

UPLC 结合化学计量学方法的肿节风指纹图谱研究

韦卓纯¹, 姚志红^{1,2*}, 王其意¹, 林培¹, 顾利红³, 戴毅^{1,2}, 姚新生^{1,2}

1. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632

2. 中药药效物质基础及创新药物研究广东省高校重点实验室, 广东 广州 510632

3. 广州市药品检验所 中药室, 广东 广州 510160

摘要: 目的 建立不同产地肿节风药材超高效液相色谱指纹图谱, 为建立快速而高效的肿节风药材整体质量控制方法提供实验依据。方法 采用 UPLC 法, 色谱柱为 Acquity HSS T3 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 采用乙腈 (D)-水 (C) (各含 0.1% 甲酸) 为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 0.5 mL/min, 检测波长 330 nm, 柱温 35 °C, 建立肿节风药材指纹图谱; 通过相似度评价, 结合聚类分析和主成分分析 (PCA), 对不同批次的肿节风药材进行质量评价。结果 建立的肿节风药材 UPLC 指纹图谱方法确证 16 个共有峰, 并对 9 个共有峰进行了明确化学成分指认; 18 批肿节风药材的相似度为 0.869~0.979; 通过聚类分析可大致聚成 2 类; PCA 结果支持了聚类分析结果, 并发现指纹图谱中迷迭香酸、新绿原酸、隐绿原酸等 5 个差异性较大的化合物。结论 肿节风的 UPLC 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: 肿节风; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)06-0895-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.06.021

Fingerprint of *Sarcandrae Herba* by UPLC coupled with chemometrics methods

WEI Zhuo-chun¹, YAO Zhi-hong^{1,2}, WANG Qi-yi¹, LIN Pei¹, GU Li-hong³, DAI Yi^{1,2}, YAO Xin-sheng^{1,2}

1. Institute of Chinese Materia Medica & Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2. Guangdong Province Key Laboratory of Pharmacodynamic Constituents of TCM and New Drug Research, Guangzhou 510632, China

3. Department of Chinese Materia Medica, Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China

Abstract: **Objective** To establish the UPLC fingerprint for effective quality control of *Sarcandrae Herba*. **Methods** The fingerprint of *Sarcandrae Herba* was developed with ultra-performance liquid chromatography, and the Acquity UPLC HSS T3 column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used in the gradient elution with a mobile phase of acetonitrile-water (both containing 0.1% formic acid): The flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was at 330 nm. Similarity evaluation combined with hierarchical clustering analysis (HCA) and principal components analysis (PCA) were used to evaluate the quality of herbs from different areas. **Results** The fingerprint of *Sarcandrae Herba* was established with good precision, reproducibility, and stability obtaining within 23 min, and nine peaks in the fingerprint were designed. Eighteen samples could be classified into two clusters. The PCA result was consistent with the HCA. A brief list of five differential compounds is presented, including rosmarinic acid, newchlorogenic acid, and so on. **Conclusion** The establishment of UPLC fingerprint of *Sarcandrae Herba* and the application of chemical pattern recognition can provide a more comprehensive reference for the quality control of herbs.

Key words: *Sarcandrae Herba*; UPLC; fingerprint; similarity evaluation; hierarchical clustering analysis; principal components analysis

肿节风 *Sarcandrae Herba* 是金粟兰科 (Chloranthaceae) 植物草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全草^[1], 具有抗菌^[2]、抗炎^[2-3]

及抗肿瘤作用^[4]。肿节风中所含化学成分主要有香豆素、挥发油、黄酮、有机酸等^[5]。中药色谱指纹图谱是中药整体性的化学表征, 能够反映中药材尽

收稿日期: 2014-08-20

基金项目: 美国药典项目资助

作者简介: 韦卓纯 (1989—), 女, 在读硕士生, 研究方向为药物代谢及药理学研究。Tel: (020)85227107 E-mail: zhuo25712495@163.com

*通信作者 姚志红 (1967—), 女, 副教授, 主要从事中药质量控制、药动学研究。Tel: (020)85221767 E-mail: tyaozh@jnu.edu.cn

量多的组分,对药材的质量控制具有整体性,现已成为中药质量控制和评价的热点之一^[6]。目前,有关肿节风药材的指纹图谱研究多采用 HPLC 法^[7-9],虽能较全面反映该药材的整体质量,但分析时间长达 60 min 以上,显然未能对其进行有效快速分离。超高效液相色谱(UPLC)采用 1.7 μm 的小粒径作为色谱柱填料,极大地提高了分离效率、分析灵敏度,缩短了分析时间,能够弥补 HPLC 法的不足。本实验建立了不同产地的肿节风 UPLC 指纹图谱,在数据处理的基础上,结合相似度评价、系统聚类分析和主成分分析(PCA)的方法,进行药材的质量分析和评价,为全面控制肿节风药材的质量提供实验依据。

1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC (ultra-performance liquid chromatography) H-Class 超高效液相色谱系统,配有四元超高压溶剂系统、自动进样恒温样本管理器、柱温箱、PDA 测器和 Empower 2 色谱工作站(美国 Waters 公司);Sartorius BP211D 十万分之一电子天平;昆山 KQ3200E 超声波清洗器。

乙腈(色谱纯);超纯水(色谱纯,广州市信洪贸易有限公司);甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司);甲酸(分析纯,山东禹王有限公司);屈臣氏蒸馏水(北京屈臣氏蒸馏水有限公司);0.22 μm 微孔滤膜(广州泛宏贸易有限公司)。新绿原酸(批号 131229,质量分数为 99.58%)、绿原酸(批号 140107,质量分数为 99.91%)、隐绿原酸(批号 140216,质量分数为 98.69%)、咖啡酸(批号 140224,质量分数为 99.97%)均购自上海融禾医药科技发展有限公司;异嗪皮啶[萨恩化学技术(上海)有限公司,批号 BI180108,质量分数为 97.86%],迷迭香酸(Sigma 公司,批号 MKBQ 2631V,质量分数为 99.22%);槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸-4-*O*- β -D-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸对照品均为本实验室从肿节风水提物中分离获得并经过波谱学实验鉴定结构,且质量分数均在 95%以上。

18 批不同产地的肿节风药材(表 1)均由广州市药品检验所中药室顾利红主任鉴定为草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全草,其中批次 S4、S7、S12~S18 为当地采收,其余批次均购自药店或药房。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 柱(50

表 1 18 批不同产地肿节风药材

Table 1 Eighteen batches of *Sarcandrae Herba* samples from different habitats

编号	产地	采集时间
S1	河北石家庄	2013-01
S2	浙江龙泉	2013-08
S3	浙江龙泉	2013-08
S4	重庆市缙云山青龙寨	2013-08
S5	四川乐山	2013-05
S6	江西新干县	2013-02
S7	江西赣州	2013-07
S8	江西樟树	2013-08
S9	江西宜丰县	2013-08
S10	福建三明市三元区	2013-09
S11	福建三明市三元区	2013-09
S12	广东广州敬修堂药业基地	2013-09
S13	广东广州敬修堂药业基地	2013-09
S14	广西无线大明山	2013-10
S15	广西武鸣马头镇	2013-10
S16	广西南宁市郊志虎岭	2013-10
S17	广西南宁高峰林坊	2013-10
S18	广西融安县雅瑶乡	2013-10

mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm);流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱,线性梯度洗脱程序为 0~0.2 min, 8% A; 0.2~2.0 min, 8%~10% A; 2.0~4.0 min, 10%~15% A; 4.0~6.5 min, 15%~18% A; 6.5~9.0 min, 18%~20% A; 9.0~12.0 min, 20%~25% A; 12.0~18.0 min, 25%~45% A; 18.0~19.5 min, 45%~60% A; 19.5~21.0 min, 60%~100% A; 21.0~22.0 min, 100% A; 22.0~22.1 min, 100%~8% A; 22.1~23.0 min, 8% A; 检测波长 330 nm; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL 。

2.2 供试品溶液制备

药材粉碎后过 40 目筛,取肿节风药材粉末 0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入体积分数为 60% 甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,取出,放冷,再称定质量。用体积分数为 60% 甲醇补足减失的质量,摇匀,9 960 r/min 离心 3 min,取上清液,过 0.22 μm 滤膜,取续滤液,即得。

2.3 混合对照品溶液制备

取对照品新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啶、槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、迷

迷迭香酸-4-*O*- β -D-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸和迷迭香酸适量，分别置于棕色量瓶中，以色谱甲醇溶解并稀释至刻度，制得对照品储备液。分别取对照品储备液各一定量置 10 mL 棕色量瓶中，作为对照品稀释液；再分别取对照品稀释液一定量，置于同一 5 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，制成含新绿原酸 8.28 μ g/mL、绿原酸 8.56 μ g/mL、隐绿原酸 9.96 μ g/mL、咖啡酸 11.12 μ g/mL、异嗪皮啉 16.56 μ g/mL、槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸 20 μ g/mL、迷迭香酸-4-*O*- β -D-葡萄糖苷 31.2 μ g/mL、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸 22.5 μ g/mL、迷迭香酸 20.24 μ g/mL 的混合对照品溶液，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度考察 取同一份肿节风药材的供试品溶液，按“2.1”项色谱条件，连续进样 6 针，记录色谱图，计算得到新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啉、槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸-4-*O*- β -D-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸、迷迭香酸 9 个主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 值不大于 1.0%，相对峰面积的 RSD 值不大于 3.0%，以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2004 版 A) 评价，6 次进样的相似度均不小于 0.999，表明仪器精密度良好，符合指纹图谱测定的要求。

2.4.2 重复性考察 取同一批肿节风药材，分别按“2.2”项下方法平行制备 6 份肿节风药材的供试品溶液，按“2.1”项色谱条件，依次进样 6 次，记录色谱图。计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啉、槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸-4-*O*- β -D-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸、迷迭香酸 9 个主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 值不大于 1.0%，相对峰面积的 RSD 值不大于 4.0%，以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2004 版 A) 评价，6 次进样的相似度均不小于 0.993，表明样品处理方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性考察 取同一份肿节风药材的供试品溶液，按“2.1”项色谱条件，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，记录色谱图。计算得到新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异嗪皮啉、槲皮素-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸苷、迷迭香酸-4-*O*- β -D-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖醛酸、迷迭香酸 9 个主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 值不大于 1.0%，相对峰面积的 RSD 值均不大于 4.0%，以《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件》(2004 版 A) 评

价，6 次进样的相似度均不小于 0.997，表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.5 样品测定及色谱峰的化学成分指认

取 18 批肿节风药材样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件依次进样测定，记录色谱图，共获得 16 个共有峰，对其中 9 个共有峰进行了指认，混合对照品溶液 UPLC 色谱图见图 1-A。

2.6 指纹图谱建立

2.6.1 参比峰的选择 在各批次样品指纹图谱中，异嗪皮啉是肿节风药材的指标成分，为所有样品共有，且分离度良好，峰位相对居中，峰面积较大，所以确定异嗪皮啉为参比峰。

2.6.2 指纹图谱的建立及相似度评价 将所得的 18 批肿节风药材 UPLC 图谱以 AIA 格式依次导入国家药典委员会研制的中药色谱指纹图谱相似度评

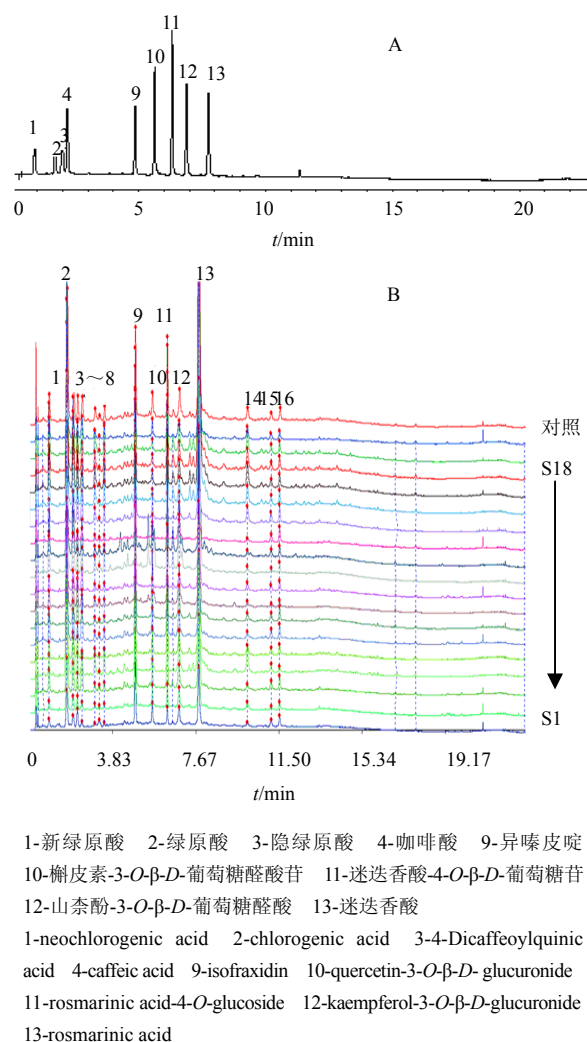


图1 混合对照品溶液 (A) 和肿节风药材 (B) UPLC 指纹图谱
Fig. 1 UPLC fingerprints of mixed reference solution (A) and batches of *Sarcandrae Herba*

价系统(2004 版 A 科研类)软件,以 S1 批药材图谱作为参照谱进行指纹匹配,确定了 16 个共有峰,建立了肿节风药材 UPLC 指纹图谱,18 批肿节风药材 UPLC 指纹图谱叠加图见图 1-B,并进行了相似度计算,18 批药材的相似度在 0.869~0.979,见表 2。

表 2 18 批肿节风药材相似度

Table 2 Similarities of 18 batches of *Sarcandrae Herba*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.939	S10	0.947
S2	0.952	S11	0.910
S3	0.960	S12	0.896
S4	0.949	S13	0.949
S5	0.957	S14	0.869
S6	0.967	S15	0.873
S7	0.968	S16	0.870
S8	0.909	S17	0.876
S9	0.979	S18	0.934

表 3 16 个共有色谱峰的相对峰面积值

Table 3 Relative peak areas of 16 common chromatographic peaks

峰号	保留时间/min	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
1	0.929	0.268	0.173	0.264	0.280	0.352	0.250	0.213	0.231	0.254	0.591	0.529	0.218	0.192	0.936	0.769	0.853	0.697	0.917
2	1.769	0.974	0.767	1.111	2.796	1.609	1.016	0.765	1.248	0.936	2.764	2.577	1.012	0.800	3.544	3.442	3.434	2.620	4.230
3	2.063	0.293	0.213	0.322	0.524	0.493	0.298	0.276	0.358	0.256	0.869	0.784	0.205	0.257	1.078	0.882	0.981	0.762	0.914
4	2.242	0.351	0.162	0.180	0.240	0.317	0.148	0.390	0.309	0.189	0.299	0.301	0.213	0.225	0.559	0.522	0.564	0.390	0.490
5	2.462	0.127	0.111	0.397	0.232	0.128	0.401	0.146	0.252	0.267	0.362	0.481	0.326	0.255	0.608	0.483	0.543	0.504	0.715
6	3.053	0.084	0.089	0.096	0.262	0.155	0.087	0.064	0.198	0.083	0.257	0.266	0.134	0.138	0.395	0.407	0.405	0.367	0.275
7	3.264	0.196	0.065	0.068	0.056	0.047	0.059	0.044	0.142	0.052	0.150	0.212	0.082	0.019	0.086	0.076	0.080	0.058	0.089
8	3.476	0.100	0.069	0.071	0.272	0.100	0.070	0.062	0.149	0.072	0.219	0.181	0.090	0.091	0.317	0.338	0.358	0.306	0.290
9	4.891	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
10	5.673	0.392	0.279	0.223	0.559	0.361	0.195	0.283	0.609	0.085	0.367	0.569	0.394	0.151	0.261	0.270	0.258	0.225	0.458
11	6.373	0.231	0.241	0.777	0.622	0.919	0.720	0.603	0.745	0.306	0.693	1.184	0.232	0.243	1.202	1.039	1.184	1.020	0.884
12	6.956	0.475	0.319	0.338	0.638	0.509	0.324	0.386	0.641	0.217	0.918	0.873	0.694	0.257	0.658	0.624	0.666	0.495	0.770
13	7.830	1.278	1.261	1.402	6.305	4.767	1.294	1.685	1.091	1.715	2.375	1.983	0.955	2.712	17.568	16.077	16.987	13.039	10.491
14	10.075	0.119	0.110	0.082	0.455	0.226	0.088	0.115	0.084	0.096	0.152	0.095	0.090	0.166	0.507	0.588	0.554	0.438	0.479
15	11.165	0.159	0.049	0.086	0.131	0.160	0.084	0.096	0.043	0.070	0.045	0.090	0.192	0.099	0.213	0.179	0.184	0.144	0.224
16	11.577	0.197	0.088	0.114	0.089	0.165	0.106	0.128	0.063	0.088	0.113	0.086	0.299	0.129	0.264	0.213	0.237	0.162	0.242

的相对峰面积明显大于第 1 类药材(S1~S13)中有该峰峰面积,初步猜测这是造成广西产地药材与其他产地药材分开的主要原因之一。

2.6.4 主成分分析(PCA) 选取了 16 个主要色谱峰的相对峰面积值作为变量(将异嗪皮啉的色谱峰设为参比峰),见表 3。采用 EZinfo 软件对表 1 中

2.6.3 聚类分析 聚类分析是根据相似程度大小把样品归类,目前在中药的真伪鉴别、质量评价、品种分类等方面有较多的应用^[10-11]。本实验对 18 个产地的肿节风药材进行指纹图谱分析,获得包括异嗪皮啉(9 号峰)的 16 个共有色谱峰,将各个共有峰相对于参比峰的峰面积量化,得到 18×16 阶数据矩阵(表 3),导入 SPSS 19.0 版软件,采用组间连接法,选用欧氏距离对 18 批药材进行聚类分析,结果见图 2。根据聚类分析结果,18 个产地的肿节风药材分为两类,其中来自江西、广东、浙江、四川等 6 个产地的药材即样品 S1~S13 聚为第一类,说明这 6 个产地的肿节风药材指纹图谱较为相似;来自广西产地的 5 批药材即样品 S14~S18 明显单独聚为第 2 类,说明广西产地的药材与其他产地的药材存在一定的差异,直观分析这两类药材的指纹图谱色谱峰的相对峰面积(表 3)可以发现,第 2 类药材(S14~S18)的指纹图谱中迷迭香酸(13 号峰)

18 批药材样品进行 PCA。通过不同产地药材的得分图可以看出 18 批肿节风药材大致可以分成两大类,其中 S1~S13 为一类,分布在 A 区域, S14~S18 为一类,分布在 B 区域,见图 3,与聚类分析结果一致。为了寻找样品组间差异,本实验在此基础上对 A、B 两组样品进行了 OPLS-DA 分析,找出了

- spectrometry electrospray ionization tandem mass analyses [J]. *Food Chem*, 2013, 138(4): 2390-2398.
- [10] 高鸿彬, 刘 浩, 相秉仁. 半夏及其伪品天南星的近红外漫反射快速无损鉴别 [J]. 光谱实验室, 2012, 29(2): 899-901.
- [11] 郭怀忠, 吴 芳, 张伟泉, 等. 聚类分析辅助中药寡糖电泳分析鉴定中药 [J]. 色谱, 2013, 31(10): 1001-1004.
- [12] Da Cunha F M, Duma D, Assreuy J, *et al*. Caffeic acid derivatives: *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties [J]. *Free Radic Res*, 2004, 38(11): 1241-1253.
- [13] Vivek S, Joydeep G, Sounya G, *et al*. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of *Japanese Encephalitis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(9): 3367-3370.
- [14] 杨 斌, 丘 岳, 王柳萍, 等. 广西山银花绿原酸体外抗炎作用及分子机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4): 542-545.