

苦杏仁指纹图谱的建立及质量评价

董自亮^{1,2}, 徐瑞超², 官柳², 冉亚东², 秦郁文², 黄静², 胡林峰³, 秦少容^{2*}, 傅超美^{1*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司, 重庆 408000;
3. 重庆医药高等专科学校, 重庆 401331)

[摘要] 目的:评价不同产地苦杏仁的质量,建立苦杏仁药材指纹图谱,并进行主成分分析和聚类判别。方法:采用 Inertsil ODS-3 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸水溶液进行梯度洗脱,检测波长 215 nm,体积流量 1.0 mL·min⁻¹,测定 10 个不同产地苦杏仁指纹图谱,建立苦杏仁的 HPLC 指纹图谱,通过相似度评价,结合聚类分析和主成分分析(PCA),对不同批次的苦杏仁药材进行质量评价。结果:建立了苦杏仁指纹图谱共有模式,标定了 12 个共有峰,并采用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行模式识别。结论:所建立的苦杏仁指纹图谱表征方法为不同产地苦杏仁的质量评价及合理采收提供了理论依据;河北采集的苦杏仁质量较佳,可以作为华盖散处方中苦杏仁的优选来源产地。

[关键词] 苦杏仁; 高效液相色谱; 指纹图谱; 来源产地

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0060-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110060

Establishment of Fingerprints of Semen Armeniacae Amarum and Its Quality Evaluation

DONG Zi-liang^{1,2}, XU Rui-chao², GUAN Liu², RAN Ya-dong², QIN Yu-wen²,
HUANG Jing², HU Lin-feng³, QIN Shao-rong^{2*}, FU Chao-mei^{1*}

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;
2. Taiji Group Chongqing Fuling Pharmaceuticals Co. Ltd., Chongqing 408000, China;
3. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the quality of Semen Armeniacae Amarum collected from various habitats. To establish an HPLC fingerprint of Semen Armeniacae Amarum collected from various habitats, and to make evaluation by principal component analysis and cluster analysis. **Method:** Inertsil ODS-3 C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution as mobile phase for gradient elution. The detective wavelength was 215 nm and the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹. HPLC fingerprints of Semen Armeniacae Amarum from ten different sources were set up. Similarity evaluation combined with hierarchical clustering analysis (HCA) and principal components analysis (PCA) were used to evaluate the quality of Semen Armeniacae Amarum herb from ten different sources. **Result:** The common mode of HPLC fingerprints for Semen Armeniacae Amarum was established and 12 common peaks were marked in the fingerprints. The cluster analysis and principal component analysis were applied for pattern recognition. **Conclusion:** The established fingerprints method provides scientific foundation for the reasonable collection and quality evaluation of Semen Armeniacae Amarum. The Semen Armeniacae Amarum collected in Hebei province has better quality.

[Key words] Semen Armeniacae Amarum; HPLC; fingerprint; source

[收稿日期] 20150602(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09508-105)

[第一作者] 董自亮,在读博士,从事中药新制剂新技术, Tel:18225129378, E-mail: dzledutcm@163.com

[通讯作者] * 秦少容,主任药师,从事新药研究与开发, E-mail: srqin@163.com;

* 傅超美,博士,教授,博士生导师,从事中药新制剂和新剂型研究与开发, E-mail: chaomeifu@126.com

苦杏仁来源于蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* var. *ansu*, 西伯利亚杏 *P. sibirica*, 东北杏 *P. mandshurica* 或杏 *P. armeniaca* 的干燥成熟种子^[1], 收载于历版《中国药典》, 具有降气止咳平喘、润肠通便之功效, 而苦杏仁苷 ($C_{20}H_{27}NO_{11}$) 是其止咳平喘的主要药效成分^[2], 占药材 3.0% 以上。

HPLC 指纹图谱是一种从“全成分”的角度出发的现代中药质量控制方法, 顺应了中药多组分、多靶点的特点, 现已成为国内外广泛接受的中药质量控制评价模型^[3-5]。本研究采用 HPLC-DAD 检测系统建立了检测不同产地采收的苦杏仁的指纹图谱, 并对苦杏仁苷的含量进行了测定; 通过相似度评价, 结合聚类分析和主成分分析 (PCA), 对不同批次的苦杏仁药材进行质量评价, 为苦杏仁质量综合评价提供参考。

1 材料

1200 型 DAD 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), BP211D 型电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司)。

苦杏仁苷对照品 (批号 11082-200403, 中国食品药品检定研究院)。乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 纯水为自制。

苦杏仁来自 10 个产地, 共 10 批, 经太极集团有限公司质检中心鉴定均为正品。10 个药材样品的来源分别为山西临汾 (S1), 山西安塞 (S2), 山西大同 (S3), 河北承德 (S4), 河北兴隆 (S5), 河北围场 (S6), 甘肃庆阳 (S7), 甘肃平凉 (S8), 甘肃陇西 (S9), 山西隰县 (S10)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 选用 Inertsil ODS-3 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μ m), 流动相乙腈 (A)-0.05% 磷酸水溶液 (B) 进行梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 5% ~ 10% A; 20 ~ 25 min, 10% ~ 20% A; 25 ~ 30 min, 20% ~ 25% A; 30 ~ 35 min, 25% ~ 30% A; 35 ~ 40 min, 30% ~ 45% A; 40 ~ 50 min, 45% ~ 55% A), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 215 nm, 进样量 10 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密量取苦杏仁苷对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 80 μ g 苦杏仁苷的对照品溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取过 60 目筛的苦杏仁药材粉末 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇 45 mL, 摇匀, 称定质量, 超声提取 30 min (功率 250 kW, 频率 40 kHz), 取出, 放冷, 以 80% 甲

醇补足质量, 摇匀, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.3 方法学试验

2.3.1 精密度试验 取同一供试品, 连续进样 6 次, 以苦杏仁苷峰为参照峰, 考察谱图中各主要色谱峰相对保留时间及峰面积。结果显示, 各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均 < 0.8%, 相对峰面积的 RSD 均 < 2.2%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品, 分别在 0, 4, 8, 12, 16, 24, 30, 36 h 进样, 以苦杏仁苷峰为参照峰, 考察各主要谱图中色谱峰相对保留时间及峰面积。结果显示, 各主要色谱峰相对保留时间的 RSD 均 < 1.1%, 相对峰面积的 RSD 均 < 2.6%, 表明供试品溶液在 36 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批苦杏仁粉末 (60 目), 按 2.2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 分别进样, 以苦杏仁苷峰为参照峰, 考察各谱图中主要色谱峰相对保留时间及峰面积。结果显示, 各色谱峰的相对保留时间的 RSD 均 < 1.3%, 相对峰面积的 RSD 均 < 2.5%, 表明重复性良好。

2.4 结果与分析

2.4.1 指纹图谱共有峰的标定 根据 10 批苦杏仁药材的 HPLC 指纹图谱, 标定了其中 12 个色谱峰作为苦杏仁 HPLC 指纹图谱的共有峰, 12 个共有峰的面积之和占整体峰面积之和 90% 以上, 符合中药指纹图谱的相关技术要求, 见图 1; 10 批样品共有峰相对保留时间及相对峰面积见表 1, 2。

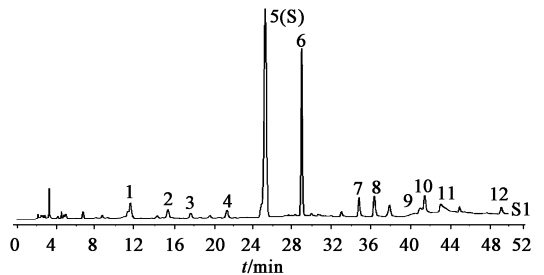


图 1 苦杏仁共有峰 HPLC

Fig. 1 HPLC of common peaks of Semen Armeniaca Amarum

2.4.2 样品测定 将各批次苦杏仁药材按上述 HPLC 指纹图谱方法测定, 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” (2004A 科研版) 软件进行相似度计算, 见图 2, 表 3。

2.4.3 产地与苦杏仁质量关系的聚类分析 聚类分析是根据不同样品相似程度将其归类, 目前在中药材的真伪优劣鉴别、质量评价、品种分类等方面已得到越来越广泛的应用^[6-7]。本研究分别以苦杏仁指纹图谱中 12 个共有峰的相对峰面积为变量, 用

表 1 12 个共有色谱峰的相对保留时间

Table 1 Relative retention time of 12 common chromatographic peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.455	0.455	0.456	0.457	0.457	0.456	0.456	0.457	0.456	0.456
2	0.609	0.609	0.609	0.608	0.608	0.606	0.606	0.606	0.606	0.605
3	0.699	0.698	0.699	0.699	0.700	0.699	0.699	0.699	0.699	0.699
4	0.845	0.845	0.846	0.846	0.846	0.845	0.845	0.845	0.845	0.845
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	1.148	1.149	1.147	1.147	1.147	1.148	1.148	1.148	1.148	1.148
7	1.376	1.379	1.378	1.378	1.378	1.379	1.380	1.379	1.379	1.380
8	1.437	1.441	1.440	1.440	1.440	1.441	1.442	1.440	1.441	1.442
9	1.626	1.628	1.625	1.625	1.624	1.626	1.626	1.626	1.627	1.627
10	1.645	1.648	1.644	1.644	1.643	1.644	1.645	1.644	1.645	1.645
11	1.708	1.712	1.708	1.708	1.707	1.709	1.710	1.709	1.711	1.710
12	1.951	1.956	1.952	1.952	1.951	1.954	1.954	1.953	1.954	1.953

表 2 12 个共有色谱峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of 12 common chromatographic peaks

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
1	0.136	0.138	0.061	0.059	0.067	0.038	0.068	0.073	0.067	0.052
2	0.038	0.033	0.033	0.030	0.036	0.030	0.026	0.027	0.028	0.035
3	0.036	0.040	0.021	0.019	0.024	0.019	0.036	0.039	0.031	0.025
4	0.032	0.035	0.033	0.033	0.035	0.034	0.032	0.035	0.032	0.043
5	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
6	0.384	0.479	0.416	0.348	0.455	0.419	0.287	0.360	0.409	0.764
7	0.064	0.066	0.064	0.060	0.065	0.067	0.057	0.059	0.062	0.075
8	0.106	0.118	0.105	0.089	0.083	0.076	0.067	0.070	0.069	0.087
9	0.034	0.034	0.032	0.031	0.035	0.028	0.044	0.025	0.044	0.030
10	0.072	0.080	0.070	0.061	0.081	0.064	0.040	0.048	0.064	0.091
11	0.056	0.068	0.067	0.065	0.073	0.076	0.065	0.067	0.099	0.088
12	0.025	0.028	0.028	0.026	0.030	0.045	0.033	0.034	0.043	0.039

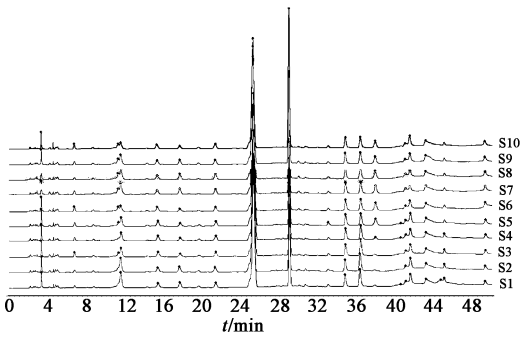


图 2 苦杏仁 HPLC 指纹谱

Fig. 2 HPLC fingerprint of Semen Armeniaca Amarum

SPSS 16.0 数据统计软件,采用组间均连法,以欧氏距离的平方(squared euclidean distance)为测度,进行聚类分析研究,见图 3。根据苦杏仁药材 HPLC 特征图谱聚类分析的结果,将苦杏仁药材大致可分为 2 类, I 类包括 S3, S4, S5, S10, S6, S9, S7, S8; II 类包括 S1, S2。

2.4.4 主成分分析 分别以苦杏仁指纹图谱中 12 个共有峰的峰面积为变量,用 SPSS 16.0 统计分析

表 3 苦杏仁指纹谱相似度

Table 3 Similarity evaluation on whole plant of Semen Armeniaca Amarum

编号	相似度	苦杏仁苷 /%	编号	相似度	苦杏仁苷 /%
S1	0.978	6.166	S7	0.988	5.432
S2	0.979	5.817	S8	0.998	5.633
S3	0.990	5.668	S9	0.999	5.467
S4	0.989	6.421	S10	0.968	6.208
S5	0.991	6.416	对照图谱	1	
S6	0.992	6.439			

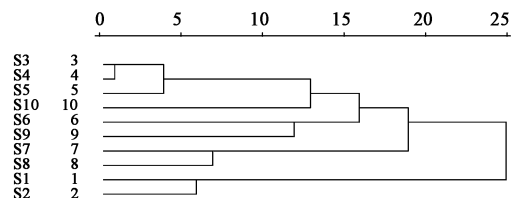


图 3 10 个产地苦杏仁聚类分析树状关系

Fig. 3 Dendrogram of cluster analysis on Semen Armeniaca Amarum from 10 habitats

软件对已做标准化处理的数据进行主成分分析 (PCA), 以主成分的特征根、方差贡献率及累计贡献率作为选择主成分的依据。

对 10 个不同产地苦杏仁样品的 12 个共有峰为变量进行主成分分析, 主成分个数提取原则是选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 80.15%, 包含了苦杏仁指纹图谱的大部分信息, 第 1 主成分特征值为 4.80, 方差贡献率为 39.99%; 第 2 主成分特征值为 3.23, 方差贡献率为 26.95%; 第 3 主成分特征值为 1.59, 方差贡献率为 13.21%。以第 1, 2, 3 主成分来建立坐标系, 进行投影即可得到样本的 PCA 三维投影图, 见图 4。图中每个点分别对应 1 个共有峰, 12 个共有峰可分为 3 类。载荷因子是主成分分析中重要变量贡献的集, 载荷因子矩阵可以显示各变量对主成分的贡献大小。苦杏仁药材指纹图谱 PCA 旋转后的公共因子负荷矩阵见表 4。峰 1, 峰 2, 峰 7, 峰 8 对因子 1 的贡献最大, 峰 5, 峰 9 对因子 2 的贡献最大。可见, 主要因子基本由峰面积较大的主要色谱峰贡献, 利用主成分分析方法将苦杏仁指纹图谱中的 12 个特征变量降维至 3 个主成分, 可快速、方便分析与评价苦杏仁指纹图谱的整体数据信息。

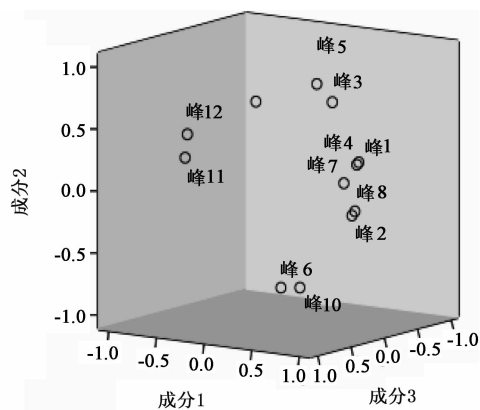


图 4 苦杏仁指纹图谱三维投影
Fig. 4 3D loading scatter plot of HPLC fingerprint of Semen Armeniacae Amarum from different habitats

3 讨论

比较了甲醇, 70% 甲醇, 80% 甲醇, 90% 甲醇提取制备供试品, 结果发现, 采用 80% 甲醇提取的样品色谱峰最多且整体分离效果较佳。同时考察了加热回流与超声提取 2 种方法, 结果发现 2 种方法所得色谱峰整体峰貌及峰面积相当, 因而采用相对简单且高效的超声提取方法。对超声时间、溶剂用量等参数进行考察, 最终确定了超声时间及溶剂用量。

分别尝试了乙腈(甲醇)-水、乙腈(甲醇)-

表 4 主要因子载荷矩阵

Table 4 Main factor loading matrix

序号	因子 1	因子 2	因子 3
峰 1	0.857	0.258	0.046
峰 2	0.900	-0.128	0.182
峰 3	0.371	0.665	-0.281
峰 4	0.228	0.080	-0.881
峰 5	0.393	0.852	-0.017
峰 6	-0.028	-0.842	-0.079
峰 7	0.851	0.135	0.233
峰 8	0.918	-0.096	0.161
峰 9	0.060	0.740	0.421
峰 10	0.508	-0.718	0.402
峰 11	-0.641	0.226	0.481
峰 12	-0.818	0.355	0.195

0.05% 磷酸水溶液、乙腈(甲醇)-0.1% 磷酸水溶液、乙腈(甲醇)-0.2% 磷酸水溶液等不同流动相系统, 结果显示以乙腈-0.05% 磷酸水溶液为流动相系统得到的整体色谱峰峰形好且稳定。通过二极管阵列检测器于 200~400 nm 波长扫描, 同时比较了 205, 215, 225, 254, 280 nm 不同波长下色谱图信息, 结果显示 215 nm 波长下色谱图的色谱峰信息量最多、基线噪音相对较低, 各成分分离情况相对较佳, 因此本研究选择 215 nm 作为该指纹图谱的检测波长。

本研究建立了苦杏仁指纹图谱并进行了计量学分析, 综合苦杏仁指纹图谱相似度分析、聚类分析、主成分分析以及苦杏仁苦含量等, 对苦杏仁药材进行系统的质量评价, 结果显示在收集的 10 个不同产地的苦杏仁药材中, 以河北产的质量较佳, 尤以河北省围场县产苦杏仁药材质量最好。

[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: 187.
- [2] 刘涛, 刘利国, 高晓霞, 等. 高效液相色谱法测定麻杏石甘汤中苦杏仁苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(8): 1040-1041.
- [3] 郝子博, 王丽莉, 张铁军. 落花生茎叶 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2012, 43(10): 2050-2054.
- [4] 关洪月, 李林, 刘晓, 等. 中药指纹图谱相似度计算方法探析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 282-287.
- [5] 张小梅, 柯秀梅, 励娜, 等. 藏族药翼首草的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 75-78.
- [6] 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): 899-902.
- [7] 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.

[责任编辑 顾雪竹]