

## 鳖甲 HPLC 指纹图谱的分析模式探讨

肖云芝<sup>1,2</sup>, 万露<sup>1,3</sup>, 刘朝勇<sup>1,2</sup>, 李晓荣<sup>1,2</sup>, 韩晋<sup>1\*</sup>, 袁海龙<sup>2\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 中国人民解放军第三〇二医院, 北京 100039;  
3. 江西中医药大学, 南昌 330000)

**[摘要]** 目的:建立不同产地鳖甲药材的高效液相指纹图谱评价方法。方法:采用 HPLC-DAD 方法测定了 12 个产地鳖甲药材样品,通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 A 进行评价,建立了共有模式,以相关度评价图谱的相似性,对结果进行聚类分析和主成分分析。结果:12 批不同产地的鳖甲药材有 7 个共有峰,其高效液相色谱指纹图谱相似度均在 0.9 以上,不同产地鳖甲药材可分为两类,质量相似性较好;主成分分析结果同聚类分析法分析结果一致,经主成分分析,12 批鳖甲药材共提取出 3 个主成分,其累积贡献率达 83.21%。结论:用 SPSS 软件对鳖甲药材的指纹图谱进行主成分分析及聚类分析,所建立的模式识别方法,操作简便,统计结果具有可靠性,对鳖甲药材化学计量学分类及其质量评价提供有效参考。

**[关键词]** 鳖甲; 高效液相色谱; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0032-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060032

**Chemical Pattern Recognition Study on HPLC Fingerprint of Trionycis Carapax Based on Principal Component Analysis and Cluster Analysis** XIAO Yun-zhi<sup>1,2</sup>, WAN Lu<sup>1,3</sup>, LIU Chao-yong<sup>1,2</sup>, LI Xiao-rong<sup>1,2</sup>, HAN Jin<sup>1\*</sup>, YUAN Hai-long<sup>2\*</sup> (1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China; 3. Jiangxi University of TCM, Nanchang 330000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a sensitive and specific HPLC-fingerprint method for the quality control of Trionycis Carapax from different areas. **Method:** The samples from different areas were determined with the method. Mean chromatogram was generated as the representative standard fingerprint and the similarity of each chromatogram against the mean chromatogram was also calculated using the ‘Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine’ (Version 2004A). Samples were clustered using Hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) based on the ratio of characteristic peaks and standard peak. **Result:** Seven common peaks in the HPLC-fingerprint of Trionycis Carapax were obtained, and one peak was identified. In addition, all the similarities were over 0.9. 12 batches of Trionycis Carapax from different areas were classified into two groups based on hierarchical cluster, which showed the quality of Trionycis Carapax from different areas was in good consistency. The classification result according to PCA was consistent with the HCA. The PCA showed that seven common peaks were integrated into three principal components (PC) and their accumulation contributing rate amounted to 83.21%. **Conclusion:** SPSS 19.0 software can be used to cluster samples. Its operation is simple and convenient. The result of statistics is reliable and able to provide a reference for the chemometrics classification and quality evaluation of Trionycis Carapax.

**[Key words]** Trionycis Carapax; HPLC; chromatographic fingerprint; clustering analysis; principal component analysis (PCA)

鳖甲<sup>[1]</sup>具有滋阴潜阳、退热除蒸、软坚散结的功效。相关药理研究表明,鳖甲提取物能促进早期

**[收稿日期]** 20140527(005)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09201-201-14);国家自然科学基金项目(81073069)

**[第一作者]** 肖云芝,在读硕士,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究,Tel:010-66933312,E-mail:destiney7@163.com

**[通讯作者]** \*袁海龙,博士,研究员,博士生导师,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究,Tel:010-66933367,E-mail:yhlpharm@126.com;

\*韩晋,主任药师,博士生导师,从事中药新制剂、新剂型、新技术研究,Tel:010-66933225,E-mail:hanjin302emba@163.com

或者晚期肝硬化肝细胞恢复及纤维组织重吸收<sup>[2-5]</sup>。

采用综合的、量化的指纹图谱作为中药药材及其制剂的质量控制手段,具有与中医理论原则和中药作用机制相对应的整体性和模糊性<sup>[6-9]</sup>。

对鳖甲质量控制的研究报道较少,本研究采用高效液相色谱对不同产地的鳖甲进行指纹图谱分析,同时对其指纹图谱进行相似度评价和聚类分析,以期为鳖甲的控制建立有效的方法,同时为鳖甲的临床应用提供科学基础。

### 1 材料

BT-25S型精密电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),LC-20AT型高效液相色谱仪(含在线脱气机,四元梯度泵,自动进样器,DAD检测器,日本岛津),RE52型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。所购买鳖甲经解放军三〇二医院袁海龙研究员鉴定为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* 的背甲。尿苷(批号YY10961),鸟苷(批号YY10964)对照品购自上海源叶生物科技有限公司。色谱甲醇,重蒸水,其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Arcus EP C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~35 min, 88% A; 35~45 min, 88%~80% A; 45~70 min, 80.0% A),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,柱温室温,检测波长 254 nm,进样量 20 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 取尿苷、鸟苷对照品适量,精密称定,置量瓶中,加甲醇制成含尿苷、鸟苷 36.68, 27.2 mg·L<sup>-1</sup> 的混合溶液,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 将 12 批鳖甲于 40 °C 干燥 30 min,粉碎(过 80 目筛),精密称定约 5.0 g,加 75% 乙醇 50 mL,回流提取 1.5 h,滤过,残渣加 75% 乙醇 50 mL 继续回流 1.5 h,合并 2 次滤液,减压浓缩至约 20 mL,加水至 25 mL 左右,放置 24 h,滤除沉淀,滤液经减压浓缩至 25 mL,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续溶液即得。

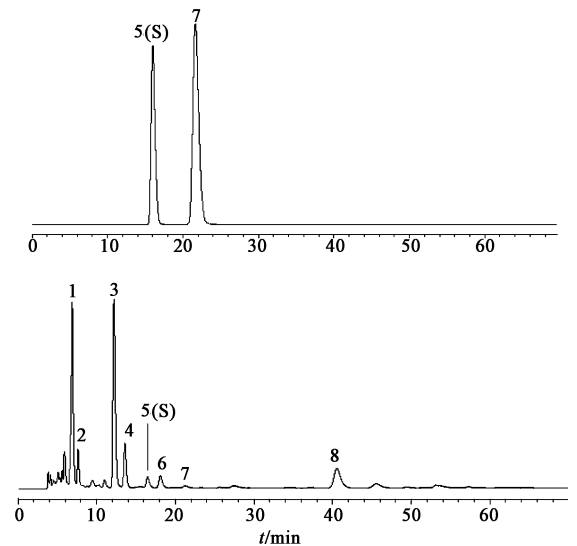
**2.4 精密度试验** 取同一供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次进行测定,计算各主要色谱峰与参比峰(峰 5)的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各主要色谱峰相对保留时间 RSD < 1.0%,相对峰面积 RSD < 3.7%,表明仪器精密度良好。

**2.5 稳定性试验** 取同一供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h,按 2.1 项下色谱条件进行测定,计算各主要色谱峰与参比峰(峰 5)的相对保留时间和

相对峰面积。结果显示,各主要色谱峰相对保留时间 RSD < 1.2%,相对峰面积 RSD < 2.3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.6 重复性试验** 取同一批鳖甲粉末 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进行测定,计算各主要色谱峰与参比峰(峰 5)的相对保留时间和相对峰面积。结果显示,各主要色谱峰相对保留时间 RSD < 1.3%,相对峰面积 RSD < 2.2%,表明本方法重复性良好。

**2.7 共有峰的标定** 采用相对保留时间标定共有指纹峰,结果 12 批鳖甲标定了 7 个共有峰,占总峰面积的 73.4%。与混合对照品比对,鉴定出 5 号峰,7 号峰分别为尿苷、鸟苷,见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 5(S). 尿苷; 7. 鸟苷

图 1 鳖甲药材 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of *Trionyx Carapax*

**2.8 共有峰相对保留时间和相对面积** 供试品溶液色谱图中以 5 号峰(尿苷)为参照峰,其相对保留时间和峰面积为 1,计算指纹图谱共有峰的相对保留时间及峰面积比值,结果见表 1, 2。

**2.9 鳖甲指纹图谱相似度评价** 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”2004A 版,对各产地供试品 HPLC 图谱进行处理,生成对照指纹图谱,12 批鳖甲药材的色谱图见图 2,同时计算各批次药材相似度,见表 3。

由相似度计算结果可知,12 批次药材的相似度均在 0.926~0.991,表明了各批次间相似度较高,同时也反映了药材在化学成分组成上基本相同,但在组分含量上存在一定的差异,样品 S1(江西九江),S2(安徽安庆),S4(浙江金华),S5(浙江嘉兴)

表 1 不同产地鳖甲指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of common peaks of Trionycis Carapax samples from different areas

供试品	相对保留时间					
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 6	峰 8
S1	0.421	0.462	0.741	0.837	1.099	2.475
S2	0.427	0.469	0.743	0.833	1.1053	2.514
S3	0.419	0.464	0.741	0.826	1.098	2.458
S4	0.419	0.462	0.741	0.830	1.098	2.410
S5	0.418	0.460	0.740	0.826	1.097	2.467
S6	0.418	0.463	0.741	0.825	1.098	2.429
S7	0.425	0.466	0.743	0.815	1.104	2.478
S8	0.427	0.469	0.741	0.826	1.104	2.454
S9	0.419	0.462	0.740	0.838	1.098	2.441
S10	0.419	0.464	0.742	0.827	1.099	2.493
S11	0.419	0.461	0.740	0.838	1.097	2.450
S12	0.430	0.469	0.741	0.825	1.103	2.450

注:5 号峰为参照峰。表 2 同。

表 2 不同产地鳖甲药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak area of common peaks of Trionycis Carapax samples from different areas

供试品	相对峰面积					
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 6	峰 8
S1	5.920	1.360	13.968	3.643	1.177	0.432
S2	6.286	2.334	6.254	2.776	1.309	0.505
S3	6.492	1.809	9.947	4.014	1.534	0.544
S4	11.547	3.240	13.818	3.724	1.017	0.635
S5	11.590	2.396	14.212	3.819	1.578	0.532
S6	12.247	2.367	13.937	3.613	0.490	0.488
S7	11.147	2.591	23.965	3.149	1.728	0.795
S8	11.024	1.360	12.437	3.643	1.177	0.430
S9	6.286	2.334	6.400	2.776	1.309	0.524
S10	6.492	1.809	9.947	4.014	1.234	0.546
S11	10.501	2.390	6.734	4.290	1.008	0.539
S12	6.104	1.713	10.941	4.441	1.243	0.377

均含有第 7 号峰(鸟苷),其余产地的药材在该保留时间下未见色谱峰,也表明了不同产地鳖甲药材的组分存在差异。

**2.10 鳖甲指纹图谱聚类分析** 将不同产地鳖甲的 HPLC 指纹图谱中 7 个共有峰与峰 5(S)的比值组成 12×7 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 19.0 软件对其进行分析,采用最短距离法,利用欧氏距离平方为样品测度,聚类分析结果见图 3。由树状聚类图可看出,

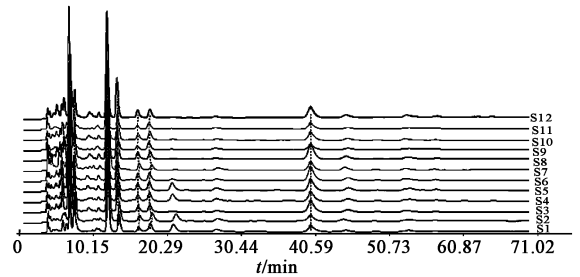


图 2 不同产地鳖甲的 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC-fingerprints of twelve batches of Trionycis Carapax samples

表 3 不同产地鳖甲 HPLC 指纹图谱相似度

Table 3 Similarity analysis of Trionycis Carapax from different areas

No.	采集地点	相似度	No.	采集地点	相似度
S1	江西九江	0.965	S7	河南商城	0.926
S2	安徽安庆	0.982	S8	湖北孝感	0.974
S3	安徽芜湖	0.984	S9	湖北黄陂	0.976
S4	浙江金华	0.991	S10	湖北监利	0.977
S5	浙江嘉兴	0.991	S11	湖南常德	0.939
S6	浙江吴兴	0.987	S12	湖南邵阳	0.955

12 个样品多数可聚为一类,其中 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S8, S9, S10, S11, S12 为一类, S7(河南商城)单独成为一类。同时结合色谱图观察,第 1 号峰、第 3 号峰在 12 批次鳖甲药材中含量均较大,12 批次鳖甲药材的相似度均较高,大多数能聚为一类。但样品 S7(河南商城)药材峰的变化与样品 S9(湖北黄陂), S10(湖北监利), S11(湖南常德)相似却未能聚为一类,分析原因,可能是样品 S7(河南商城)药材中第 3 号峰面积是 12 批药材中最大的,为其余产地鳖甲药材的 2 倍及其以上,从而导致样品 S7(河南商城)独成一类。

本研究使用系统聚类法(hierarchical cluster),并利用欧氏距离平方(squared euclidean distance)作为样品测度,以欧氏距离平方为测度,聚类分析结果侧重于体现各药材之间“量”的差异,故由结果可看出 S7(河南商城)的“量”与其他批次的鳖甲药材存在一定的差异,本研究的聚类分析结果与相似度评价一致。

**2.11 鳖甲指纹图谱主成分分析**<sup>[11]</sup> 本实验运用 SPSS 19.0 统计分析软件对 12 批次鳖甲进行主成分分析,得到主成分方差以及初始因子载荷矩阵,结果见表 4,5,由主成分的贡献率可知,PC1 的贡献率最大为 36.744%, PC2 和 PC3 贡献率其次分别为

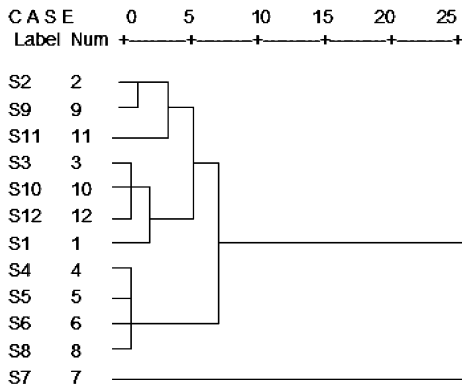


图 3 不同产地鳖甲 HPLC 指纹图谱聚类分析

Fig. 3 Hierarchical clustering analysis of *Trionycis Carapax* samples from different areas

25.299%, 21.169%, 其他成分的贡献率较小, 系统自动提取了前 3 个特征根大于 1 的主成分, 其累计方差贡献率达到 83.212%, 可用这 3 个主成分新变量代替原有的 7 个变量。故选取分析所得的第 1 主成分, 第 2 主成分和第 3 主成分作图, 得到 3 个主成分的得分图, 见图 4, 图中每个点对应 1 个样品, 可知, 12 批次样品可分为 2 类, S7 (河南商城) 为一类, 其余批次为一类, 结果与聚类分析结果相符, 即可验证聚类结果合理。

表 4 鳖甲主成分分析贡献率及累计贡献率

Table 4 Turtle contribution rate and cumulative contribution rate of principal component in *Trionycis Carapax* samples from different areas

主成分 序号	初始特征值			提取特征值		
	特征根	方差 贡献率 /%	积累方差 贡献率 /%	特征根	方差 贡献率 /%	积累方差 贡献率 /%
	1	2.572	36.744	36.744	2.572	36.744
2	1.771	25.299	62.043	1.771	25.299	62.043
3	1.482	21.169	83.212	1.482	21.169	83.212

表 5 鳖甲主成分初始因子载荷矩阵

Table 5 Matrix of initial factors

峰位	主成分		
	1	2	3
1	0.569	0.341	0.640
2	0.405	0.822	-0.110
3	0.328	-0.410	0.737
4	0.839	-0.36	0.011
6	0.356	-0.560	-0.603
8	0.596	0.554	-0.359

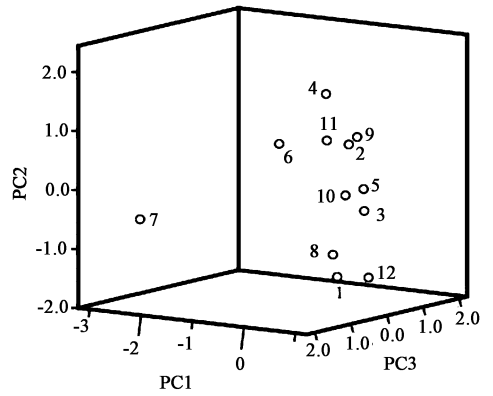


图 4 鳖甲主成分得分

Fig. 4 Principal component analysis score

初始因子载荷矩阵中, 每一个载荷量表示主成分与对应变量的相关系数, 将主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根便得到 3 个主成分中每个指标所对应的系数, 经计算可得主成分模型为:  $F_1 = 0.355X_1 + 0.253X_2 + 0.205X_3 + 0.523X_4 + 0.222X_6 + 0.372X_8$ ;  $F_2 = 0.256X_1 + 0.618X_2 - 0.308X_3 - 0.271X_4 - 0.421X_6 + 0.416X_8$ ;  $F_3 = 0.526X_1 - 0.009X_2 + 0.605X_3 + 0.009X_4 - 0.496X_6 - 0.295X_8$ , 其中  $F_1, F_2, F_3$  表示 3 个主成分,  $X_1, X_2, X_3, \dots, X_8$  表示各个色谱峰 (峰 1, 2, 3, \dots, 8) 相对于参照峰 (峰 5) 的相对峰面积。在 3 个主成分中,  $F_1$  是特征值最大的, “信息量最全面”的指标, 而第 1 主成分中  $X_4$  的系数最大, 表明峰 4 的量在鳖甲药材的质量控制中有相对重要的作用, 本实验室将进一步分析峰 4 为何种化合物, 为鳖甲的质量控制提供科学依据。

### 3 讨论

取同一批鳖甲, 以 50%, 75%, 95% 乙醇溶剂制备供试品溶液, 进样并检测, 结果以 75% 乙醇提取样品的色谱峰数较多, 谱图特征性较强; 同时, 对提取方法 (加热回流、超声、冷浸等) 也进行了考察, 结果以加热回流测得的色谱峰信息丰富, 因此选择 75% 乙醇, 加热回流为最佳提取方法。

由于鳖甲是动物药, 其成分复杂, 大多数文献只报道其药理作用, 关于鳖甲质量控制的研究文献极少。本研究通过梯度洗脱模式建立鳖甲指纹图谱, 该方法图谱指纹性较强, 且色谱峰大部分得到了基线分离。在本研究中, 经对照品 HPLC 图定位出一共有峰 (尿苷), 在已有的研究文献中未见报道。采用二极管阵列检测器做全波长扫描, 考察了不同吸收波长图谱, 结果表明, 254 nm 处各成分具有较好的紫外吸收, 色谱信息较为全面, 而且避免了溶剂末

端吸收的影响。

由12批鳖甲药材的指纹图谱相似度评价结果可知,各批次之间的相似度均较高,说明各产地鳖甲的质量具有一定的稳定性,但由12批鳖甲共有峰的相对峰面积比值可看出不同产地鳖甲成分的含量存在一定的差异,这可能是受环境因素的影响,有必要对鳖甲的生长环境进行考察,建立鳖甲的GAP培育基地,从源头保证鳖甲的质量。

本研究对不同产地鳖甲HPLC指纹图谱进行了相似度评价,并使用系统聚类分析及主成分分析化学模式识别的方法,对数据进行分析,两种分类方法相互验证,表明该方法合理,说明了指纹图谱和模式识别相结合为药材质量控制提供了科学依据。通过指纹图谱对中药进行综合宏观分析,并结合聚类分析及主成分分析结果,不仅保证了共有模式建立的代表性和科学性,也促进药材及制剂研制水平和质量控制的全面提高。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.  
[2] 唐尹萍,刘焱文,许腊英. 中药鳖甲提取物抗肝纤维化的实验研究[J]. 湖北中医药大学学报,2011,13

(2):44-46.

[3] 施婧妮,陈进文,高建蓉,等. 鳖甲炮制前后抗肝纤维化有效物质部位HPCE指纹图谱的比较研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(2):63-66.  
[4] 李彬,郭力城. 鳖甲的化学成分和药理作用研究概况[J]. 中医药信息,2009,26(1):25-27.  
[5] 王拥泽,杨宏志,林炳亮,等. 加减鳖甲煎治疗肝硬化失代偿期的临床研究[J]. 中药材,2007,30(6):755-757.  
[6] 易伦朝,吴海,梁逸曾. 色谱指纹图谱与中药质量控制[J]. 色谱,2008,26(2):166-171.  
[7] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略[J]. 中药新药与临床药理,2001,12(3):141-151.  
[8] Jiang Y, David B, Tu P F, et al. Recent analytical approaches in quality control of traditional Chinese medicines—A review[J]. Anal Chim Acta, 2010, 657(1):9-18.  
[9] 罗国安,王义明,曹进. 多维多息特征谱及其应用[J]. 中成药,2000,22(6):395-397.  
[10] 韩晔华,霍飞凤,杨悠悠. 中药指纹图谱研究的某些进展与展望[J]. 色谱,2008,26(2):142-152.  
[11] 许禄. 化学计量学[M]. 北京:科学出版社,2004.

[责任编辑 顾雪竹]