

丁香茄子的 HPLC 指纹图谱分析

范卫锋^{1*}, 郑兆广^{2*}, 胡琴², 李琴¹, 叶志文¹, 潘兰¹

(1. 广西玉林制药集团有限责任公司, 广西 玉林 537001;
2. 广州康臣药物研究有限公司, 广州 510530)

[摘要] 目的:建立丁香茄子的 HPLC 指纹图谱分析方法,为该药材的鉴别及质量评价提供依据。方法:采用 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,柱温 30 °C,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 300 nm,进样量 10 μL,分析丁香茄子的 HPLC 图谱,使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算相似度,并进行聚类分析、主成分分析、偏最小二乘判别分析。结果:方法学考察显示丁香茄子的液相色谱指纹图谱精密度、重复性、稳定性均可满足指纹图谱分析的需要;指纹图谱中呈现 14 个共有峰,10 批广西地区的丁香茄子的指纹图谱相似度评价结果在 0.70 以上,表明广西不同产地丁香茄子的质量差异较大,通过聚类分析、主成分分析、偏最小二乘判别分析,丁香茄子分成三类,显示产地和采集时间与药材的质量相关。结论:建立的丁香茄子的液相色谱指纹图谱方法快速、简便,能够全面反映丁香茄子的生物碱化学成分信息,可用于丁香茄子的质量评价;玉林和桂林采集的丁香茄子质量较佳,可以作为丁香茄子来源产地。

[关键词] 丁香茄子; 高效液相色谱; 指纹图谱; 相似度; 广西

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0066-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200066

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1047.064.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:47

HPLC Fingerprint Analysis of Calonyctii Semen

FAN Wei-feng^{1*}, ZHENG Zhao-guang^{2*}, HU Qin², LI Qin¹, YE Zhi-wen¹, PAN Lan¹

(1. Guangxi Yulin Pharmaceutical Group Co. Ltd., Yulin 537001, China; 2. Guangzhou Consun Drug Research Ltd., Guangzhou 510530, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC chromatographic fingerprint analysis method for the quality evaluation of Calonyctii Semen. **Method:** The analysis was carried out by Agilent Extend-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), with acetonitrile (A) -0.1% formic acid solution (B) as the mobile phase for gradient elution. The temperature of column was 30 °C at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹; the detection wavelength was set at 300 nm, and the injection volume was 10 μL. The HPLC fingerprint was analyzed and the similarity was evaluated with *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine* (version 2012). The comparison with reference drugs, cluster analysis, principal component analysis and partial least square discriminant analysis (PLS-DA) were used for analysis. **Result:** The precision, repeatability and stability of the established method can meet the requirements of fingerprint chromatography analysis. There were 14 common peaks in the HPLC fingerprint. The similarity of 10 batches of samples from Guangxi was greater than 0.70, indicating great differences in quality of Calonyctii Semen from different areas of Guangxi. Through the cluster analysis, principal component analysis and partial least square discriminant analysis (PLS-DA), the samples were divided into three categories and showed that the producing origins and collection time were correlated with the quality of

[收稿日期] 20170415(009)

[基金项目] 广西重点研发计划项目(桂科 AB16380211); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 1355004-9)

[通讯作者] * 范卫锋, 硕士, 高级工程师, 从事新药开发与研究, Tel: 0775-3892661, E-mail: fanweifeng78@126.com;

* 郑兆广, 博士, 从事新药开发与研究, E-mail: dzhg168@126.com

medicinal herbs. **Conclusion:** The developed HPLC fingerprint method is quick, simple, and could comprehensively reflect the chemical components information of alkaloids for *Calonyctii Semen*. Therefore, it could be used in quality evaluation of *Calonyctii Semen*. The samples collected in Yulin city and Guilin city have better quality, so these two cities can be the producing origins for *Calonyctii Semen*.

[**Key words**] *Calonyctii Semen*; HPLC; fingerprint; similarity; Guangxi

丁香茄子又名华佗豆、天茄、金丝吊葫芦,本品原植物始载于《救荒本草》,名丁香茄苗,其味苦、性寒,具有泻下、解毒之功效,可以用作蛇药和泻药,分布在墨西哥、菲律宾、越南、印度、日本、缅甸等地,我国主要分布在河南、湖南、云南、广西、湖北等地。丁香茄子在广西忻城亦称为跌打豆,用于治疗小儿疳积、小儿肺炎、跌打损伤,疗效很好,特别是在消肿止痛等方面,用华佗豆治疗癌症疼痛效果显著^[1-2]。丁香茄子的生物碱粗提物具有明显的抗微生物活性^[3]。梁洁等^[4]采用化学反应鉴别法分别对华佗豆水提取液、乙醇提取液和石油醚提取液进行化学成分预试,初步表明华佗豆中可能含黄酮类、生物碱、酚类、有机酸、挥发油、皂苷、苷类、糖类等化学成分。王英明等^[5]从天茄子中分离得到 5 种生物碱,分别是白牵牛碱,华佗豆丙碱,华佗豆丁碱,isoipomine 和 ipomine;陆仁荣等^[6]从华佗豆中分离得到华佗豆甲碱、华佗豆乙碱、华佗豆戊碱、华佗豆丁碱 4 种生物碱;范卫锋等^[7]用 HPLC 测定丁香茄子中华佗豆碱乙的含量;朱小勇等^[8]运用超临界 CO₂ 对丁香茄子挥发油进行化学成分的分析。

对中药质量进行评价和质量控制时,通常分析一个或者几个指标成分,但并不能完全表现出中药的内在质量,因此应建立更加全面和系统的评价方法对中药进行评价,中药指纹图谱的出现,为建立更加完整和科学的中药质量评价体系提供一个新思路,而指纹图谱的数据处理方法包括聚类分析、主成分分析、偏最小二乘判别分析,其具有对高维数据降维、分类和识别等功能,分析过程简便,结果具有综合性,中药质量控制领域得到越来越广泛的应用,对中药内在化学成分进行综合评价和整体质量的全面控制^[9]。

本实验对广西不同产地 10 批丁香茄子药材进行指纹图谱的分析,使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算相似度,运用系统聚类分析、主成分分析、偏最小二乘判别分析广西不同产地丁香茄子之间的相似程度;根据系统聚类分析、主成分分析、偏最小二乘判别分析结果,进行药材质量分析及评价,分析结果的可靠性和客观性,为广西地区丁香茄子

的质量控制提供科学依据。

1 材料

1260 系列高效相色谱仪(美国 Agilent 公司),Synsv0000 型超纯水器(美国 Millipore 公司),BT 25S 型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],JP-060 型超声波清洗器(深圳市洁盟清洗设备有限公司),L-550 型离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)。

10 批丁香茄子药材样品,分别于 2015—2016 年采购于广西各地,经广西玉林制药集团有限责任公司高级工程师蒙毅鉴定为旋花科植物丁香茄 *Ipomoea turbinata* 的种子,药材样品具体来源见表 1,水为纯化水,乙腈、甲酸为色谱级,其他试剂均为分析纯。

表 1 丁香茄子样品来源

Table 1 Producing place of *Calonyctii Semen*

No.	产地	收集时间	No.	产地	收集时间
S1	玉林仁厚	2016-10	S6	桂林荔浦	2015-10
S2	玉林仁厚	2016-08	S7	南宁隆安	2016-10
S3	桂林临桂	2015-12	S8	百色凌云	2015-09
S4	柳州鹿寨	2015-03	S9	柳州融水	2016-01
S5	南宁武鸣	2015-12	S10	贺州钟山	2016-05

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Extend-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0 ~ 15 min, 5% ~ 15% A; 15 ~ 30 min, 15% A; 30 ~ 45 min, 15% ~ 30% A; 45 ~ 60 min, 30% ~ 90% A, 60 ~ 75 min, 90% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 300 nm。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取丁香茄子样品 0.30 g,精密加入氨水-甲醇(1:2)混合液 20 mL,放置过夜,超声 30 min,离心(5 000 r·min⁻¹, 5 min),精密量取 10 mL 置入蒸发皿,水浴蒸干,加甲醇溶解,置入 10 mL 量瓶中,并定容至刻度,滤过,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取丁香茄子样品(S1),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,连续进样 6 次,进样量 10 μL。以 13 号色

谱峰为参照,计算 14 个共有峰相对保留时间和相对峰面积,RSD 均 < 3%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取丁香茄子样品(S1),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0,2,4,8,12,24,36 h 进样,进样 10 μL,按 2.1 项下色谱条件测定。以 13 号色谱峰为参照,计算 14 个共有峰相对保留时间和相对峰面积 RSD 均 < 3%,结果表明供试品溶液 36 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取丁香茄子溶液样品(S1),按 2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液,分别进样 10 μL,按 2.1 项下色谱条件测定,以 13 号色谱峰为参照,计算 14 个共有峰相对保留时间和相对峰面

积,结果 RSD 均 < 4%,表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立与分析

2.4.1 指纹图谱的建立 取 10 批丁香茄子,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,得到 10 批丁香茄子的 HPLC 指纹图谱。

2.4.2 参照峰的选择 选取分离度好、出峰时间适中、易于辨认、峰面积较大且稳定的 13 号峰,作为本品 HPLC 指纹图谱的参照峰。

2.4.3 共有峰的标定 以 13 号(S) 色谱峰为参照,设其保留时间和峰面积为 1,计算样品的 14 个共有峰的相对保留时间、相对峰面积,共有指纹峰特征参数见表 2,3。

表 2 10 批丁香茄子的 14 个共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retentive time of 10 batches of Calonyctii Semen

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
S1	0.121 6	0.185 2	0.232 9	0.257 3	0.279 3	0.342 0	0.421 7	0.437 0	0.461 3	0.494 3	0.816 9	0.953 0	1.027 9
S2	0.122 5	0.185 7	0.233 2	0.257 7	0.279 8	0.341 6	0.421 4	0.436 1	0.460 5	0.492 2	0.816 2	0.953 3	1.028 3
S3	0.122 2	0.185 6	0.232 4	0.257 1	0.278 7	0.340 9	0.420 9	0.435 6	0.459 9	0.491 7	0.816 1	0.953 2	1.028 1
S4	0.121 2	0.184 9	0.232 2	0.256 9	0.278 7	0.341 2	0.420 9	0.435 7	0.460 1	0.491 0	0.815 9	0.953 5	1.028 0
S5	0.122 2	0.185 3	0.232 7	0.257 9	0.279 7	0.341 9	0.421 6	0.436 7	0.461 0	0.492 0	0.817 3	0.953 0	1.027 8
S6	0.121 9	0.185 7	0.231 9	0.257 4	0.279 4	0.341 7	0.421 4	0.436 2	0.460 7	0.490 7	0.816 8	0.953 1	1.027 8
S7	0.121 7	0.181 1	0.232 7	0.258 4	0.280 0	0.342 3	0.421 9	0.437 3	0.461 8	0.492 4	0.817 8	0.953 0	1.027 8
S8	0.122 1	0.185 4	0.232 9	0.257 5	0.279 6	0.342 2	0.421 8	0.437 3	0.461 6	0.495 2	0.816 5	0.952 9	1.027 9
S9	0.121 9	0.185 4	0.232 8	0.257 5	0.279 5	0.341 8	0.421 8	0.437 1	0.461 3	0.495 1	0.816 8	0.953 1	1.028 0
S10	0.121 8	0.185 2	0.232 5	0.257 4	0.279 3	0.341 3	0.421 4	0.436 5	0.460 9	0.494 1	0.816 9	0.953 1	1.027 8

注:13 号峰均为 1.000 0,表 3 同。

表 3 10 批丁香茄子的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of 10 batches of Calonyctii Semen

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14
S1	0.190 3	0.276 3	0.050 1	0.297 1	0.242 6	0.149 1	0.193 5	0.357 7	0.083 8	0.850 2	0.151 5	0.087 7	0.058 6
S2	0.194 5	0.296 4	0.065 9	0.338 3	0.267 7	0.145 9	0.184 3	0.367 6	0.080 5	0.882 0	0.161 2	0.085 5	0.062 5
S3	0.222 5	0.345 4	0.169 1	0.369 2	0.311 4	0.129 7	0.241 7	0.278 2	0.093 2	0.949 5	0.207 7	0.095 8	0.060 3
S4	0.154 3	0.469 3	0.067 5	0.533 3	0.417 0	0.104 4	0.086 4	0.232 0	0.105 8	1.018 5	0.227 7	0.083 1	0.053 6
S5	0.134 2	0.069 5	0.098 2	0.047 0	0.043 7	0.089 6	0.162 4	0.209 6	0.086 7	1.061 2	0.043 6	0.080 7	0.041 3
S6	0.185 7	0.528 3	0.148 2	0.492 3	0.369 6	0.027 3	0.253 4	0.033 0	0.092 9	1.286 1	0.214 8	0.110 0	0.057 5
S7	0.262 9	0.029 9	0.160 3	0.022 3	0.024 5	0.073 8	0.108 4	0.177 3	0.123 4	1.468 7	0.033 8	0.118 6	0.053 3
S8	0.231 9	0.465 2	0.200 6	0.551 1	0.426 1	0.147 4	0.244 5	0.257 0	0.092 2	0.978 9	0.267 4	0.100 4	0.060 4
S9	0.231 5	0.344 1	0.200 9	0.398 0	0.311 9	0.130 4	0.243 3	0.277 4	0.089 3	0.872 1	0.207 2	0.095 9	0.060 4
S10	0.220 6	0.236 0	0.190 6	0.222 5	0.167 0	0.148 2	0.238 1	0.322 3	0.085 9	0.888 4	0.119 7	0.095 1	0.063 6

2.4.4 指纹图谱的相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”2012 版对 10 批丁香茄子进行相似度评价,指纹图谱叠加见图 1 和表 4。

2.5 丁香茄子色谱数据的化学计量学分析 将色

谱仪采集的数据采用 IBM SPSS 22.0 软件和 SIMCA 13.0 软件进行聚类分析、主成分分析和偏最小二乘判别分析。

2.5.1 聚类分析 将各样品指纹图谱的 14 个共有

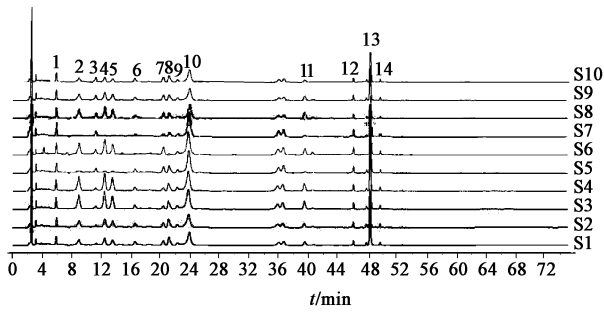


图 1 10 批丁香茄子 HPLC 指纹谱
Fig. 1 HPLC fingerprint layout chart of 10 batches of Calonyctii Semen

表 4 10 批丁香茄子相似度评价

Table 4 Similarity evaluation of 10 batches of Calonyctii Semen

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1	0.669	0.629	0.629	0.544	0.554	0.440	0.972	0.989	0.991	0.794
S2	0.669	1	0.978	0.978	0.942	0.952	0.896	0.652	0.669	0.645	0.972
S3	0.629	0.978	1	1	0.894	0.979	0.857	0.652	0.647	0.593	0.960
S4	0.629	0.978	1	1	0.894	0.979	0.857	0.652	0.647	0.593	0.960
S5	0.544	0.942	0.894	0.894	1	0.909	0.983	0.486	0.583	0.533	0.908
S6	0.554	0.952	0.979	0.979	0.909	1	0.892	0.587	0.583	0.533	0.937
S7	0.440	0.896	0.857	0.857	0.983	0.892	1	0.390	0.430	0.448	0.855
S8	0.972	0.652	0.652	0.652	0.486	0.587	0.390	1	0.993	0.960	0.788
S9	0.989	0.669	0.647	0.647	0.529	0.583	0.430	0.993	1	0.985	0.802
S10	0.991	0.645	0.593	0.593	0.546	0.533	0.448	0.960	0.985	1	0.778
R	0.794	0.972	0.960	0.960	0.908	0.937	0.855	0.788	0.802	0.778	1

程度,与采用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”2012 版计算样品间相似度的相关性比较,结果一致。

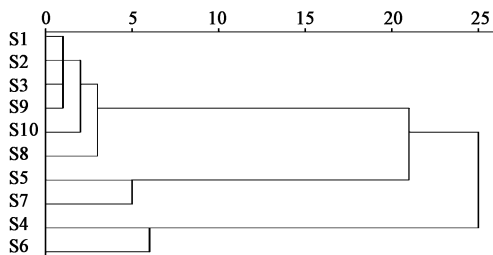


图 2 10 批丁香茄子的聚类分析树状关系
Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis of 10 batches of Calonyctii Semen

2.5.2 主成分分析 以主成分的特征根和贡献率作为选择主成分的依据。主成分的特征根 > 1 的主成分共有 4 个,且 4 个主成分的累积方差贡献率 > 95.932%。PCA 碎石图可以看出率先提取出来的 4 个主成分的坡度较为陡峭而后续形成的坡度较为平缓。说明所提取 4 个主成分可以代表丁香茄子药材的质量。其中第 1 主成分特征值为 5.681,方差贡献率为 40.582%;第 2 主成分特征值为 3.993,方差

峰峰面积相对于称样量量化,运用 SPSS 22.0 软件对所有丁香茄子样品进行系统聚类分析。采用 Ward 法,采用平方 Euclidean 距离 (squared euclidean distance) 法,计算不同批号样品间相似程度,聚类分析结果见图 2。10 批丁香茄子样品大致分为 3 类:第 I 类包括批号为 S1, S2, S3, S8, S9, S10 的样品,第 II 类包括批号为 S5, S7 的样品,第 III 类包括批号为 S4, S6 的样品;整体而言,这 10 批丁香茄子样品均聚在同一类,产品相似度比较集中,质量差异性较小。聚类分析得到的样品之间的相关

贡献率为 28.524%;第 3 主成分特征值为 2.677,方差贡献率为 19.123%;第 4 主成分特征值为 1.078,方差贡献率为 7.703%。用 SIMCA 13.0 分析软件得到 PCA 得分图,可以看出样品被分为 3 类,与聚类分析结果一致。结果见图 3。

2.5.3 偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 采用 SIMCA 软件对 10 批样品色谱数据进行分析,PLS-DA 得分图见图 4。从图可以看出 10 批样品被分为 3 类,与聚类分析与主成分分析结果一致。PLS-DA 还经常应用于寻找区分不同批次样品的化学成分。在 PLS-DA 模型中,VIP 图可反映出不同峰的贡献程度,并进行高低排序。以 VIP 值 > 0.8 为标准,4,9,2,7 号峰可能是区分鉴别丁香茄子样品最主要的特征峰,与主成分分析结果基本一致。

3 讨论

分别以不同体积分数的甲醇、乙醇和氨水甲醇为提取溶剂进行考察^[10],从 HPLC 色谱分析选择氨水甲醇作为提取溶剂,氨水甲醇提取的色谱图出峰数最多、有较丰富的色谱信息,较为全面地反映丁香茄子药材生物碱的质量。

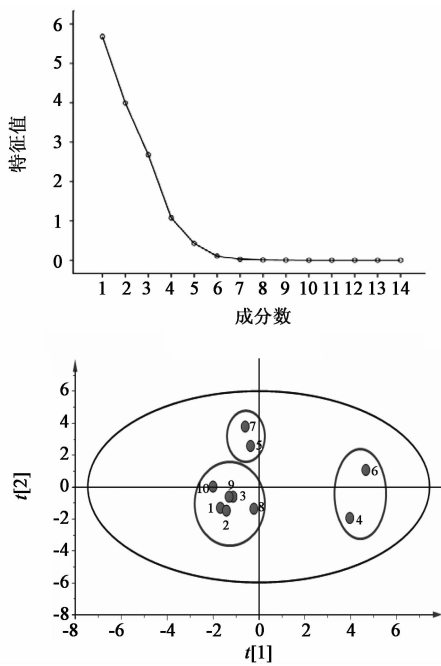


图 3 丁香茄子药材主成分分析
Fig. 3 PCA results of Calonyctii Semen

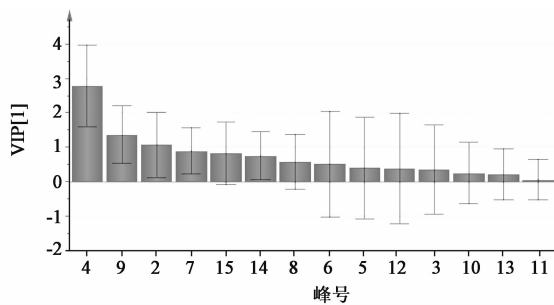


图 4 丁香茄子药材 PLS-DA 分析 (n=10)
Fig. 4 PLS-DA results of Calonyctii Semen (n=10)

分别用甲醇-水、乙腈-水、乙腈-甲酸水、乙腈-乙酸三乙胺缓冲体系为流动相,以不同梯度进行试验,结果表明用乙腈-甲酸水线性梯度洗脱效果最好。同时采用 DAD 检测对丁香茄子供试品溶液在 200 ~ 400 nm 的紫外吸收进行了考察,结果表明在 300 nm 波长下,色谱图所包含的信息量最大,各成分均有较好地吸收,且各色谱峰分离较好,基线较平稳。

将指纹图谱数据与相似度评价、化学计量学分析相结合可反映不同产地丁香茄子质量的整体变化,结果表明,不同批次或产地的丁香茄子指纹图谱既有共性又存在差异,主要色谱峰的整体面貌基本一致,但峰面积有所不同,相似度结果表明不同产地的丁香茄子在化学成分组成上基本一致,但仍存在一定的差异,聚类分析、主成分分析、偏最小二乘判别分析结果表明可将上述产地的丁香茄子大致分为 3 大类,总体来说,来自玉林、桂林、贺州等地的丁香

茄子聚为一类,来自南宁等地的丁香茄子聚为一类,来自柳州等地的丁香茄子聚为一类;这说明不同因素会对药材中成分含量产生一定影响,是否与生长环境、土壤条件等因素有关,有待进一步考察。

相似度评价与化学计量学分析,同一产地,不同时间采集的丁香茄子,各共有峰相对保留时间差异较小,而相对峰面积差异则较大,表明不同批次丁香茄子样品中化学成分在量上存在较大差异;丁香茄子的颜色会随着储存时间的延长而变深,因此要规范丁香茄子质量,必须规范其适宜采收期、储藏条件和时间。

本实验建立的方法简便、准确、可靠,指纹图谱结合相似度分析、系统聚类分析、主成分分析、偏最小二乘判别分析^[11-12]等统计分析方法,为丁香茄子药材的分类、品质分析、质量控制等提供科学依据。

[参考文献]

[1] 邓晋丽. 天茄子指标成分分析及镇痛消颗粒的提取工艺优化[D]. 天津:天津大学,2016.
[2] 梁洁,吕松林,林辰,等. 华佗豆不同提取部位抗炎镇痛的实验研究[J]. 中药材,2015,38(5):1030-1033.
[3] Guevara B Q, Rosalinda C, Solevilla Y B, et al. Preliminary phytochemical, microbiological and pharmacological studies of *Calonyction muricatum* Linn [J]. Acta Manil Ser A Nat Appl Sci,1978(17):20-35.
[4] 梁洁,翁翎,温海成,等. 壮药华佗豆化学成分的初步研究[J]. 广西中医学院学报,2014,17(1):62-64.
[5] 王英明,李小娟,王英武,等. 天茄子生物碱的研究[J]. 中草药,2002,33(2):111-113.
[6] 陆仁荣,刘铸晋,徐风. 华佗豆生物碱间的相互转化[J]. 化学学报,1987,45(5):514-517.
[7] 范卫锋,胡琴,郑兆广,等. 高效液相色谱法测定天茄子的华佗豆碱乙含量[J]. 广州中医药大学学报,2017,34(1):107-109.
[8] 朱小勇,赵红艳,黄贵庆,等. 超临界 CO₂ 提取天茄子挥发油化学成分的分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):139-141.
[9] 王露露,孙倩怡,杨慧海,等. 模式识别及其在中药质量评价中的应用[J]. 中草药,2016,47(23):4282-4288.
[10] 费艳美,张玉萍,方步武. 不同产地延胡索药材的指纹图谱及质量研究[J]. 现代中药研究与实践,2012,26(6):23-25.
[11] 陈文静,梁文仪,李师,等. 基于指纹图谱分析和多成分同时定量的藏药毛诃子质量评价研究[J]. 中草药,2017,48(6):1210-1215.
[12] 张慧,杨孟妮,刘娟,等. 基于多种分析模式对藏茵陈水部位的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材,2017,40(1):114-118.

[责任编辑 顾雪竹]