

基于聚类分析和主成分分析的栀子指纹图谱研究

付小梅, 孙 茜, 刘 婧*, 裴建国, 吴志瑰, 黄 潇

江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

摘要:目的 建立栀子的 HPLC 指纹图谱, 为其真伪鉴别及质量评价提供依据。方法 采用 HPLC 法建立栀子及其主要混淆品(水栀子、大红栀子)的指纹图谱, 并通过 HPLC-ESI-MS 对指纹图谱中的色谱峰进行鉴定。同时采用聚类分析及主成分分析对样品进行分类分析。结果 获得了栀子的 HPLC 指纹图谱, 共有峰 17 个, 鉴定出 15 个共有峰。聚类分析及主成分分析能将 22 批栀子类药材区分为栀子、水栀子、大红栀子。结论 栀子指纹图谱的构建和化学模式识别为栀子的真伪鉴别和质量控制提供科学依据。

关键词: 栀子; 水栀子; 大红栀子; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; HPLC

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4653-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.028

HPLC fingerprint of fruits of *Gardenia Fructus* based on cluster analysis and principal component analysis

FU Xiao-mei, SUN Han, LIU Jing, PEI Jian-guo, WU Zhi-gui, HUANG Xiao

School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To establish an HPLC fingerprint method of *Gardeniae Fructus* which could provide the basis for its authenticity identification and quality evaluation. **Methods** HPLC method was adopted to construct the fingerprint of *Gardeniae Fructus* and its main confused species (*G. jasminoides* f. *logocarpa* and *G. jasminoides* var. *grandiflora*). HPLC-ESI-MS was applied to identify the common peaks. The cluster analysis (CA) and principal component analysis (PCA) were used to classify the samples. **Results** The HPLC fingerprint of *Gardeniae Fructus* was obtained with 17 common peaks, and 15 common peaks were identified using HPLC-ESI-MS. A total of 22 batches of the fruits of *Gardenia* were classified to *Gardeniae Fructus*, *G. jasminoides* Ellis f. *logocarpa*, and *G. jasminoides* var. *grandiflora* by CA and PCA. **Conclusion** The establishment of HPLC fingerprint of *Gardeniae Fructus* and the application of chemical pattern recognition can provide scientific basis for authenticity identification and quality control of *Gardeniae Fructus*.

Key words: *Gardeniae Fructus*; *Gardeniae jasminoides* Ellis f. *logocarpa* Z. W. Xie et Okada.; *Gardeniae jasminoides* Ellis var. *grandiflora* Nakai; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis; HPLC

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的成熟果实, 为历版《中国药典》收载, 具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒等功效。栀子在临床上应用广泛, 早在张仲景所著的《金匱要略》、《伤寒论》里收载栀子药方达 10 余首, 在国家标准中收载有栀子的处方达 400 余首。《中国植物志》栀子属收载有栀子、匙叶栀子 *G. angkorensis* Pitard.、大黄栀子 *G. sootepensis* Hutchins.、狭叶栀子 *G. stenophylla* Merr.、海南栀子 *G. hainanensis* Merr. 共

5 种, 1 个变种即为白蟾 *G. jasminoides* Ellis var. *fortuniana* (Lindl.), 同时认为栀子变异有 2 种类型, 即山栀子和水栀子^[1]。《常用中药材品种整理和质量研究》中“栀子类的研究”记载水栀子历来为正品栀子的混淆品, 大黄栀子、海南栀子、狭叶栀子和匙叶栀子虽有分布, 但商品药材很少见或根本不存在^[2]。《全国中草药汇编》记载水栀子即长果栀子 *G. jasminoides* Ellis f. *logocarpa* Z. W. Xie et Okada. 和大红栀子 *G. jasminoides* Ellis var. *grandiflora* Nakai,

收稿日期: 2018-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360620); 江西省研究生教育创新计划 (JXYJG-2015-086); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ150846, GJJ160854); 江西省卫生计生厅中医药科研项目 (2015A040, 2015A051, 2016A019)

作者简介: 付小梅 (1976—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为中药品质评价研究。E-mail: smilefxm@163.com

*通信作者 刘 婧 (1986—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为中药有效成分研究。E-mail: liujing860828@163.com

亦在地方作梔子入药^[3]。《中药品种理论与应用》谢宗万教授认为水梔子即为历代古本草记载的伏尸梔子，在部分地区作梔子入药。水梔子自古以来均不作药用，只作染料用^[4]。这与前期研究报道一致^[5]，即梔子为主流品种，其主要的混淆品为水梔子，其次为大红梔子。本实验应用指纹图谱技术与聚类分析和主成分分析（PCA）2 种统计方法相结合对 3 类梔子药材的高效液相图谱进行了比较分析，并利用 LC-MS 技术对色谱峰进行了归属，为梔子类药材的鉴定提供科学依据，为临床用药安全提供依据。

1 材料

1.1 药材

从各地药材公司（药店）或产地共收购和采集了 22 个省、市（区）的梔子生药材及商品药材 18 份、水梔子 3 份、大红梔子 1 份，见表 1。药材经江西中医药大学范崔生教授鉴定，分别为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实、水梔子 *G. jasminoides* Ellis f. *logocarpa* Z. W. Xie et Okada. 的干燥成熟果实、大红梔子 *G. jasminoides* Ellis var. *grandiflora* Nakai. 的干燥成熟果实。

1.2 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪（自动进样器，

四元泵，柱温箱，DAD 检测器，Agilent 公司，美国），KQ-250DB 数控超声波清洗仪（昆山市超声仪器有限公司），BP211D 型电子天平（十万分之一，Satorius Co. Ltd.，德国）。HPLC-PDA-MS^N 联用系统：高效液相系统为 Surveyor LC system（Thermo Finnigan, San Jose, 美国），包括在线脱气机、四元泵、自动进样器和 PDA 检测器；MS 和 MSⁿ 实验使用 LCQ DECAXP^{plus} 质谱仪（Thermo Finnigan 公司，美国）包括 ESI 离子源和离子阱系统。

1.3 试剂

对照品京尼平苷酸、去乙酰基车叶草苷、羟基梔子苷、鸡矢藤次苷甲酯、京尼平龙胆双糖苷、京尼平苷、对香豆酰京尼平龙胆双糖苷、西红花苷-1、西红花苷-2、西红花苷-3 为自制，质量分数经高效液相按面积归一化法测定均大于 98%。甲醇、乙醇、醋酸均为分析纯（上海国药集团化学试剂有限公司），乙腈色谱纯（Merck 公司），自制双蒸水。

2 方法

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 HPLC-DAD 色谱条件 色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈（150 mm×4.6 mm，5 μm），流动相 乙腈（A）-0.2%磷酸溶液（B）洗脱，0~10 min，

表 1 样品及产地

Table 1 Samples from different sources

编号	药材名	收购地	产地	时间
Z1	梔子	上海华宇药业	江苏	2007-05-21
Z2	梔子	北京	江西	2007-11-20
Z3	梔子	江西樟树	江西樟树	2006-12-22
Z4	梔子	江西樟树	江西樟树	2007-12-30
Z5	梔子	山西	山西	2007-12-02
Z6	梔子	杭州惠远	杭州惠远	2007-12-21
Z7	梔子	湖南长沙	湖南长沙	2007-12-14
Z8	梔子	江西临川	江西临川	2007-12-04
Z9	梔子	南京先声药业	江苏	2007-12-03
Z10	梔子	湖北武汉	湖北	2007-11-21
Z11	梔子	河南信阳	河南信阳	2007-12-01
Z12	梔子	广西横县	广西横县	2007-11-29
Z13	梔子	南昌湾里	南昌湾里	2007-12-01
Z14	梔子	广东广州	江西	2007-12-07
Z15	梔子	福建浦田	福建浦田	2007-11-20
Z16	梔子	山东	山东	2007-12-01
Z17	梔子	上海养和堂药店	江西	2007-12-06
Z18	梔子	安徽亳州	安徽	2007-12-09
Z19	水梔子	江西瑞金	江西瑞金	2007-12-12
Z20	水梔子	广西邕宁	广西邕宁	2007-12-17
Z21	水梔子	亳州药材市场	湖南	2007-12-10
Z22	大红梔子	四川宜宾	四川宜宾	2007-11-26

6% A; 10~18 min, 6%~12% A; 18~22 min, 12%~16% A; 18~28 min, 16%~20% A; 28~40 min, 20% A; 40~60 min, 20%~36% A; 60~65 min, 36%~55% A; 平衡时间 10 min; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 5 μ L; 柱温 30 $^{\circ}$ C; DAD 检测器采集范围: 195~700 nm; 检测波长 238、440 nm。

2.1.2 LC-MS 条件 流动相为乙腈(A)-0.2%冰醋酸溶液(B), 洗脱程序与上述条件相同; 柱后分流, 分流比为 1:50; 进样量 10 μ L; 柱温 30 $^{\circ}$ C; ESI源; 源电压-3.2 kV; 负离子模式; 雾化气(GAS1) 241.33 kPa, 帘气(CUR) 110.32 kPa, 去簇电势(DP) -20 V, 聚焦电势(FP) -80 V, 去簇电势 2 (DP2) -20 V。质谱扫描质量范围 m/z 100~800。

2.2 样品提取条件的优化

根据现有的文献报道^[5-8], 梔子指纹图谱的研究主要集中在环烯醚萜类和西红花酸类成分的指纹图谱。这 2 类成分均为中等或大极性成分, 易溶于甲醇、乙醇等极性溶剂。因此通过比较以 30%、50%、70%、100%甲醇及 30%、50%、70%、100%乙醇为溶剂分别超声 20、30、40 min 的提取率, 发现 70%甲醇与 70%乙醇提取率无明显差异, 但乙醇毒性小。

最终优化的提取方法: 取梔子药材粉末(过 40 目筛) 0.40 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 25 mL, 称定质量, 超声(25 $^{\circ}$ C) 30 min, 放冷, 称定质量, 用 70%乙醇补足减失质量。3 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 微孔滤膜滤过, 即得。

通过 HPLC 的可变波长功能同时测定环烯醚萜类和二萜类成分, 得到成分相互分离图谱, 图谱中共显示出环烯醚萜类和二萜类成分 20 多个色谱峰。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 取对照品京尼平苷酸、去乙酰基车叶草苷、羟基梔子苷、鸡矢藤次苷甲酯、京尼平龙胆双糖苷、京尼平苷、对香豆酰京尼平龙胆双糖苷、西红花苷-1、西红花苷-2、西红花苷-3 适量, 精密称定, 用甲醇溶解, 分别制成含上述对照品 50、15、50、80、80、200、100、50、50、50 μ g/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取梔子药材粉末(过 40 目筛) 0.40 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%乙醇 25 mL, 称定质量, 超声(25 $^{\circ}$ C) 30 min, 放冷, 称定质量, 用 70%乙醇补足减失质量。3 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一份供试品溶液(编号 Z23), 按照“2.1.2”项色谱条件, 连续进样 5 次测定, 以京尼平苷峰为参照峰, 分别计算 17 个特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值, 均小于 3%, 说明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一份供试品溶液(编号 Z23), 按照“2.1.2”项色谱条件, 分别于 1、3、5、7、9、12、24 和 48 h 进样测定, 以京尼平苷峰为参照峰, 分别计算 20 个特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值, 均小于 3%, 说明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 同一样品粉末分别精密称取 5 份(编号 Z23), 按照“2.3.2”项方法制成供试品溶液, 按照“2.1.2”项色谱条件, 进样检测。以京尼平苷峰为参照峰, 分别计算 20 个特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 均小于 3%。说明该方法的重复性良好。

2.5 耐用性实验

取同一供试品溶液, 分别使用 Thermo Hypersil ODS(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Kromasil ODS(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Waters symmetry ODS(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Agilent SB-C₁₈(150 mm $\times$ 3.0 mm, 3.5 μ m)、Agilent SB-C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)、Agilent XDB-C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 5 个不同品牌的 ODS 色谱柱进行检测, 记录色谱图。其中 Agilent SB-C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 柱能使梔子各色谱峰得到较好的分离, 分离度好、柱效高。因此实验最终选用 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱。考察了 2 根 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱的重现性(PN 880975-902, SN USCL020053, BN LNB04124; PN 880975-902, SN USCL017143, BN LNB04124), 取同一供试品溶液在 2 根 Agilent SB-C₁₈ 谱柱上测试, 结果色谱行为有较好的一致性。

3 结果与分析

3.1 梔子的指纹图谱分析

京尼平苷、西红花苷-1 在线紫外光谱图显示这 2 个化合物的最大吸收波长分别为 238、440 nm, 因此选定 238、440 nm 作为检测波长。贾琳等^[9]利用 HPLC 的可变波长功能在一张色谱图上同时表征了京尼平苷和西红花苷-1 的色谱峰。梔子药材的色谱图表明, 在 238 nm 波长检测下, 保留时间 43 min 前为环烯醚萜类成分的色谱峰(图 1-A); 而在 440

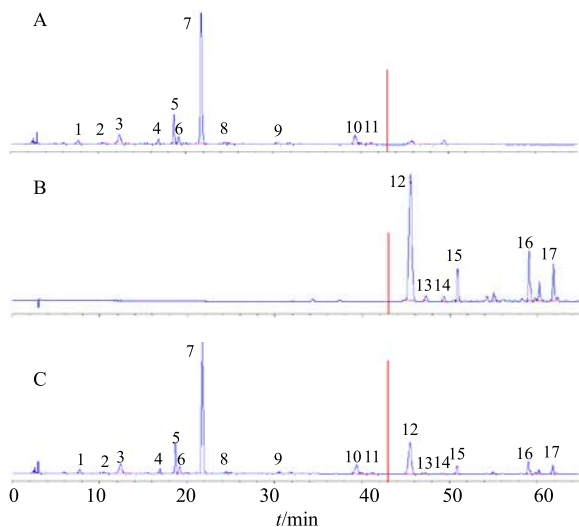


图 1 梔子在 238 (A)、440 nm (B) 和可变波长 (C) 下的 HPLC 色谱

Fig. 1 HPLC of *Gardeniae Fructus* at wavelength 238 nm (A), 440 nm (B), and variable wavelength (C)

nm 波长检测下, 保留时间 43 min 前几乎没有色谱峰, 43 min 后为西红花素类成分的色谱峰(图 1-B), 因此利用 HPLC 的可变波长功能将 2 类成分在一张色谱图上同时表征(图 1-C)。

采用上述已建立的指纹图谱方法, 分别对收集的 18 批不同产地或收集地梔子药材样品、1 批大红梔子和 3 批水梔子进行了 HPLC-DAD 指纹图谱测定, 并按上述方法将 2 类成分合在一张色谱图上, 结果见图 2。在梔子药材指纹图谱中, 京尼平苷(7 号峰)既是该指纹图谱中的最强峰, 又是有效成分。故以其为参照峰(S), 选取 18 批药材中都含有的 17 个特征峰作为梔子药材指纹图谱的共有峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 见表 2、3。

结果显示, 这些梔子药材化学成分的分布具有相似性, 每批药材被检测的色谱峰数目几乎相等; 在环烯醚萜类成分中, 京尼平苷的色谱峰占非常高的比例, 最高达 58.18%, 最低有 47.34%, 平均为 52.84%, 说明该化合物是环烯醚萜类成分的主要成分之一, 也是药材中主要成分之一。在西红花素类成分中, 西红花苷-1 的色谱峰占更高的比例, 最高达 66.56%, 最低有 54.99%, 平均为 61.68%, 说明该化合物是西红花素类成分的主要成分之一, 也是药材中主要成分之一。西红花素成分以 5 个色谱峰为主, 平均占西红花素成分的 95% 以上, 西红花苷-1、西红花苷-2、西红花苷-3 平均占西红花素成分的 76%

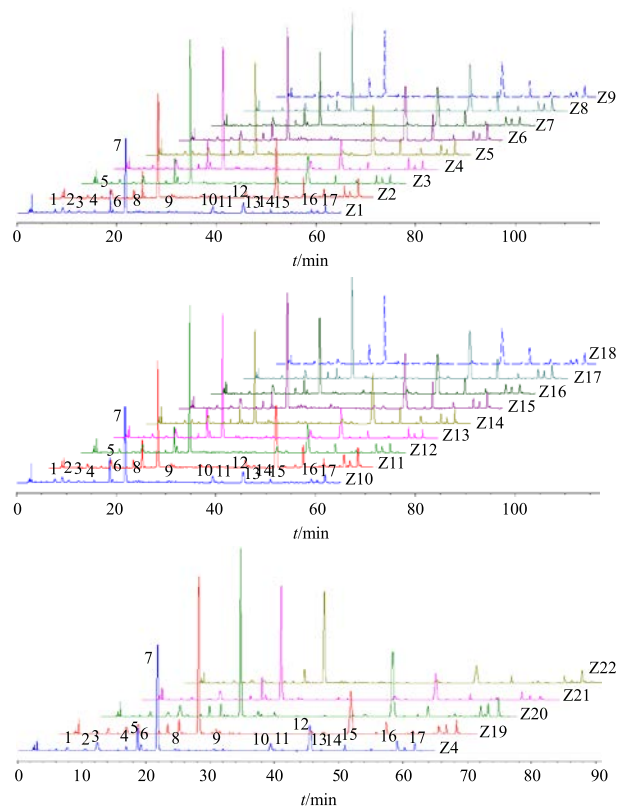


图 2 22 批样品指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprinting chromatograms of 22 batches of samples

以上。17 个共有峰中有 2 个共有峰峰面积归一化值大于 20%, 即京尼平苷和西红花苷-1, 就这 2 个主要成分来说, 药材之间的相互差异比较小, 18 批药材, 京尼平苷、西红花苷-1 的 RSD 分别为 7.24%、4.19%; 其余共有峰峰面积归一化值均小于 10%, RSD 在 20% 以上。

3.2 HPLC 指纹图谱主要色谱峰的 LC-MS 鉴定

为了尽可能多地了解 HPLC 指纹图谱中各成分的结构信息, 实验采用 LC-ESI-MS 对梔子样品进行进一步分析, 结合对照品及与文献对照^[10-12], 确定了 15 个色谱峰的归属, 其中 14 个峰通过对照品鉴定归属。分析和指认的结果见图 3、4 和表 4。

3.3 梔子类药材的指纹图谱直观比较

根据上述梔子指纹图谱条件, 获得了水梔子、大红梔子的指纹图谱, 色谱图及特征峰面积归一化值见图 2 和表 5、6。从 3 类梔子药材的高效液相色谱结果显示, 水梔子、大红梔子的指纹图谱中可以找到与梔子保留时间一致的 17 个共有峰, 但是各成分的含量差异比较大, 而且在水梔子、大红梔子都出现差异成分, 见图 5、6。

表2 18批栀子药材的17个共有峰的相对峰面积

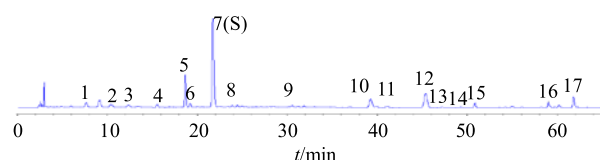
Table 2 Normalization 17 common peak area of chromatographic fingerprint of 18 batches of *Gardeniae Fructus*

编号	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	峰12	峰13	峰14	峰15	峰16	峰17
Z1	0.052	0.048	0.038	0.000	0.230	0.035	1.000	0.018	0.022	0.139	0.022	1.080	0.180	0.000	0.204	0.098	0.410
Z2	0.032	0.023	0.13	0.048	0.180	0.015	1.000	0.031	0.027	0.100	0.034	1.280	0.230	0.091	0.135	0.062	0.210
Z3	0.029	0.019	0.093	0.015	0.120	0.039	1.000	0.012	0.015	0.069	0.030	1.030	0.160	0.061	0.160	0.12	0.170
Z4	0.031	0.017	0.120	0.026	0.160	0.050	1.000	0.014	0.015	0.110	0.024	1.080	0.140	0.046	0.228	0.089	0.170
Z5	0.037	0.023	0.120	0.030	0.140	0.038	1.000	0.035	0.024	0.072	0.040	1.300	0.220	0.084	0.131	0.077	0.200
Z6	0.034	0.035	0.130	0.042	0.096	0.016	1.000	0.032	0.030	0.039	0.000	1.200	0.280	0.072	0.111	0.070	0.190
Z7	0.035	0.028	0.180	0.047	0.160	0.046	1.000	0.024	0.042	0.082	0.036	1.270	0.250	0.072	0.155	0.10	0.150
Z8	0.035	0.023	0.130	0.043	0.074	0.023	1.000	0.031	0.025	0.000	0.000	1.160	0.230	0.066	0.124	0.084	0.160
Z9	0.035	0.042	0.120	0.031	0.190	0.000	1.000	0.028	0.022	0.089	0.020	1.170	0.260	0.082	0.096	0.073	0.180
Z10	0.038	0.042	0.200	0.039	0.071	0.062	1.000	0.028	0.041	0.043	0.031	1.280	0.230	0.073	0.152	0.096	0.190
Z11	0.033	0.026	0.082	0.012	0.160	0.024	1.000	0.013	0.011	0.078	0.018	1.020	0.200	0.058	0.148	0.086	0.210
Z12	0.050	0.000	0.100	0.027	0.170	0.079	1.000	0.019	0.048	0.065	0.033	1.290	0.110	0.052	0.198	0.11	0.110
Z13	0.034	0.025	0.170	0.045	0.096	0.033	1.000	0.034	0.029	0.049	0.049	1.320	0.210	0.072	0.113	0.083	0.160
Z14	0.031	0.023	0.100	0.015	0.160	0.038	1.000	0.012	0.018	0.099	0.016	1.110	0.160	0.056	0.178	0.088	0.180
Z15	0.048	0.030	0.120	0.019	0.170	0.049	1.000	0.026	0.027	0.095	0.031	1.351	0.140	0.062	0.196	0.078	0.180
Z16	0.030	0.024	0.110	0.027	0.160	0.020	1.000	0.017	0.014	0.073	0.026	1.101	0.220	0.068	0.117	0.088	0.180
Z17	0.030	0.055	0.074	0.029	0.097	0.012	1.000	0.036	0.017	0.073	0.042	1.077	0.140	0.029	0.181	0.063	0.270
Z18	0.025	0.025	0.085	0.035	0.130	0.017	1.000	0.026	0.011	0.096	0.025	1.028	0.170	0.056	0.151	0.059	0.190
平均	0.036	0.028	0.120	0.029	0.140	0.033	1.000	0.024	0.024	0.077	0.027	1.170	0.200	0.061	0.154	0.085	0.190
RSD/%	20.63	44.74	33.29	45.66	29.76	59.60	0.00	34.17	43.60	40.92	48.57	9.67	24.08	34.56	23.90	19.75	31.84

表3 18批栀子药材的17个共有峰的相对保留时间

Table 3 Relative retention time of 17 common peaks of chromatographic fingerprint of 18 batches of *Gardeniae Fructus*

编号	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	峰12	峰13	峰14	峰15	峰16	峰17
Z1	0.35	0.48	0.57	0.79	0.86	0.88	1.00	1.14	1.41	1.81	1.89	2.09	2.33	2.53	2.72	2.78	2.85
Z2	0.35	0.48	0.57	0.78	0.88	0.88	1.00	1.13	1.40	1.80	1.89	2.09	2.34	2.52	2.73	2.78	2.85
Z3	0.34	0.48	0.57	0.76	0.86	0.89	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.10	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z4	0.35	0.49	0.57	0.78	0.86	0.88	1.00	1.14	1.42	1.81	1.90	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z5	0.35	0.48	0.57	0.78	0.87	0.88	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.77	2.85
Z6	0.35	0.48	0.58	0.78	0.86	0.88	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.09	2.34	2.52	2.72	2.78	2.86
Z7	0.35	0.48	0.57	0.78	0.86	0.87	1.00	1.12	1.39	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z8	0.35	0.47	0.57	0.77	0.87	0.88	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z9	0.36	0.48	0.57	0.78	0.86	0.88	1.00	1.13	1.40	1.81	1.90	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z10	0.35	0.48	0.56	0.78	0.86	0.88	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z11	0.35	0.49	0.57	0.78	0.86	0.88	1.00	1.13	1.41	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z12	0.35	0.48	0.57	0.79	0.86	0.89	1.00	1.14	1.40	1.80	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z13	0.35	0.48	0.57	0.78	0.85	0.88	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.77	2.85
Z14	0.35	0.48	0.56	0.78	0.86	0.88	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.73	2.78	2.85
Z15	0.35	0.47	0.57	0.78	0.86	0.88	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z16	0.35	0.48	0.57	0.76	0.86	0.88	1.00	1.15	1.39	1.81	1.89	2.10	2.33	2.53	2.72	2.78	2.85
Z17	0.34	0.48	0.55	0.78	0.86	0.88	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.85
Z18	0.36	0.46	0.57	0.78	0.86	0.89	1.00	1.13	1.40	1.81	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.78	2.86
RSD/%	1.39	1.41	1.09	1.01	0.72	0.54	0.00	0.57	0.48	0.18	0.17	0.15	0.14	0.13	0.12	0.12	0.11



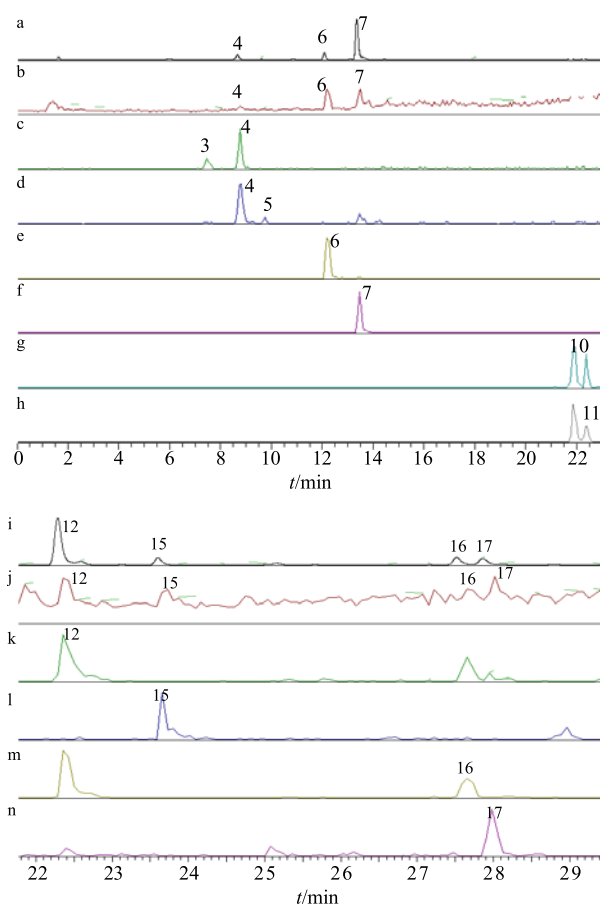
1-京尼平苷酸 2-去乙酰基车叶草苷 3-羟基梔子苷 4-鸡矢藤次苷甲酯 5-京尼平龙胆双糖苷 6-绿原酸 7-京尼平苷 10-对香豆酰京尼平龙胆双糖苷 11-4"-对-香豆酰京尼平龙胆双糖苷 12-西红花苷-1 13-5-咖啡酰-4-芥子酰奎宁酸甲酯 14-3,4-二咖啡酰-5-(羟甲基) 戊二酰奎宁酸 15-西红花苷-2 16-1-顺-西红花苷-1 17-西红花苷-3
1-geniposidic acid 2-deacetylasperulosidic acid methyl ester 3-gardenoside 4-scandoside methyl ester 5-genipin-1-β-D-gentiobioside 6-chlorogenic acid 7-geniposide 8-unknown peak 9-unknown peak 10-6"-O-p-trans-coumaroylgenipin 11-4"-O-p-trans-coumaroylgenipin 12-crocin-1 13-5-O-caffeoyl-4-O-sinapoylquinic acid methyl ester 14-3,4-di-caffeoyl-5-(3-hydroxy-3-methyl) glutaroylquinic acid, 15-crocin-2 16-1-cis-crocin-1 17-crocin-3

图3 梔子的指纹图谱峰归属

Fig. 3 Standard HPLC fingerprinting chromatogram of *Gardeniae Fructus*

3.4 梔子类药材指纹图谱的系统聚类分析

系统聚类分析 (cluster analysis, CA) 又称集群分析, 是按“物以类聚”原则研究事物分类的一种多元统计方法, 根据样本的多指标 (变量)、多个观察数据, 定量地确定样品、指标之间存在的相似性或亲疏关系, 找出一些能够度量样品之间相似程度的统计量, 以这些统计量作为划分类型的依据, 把相似程度较大的样品聚合为一类, 相似度高的聚合到一个小的分类单位, 相似度低的聚合到一个大的分类单位, 直到把所有的样品聚合完毕, 构成分类树状图。



a、i-紫外光谱图 b、j-总离子流图 c、d、e、f、g、h、k、l、m、n-选择离子图

a, i-LC-UV chromatogram monitored at 238 nm b, j-total ion current (TIC) c, d, e, f, g, h, k, l, m, n-selected ion current

图4 梔子的 HPLC-DAD-ESI-MS 分析

Fig. 4 HPLC-DAD-ESI-MS analyses of *Gardeniae Fructus*

表4 梔子液相色谱中色谱峰的鉴定

Table 4 Identification of components of *Gardeniae Fructus* in chromatogram by LC/DAD/MS

峰号	鉴定成分	<i>m/z</i>	$\lambda_{\max}/\text{nm}$
1*	京尼平苷酸	419 [M+HCOO] ⁻	235
2*	去乙酰基车叶草苷	422 [M+NH ₄] ⁺	238
3*	羟基梔子苷	449 [M+HCOO] ⁻ , 403 [M-H] ⁻ , 422 [M+NH ₄] ⁺	238
4*	鸡矢藤次苷甲酯	449 [M+HCOO] ⁻	238
5*	京尼平龙胆双糖苷	595 [M+HCOO] ⁻ , 551 [M+H] ⁺ , 568 [M+NH ₄] ⁺	238
6*	绿原酸	399 [M+HCOO] ⁻ , 353 [M-H] ⁻	235, 320
7*	京尼平苷	433 [M+HCOO] ⁻ , 777 [2M+H] ⁺ , 406 [M+NH ₄] ⁺	238
10*	对香豆酰京尼平龙胆双糖苷	741 [M+HCOO] ⁻ , 714 [M+NH ₄] ⁺	238, 320
11*	4"-对-香豆酰京尼平龙胆双糖苷	714 [M+NH ₄] ⁺ , 719 [M+Na] ⁺	232, 316
12*	西红花苷-1	994 [M+NH ₄] ⁺ , 999 [M+Na] ⁺ , 675 [M+Na-324] ⁺	316, 440
13*	5-咖啡酰-4-芥子酰奎宁酸甲酯	659 [M-H] ⁻ , 678 [M+NH ₄] ⁺	235, 328
14*	3,4-二咖啡酰-5-(羟甲基) 戊二酰奎宁酸	559 [M-H] ⁻	232, 328
15*	西红花苷-2	832 [M+NH ₄] ⁺ , 837 [M+Na] ⁺ , 859 [M+HCOO] ⁻	325, 440
16	1-顺-西红花苷-1	1 021 [M+HCOO] ⁻ , 994 [M+NH ₄] ⁺	325, 440
17*	西红花苷-3	670 [M+NH ₄] ⁺ , 675 [M+Na] ⁺ , 697 [M+HCOO] ⁻	328, 440

*根据对照品鉴定

*identified by the standards

表 5 水栀子、大红栀子的 17 个特征峰的相对峰面积

Table 5 Data of normalization peak area of 17 peaks of *G. jasminoides* f. *logocarpa* and *G. jasminoides* var. *grandiflora*

编号	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	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17
Z19	0.037	0.069	0.097	0.040	0.064	0.006	1.000	0.027	0.013	0.027	0.020	1.00	0.136	0.042	0.101	0.096	0.160
Z20	0.035	0.042	0.113	0.040	0.052	0.013	1.000	0.033	0.013	0.000	0.000	1.092	0.084	0.028	0.099	0.099	0.154
Z21	0.029	0.000	0.127	0.023	0.149	0.041	1.000	0.012	0.000	0.068	0.013	1.090	0.124	0.040	0.178	0.090	0.085
Z22	0.031	0.050	0.046	0.011	0.103	0.000	1.000	0.018	0.012	0.056	0.000	0.819	0.166	0.040	0.153	0.060	0.269

表 6 水栀子、大红栀子的 17 个特征峰的相对保留时间

Table 6 Relative retention time of 17 peaks of *G. jasminoides* f. *logocarpa* and *G. jasminoides* var. *grandiflora*

编号	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	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16	峰 17
Z19	0.35	0.48	0.58	0.78	0.86	0.90	1.00	1.13	1.40	1.81	1.88	2.09	2.34	2.52	2.72	2.80	2.85
Z20	0.36	0.48	0.57	0.78	0.86	0.90	1.00	1.13	1.41	1.81	1.89	2.10	2.34	2.53	2.72	2.80	2.85
Z21	0.35	0.49	0.57	0.78	0.86	0.90	1.00	1.12	1.40	1.81	1.89	2.09	2.33	2.53	2.73	2.80	2.85
Z22	0.35	0.48	0.57	0.78	0.87	0.90	1.00	1.13	1.40	1.82	1.89	2.09	2.34	2.53	2.72	2.80	2.84

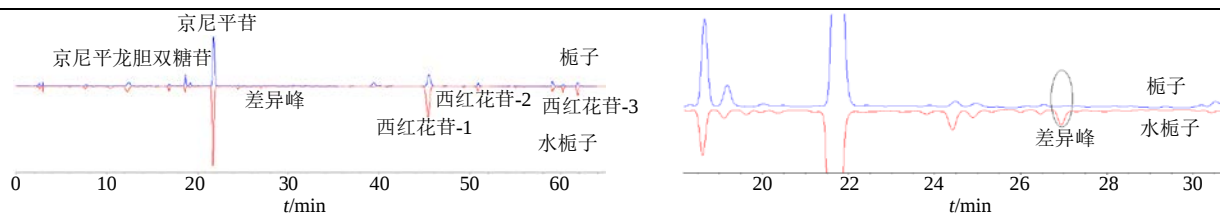


图 5 栀子与水栀子的高效液相色谱图比较

Fig. 5 Comparison on fingerprint chromatograms of *G. jasminoides* and *G. jasminoides* f. *logocarpa*

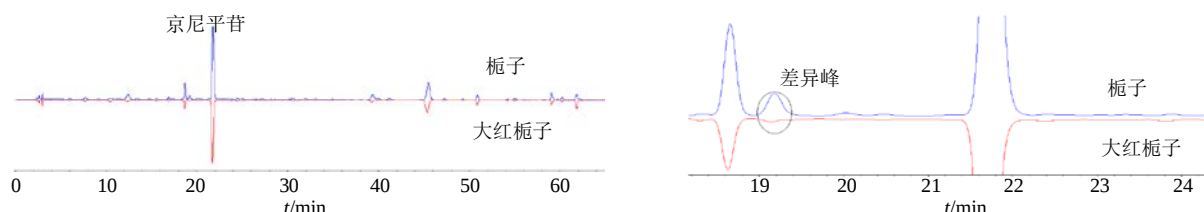


图 6 栀子与大红栀子的高效液相色谱图比较

Fig. 6 Comparison on fingerprint chromatograms of *G. jasminoides* and *G. jasminoides* var. *grandiflora*

采用组间均联法 (between-groups linkage), 以欧式距离平方 (squared euclidean distance) 作为样品的测度, 对 22 批药材采用系统聚类分析法进行模式识别分析。聚类分析的结果见图 7。

根据聚类分析的树状图, 22 份样品被分成了 3 大类: 第 1 大类为栀子药材 (除上海华宇药业); 第 2 大类为水栀子药材; 第 3 大类为大红栀子药材, 这与药材的性状鉴别结果是一致的。

18 份栀子药材除上海华宇药业收购的栀子 (Z1) 外均聚为一类, Z1 药材外观性状为灰棕色, 里面种子团为暗黄色, 可能为近成熟的干燥栀子果实, 其 HPLC

图谱表明京尼平苷峰面积归一化值几乎为最低值、西红花苷-1 峰面积归一化值最小, 其他成分也较低, 说明 Z1 栀子药材质量较差, 从而使其成为离群样本。

3.5 栀子类药材指纹图谱的 PCA

PCA 是一种掌握主要矛盾的统计方法。PCA 通过线性变换, 将原来多个指标组合成相互独立的少数几个能反映总体信息的指标, 即以最少的丢失信息为代价, 将众多的观测变量浓缩为少数几个因子, 该方法对于多元复杂事物的研究具有重要意义, 它可以从多元事物中揭示现象的主要方面, 找出事物发展的主要倾向, 帮助人们了解生命活动的

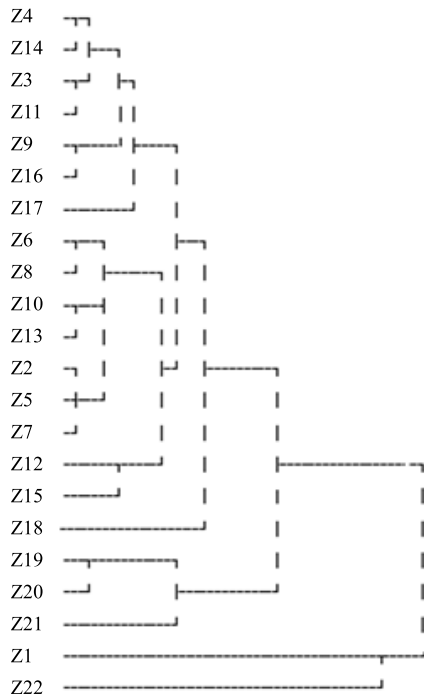


图 7 22 批栀子类药材聚类分析树状图

Fig. 7 Cluster analysis of 22 batches of *Gardeniae Fructus*

规律,从而达到掌握和认识生命现象的本质。

按上述指纹图谱方法建立 22 批样品的 HPLC 色谱图,采用二极管阵列检测器 (DAD),记录每个色谱峰在全波长 (200~700 nm) 的紫外吸收光谱图。以每个色谱峰的保留时间为定性指标,以峰高为定量指标,以京尼平苷为参照峰,统计各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。选择斜率大于 5,峰宽大于 0.05,峰高大于 5 的色谱峰,结合各色谱峰的相对保留时间和紫外吸收特征确定了 22 批样品的 32 个特征峰 (各批次样品中相对保留时间差异允许在 1% 范围内),运用 MVSP3.1 (Multi-Variate Statistical Package) 软件,对上述的 22×32 阶的数据矩阵进行 PCA,结果如下,从表 7 所示,前 3 个主成分的累积贡献率可达 79.519%,前 4 个主成分的累积贡献率可达 88.957%,说明通过引用前 4 个主成

表 7 PCA 的特征值、贡献率、累积贡献率

Table 7 Eigenvalues, contribution rate and accumulating contribution rate of PCA

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	35.571	39.576	39.576
2	24.755	27.543	67.119
3	11.145	12.400	79.519
4	8.484	9.439	88.957

分即可以代表样品 88% 以上的信息,证明该组数据有突出的成分可以依据,适用于 PCA。第一主成分的贡献率为 39.576%,第二主成分的贡献率为 27.543%,见图 8。依据每个样本的得分 (PCA case scores) 所作的 22 个样本的分布图。从图 8 中可以看出,22 个样本可分为 A、B、C 3 个区,其中 A 区为栀子药材样本,B 区为水栀子药材样本,C 区为大红栀子药材样本。Z1 为上海华宇药业收购的栀子,为离群样本。

因此,3 种药材的系统聚类分析结果与 PCA 结果是一致的,均能将栀子、水栀子、大红栀子药材区别开来,而且能区分劣质的栀子药材。

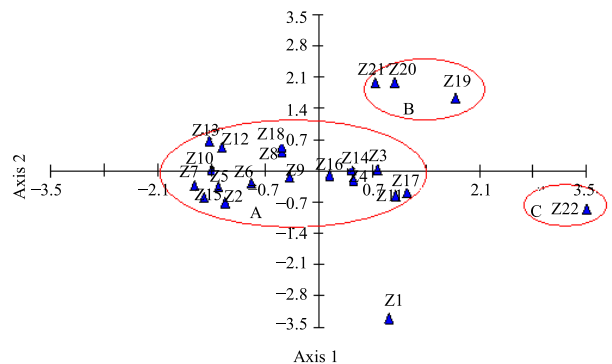


图 8 栀子类药材的 PCA 分布图

Fig. 8 PCA plot of *Gardeniae Fructus*

4 讨论

江西为栀子的道地产区,所产栀子因皮薄、色红、饱满、品质优良,被称为“小红栀”,畅销全国及东南亚地区。国内学者主要是对不同产地栀子的指纹图谱研究较多,但对栀子属其他药材如水栀子、大红栀子的指纹图谱研究几乎没有报道。因此本实验建立了不同产地的栀子及市场上栀子的主要混淆品的高效液相指纹图谱,标记了 17 个共有峰,比较全面反映了 3 类栀子药材的化学成分信息,方法简单、快捷。

栀子、水栀子及大红栀子 3 类药材的指纹色谱的色谱峰个数几乎相同,仅含量差异大。进一步应用聚类分析及 PCA 对指纹图谱进行了综合分析,发现能将栀子、水栀子、大红栀子 3 类药材区别开来,同时能将颜色不合格的栀子药材区分出来,说明颜色这一性状鉴别特征是栀子质量标准的重要标志。

栀子中含有环烯醚萜类、西红花素类、黄酮类、有机酸类等成分,国内外学者^[13-14]应用 LC-MS 对栀子中的多个成分的鉴定较少,主要集中于少数几

个含量高的成分,比如环烯醚萜类如京尼平苷、京尼平龙胆双糖苷,西红花素类如西红花苷-1、西红花苷-2。本实验采用 LC/MS 对栀子类药材的高效液相指纹图谱的色谱峰进行了归属,共鉴定 15 个色谱峰,其中 14 个色谱峰通过对照品对照鉴定,提高了鉴定的准确度,对栀子及其制剂的质量鉴定具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 71 卷, 第 1 册) [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [2] 蔡少青, 李 军. 常用中药材品种整理和质量研究. 北方编第 5 册 [M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2001.
- [3] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 [M]. 第 2 版北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [4] 谢宗万. 中药品种理论与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [5] 付小梅, 彭水梅, 刘 婧, 等. HPLC 法同时测定栀子类药材中 10 个主要有效成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(4): 615-621.
- [6] 冀云涛, 朱小玲, 李 斌, 等. RP-HPLC 法同时测定蒙药复方协日嘎-4 中栀子苷、京尼平-1- O - β -D-龙胆二糖苷、西红花苷-1、西红花苷-3 的含量 [J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2016, 47(6): 604-608.
- [7] 孙 娜, 徐 钢, 赵 远, 等. HPLC 测定栀子不同炮制品中栀子苷、绿原酸和西红花苷-I 含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 50-53.
- [8] 单玉庆, 刘 青, 张群正, 等. 高效液相色谱-离子阱质谱法研究栀子提取工艺 [J]. 中国药业, 2007, 16(7): 26-28.
- [9] 贾 琳, 张 浩, 陈 维, 等. HPLC 同时测定栀子药材中栀子苷和西红花苷-1 的含量 [J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(3): 223-225.
- [10] Wang S C, Huang C M, Tsai T H. Determinations of geniposide using LC/MS/MS methods via forming ammonium and acetate adducts [J]. *Microchemical J*, 2007, 86(2): 174-182.
- [11] 刘 青, 曹瑞军, 赵 欣, 等. 栀子水提物的 HPLC-ESI-MS 分析 [J]. 中成药, 2007, 29(11): 1651-1654.
- [12] 姚 超, 辛 华, 陆兔林, 等. 不同产地栀子的超高效液相色谱指纹图谱及模式识别研究 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(1): 63-67.
- [13] 苗 琦, 罗光明, 罗扬婧, 等. 栀子多波长 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3159-3164.
- [14] 陈建中, 葛水莲, 乔莉娟, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定肉制品中栀子黄色素 [J]. 食品科技, 2016, 37(1): 290-294.