

茯苓 HPLC 指纹图谱及化学模式识别

宋潇^{1,2}, 谢昭明^{2*}, 黄丹¹, 刘塔斯¹, 邓富民¹, 舒志芬¹, 刘金香¹, 冉玲菊¹, 李如意¹

(1. 湖南中医药大学 湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 长沙 410208;
2. 湖南省中医药研究院 中药研究所, 长沙 410013)

[摘要] **目的:**建立茯苓药材 HPLC 指纹图谱,并进行主成分聚类分析,为其质量控制提供有效、可靠的实验依据。**方法:**采用 CAPCELL PAK C₁₈ MG II S5 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱,检测波长 242 nm,柱温 25 ℃,应用 SPSS 软件对数据进行统计学分析。**结果:**建立了茯苓药材 HPLC 指纹图谱共有模式,并使用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行了模式识别。**结论:**将指纹图谱和模式识别结合起来进行中药材质量控制是一种行之有效的方法,可较全面的反映茯苓药材中化学成分的信息,为评价茯苓药材提供了科学实验依据。

[关键词] 茯苓; 指纹图谱; 高效液相色谱; 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)17-0036-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170036

HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition of Poria SONG Xiao^{1,2}, XIE Zhao-ming^{2*}, HUANG Dan¹, LIU Ta-si¹, DENG Fu-min¹, SHU Zhi-fen¹, LIU Jin-xiang¹, RAN Ling-ju¹, LI Ru-yi¹
(1. Provincial and Ministerial Key Laboratory Breeding Base of Traditional Chinese Medicine Powder and Innovative Medicine in Hunan, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC fingerprint of Poria and make the principal component cluster analysis, in order to provider the effective and reliable experimental basis for its quality control. **Method:** The HPLC analysis was performed on a CAPCELL PAK C₁₈ MG II S5 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the column temperature at 25 ℃. The mobile phase was water containing 0.1% phosphoric acid and acetonitrile in the gradient mode. The detection wavelength was set at 242 nm. All data was analyzed by the SPSS statistical software. **Result:** The common mode of HPLC fingerprint was established, and the cluster analysis and principal component analysis (PCA) were applied to study 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 traditional Chinese medicinal materials and can reflect the comprehensive information of Poria and provide the scientific experimental basis for evaluating Poria.

[Key words] Poria; fingerprint; HPLC; hierarchical cluster analysis; principal component analysis

茯苓具有利水渗湿、健脾化痰、宁心安神的功
能^[1-3],其主要有效成分为三萜类和多糖类,具有抑
制肿瘤生长、调节机体免疫等功能^[4-5],2010年版
《中国药典》质量控制仅限于性状、显微鉴别和薄层
鉴别,至今无明确指标衡量茯苓药材品质。指纹图
谱针对中药多组分、多靶点的特点,从“全成分”角

度出发进行质量控制^[6],该方法准确、重复性好、操
作简便可行^[7]。基于主成分分析和聚类分析的模式
识别研究,为指纹图谱提供了更加全面的评价方
法。本实验通过建立茯苓高效液相指纹图谱共有模
式,并结合主成分分析和聚类分析用于不同产地茯
苓药材的模式识别,为该药材的质量标准建立和

[收稿日期] 20141028(009)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI01B09)

[第一作者] 宋潇,在读硕士,从事中药资源及药用植物栽培研究,Tel:18973615040

[通讯作者] * 谢昭明,研究员,硕士生导师,从事中药资源及药用植物栽培研究,E-mail: xzm1962@126.com

GAP 种植提供科学依据。

1 仪器与试药

1260 系列高效液相色谱仪(含 DAD 检测器,在线真空脱气机、四元梯度泵、柱温箱,美国 Agilent 公司),色谱数据的采集与处理由 Agilent 化学工作站完成。茯苓酸 A(批号 140213),茯苓酸 B(批号 140723),去氢茯苓酸(批号 140903),松苓新酸(批号 140902)对照品均购自成都克洛玛有限公司;甲醇、磷酸、乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司),水为超纯水。本实验所用茯苓药材经湖南省中医药研究院中药研究所谢昭明研究员鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核,共 22 批,详细资料见表 1。

表 1 茯苓样品来源

Table 1 Origins of Poria samples collected

No.	产地	No.	产地
1	湖南省怀化市 01	12	湖北省英山县石头嘴镇 01
2	湖南省怀化市 02	13	湖北省英山县石头嘴镇 02
3	湖南省怀化市 03	14	江西省宁都县
4	湖南省怀化市 04	15	云南省普洱市思茅区
5	湖南省长沙市铜关镇	16	云南省昆明市(野生)
6	安徽省金寨县	17	云南省丽江市
7	安徽省岳西县	18	广西省蒙山县
8	安徽省霍山县漫水河镇 01	19	广西省百色市
9	安徽省霍山县漫水河镇 02	20	广西省
10	湖北省罗田县九资河镇 01	21	贵州省都匀市
11	湖北省罗田县九资河镇 02	22	广东省韶关市翁源县

2 方法与结果

2.1 色谱条件 CAPCELL PAK C₁₈ MG II S5 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min, 52% ~ 55% A; 20 ~ 40 min, 55% ~ 58% A; 40 ~ 65 min, 58% ~ 80% A; 65 ~ 80 min, 80% ~ 100% A; 80 ~ 90 min, 100% A),检测波长 242 nm,柱温 25 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,记录时间 90 min。

2.2 供试品溶液的制备 取茯苓药材粉末(过 80 目筛)约 5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,精密称定,超声提取 20 min,冷却至室温,精密称定,补足减失的质量,滤过,精密吸取续滤液 25 mL,置于蒸发皿中,水浴蒸干,残留物用甲醇分次溶解、洗涤,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,微孔滤膜(0.45 μm)滤过,即得。

2.3 混合对照品溶液制备 取经 105 °C 干燥至恒

重的茯苓酸 A 对照品约 7 mg,去氢茯苓酸约 5 mg,茯苓新酸 B 约 6 mg,松龄新酸约 6 mg,精密称定,分别置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得对照品储备液。依次精密吸取上述储备液 6.00, 8.00, 7.00, 4.00 mL,置同一 25 mL 量瓶中,摇匀,制成混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,测得各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样测定,其各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3.0%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取同一批茯苓药材粉末(过 80 目筛)6 份,分别按 2.2 项下操作制备供试品溶液,进样,测得其各共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3.0%,表明重复性较好。

2.5 茯苓 HPLC 指纹图谱的建立 根据 22 批不同产地茯苓药材供试品溶液 HPLC 图提供的相关参数,建立茯苓药材三萜类成分的指纹图谱,见图 1。比较 22 批茯苓样品的色谱图,确定了 20 个共有峰。其中 9 号峰峰面积较大,经对照品比对归属为茯苓酸 A,且不同批次样品中稳定存在,故选其为参照峰,其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积均通过 9 号峰比对获得。结果显示,各个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 3.0%,但各个共有峰的相对峰面积的 RSD 有很大差异,以峰 11, 14, 19 所代表成分最为明显,说明这 3 个色谱峰所代表的成分在各药材样品中的量存在很大差异。

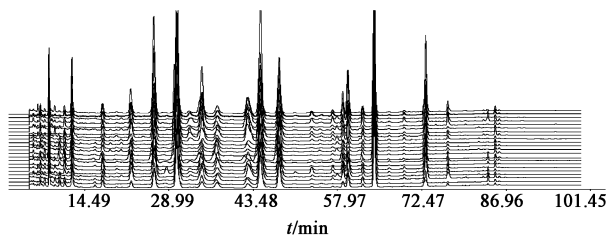
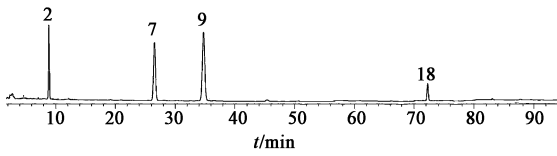


图 1 22 批茯苓药材 HPLC 指纹谱
Fig. 1 HPLC fingerprint of twenty-two batches of Poria

将茯苓指纹图谱共有模式图谱与混合对照品对照,见图 2, 3。指认其中 4 个色谱峰,分别为去氢茯苓酸、茯苓酸 B、茯苓酸 A 以及松苓新酸。

采用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004 A 版,经平均数法进行多



2. 去氢茯苓酸; 7. 茯苓酸 B; 9. 茯苓酸 A; 18. 松苓新酸

图 2 混合对照品指纹谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of hybrid reference substance

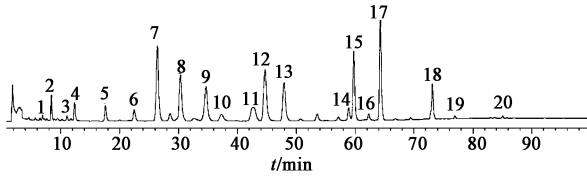


图 3 茯苓指纹谱共有模式

Fig. 3 HPLC fingerprint of Poria

点校正,对色谱峰进行自动匹配生成样品的色谱指纹图谱共有模式,以第 14 批药材图谱作为参照图谱,进行相似度计算,结果见表 2。分析结果显示 5, 14, 19 号样品相似度 < 0.90, 其余样品相似度均 > 0.90。

表 2 茯苓样品相似度评价

Table 2 Results of similarity evaluation of Poria

No.	相似度	No.	相似度	No.	相似度
1	0.994	9	0.988	16	0.992
2	0.962	10	0.921	17	0.958
3	0.938	11	0.971	18	0.925
4	0.985	12	0.981	19	0.866
5	0.854	13	0.976	20	0.969
6	0.963	14	0.863	21	0.954
7	0.975	15	0.970	22	0.957
8	0.992				

2.6 化学模式识别

2.6.1 聚类分析(HCA) 首先对 22 批茯苓进行系统聚类分析,应用 SPSS 17.0 软件,采用组间均联法 (between group linkage),以欧氏距离 (euclidean metric) 作为样品的分类依据。22 批样品可分为 2 类,样品 15 为一类;其余样品为另一类,聚类分析结果见图 4。

2.6.2 主成分分析(PCA) 采用 SPSS 17.0 软件分别以共有峰的峰面积作为数据源进行主成分分析, KNO 检验值为 0.724, Bartlett's 检验均为 $P < 0.05$,表明数据适于主成分分析,提取 PC1 ~ PC4 4 个主成分,解释了总方差累计贡献率的 85.182%。根据排名,样品 15 总因子得分最高,归为一类,其余

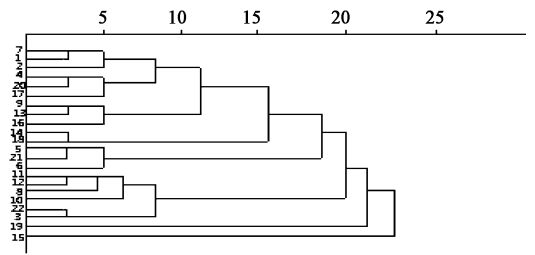


图 4 茯苓样品聚类分析

Fig. 4 Hierarchical clustering analysis of Poria samples

样品归为一类,该统计结果与聚类分析基本一致。22 批茯苓样品的主成分得分值 (PC1 ~ PC4), 总因子得分值 (F) 及按 F 值排名情况见表 3。

表 3 22 批茯苓样品的主成分得分、总因子得分及排名

Table 3 PCA scores and rankings of twenty-two batches of Poria

No.	PC1	PC2	PC3	PC4	F	排名
1	-0.898 8	0.133 7	-0.194 6	-0.993 5	-0.105 6	12
2	-0.807 7	-0.021 0	-1.069 5	-0.598 9	0.131 1	11
3	-0.316 2	-0.288 5	3.825 7	-0.087 3	-1.050 9	21
4	-0.669 0	-0.642 0	0.252 8	-0.602 9	-1.031 9	20
5	0.463 0	-1.497 7	-0.557 8	-1.519 0	-0.373 8	14
6	0.967 8	0.612 9	-0.427 1	-0.781 1	0.888 1	5
7	-1.025 9	0.840 2	-0.754 5	0.014 8	0.518 0	6
8	0.468 0	0.966 9	-0.153 6	0.806 4	0.907 2	4
9	-0.509 4	0.747 2	-0.233 2	0.398 4	0.286 9	8
10	-0.940 0	0.829 7	0.246 6	1.103 8	-0.700 4	16
11	-0.204 4	0.943 4	-0.058 0	1.365 5	-0.170 3	13
12	0.096 1	1.519 1	-0.736 0	0.939 4	1.517 8	2
13	-0.924 9	0.115 4	0.155 5	0.011 5	-0.956 4	19
14	-0.098 2	-1.484 6	-0.701 6	1.211 6	-0.840 5	17
15	2.830 4	1.738 0	0.067 7	-0.916 1	1.710 1	1
16	-0.570 9	-0.266 5	0.121 5	-0.632 1	-0.547 3	15
17	-0.223 8	-0.676 6	-0.210 2	-0.801 3	-0.912 7	18
18	-0.137 1	-0.658 2	-0.062 1	1.706 1	0.255 1	10
19	2.143 3	-1.958 4	0.269 9	1.796 7	0.260 8	9
20	-0.819 4	-0.788 1	-0.203 9	-0.494 5	-1.067 9	22
21	0.859 4	-0.828 2	-0.925 5	-0.939 0	0.353 6	7
22	0.317 7	0.663 5	1.347 9	-0.988 4	0.929 0	3

3 讨论

本实验采用 DAD 检测器进行全波长监测,结果显示,在 242 nm 时,基线较平稳,检出峰各峰比例适中,能基本反映出茯苓提取物中多成分的整体面貌,故选择以 242 nm 作为检测波长。分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水-磷酸、乙腈-水-磷酸 4 个流动

相系统^[8],结果表明采用乙腈-水-磷酸流动相系统洗脱效果较好。同时考察了120 min的色谱图显示,90 min后无其他色谱峰出现。

结合主成分分析法和聚类分析2种化学计量学方法对茯苓药材进行了模式识别的探讨,两者的判断结果较一致,将茯苓药材样品分为两类,各批茯苓药材之间既存在一定程度的相似性又存在明显的差异,主要原因可能是受气候、海拔、土壤类型、菌种、种植方法等因素影响,有待进一步的考证。其中样品15三萜成分含量高,优于其他批次茯苓药材样品,样品15来源于云南普洱市,也印证了云南作为传统茯苓道地产区的科学性^[9]。主成分分析能够筛选出共有的特征成分,指导发现决定性要素,与聚类分析结合使用,可相互支持,相互依托,弥补了单纯用相似度评价指纹图谱的不足,更为客观地评价中药真伪与优劣,可作为控制药材质量的一种手段^[10]。

[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,2010:224.
[2] 清·黄奭. 神农本草经[M]. 北京:中医药古籍出版

社,1982.

[3] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008:4229.
[4] 张思访,刘静涵,蒋建勤,等. 茯苓的化学成分和药理作用及开发利用[J]. 中华实用中西医杂志,2005,18(2):227-230.
[5] 张敏,高晓红,孙晓萌,等. 茯苓的药理作用及研究进展[J]. 北华大学学报:自然科学版,2008,9(1):63-65.
[6] 王文燕,赵强,张铁军,等. 决明子的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药,2009,40(10):1638-1641.
[7] 陈蓉,沈蓓,吴启南. 基于主成分分析和聚类判别模式对不同产地芡实 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2012,34(5):781-787.
[8] 张琦,王振中,萧伟,等. 茯苓 UPLC 特征指纹图谱[J]. 中国中药杂志,2012,37(7):966-968.
[9] 王克勤,傅杰,苏玮,等. 道地药材茯苓疏[J]. 中药研究与信息,2002,4(6):16-17.
[10] 黄琪,雷鹏,李新,等. 中毛两面针药材 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(5):918-923.

[责任编辑 顾雪竹]