

## 广西金樱子 HPLC 指纹图谱

冯阳, 陈玉梅, 辛华\*

(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

**[摘要]** 目的:建立广西产金樱子的 HPLC 指纹图谱,并进行聚类分析和主成分分析,为评价其质量提供依据。方法:采用十八烷基硅烷键合硅胶为固定相,以甲醇-0.2%磷酸水溶液作为流动相,进行梯度洗脱,柱温 25 ℃,流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 255 nm,进样量 10 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.1 版软件对 10 批样品进行共有峰确认及相似度评价。运用 SPSS 22.0 统计学软件对 HPLC 指纹图谱进行聚类分析和主成分分析。结果:色谱评价软件共标定出共有色谱峰 13 个,从中选择了 10 个稳定性好,吸收峰强,特征明显的色谱峰作为金樱子指纹图谱的共有峰。用对照品指认了其中的 3 个化学成分,分别为儿茶素、橙皮苷、芦丁。10 批金樱子样品指纹图谱的相似度均 >0.96。通过聚类分析,将不同产地的 10 批样品分为 3 类,并且 2 个主成分的累计方差贡献率为 82.98%。结论:该研究能为广西金樱子质量标准的提高提供数据支持,并为其品质与开发利用提供评价依据。

**[关键词]** 金樱子; 高效液相色谱指纹图谱; 儿茶素; 橙皮苷; 芦丁; 相似度评价; 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(2017)05-0079-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050079

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1432.076.html>

**[网络出版时间]** 2016-12-07 14:32

## HPLC Fingerprint of *Rosae Laevigatae Fructus* in Guangxi

FENG Yang, CHEN Yu-mei, XIN Hua\*

(School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of *Rosae Laevigatae Fructus* from Guangxi and make cluster analysis and principal component analysis in order to provide a basis for its quality control. **Method:** ODS column was used with methanol-0.2% phosphoric acid solution as the mobile phase for gradient elution. The column temperature was 25 ℃; the flow rate of the mobile phase was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; the detection wavelength was 255 nm, and the injection volume was 10 μL. Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine (2012.1 version) was used to confirm the common peaks in 10 batches of samples and evaluate the similarity. SPSS 22.0 statistical software was used to make cluster analysis and principal component analysis for the HPLC fingerprint. **Result:** A total of thirteen common chromatographic peaks were identified in the software of chromatographical evaluation, and ten peaks of them with good stability, strong absorption peak, and obvious characteristics as common peaks. By comparing with control products, three chemical components were identified as catechin, hesperidin and rutin. The fingerprint similarity was greater than 0.96 for 10 batches of *Rosae Laevigatae Fructus* samples. 10 batches of samples from different areas were classified into three groups based on cluster analysis, and the accumulative variance contribution was 82.98% for two principal components. **Conclusion:** The study can provide data support for improving quality standards of *Rosae Laevigatae Fructus* from

**[收稿日期]** 20160425(001)

**[基金项目]** 壮瑶药协同创新中心项目(桂新科研[2013]20号);广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32号);广西重点学科壮药项目(桂教科研[2013]16号)

**[第一作者]** 冯阳,在读硕士,从事中药质量控制研究,Tel:15008987131,E-mail:729698315@qq.com

**[通讯作者]** \*辛华,硕士,副教授,硕士生导师,从事中药制剂分析研究,Tel:13977180603,E-mail:455480413@qq.com

Guangxi, providing basis for quality evaluation and exploitation.

[Key words] *Rosae Laevigatae Fructus*; HPLC fingerprint; catechin; hesperidin; rutin; similarity calculation; cluster analysis; principal component analysis

金樱子<sup>[1]</sup>为 2015 年版《中国药典》收载品种。现代研究表明金樱子有固精涩肠作用,主治遗精、遗尿、痢疾泄泻、崩漏带下、子宫脱垂、痔疮<sup>[2]</sup>,可用于治疗烧烫伤<sup>[3]</sup>,止滑痢,煎醋服化骨哽<sup>[4]</sup>,现在已广泛地被用于临床。

金樱子在广西有着丰富的野生资源,在广西瑶族地区称之为“落懂紧”,是常用瑶族药。民间常用于治疗尿频、滑精、高血压等。从已有文献报道中可以了解到,有关金樱子的研究多集中在药理与临床应用以及多糖类<sup>[5-6]</sup>、黄酮类和总黄酮<sup>[7-13]</sup>、鞣质类<sup>[14]</sup>、微量元素<sup>[15]</sup>的提取或含量检测等方面,另外在炮制加工<sup>[16-17]</sup>、采收期<sup>[18]</sup>等对金樱子质量的影响及黄酮类的指纹图谱<sup>[19]</sup>方面也有涉足。王晟<sup>[20]</sup>曾对金樱子的性状鉴别与质量进行了评价;林芳花等<sup>[21]</sup>曾对广东惠州产的对光果金樱子和金樱子质量进行了比较研究。所有文献中未见对广西产的金樱子进行系统研究报道,且金樱子在品质评价上也有很大的研究空白。指纹图谱是一种国际公认的控制中药或天然药物质量的有效手段,已被国内外广泛认可<sup>[22-23]</sup>。因此本论文对广西不同产地的金樱子药材进行 HPLC 指纹图谱研究,同时运用 2012.1 版中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件及 SPSS 22.0 软件对广西不同产地的 10 批样品进行比较分析。该方法为评价广西金樱子的品质与综合开发利用提供数据支持,并为金樱子质量标准的提高提供参考。

## 1 材料

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent),HH-S6 型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂),DHG-9146A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),PA225D 型 1/1 万电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],KQ5200B 型昆山禾创台式超声清洗器(超声功率 200 W,超声频率 40 kHz)。

水为超纯水,甲醇、乙腈色谱纯,冰乙酸,盐酸(38%,天津大茂化学试剂厂),其余试剂为分析纯。对照品儿茶素(批号 110877-201203),芦丁(批号 100080-201409),橙皮苷(批号 110721-201316)均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用。10 批

金樱子药材由广西药农提供,经广西中医药大学中药鉴定教研室银胜高副教授鉴定为蔷薇科植物金樱子 *Rosa laevigata* 的干燥果实;10 批样品(S1~S10)的产地分别为巴马县、天峨县、东兰县、崇左县、都安县、凤山县、蒙山县、宾阳县、三江县、藤县。

## 2 方法和结果

**2.1 色谱条件** 采用 Elite Hypersil ODS2-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 5%~8% A; 5~18 min, 8%~15% A; 18~34 min, 15%~18% A; 34~46 min, 18%~24% A; 46~56 min, 24%~26% A; 56~65 min, 26%~30% A; 65~71 min, 30%~33% A; 71~74 min, 33%~35% A; 74~80 min, 35%~47% A; 80~83 min, 47%~50% A; 83~93 min, 50% A; 93~98 min, 50%~62% A; 98~103 min, 62%~72% A; 103~106 min, 72%~79% A; 106~118 min, 79%~90% A; 118~120 min, 90%~100% A),流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 255 nm,柱温 25 °C,进样量 10 μL。

**2.2 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取儿茶素、橙皮苷、芦丁的对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含儿茶素 1.6 μg,橙皮苷 20 μg,芦丁 12 μg 的混合对照品溶液,备用。

**2.3 供试品溶液的制备** 取金樱子粉末(过三号筛)约 2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 40 mL,称定质量,超声 40 min,放冷,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 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** 取同一批金樱子药材粉末 2.00 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在其色谱条件下连续测定 6 次,10 个共有峰相对保留时间的 RSD < 0.5%,相对峰面积的 RSD < 2.6%,表明仪器的精密度良好。

**2.4.2 稳定性试验** 取同一批金樱子药材粉末 2.00 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别在溶液制备的 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 在其色谱条件下进样分析。10 个共有峰相对保留时间的 RSD < 0.5%,相对峰面积的 RSD < 2.4%,表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

**2.4.3 重复性试验** 取同一批的金樱子药材粉末 6 份,每份约 2.00 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,分别进样,在其色谱条件进行分析。10 个共有峰相对保留时间的 RSD < 0.7%, 相对峰面积的 RSD < 2.3%,表明该方法的重复性良好。

**2.5 指纹图谱的建立及相似度分析**

**2.5.1 指纹图谱的建立** 取 10 批广西不同产地的金樱子样品,每份约 2.00 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在其色谱条件下进样分析,记录各产地金樱子的 HPLC 色谱。将其导入国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012.1 版软件进行分析,以都安县金樱子样品(S5)的指纹图谱为参照图谱,采用平均数相关系数法对各指纹图谱的色谱峰进行了多点校正和自动匹配,生成对照指纹图谱 R,并建立 10 批金樱子药材的指纹图谱,见图 1。

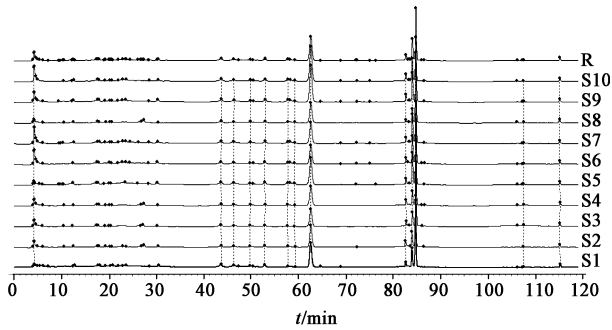


图 1 10 批金樱子药材的 HPLC 指纹谱  
Fig. 1 HPLC fingerprints of 10 batches of Rosae Laecigatae Fructus

**2.5.2 共有峰的标定** 根据 10 批金樱子药材指纹图谱的检测结果,利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.1)的数据匹配功能,在对照指纹图谱上共标定出共有色谱峰 13 个。从中选择了 10 个稳定性好,吸收峰强,特征明显的色谱峰作为金樱子

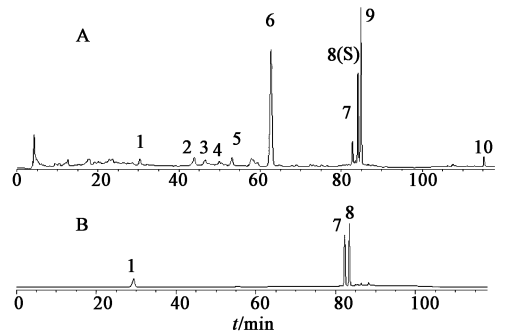
表 3 共有峰相对峰面积及相对标准偏差

Table 3 RSD of relative peak area of common peaks

批号	1	2	3	4	5	6	7	9	10
S1	0.173	0.377	0.261	0.131	0.247	2.739	0.287	3.509	0.187
S2	0.148	0.315	0.158	0.060	0.210	3.054	0.374	3.236	0.207
S3	0.108	0.357	0.159	0.078	0.236	2.940	0.399	3.650	0.241
S4	0.104	0.316	0.147	0.060	0.215	3.108	0.436	3.230	0.225
S5	0.084	0.190	0.145	0.060	0.150	1.801	0.191	1.452	0.095
S6	0.098	0.190	0.118	0.052	0.164	1.509	0.178	1.711	0.115
S7	0.094	0.191	0.119	0.028	0.167	1.625	0.209	1.440	0.111
S8	0.078	0.364	0.142	0.077	0.218	3.109	0.191	4.763	0.342
S9	0.108	0.230	0.122	0.076	0.187	2.603	0.249	1.652	0.114
S10	0.129	0.281	0.141	0.093	0.218	3.342	0.290	1.922	0.138

**2.5.3 相似度评价** 采用中药色谱指纹图谱相似

指纹图谱的共有峰,见图 2。与对照品比对指认了其中的 3 个共有峰,分别为儿茶素(峰 1),橙皮苷(峰 7),芦丁(峰 8)。在样品图谱中选择峰面积较大,出峰时间适中且稳定的 8 号芦丁色谱峰作为参照峰,分别计算其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表 2,3。



A. 供试品; B. 对照品; 1. 儿茶素; 7. 橙皮苷; 8. 芦丁

图 2 金樱子药材共有模式 HPLC

Fig. 2 HPLC chromatogram common model of Rosae Laecigatae Fructus

表 2 共有峰相对保留时间

Table 2 RSD of relative retention time of common peaks

批号	1	2	3	4	5	6	10
S1	0.363	0.521	0.552	0.593	0.631	0.746	1.371
S2	0.363	0.521	0.553	0.594	0.631	0.747	1.371
S3	0.358	0.518	0.550	0.591	0.631	0.747	1.369
S4	0.358	0.518	0.550	0.591	0.629	0.743	1.372
S5	0.359	0.519	0.551	0.592	0.629	0.745	1.371
S6	0.359	0.519	0.551	0.592	0.629	0.744	1.371
S7	0.361	0.520	0.551	0.593	0.630	0.745	1.370
S8	0.367	0.521	0.552	0.593	0.631	0.745	1.370
S9	0.361	0.521	0.552	0.594	0.631	0.745	1.369
S10	0.362	0.522	0.553	0.594	0.631	0.747	1.369

注:8 号峰(S)均为 1.000;表 3 同。7 号峰均为 0.984;9 号峰均为 1.009。

度评价系统 2012.1 版软件对 10 批金樱子药材的

指纹图谱进行相似度评价,与生成的共有模式对照指纹图谱进行比较,10 批相似度分别为 0.982, 0.994, 0.985, 0.995, 0.984, 0.982, 0.984, 0.965, 0.972, 0.971, 均 > 0.96。

**2.6 金樱子药材指纹图谱聚类分析** 以 10 批样品的 10 个共有峰面积为原始数据,运用 SPSS 22.0 统计分析软件,进行聚类分析,采用组之间连接的聚类方法,以夹角余弦为样品相似度的距离公式,聚类分析结果见图 3。从图可以看出,10 批样品可以分为 3 大类, I 类包括 S1, S2, S3, S4, S8, II 类包括 S9, S10, III 类包括 S5, S6, S7。原因可能是品种和地理位置间的差异。通过聚类分析发现,各产地金樱子药材之间的相关性与相似度分析结果较为一致。

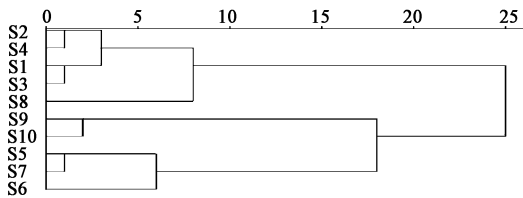


图 3 样品聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of samples

**2.7 金樱子药材指纹图谱主成分分析(PCA)** 采用 SPSS 22.0 统计分析软件对原始数据进行标准化处理,再对其进行运算,以主成分的特征值及贡献率为依据,对 10 批不同产地的金樱子药材的 10 个共有峰(变量)进行主成分分析,其结果见表 5。

表 5 主成分特征值与贡献率

Table 5 Eigenvalues and contribution rates

主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
1	6.102	61.02	61.02
2	2.196	21.96	82.98
3	0.767	7.67	90.65
4	0.616	6.16	96.81
5	0.140	1.40	98.22
6	0.093	0.92	99.14
7	0.046	0.45	99.60
8	0.037	0.37	99.97
9	0.002	0.02	100.00

由表可知,主成分个数的提取原则为其对应的特征值 > 1,故取前 2 个作为主成分,其累计方差贡献率为 82.98%,接近于 85%,适用于主成分分析。其中,第一主成分方差贡献率为 61.02%,第二主成分方差贡献率为 21.96%。

旋转后的公共因子载荷矩阵见表 6,可以得出 1,2,3,4,5,6,8 号色谱峰在主成分 1 中有明显的正相负荷,表明其增加,第一主成分增大;其他的色谱

峰对第一主成分的影响相对较小。7 号色谱峰在主成分 2 中有明显的正相负荷,表明其增加,第二主成分增大;9,10 号在主成分 2 中有明显的逆相负荷,表明其增加,第二主成分减少;其他的色谱峰对第二主成分的影响相对较小。

表 6 旋转后的公共因子载荷矩阵

Table 6 Load matrixes of postrotational common factors

峰号	成分值	
	1	2
2	0.985	-0.055
4	0.927	-0.114
5	0.908	0.314
1	0.863	0.374
3	0.858	0.113
6	0.783	0.197
8	0.724	0.396
9	0.058	-0.968
10	-0.116	-0.885
7	0.472	0.778

对数据矩阵进行 PCA 后,以第 1,2 主成分建立坐标系即得所有样品的 PCA 平面得分,见图 4,样品的内在相互关系可较好的表现出来,进而实现样品之间的分类,从图中可以看出 10 批不同产地的金樱子药材被分为三类,其结果与聚类分析结果一致。

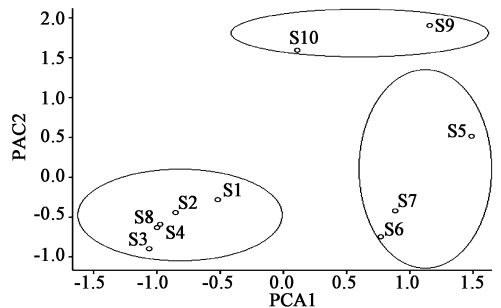


图 4 主成分平面得分

Fig. 4 Score graph of principal components

### 3 讨论

**3.1 供试品溶液制备方法的选择** 本实验优选不同提取条件制备供试品溶液,采用单因素变量法,考察了不同提取方式(超声提取、冷浸提取、加热回流提取),提取溶剂(甲醇,80% 甲醇,无水乙醇,80% 乙醇),提取溶剂用量(25, 40, 55 mL),提取时间(20, 40, 50 min)对金樱子药材中有效成分提取率的影响。结果表明金樱子药材粉末(过三号筛)2.00 g,加入 80% 甲醇 40 mL,超声 40 min 时的提取效率最高。

**3.2 色谱条件的考察** 供试品溶液的色谱条件考察中,分别考察了甲醇-0.1% 磷酸水、甲醇-0.2%

磷酸水、甲醇-0.1% 乙酸水、乙腈-0.1% 磷酸水、甲醇-水、乙腈-水 6 个流动相系统,结果表明采用甲醇-0.2% 磷酸水作为流动相时,基线平稳,指纹信息丰富,色谱峰分离度较高且峰面积较大,有利于指纹图谱的分析,故最终选择甲醇-0.2% 磷酸水作为流动相系统。本实验分别考察了 208, 255, 260, 265, 270, 280, 290, 330 nm 检测波长下的色谱图,结果表明 255 nm 检测波长下的色谱峰数目较多、峰面积较大,故确定 255 nm 为检测波长。

**3.3 指纹图谱结果差异分析** 10 批广西不同产地金樱子药材的 HPLC 指纹图谱中,共有峰的相对保留时间基本一致,共有峰的相对峰面积则存在着较大的差异,可能是由于不同的地理位置(日照、水质、土质)所导致的有效成分的含量差异,其原因有待进一步的考究。10 批样品的相似度均 >0.96,说明广西不同产地金樱子的化学组成一致性较好。

**3.4 聚类分析和主成分分析** 聚类分析能将 10 批广西不同产地的金樱子药材进行分类鉴定,结果分为 3 大类,如都安县、凤山县、蒙山县的金樱子药材聚在一起,说明这 3 个产地金樱子的品种、生长环境相近。而且,它与相似度分析结果较为一致,得到了相互验证。利用主成分分析,得到了 2 个主成分,累计方差贡献率为 82.98%,说明这 2 个主成分可表达全部金樱子药材化学成分的 82.98%,只有 17.02% 的信息丢失。其中,第 1 主成分方差贡献率最大,为 61.02%,是金樱子药材最重要的成分群,它所包含的化学成分基本反映出各产地金樱子药材化学成分之间的相似性。

**3.5 结论** 本实验建立了广西不同产地金樱子药材的 HPLC 指纹图谱,通过相似度计算、聚类分析和主成分分析,对药材进行综合评价,得到较理想的结果。同时,进行了 HPLC 方法学考察,发现精密度、稳定性、重复性都符合指纹图谱的要求,本实验所建立的方法以及指纹图谱均稳定性好,专属性强,能为广西金樱子的品质提高与开发利用提供数据支持和评价依据。

[参考文献]

[1] 庞声航. 实用瑶药学[M]. 南宁:广西科技出版社, 2018:216-219.  
[2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准. 第 2 册[M]. 南宁:广西科技出版社,1996:68-69.  
[3] 梁志廷. 金樱根治疗烧烫伤[J]. 浙江中医杂志, 1989,24(4):188.  
[4] 明·李时珍. 本草纲目. 下册[M]. 北京:人民卫生出版社,1978:2096.

[5] 文全泰,潘廷啟,颜祖弟. 正交设计优化金樱子多糖的酶提取工艺[J]. 中国执业药师,2012,9(11): 28-31.  
[6] 李连芳,王晓丽. 贵州产金樱子多糖的含量测定[J]. 贵阳医学院学报,2013,38(2):162-164.  
[7] 薛梅,王自军,闫豫君. 金樱子中总黄酮和多糖的微波提取与含量测定[J]. 食品工业科技,2005,26(10):134-136.  
[8] 薛梅,王鲁石,杜华. 金樱子中总黄酮的提取及含量测定[J]. 现代中药研究与实践,2003,17(5):16-17.  
[9] 刘军海,黄宝旭,刘玉刚. 金樱子总黄酮提取工艺的响应面法优化[J]. 食品研究与开发,2010,31(11): 51-61.  
[10] 陈乃富,陈科,张莉. 大孔树脂柱层析法纯化金樱子总黄酮的初步研究[J]. 中药材,2007,30(8): 1013-1016.  
[11] 高一品,金梅,杨颂,等. 金樱子黄酮两种提取工艺优化及比较[J]. 食品工业科学,2014,35(1):237-241.  
[12] 李尼曼. 金樱子黄酮化合物的提取、纯化以及药理活性研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2009.  
[13] 高焱,高智席,李丽,等. 金樱子中芦丁和槲皮素不同提取方法的比较研究[J]. 安徽农业科学,2011(8): 4521-4522.  
[14] 李志猛,李向日. 干酪素法测定不同产地金樱子中鞣质类成分的研究[J]. 中华中医药杂志,2009,24(2): 230-232.  
[15] 曹朝晖,杨江柳,方恩. 金樱子中微量元素含量分析[J]. 微量元素与健康研究,2005,22(6):31-32.  
[16] 赵四清,周日宝,陈胜璜. 不同的产地加工方法对中药材金樱子质量的影响[J]. 湖南中医学院学报, 2005,25(3):21-22.  
[17] 陈胜璜,汤艳红,周日宝. 不同炮制方法对金樱子质量的影响[J]. 中药材,2006,29(12):1288-1289.  
[18] 陈海云,陈新华,高言明. 花溪高坡惠水两地不同采收期金樱子中总黄酮含量分析[J]. 微量元素与健康研究,2005,22(4):23-24.  
[19] 陈乃富,韩邦兴,张莉,等. 金樱子总黄酮的 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. 安徽农学通报,2007,13(3): 34-35.  
[20] 王晟. 中药材金樱子的性状鉴别及质量评价[D]. 长沙:湖南中医药大学,2008:3-30.  
[21] 林芳花,彭永宏,柴素芬. 光果金樱子和金樱子质量比较研究[J]. 广东药学院学报,2010,26(4): 345-347.  
[22] 聂磊,罗国安,曹进,等. 中药二维信息指纹图谱模式识别[J]. 药学学报,2004,39(2):1362.  
[23] 刘智,王爱民,许祖超,等. 全天麻胶囊特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):86-88.

[责任编辑 顾雪竹]