2	0.983	S7	0.966
S3	0.964	S8	0.865
S4	0.899	S9	0.705
S5	0.948	对照图谱	1.000



R-对照图谱 2-没食子酸 5-柯里拉京 6-老鹳草素 7-短叶苏木酚酸甲酯 8-叶下珠素 9-短叶苏木酚酸 10-叶下珠素 A 11-短叶苏木酚酸甲酯

R-common mode of HPLC fingerprints 2-galic acid 5-corilagin 6-geraniin 7-methyl brevifolin-carboxylate 8-phyllanthin 9-brevifolin-carboxylic acid 10-ellagic acid 11-phyllanthin A

图 1 不同产地叶下珠药材 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint for whole plant of *P. urinaria* from nine different habitats

2.5.2 叶下珠药材指纹图谱特征峰指认 精密吸取叶下珠药材供试品溶液注入 HPLC 仪及 LC-MS 仪, 按上述条件进行检测, 根据叶下珠药材总离子流图各色谱峰的保留时间, 结合各色谱峰的一级、二级质谱信息及紫外光谱信息, 确定主要色谱峰结构。同时通过添加对照品对照, 指认出不同产地叶下珠 8 个共有峰, 分别为没食子酸 (2 号峰)、柯里拉京 (5 号峰)、老鹳草素 (6 号峰)、短叶苏木酚酸甲酯

(7 号峰)、叶下珠素 C (8 号峰)、短叶苏木酚酸 (9 号峰)、鞣花酸 (10 号峰) 叶下珠素 A (11 号峰)。

2.6 聚类分析

分别以叶下珠指纹图谱中标定的共有峰的相对峰面积为变量, 采用 SPSS16.0 数据统计软件, 采用欧氏距离进行聚类分析, 结果见图 2。根据叶下珠药材 HPLC 特征图谱聚类分析的结果, 将叶下珠药材大致可分为 2 类, I 类包括 S2、S9、S4、S8、S6、S7、S3; II 类包括 S1、S5。

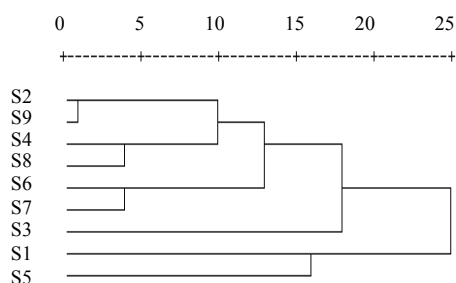


图 2 叶下珠药材 HPLC 特征图谱聚类分析

Fig. 2 HPLC cluster analysis on whole plant of *P. urinaria*

2.7 主成分分析

分别以叶下珠指纹图谱中标定的共有峰的峰面积为变量, 用 SPSS 16.0 统计分析软件对原始数据做标准化处理后进行主成分分析 (PCA), 以主成分的特征根及贡献率作为选择主成分的依据。

对 9 个不同产地叶下珠药材合格样品的 11 个共有峰进行主成分分析, 主成分个数提取原则是取主成分对应的特征值大于 1 的前 3 个主成分, 其累计贡献可以达到 80.13%, 包含了大部分信息, 其中第 1 主成分特征值为 3.998, 方差贡献率为 35.44%; 其中第 2 主成分特征值为 3.15, 方差贡献率为 28.95%; 其中第 3 主成分特征值为 1.77, 方差贡献率为 16.05%。分别以第 1、2、3 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 3, 图中每个点对应 1 个共有峰, 11 个共有峰可分为 3 类。叶下珠药材 PCA 旋转后的公共因子负荷矩阵见表 6。

3 讨论

本实验建立了 9 个不同产地叶下珠指纹图谱并进行了相似度分析, 结果表明不同产地叶下珠药材质量存在一定差异, 但叶下珠酚酸部位质量稳定, 差异较小。说明建立的酚酸部位制备工艺可以很好地富集叶下珠酚酸类成分。

本研究首次建立了叶下珠药材及其酚酸部位的

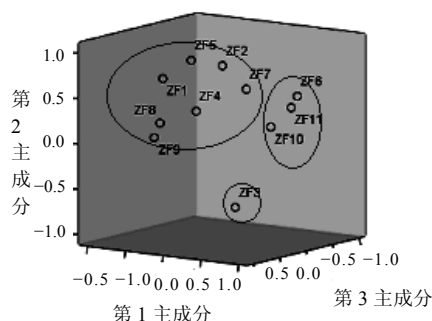


图 3 叶下珠药材主成分得分图

Fig. 3 PCA score figure for whole plant of *P. urinaria*

表 6 药材因子负荷矩阵

Table 6 Factor loading matrix for whole plant of *P. urinaria*

共有峰	成分值			
	1	2	3	4
F1	-0.781	0.590	0.002	-0.017
F2	0.243	0.885	0.337	-0.040
F3	0.477	-0.641	0.430	0.217
F4	0.205	0.443	0.781	0.238
F5	-0.280	0.869	0.183	-0.223
F6	0.723	0.491	-0.393	0.131
F7	-0.153	0.439	-0.677	0.483
F8	-0.873	0.080	-0.074	-0.310
F9	-0.625	0.012	0.390	0.643
F10	0.747	0.233	0.144	-0.460
F11	0.789	0.403	-0.180	0.299

指纹图谱并进行了计量学分析, 综合叶下珠相似度分析、聚类分析、主成分分析、总酚酸量^[4-5]、4 个单一成分量结果, 说明安徽、福建、四川、陕西安康产叶下珠药材质量最好, 广东和湖南产叶下珠质量较差, 为叶下珠药材质量评价和合理应用提供依据。

参考文献

- [1] 陈征途, 李凤仙, 邓文娣, 等. 同品种、不同产地叶下珠属植物在体外细胞培养中抗 HBV 作用的研究 [J]. 中草药, 1997, 28(10): 616-618.
- [2] 陈压西, 郭树华, 张定凤, 等. 不同产地叶下珠及其联合用药抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(4): 225-227.
- [3] 袁永兵, 张兰珍, 郭亚健, 等. RP-HPLC 法测定叶下珠中没食子酸、柯里拉京和鞣花酸的含量 [J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(1): 56-58.
- [4] 林琛, 袁永兵, 张兰珍, 等. 不同产地叶下珠中 4 种酚酸类成分的测定 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2055-2057.
- [5] 王坤凤, 林琛, 张兰珍, 等. 不同产地叶下珠中酚酸含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 110-112.