

· 化学与分析 ·

广西细圆藤药材 HPLC 指纹图谱分析

魏中璇, 叶信, 陈勇*, 魏江存, 张昕, 庾延和

(广西中医药大学药学院, 南宁 530229)

[摘要] 目的:采用高效液相色谱法建立细圆藤药材的指纹图谱,对多批细圆藤药材进行质量评价,为细圆藤药材质量标准的研究提供一定的科学依据。方法:采用高效液相色谱法, Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),以乙腈-0.2% 磷酸为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 327 nm,柱温 30 °C;建立细圆藤药材 HPLC 指纹图谱,利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012.1 版软件对 10 批药材进行相似度评价,并利用 SPSS 22.0 软件对所得 10 批细圆藤药材色谱数据采用 Ward 法,平方 Euclidean 距离度量标准进行聚类分析,并进行主成分分析。结果:以 S4 号样品的图谱为参照图谱,采用多点校正和 Mark 峰匹配,10 批不同产地的细圆藤药材共标定了 11 个共有峰,并用对照品指认出绿原酸;10 批样品指纹图谱的相似度均 >0.9,通过聚类及主成分分析,将 10 批不同产地的药材分为 4 类。结论:该方法具有较高的稳定性,方法简便且专属性强,所建立的指纹图谱具有较好的稳定性,对进一步研究细圆藤药效物质基础有重要意义,也为广西壮药细圆藤的质量控制与评价提供了参考。

[关键词] 细圆藤; 指纹图谱; 聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0040-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230040

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1444.056.html>

[网络出版时间] 2017-09-12 14:44

HPLC Fingerprint of *Pericampylus glaucus* in Guangxi

WEI Zhong-xuan, YE Xin, CHEN Yong*, WEI Jiang-cun, ZHANG Xin, YU Yan-he

(School of Pharmacy, Guangxi University of traditional Chinese Medicine, Nanning 530029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint chromatogram of *Pericampylus glaucus* for the quality control of multi-batches of medicinal material, and provide scientific basis for the research on quality standards of *P. glaucus*. **Method:** The separation was developed on C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.2% phosphoric acid as the mobile phase for gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 327 nm and column temperature was 30 °C. The HPLC fingerprint chromatogram of *P. glaucus* was set up, and the quality of 11 batches of *P. glaucus* was evaluated by similarity assay (Similarity evaluation system for chromatographic fingerprint of TCM, Version 2012.1) as well as principal component analysis and cluster analysis. **Result:** Eleven common peaks were marked in 10 batches of samples by using multi-point correction and Mark peak matching, with the fingerprint of S4 sample as the reference fingerprint; and chlorogenic acid was identified as compared with the control product. The similarity of fingerprint was all higher than 0.9. Samples from different producing areas were classified into four groups based on principal component cluster

[收稿日期] 20170318(005)

[基金项目] 国家自然科学基金委地区基金项目(81260673);广西壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20号);广西高校重点实验室项目(桂教科研[2014]6号)

[第一作者] 魏中璇,在读硕士,从事药物质量控制研究,Tel:18229872817,E-mail:609739708@qq.com

[通讯作者] *陈勇,教授,硕士生导师,Tel:18978947922,E-mail:448614007@qq.com

analysis. **Conclusion:** This method is highly stable, simple and reproducible. With stable fingerprint, this study has important significance on further research of *P. glaucus* pharmacodynamic material basis, and also provides a reference for the quality control and evaluation of Guangxi Zhuang medicine *P. glaucus*.

[**Key words**] *Pericampylus glaucus*; fingerprint; cluster analysis

细圆藤系防己科细圆藤属植物,该属植物共有 8 种,我国有 4 种,主要分布于南部和西南部,其中 3 种可供药用^[1]。细圆藤又名哈仔藤^[2],民间也称广藤、车线藤、土藤等^[3],其藤部味苦、性凉,根部为喉科药,可止咳,又治毒蛇咬伤,疮疖等^[4],民间常用其来治疗小儿惊风、破伤风等。细圆藤是广西地方传统药物,相较于中药,壮族药没有太多的繁杂理论,专病专方,更容易被现代人接受^[5],壮族药的起源很早,但由于壮族历史上没有形成统一的文字,壮族药未得到文字整理^[6]。有关细圆藤药材化学成分的报道仅见表木栓醇、蜂蜜酸、棕榈酸、硬脂酸、白桦脂酸、胡萝卜苷 6 个化合物及部分三萜类化合物的研究报道^[3,7];关于其药理作用的报道仅有其抗肿瘤的研究^[7]。而对于细圆藤药材质量控制的研究目前尚未见有报道,本实验采用 HPLC 对 10 批不同产地的细圆藤药材进行测定,初步建立了 HPLC 指纹图谱,标定了 11 个共有峰,并指认了指纹图谱中对照品(绿原酸)的特征峰。同时运用 SPSS 22.0 软件及 2012 版“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”对 10 批不同产地的细圆藤药材进行比较分析。为细圆藤药材的质量控制提供了科学依据,可以更全面监控药材的质量。

1 材料

XEVO G2-S 型 UPLC-TOF-MS 液质联用仪(美国 Waters)1260 系列高效液相色谱仪(G1311B 四元梯度泵, G1314F 紫外检测器,美国 Agilent 公司),SQP 型 1/1 万电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司),TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂),KQ5200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),纯水机。

乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技有限公司),甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),超纯水自制(法国默克密里博公司),磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司);对照品绿原酸(批号 110753-201415)购自中国食品药品检定研究所;10 批细圆藤药材均来源于广西壮族自治区,经广西中医药大学药学院梁子宁老师鉴定为防己科细圆藤属植物细圆藤 *Pericampylus glaucus*,具体药材来源见表 1。

表 1 细圆藤药材来源

Table 1 Producing areas of *Pericampylus glaucus*

药材编号	药材来源	采集时间
S1	广西宾阳	2014 年 7 月
S2	广西岑溪	2014 年 7 月
S3	广西大化	2016 年 8 月
S4	广西防城	2014 年 7 月
S5	广西高峰	2015 年 11 月
S6	广西南宁	2016 年 1 月
S7	广西南明	2014 年 7 月
S8	广西钦州	2014 年 7 月
S9	广西上思	2014 年 6 月
S10	广西武鸣	2014 年 7 月

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.2% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 15 min, 12% A; 15 ~ 30 min, 12% ~ 16% A; 30 ~ 40 min, 16% ~ 21% A; 40 ~ 53 min, 21% ~ 26% A; 53 ~ 57 min, 26% A; 57 ~ 60 min, 26% ~ 30% A),流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 327 nm,进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸对照品适量,置于量瓶中,加色谱甲醇定容,摇匀,制成每 1 mL 含有的绿原酸对照品 1.014 mg 的储备液,取上述溶液 200 μL,定容至 5 mL 量瓶中,配置成每 1 mL 含有 40.56 μg 的绿原酸对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取本品 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇溶液 10 mL,称定质量,超声 60 min,放至室温,称定,用 70% 甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,滤过,将续滤液全部转移至蒸发皿中挥干,待其挥干后用 70% 甲醇溶液溶解残渣并转移至 2 mL 的量瓶中定容,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取细圆藤药材(S8),按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项下色谱条件下连续进样 6 次,记录色谱图,以 1 号峰为参照,分别对各共有峰的保留时间和峰面积进行统计,共有峰相对保留时间的 RSD < 0.6%,相对峰面积的 RSD < 2.3%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取细圆藤钦州产地药材,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项下色谱条件下,分别在 0,2,4,8,12,24 h 进样分析,记录色谱图,以 1 号峰为参照,分别对各共有峰的保留时间和峰面积进行统计,共有峰相对保留时间的 RSD < 0.2%,相对峰面积的 RSD < 2.6%,表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取细圆藤药材(S8)6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项下色谱条件下,进样分析,记录色谱图,共有峰相对保留时间的 RSD < 0.6,相对峰面积的 RSD < 2.5,表明方法重复性良好。

2.5 特征峰的指认 根据出峰时间稳定,峰形及分离度等因素,将 1 号峰确定为特征峰,根据样品与对照品液相图谱的比较,初步判定 1 号峰为绿原酸,为进一步确认 1 号峰,故采用液质联用方法对细圆藤药材中绿原酸成分进行分析鉴定。

2.5.1 色谱条件 ACQUITY UPLC, HSS T3 C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相 A(0.1% 甲酸水)-B(乙腈),梯度洗脱(0 ~ 2.5 min, 90% ~ 80% A; 2.5 ~ 3.5 min, 80% ~ 75% A; 3.5 ~ 7.0 min, 75% ~ 55% A; 7.0 ~ 9.0 min, 55% ~ 20% A; 9.0 ~ 12.0 min, 20% ~ 10% A; 12.0 ~ 12.1 min, 10% ~ 90% A; 12.1 ~ 15 min, 90% A),流速 0.5 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,分析时间 15 min,样品经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,进样量 1.0 μL,检测波长 327 nm,采用自动进样方式。

2.5.2 质谱条件 离子扫描模式为:ESI 负离子模式,扫描范围 m/z 100 ~ 1 200,离子源温度 100 °C,去溶剂气温度 350 °C,去溶剂气体流速设定为 700 L·h⁻¹,在线校准物质亮氨酸脑啡肽(m/z 556.277 1),毛细管电压 2.8 kV,锥孔电压 40 V,低能量碰撞能 6 V,高能量碰撞能 30 ~ 45 V,数据获取软件 MassLynx 4.1,数据获取模式为 MSE。

2.5.3 结果分析 按照 2.5.1 及 2.5.2 项下条件分别将绿原酸对照品及细圆藤样品进样,通过对照品及样品的总离子流(图 1,2)发现,细圆藤样品与绿原酸对照品出峰的保留时间一致,图 3,4 显示,在相同保留时间处 MS 一级图谱中均有 m/z 191 和 m/z 353 的碎片离子,这与文献中报道绿原酸的碎片离子相一致^[8]。

2.6 指纹图谱的建立及相似度分析

2.6.1 指纹图谱的建立 取 10 批不同产地的细圆藤药材,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,在 2.1 项

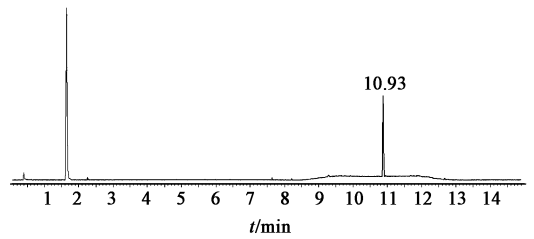


图 1 绿原酸对照品离子流

Fig. 1 Ion flow diagram of chlorogenic acid

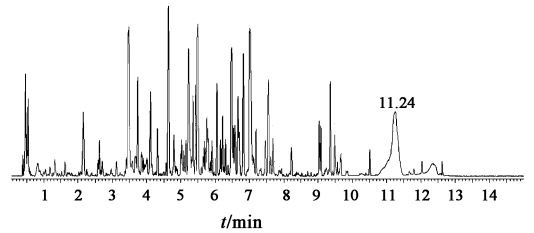


图 2 细圆藤样品总离子流

Fig. 2 TIC of *Pericampylus glaucus*

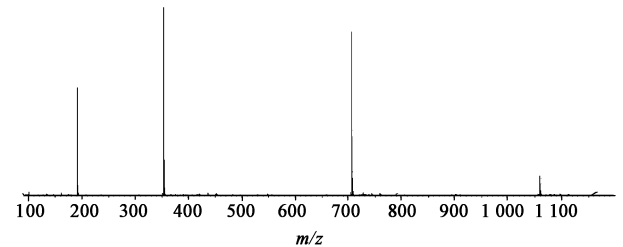


图 3 绿原酸一级质谱

Fig. 3 MS of chlorogenic acid

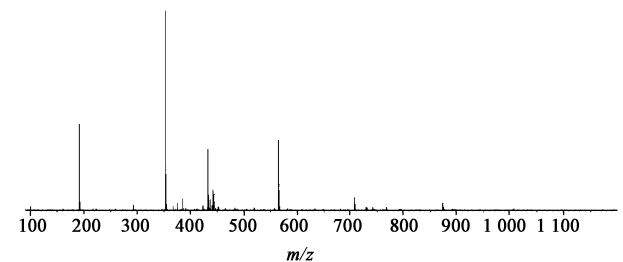


图 4 细圆藤样品一级质谱

Fig. 4 MS of *Pericampylus glaucus*

色谱条件下进样分析,得到 10 批细圆藤药材的指纹图谱,见图 5。将 10 批细圆藤药材的指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012.1 版软件对其进行分析,以 S4 号样品的图谱为参照图谱,采用多点校正和 Mark 峰匹配,标定共有色谱峰 11 个,并用对照品指认了其中的 1 号峰为绿原酸。以出峰稳定的 1 号色谱峰(绿原酸)为参照峰,同时生成细圆藤共有模式的指纹图谱,见图 6。然后进行了相似度计算,10 批细圆藤药材指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均 > 0.9。10 批样品的相似度均达到 0.90 以上。

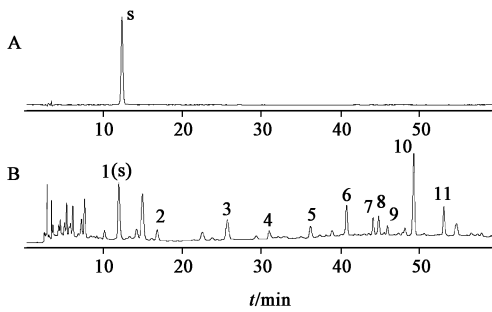


图 5 绿原酸对照品 (A) 与细圆藤药材对 HPLC 照指纹谱 (B)
Fig. 5 HPLC of reference substance (A) and reference fingerprint of *Pericampylus glaucus* (B)

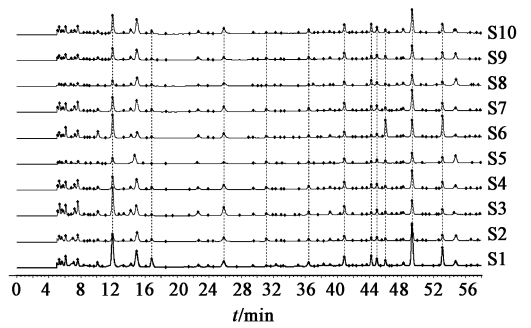


图 6 10 批细圆藤药材 HPLC 指纹谱
Fig. 6 HPLC of 10 samples of *Pericampylus glaucus*

2.6.2 共有峰的标定 对不同样品色谱图进行分析,选择峰型较好,特征明显的色谱峰为共有峰,10 批样品共标定出 11 个共有峰,在样品图谱中选择峰

型稳定的 1 号绿原酸色谱峰作为参照峰,分别计算其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,见表 2,3。

表 2 细圆藤药材 HPLC 指纹谱共有峰相对保留时间
Table 2 Relative retention time of common peaks

样品	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	1.413	2.167	2.618	3.047	3.270	3.700	3.759	3.853	4.131	4.586
S2	1.411	2.163	2.595	3.038	3.259	3.686	3.744	3.837	4.115	4.568
S3	1.411	2.164	2.613	3.061	3.288	3.722	3.780	3.871	4.149	4.591
S4	1.408	2.153	2.596	3.038	3.267	3.704	3.762	3.855	4.134	4.591
S5	1.418	2.177	2.612	3.077	3.309	3.749	3.810	3.901	4.187	4.648
S6	1.405	2.154	2.608	3.042	3.263	3.687	3.744	3.833	4.106	4.559
S7	1.408	2.157	2.607	3.048	3.272	3.703	3.761	3.853	4.127	4.583
S8	1.408	2.160	2.552	3.028	3.248	3.672	3.732	3.822	4.100	4.552
S9	1.406	2.156	2.606	3.043	3.264	3.690	3.747	3.837	4.111	4.564
S10	1.407	2.152	2.595	3.033	3.254	3.680	3.740	3.831	4.106	4.557

注:1 号峰(s)均为 1.000;表 3 同。

表 3 细圆藤药材 HPL 指纹谱共有峰相对峰面积
Table 3 Relative peak area of common peaks

样品	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
S1	0.268	0.247	0.035	0.135	0.277	0.231	0.177	0.122	1.110	0.448
S2	0.282	0.724	0.338	0.289	0.525	0.258	0.366	0.190	1.846	0.604
S3	0.038	0.429	0.077	0.131	0.290	0.055	0.135	0.069	0.487	0.167
S4	0.188	0.515	0.170	0.245	0.471	0.225	0.269	0.130	1.301	0.426
S5	0.057	0.455	0.324	0.310	0.832	0.162	0.420	0.249	1.664	0.870
S6	0.042	0.269	0.072	0.085	0.194	0.047	0.096	0.605	0.689	0.819
S7	0.166	0.505	0.155	0.229	0.438	0.223	0.254	0.129	1.276	0.417
S8	0.326	1.027	0.112	0.256	0.661	0.643	0.370	0.140	1.922	0.499
S9	0.111	0.351	0.146	0.227	0.473	0.164	0.298	0.170	1.068	0.491
S10	0.174	0.471	0.056	0.185	0.378	0.329	0.217	0.106	1.208	0.404

2.7 细圆藤药材指纹图谱聚类分析 应用 SPSS 22.0 对 10 批细圆藤药材进行系统聚类,采用 Ward

法,平方 Euclidean 距离度量标准进行聚类分析,结果见图 7。从图 7 可以看出,10 批样品可以分为 4

类;S4,S7,S10,S3 为一类;S6 为一类;S5,S8,S2,S9 为一类;S1 为一类。

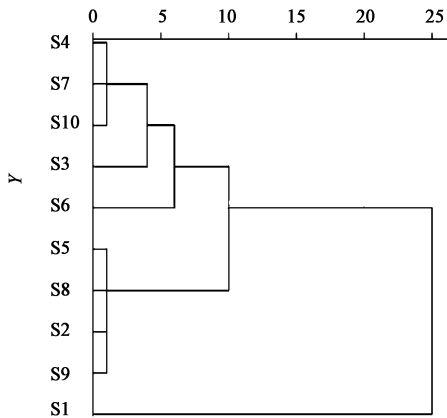


图 7 样品聚类分析

Fig. 7 Cluster analysis of *Pericampylus glaucus*

2.8 细圆藤药材指纹图谱主成分分析(PCA) 应用 SPSS 22.0 对 10 批药材进行了主成分分析,结果见表 4,并将提取的 11 个成分和对应的特征值做散点图,见图 8。由图表结果可知,前 3 个成分累积贡献较大,贡献率可达 90.651%。通过因子负荷矩阵可知,在主成分 1 中有明显正相负荷的为 1,2,3,5,7,8,10 号峰,在主成分 2 中有明显正相负荷的为 9,11 号峰,在主成分 3 中有明显正相负荷的为 7 号峰。见表 5。

表 4 特征值与贡献率

Table 4 Eigenvalues and contribution rates

成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	6.677	60.700	60.700
2	1.953	17.755	78.455
3	1.342	12.196	90.651
4	0.738	6.711	97.361
5	0.204	1.857	99.218
6	0.067	0.613	99.831
7	0.013	0.119	99.950
8	0.005	0.048	99.998
9	0.000	0.002	100.000

对数据进行主成分分析后,将前两个主成分数据整理得平面得分图,见图 9。从图中根据各批次药材的分布区域可以看出细圆藤药材分为 4 类,其结果与聚类分析结果一致。造成这种分类的原因初步判断是由于各批次药材采摘地点与采摘时间的不同所造成的。

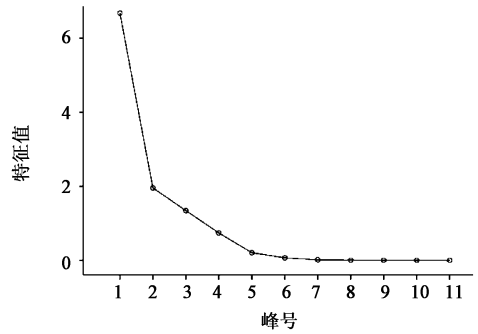


图 8 细圆藤药材特征值散点

Fig. 8 Scatter plot of eigenvalues for *Pericampylus glaucus*

表 5 因子负荷矩阵

Table 5 Matrix of factor loadings

峰号	成分		
	1	2	3
1	0.807	0.523	-0.015
2	0.813	0.130	0.466
3	0.758	0.073	-0.242
4	0.064	-0.092	-0.868
5	0.988	0.016	-0.051
6	0.968	0.052	0.009
7	0.759	-0.033	0.617
8	0.964	0.011	0.162
9	-0.111	0.990	-0.025
10	0.863	0.267	0.358
11	0.315	0.916	0.197

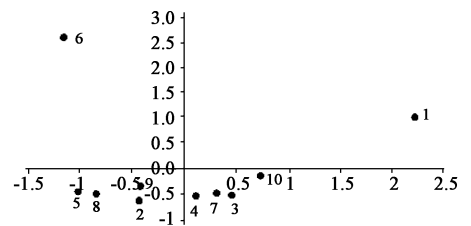


图 9 主成分平面得分

Fig. 9 Score graph of principal components

3 讨论

3.1 提取溶液及方法的选择 本实验采用超声、回流 2 种不同的提取方法,采用 30% 甲醇,50% 甲醇,70% 甲醇,85% 甲醇和纯甲醇,以及 30% 乙醇,50% 乙醇,70% 乙醇,85% 乙醇和无水乙醇不同的溶剂进行考察,通过出峰数目、峰形和大小来优选最佳提取方法,以 70% 甲醇超声 60 min 为最佳提取方法。

3.2 色谱柱及流动相的选择 本实验比较了 Agilent ZORBAX SB-C₁₈, Venusil C₁₈ 和 Waters XBridge

C₁₈ 3 种不同的色谱柱;同时考察了甲醇-水,甲醇-0.1%磷酸,乙腈-水及乙腈-0.1%磷酸 4 种不同的流动相体系,结果表明,以 Waters XBridge C₁₈ 色谱柱,乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱时,出峰数多,峰形好,分离效果好;分别比较了乙腈-0.05%磷酸、乙腈-0.1%磷酸和乙腈-0.2%磷酸 3 种不同的流动相体系,根据峰形与分离效果为指标发现流动相体系为乙腈-0.2%时,洗脱效果最好。

3.3 波长的选择 通过对主要峰采用 PDA 检测器进行全波长扫描后,结果表明 327 nm 下色谱图包含的信息量大,各色谱峰分离较好。

3.4 流速的选择 分别以流速 0.8, 1, 1.2 mL·min⁻¹ 进行洗脱,3 种流速色谱图进行比较后,1 mL·min⁻¹ 的出峰时间较适宜且峰与峰之间的分离度较好,故采用 1 mL·min⁻¹ 作为流速。

3.5 柱温的选择 分别以 25, 30, 35, 40 °C 柱温进行梯度洗脱,根据实验色谱图可知,柱温 30 °C 时色谱峰峰形较好,分离效果好,故采用 30 °C 作为柱温进行检测。

综上,对细圆藤药材进行了指纹图谱分析,共标定了 11 个共有指纹峰,鉴定出了绿原酸 1 种成分,10 批样品的相似度均 > 0.9,说明不同产地细圆藤

药材的化学组成一致性较好。本实验采用指纹图谱对细圆藤药材质量进行控制,方法稳定、简便且专属性强,所建立的指纹图谱具有较好的稳定性,对进一步研究其药效物质基础有重要意义。

[参考文献]

- [1] 连文琰. 中国防己科药用植物的初步调查[J]. 植物分类学报, 1975, 13(1): 32-53.
- [2] 冉先德. 中华药海[M]. 哈尔滨: 哈尔滨出版社, 1993: 1925.
- [3] 梁培瑜, 周琦, 周法兴. 细圆藤的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(1): 39-40.
- [4] 江苏省植物研究所. 新华本草. 第一册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988: 174.
- [5] 黄冬玲, 庞宇舟. 壮药基础理论初探[J]. 中国民族医药杂志, 2007(3): 1-4.
- [6] 钟鸣, 王柏灿. 壮药现代研究现状与发展思考[J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2006, 26(4): 36-38.
- [7] 赵卫权, 崔承彬. 细圆藤的三萜类成分及其体外抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学志, 2009, 19(3): 195-199, 211.
- [8] 罗奇志, 王有志, 罗佳波. 绿原酸水解产物的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析[J]. 药物分析杂志, 2011(7): 1345-1349.

[责任编辑 顾雪竹]