

藏药桃儿七 HPLC 指纹图谱产地识别及质量评价

叶耀辉*, 马越兴, 应亚宾, 张恩慧, 王婷, 张寿文
(江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:建立藏药桃儿七的 HPLC 指纹图谱,比较不同产地桃儿七成分含量差异,进行产地识别,综合评价桃儿七质量。方法:采用 HPLC, Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.04% 甲酸水为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,对 16 批桃儿七样品进行指纹图谱测定,并使用主成分分析和聚类分析对指纹图谱进行产地识别和质量评价。结果:建立了桃儿七药材指纹图谱;对 16 批样品相似度比较,标定了 29 个共有峰;各产地样品成分组成基本相同,但是含量存在一定差异;对各样品进行化学模式识别,根据主成分得分,产自西藏的药材质量最好。结论:该方法能够用于桃儿七药材综合评价及质量控制。

[关键词] 桃儿七; 指纹图谱; 产地识别; 质量评价

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0097-05

[doi] 10.11653/syfy2013240097

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131011.1446.005.html>

[网络出版时间] 2013-10-11 14:46

Study on Tibetan Medicine of *Sinopodophyllum hexandrum* Fingerprint by HPLC for Chemical Region Identification and Quality Evaluation

YE Yao-hui*, MA Yue-xing, YING Ya-bin, ZHANG En-hui, WANG Ting, ZHANG Shou-wen
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint of *Sinopodophyllum hexandrum* from different origin by HPLC, and compare the drug through the Chemical Pattern Recognition to provide the basis on comprehensive evaluation of the quality of *S. hexandrum*. **Method:** Based on HPLC method, Agilent Zorbax SB C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-0.04% formic acid as the mobile phase by gradient elution. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹; the column temperature was set at 30 ℃. 16 samples of *S. hexandrum* fingerprint were compared. Chemical pattern Recognition Method of *S. hexandrum* cluster was used to analyze on the origin and evaluate quality. **Result:** *S. hexandrum* fingerprint by HPLC was established with comparison of similarity for 16 batches of samples, calibration of the 29 common chromatographic peaks. The composition of each sample was the same, but the content was quite different. Based on the principal component analysis, the medicinal materia from Tibet was the best. **Conclusion:** The method can be used for *S. hexandrum* comprehensive evaluation and quality control.

[Key words] *Sinopodophyllum hexandrum*; HPLC fingerprint; origin identification; quality evaluation

珍稀濒危藏药桃儿七 *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying 是小檗科鬼臼亚科桃儿七属植物桃儿七干燥根及根茎^[1],主产于西藏、四川、陕西、甘肃、

云南、贵州等地,具有祛风除湿、杀蛊毒鬼注精物、辟恶气、解百毒的作用,具有抗肿瘤^[2]、祛痰止咳、抗炎、抗病毒等药理作用^[3],因此在藏医中应用广泛。

[收稿日期] 20130717(010)

[基金项目] 江西省卫生厅中医药科研基金课题项目(2012A035);江西中医学院课题(JZYC12B12)

[通讯作者] * 叶耀辉,副教授,硕士,从事中药资源、中药药理学研究, Tel:0791-87118716, E-mail:13870869779@139.com

在桃儿七药材质量控制方面多用鬼臼毒素作为其质量控制检查指标。近年来有文献报道^[4-7]关于桃儿七指纹图谱方面的研究,但均未能通过对桃儿七指纹图谱分析进一步对药材产地以及药材质量进行评价,未对药材优劣做出评判。基于以上分析,鉴于藏药桃儿七在生产、种植以及中医药的应用广泛,本实验采用 HPLC 对不同产地的桃儿七进行指纹图谱分析,对 16 批药材样品的指纹图谱参数指标进行评价,并对药材进行产地识别,进而评价药材质量,为全面综合评价桃儿七的质量提供实验依据。

1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,包括 G1311C 四元泵、G1316A 柱温箱、G1365 检测器、Agilent Chem 工作站;Satorius BS224S, CP225D 型电子天平。样品来源见表 1,对照品山柰酚(批号 MUST-12102503)、槲皮素(批号 MUST-121122203)、4'-去甲鬼臼毒素(批号 MUST-12121501)、鬼臼毒素(批号 MUST-10032803),杭州娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 安捷伦 ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.04% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱,(0 ~ 5 min 10% ~ 15% A, 5 ~ 30 min 15% ~ 35% A, 30 ~ 50 min 35% ~ 50% A, 50 ~ 70 min 50% ~ 70% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测器波长 254 nm,进样量 20 μL,分析时间 70 min。

2.2 对照品溶液 精密称取对照品山柰酚、槲皮素、4'-去甲鬼臼毒素、鬼臼毒素适量,加 70% 甲醇分别制成 1 mL 含 51.4, 30.6, 73.7, 89.5 μg 的溶液,备用。

2.3 供试品溶液 取供试样品粉末(过 5 号筛)约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 20 mL,称定质量,超声提取 30 min,放冷,用 70% 甲醇补足质量,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一批次供试品制备的溶液,连续进样 6 次,测定指纹图谱,经国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A)进行评价,结果表明,相似度 > 0.998,单峰面积 > 10% 总峰面积的色谱峰,其相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 3%,表明该方法精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取同一批次的供试品溶液 6

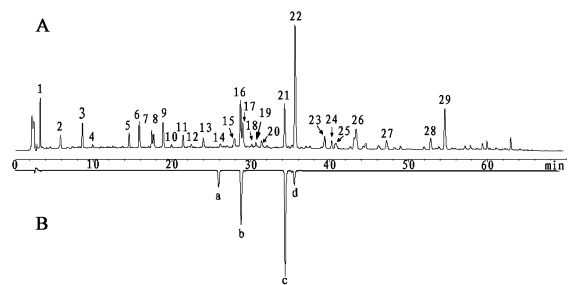
份,进行测定,考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性,结果显示各共有峰的相对保留时间和峰面积的 RSD 均 < 5%,表明该方法的重复性较好。

2.4.3 稳定性试验 取同一批次供试品溶液,分别在 0, 5, 10, 15, 24, 48 h 进样,考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比值的一致性,结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 均 < 5%,表明该方法稳定性良好。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱分析

3.1.1 共有峰的建立 取桃儿七 16 份样品按照 2.3 项下的方法制备样品;取 4 个对照品按照 2.2 项下的方法制备混合对照品,按照 2.1 项下色谱条件进行分析,记录 70 min 内的色谱图。根据 16 批样品溶液 HPLC 色谱提供的相关参数,确定桃儿七 29 个共有峰,其中 14, 16, 21, 22 号峰分别为山柰酚、槲皮素、4'-去甲鬼臼毒素、鬼臼毒素,将 22 号峰鬼臼毒素作为参照峰,代表性色谱见图 1。



A. 样品; B. 对照品; a. 山柰酚; b. 槲皮素;
c. 4'-去甲鬼臼毒素; d. 鬼臼毒素

图 1 桃儿七 HPLC 指纹图谱共有特征峰及对照品色谱峰

3.1.2 指纹图谱相似度 计算将 16 个样品的色谱图导入国家药典委员会《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A),设定匹配模块,色谱峰自动匹配,指纹图谱相似度见表 1,匹配结果见图 2。

从桃儿七相似度评价结果可以看出,各桃儿七样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度在 0.828 ~ 0.974,表明桃儿七药材由于产地、气候等原因,内在质量存在一定差异,需要对桃儿七药材进一步评价差异,以便建立可靠地药材标准指纹图谱。

3.2 主成分分析

3.2.1 共有峰的相对峰面积 将各色谱图的峰面积分别与同一色谱图中 22 号参照峰的峰面积进行比较,其比值即为各样品图谱中共有峰的相对峰面积,结果见表 2。

表 1 桃儿七来源及 HPLC 指纹图谱相似度分析

药材编号	产地	相似度
S1	西藏	0.840
S2	陕西太白山	0.950
S3	云南	0.941
S4	贵州	0.899
S5	贵州	0.906
S6	四川	0.901
S7	四川	0.891
S8	四川青川	0.939
S9	陕西西安	0.955
S10	陕西	0.828
S11	宁夏	0.916
S12	云南	0.859
S13	云南	0.911
S14	甘肃	0.974
S15	四川	0.894
S16	甘肃	0.969

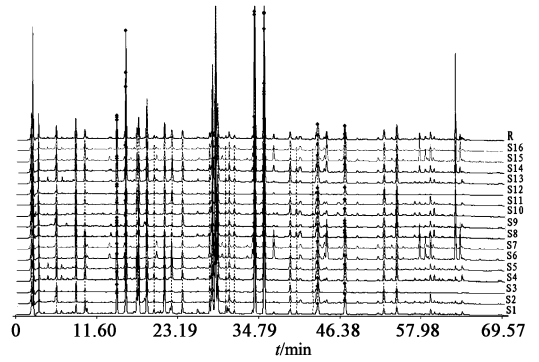


图 2 16 批桃儿七样品的 HPLC 指纹图谱

3.2.2 主成分聚类分析 使样本数据从原来的 n 维空间降到 m 维空间 ($n > m$),使数据信息不丢失的基础上投影至图上对样本进行分类。使用 SPSS 19.0 统计软件对 16 批桃儿七样品的 29 个共有峰峰面积进行主成分分析,四个主成分的累积方差贡献率为 88.809%,结果见表 3。故选取前 4 个主成分做 3D 得分图(图 3)。根据图 3 可以将桃儿七分为两大类,样品编号为 6,7,15 的分为第一类,其余样品分为第二类。

表 2 16 批样品共有峰的相对峰面积

峰号	相对峰面积																RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	
1	0.108	0.268	0.102	0.117	0.117	0.119	0.135	0.271	0.329	0.133	0.289	0.211	0.108	0.178	0.135	0.133	44.112
2	0.029	0.186	0.051	0.087	0.059	0.080	0.089	0.168	0.153	0.106	0.120	0.089	0.084	0.119	0.085	0.106	41.353
3	0.045	0.198	0.069	0.084	0.063	0.153	0.172	0.196	0.205	0.114	0.223	0.135	0.079	0.142	0.172	0.114	41.718
4	0.075	0.039	0.028	0.069	0.069	0.095	0.102	0.043	0.059	0.055	0.084	0.058	0.063	0.052	0.098	0.055	32.685
5	0.243	0.109	0.057	0.271	0.212	0.022	0.021	0.102	0.114	0.169	0.247	0.121	0.271	0.070	0.022	0.169	64.596
6	0.374	0.287	0.282	0.778	0.626	0.076	0.077	0.310	0.185	0.415	0.676	0.332	0.715	0.164	0.094	0.415	63.359
7	0.136	0.049	0.020	0.104	0.096	0.007	0.007	0.039	0.049	0.083	0.147	0.064	0.119	0.039	0.007	0.083	70.149
8	0.730	0.179	0.108	0.132	0.103	0.041	0.043	0.197	0.110	0.114	0.298	0.207	0.123	0.084	0.040	0.114	100.889
9	0.287	0.160	0.217	0.403	0.381	0.098	0.107	0.181	0.103	0.258	0.528	0.245	0.393	0.117	0.104	0.258	54.465
10	0.026	0.034	0.015	0.038	0.038	0.015	0.015	0.032	0.018	0.027	0.037	0.023	0.037	0.020	0.016	0.027	34.118
11	0.497	0.123	0.084	0.079	0.079	0.061	0.067	0.126	0.058	0.084	0.207	0.153	0.085	0.067	0.058	0.084	90.695
12	0.058	0.025	0.014	0.134	0.163	0.009	0.008	0.034	0.038	0.073	0.188	0.045	0.141	0.024	0.011	0.073	91.429
13	0.068	0.182	0.024	0.060	0.058	0.052	0.057	0.174	0.066	0.064	0.082	0.069	0.060	0.079	0.055	0.064	55.239
14	0.043	0.013	0.038	0.014	0.012	0.058	0.067	0.010	0.025	0.028	0.020	0.027	0.020	0.028	0.050	0.028	56.240
15	0.260	0.090	0.125	0.543	0.601	0.099	0.095	0.122	0.094	0.299	0.175	0.129	0.534	0.090	0.087	0.299	79.145
16	0.573	1.124	0.402	1.028	0.877	0.786	0.944	1.170	0.757	0.967	0.928	0.262	1.054	0.800	0.807	0.967	29.682
17	0.190	0.352	0.108	0.233	0.218	0.161	0.188	0.322	0.255	0.272	0.474	0.257	0.249	0.225	0.164	0.272	35.002
18	0.032	0.017	0.013	0.013	0.011	0.013	0.012	0.019	0.020	0.015	0.021	0.015	0.013	0.015	0.012	0.015	33.009
19	0.023	0.105	0.021	0.045	0.038	0.061	0.065	0.098	0.061	0.043	0.091	0.030	0.038	0.052	0.059	0.043	46.390

续表 2

峰号	相对峰面积																RSD/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	
20	0.020	0.047	0.021	0.025	0.023	0.023	0.026	0.043	0.062	0.033	0.064	0.023	0.022	0.040	0.025	0.033	42.915
21	0.590	1.099	0.540	0.788	0.783	1.720	1.951	1.031	0.747	0.994	1.236	0.350	0.868	1.037	1.739	0.994	43.439
22	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000
23	0.051	0.120	0.078	0.079	0.079	0.029	0.030	0.100	0.089	0.070	0.106	0.070	0.076	0.070	0.030	0.070	36.923
24	0.019	0.028	0.016	0.018	0.016	0.008	0.007	0.029	0.048	0.015	0.033	0.014	0.012	0.024	0.008	0.015	55.905
25	0.007	0.022	0.013	0.006	0.006	0.008	0.009	0.024	0.012	0.009	0.023	0.011	0.006	0.012	0.009	0.009	52.510
26	0.126	0.347	0.183	0.153	0.141	0.162	0.174	0.269	0.202	0.143	0.369	0.144	0.134	0.178	0.166	0.143	39.107
27	0.188	0.070	0.111	0.132	0.101	0.242	0.272	0.071	0.097	0.140	0.148	0.140	0.132	0.138	0.240	0.140	40.387
28	0.042	0.233	0.019	0.063	0.054	0.096	0.116	0.136	0.115	0.057	0.339	0.022	0.051	0.071	0.119	0.057	83.464
29	0.056	0.210	0.047	0.105	0.096	0.101	0.113	0.208	0.312	0.102	0.166	0.028	0.076	0.165	0.119	0.102	57.578

表 3 桃儿七主成分分析主因子方差解释

	特征值 λ	方差贡献率/%	累积贡献率/%
第一主成分	10.623	36.361	36.361
第二主成分	7.304	25.186	61.817
第三主成分	5.003	17.252	79.069
第四主成分	2.825	9.740	88.809

聚类分析,利用欧式距离进行样品测度,16批药材样品可分为两大类,6,15,7分为第一大类,其余样品分为第二大类,与主成分分析结果一致,聚类分析结果见图4。

表 4 主成分综合得分及排名

No.	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	综合得分 F	排名
S1	0.120 87	-0.598	-0.601 93	1.742 02	1.519 731	1
S10	-0.188 83	0.048 45	1.002 02	0.804 24	0.862 085	2
S14	0.019 1	0.303 76	0.356 4	0.261 36	0.409 876	3
S8	-0.153 66	0.148 94	0.588 95	0.345 12	0.377 009	4
S6	0.018 33	0.585 5	-0.544 37	0.140 06	0.181 277	5
S7	0.004 23	0.629 89	-0.535 18	0.083 86	0.140 266	6
S15	0.260 67	0.072 3	0.119 86	-0.027 3	0.108 874	7
S16	-0.071 95	0.478 12	-0.459 95	-0.053 84	-0.049 51	8
S13	0.569 57	-0.206 42	0.022 67	-0.405 3	-0.239 16	9
S9	-0.227 71	-0.010 83	0.235 55	-0.276 14	-0.243 25	10
S5	0.505 26	-0.239 06	0.146 47	-0.444 37	-0.301 22	11
S2	-0.201 32	0.064 21	0.232 22	-0.395 58	-0.312 89	12
S4	0.413 79	-0.209 66	0.062 97	-0.456 19	-0.346 46	13
S11	-0.200 47	-0.144 92	0.015 77	-0.389 5	-0.461 24	14
S3	-0.388 15	-0.384 88	-0.257 58	-0.351 68	-0.673 18	15
S12	-0.479 74	-0.537 38	-0.383 87	-0.576 76	-0.972 2	16

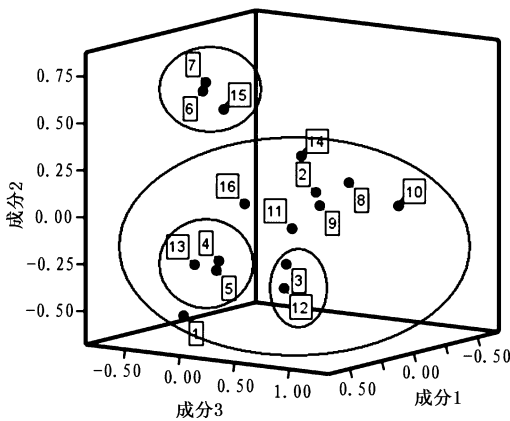


图 3 主成分得分

3.2.3 主成分综合评分 根据 3.2.1 项下主成分分析,将样品的 29 个特征峰峰面积进行得分计算,将特征值贡献率作为加权系数计算综合得分(综合得分 $F = 0.363 61F_1 + 0.251 86F_2 + 0.172 52F_3 + 0.097 40F_4$),通过药材 29 个特征峰面积进行综合评分,以区分药材优劣^[8],实验结果见表 4。从综合得分可以看出 1 号药材得分最高,说明药材质量较好,3、12 号药材得分最低,药材质量一般。

3.3 系统聚类分析 将 16 批桃儿七样品的 29 个共有峰相对峰面积进行聚类分析,将鬼臼毒素(22 号峰)设为参照峰,计算其他色谱峰相对参照峰的峰面积。运用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行系统

4 讨论

4.1 色谱波长优选 根据 200 ~ 400 nm 光谱扫描,对比各波长下的色谱图,结果表明,在 254 nm 处指纹图谱特征峰明显,峰分离度良好,峰形较好,从该波长下能够获取到反应体系组成的全貌以及各组分信息,因此选定 254 nm 作为检测波长。

4.2 流动相选择 选用甲醇-水、乙腈-水、甲醇-甲酸溶液、乙腈-甲酸溶液等流动相体系进行梯度洗

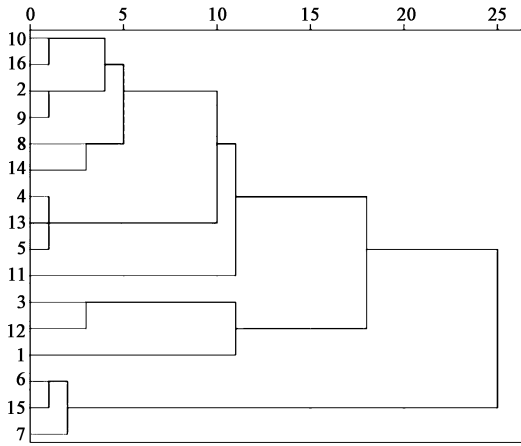


图4 桃儿七样品系统聚类分析结果

脱,结果表明,使用乙腈-甲酸溶液体系时基线平稳,峰形良好,各色谱均实现较好分离,因此选择乙腈-甲酸溶液作为流动相。

4.3 供试品溶液制备条件 选择比较回流提取和超声提取、提取溶剂(水、30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇)、提取时间(20,30,40,60 min)的提取效果,结果表明,70% 甲醇超声提取 30 min 色谱峰面积较大,峰数目多,能最大限度的反应药材特征值。

4.4 药材产地聚类分析 应用系统聚类分析和主成分分析两种化学计量方法对桃儿七进行色谱积分探讨,两者识别结果相似,均把桃儿七药材分为两大类,说明各批桃儿七药材之间既存在明显的差异又存在一定的相似性。将 6,7,15 号药材聚为一类,均产自四川;1 号药材单独为一类,产自西藏;3,12 号药材分为一类,药材产地为云南;4,5,13 号分为一类,产自云贵高原;2,8,9,10,11,14,16 号药材分为一类,药材产自陕西、甘肃等北方地区。综上分类结果分析,各批药材组成成分相似,但含量存在一定的差异性。表明桃儿七药材化学成分及含量受海拔高度以及气候条件的影响较大,系统聚类分析与主成分分析相结合对药材进行化学模式识别,可以相互支持,互为依托,这种识别方法能够直观的为药材产地评价提供实验依据,为客观的鉴别药材质量提供

技术支持。

4.5 药材质量评价 通过对桃儿七指纹图谱 29 个共有峰峰面积进行主成分综合分析,对药材各成分进行综合评分,产自西藏的药材得分最高,质量最好,而产自云南的药材综合得分较低,质量相对较差。结合药材产地聚类与药材综合得分分析,除道地产地西藏的桃儿七质量较好外,产自我国北方陕西、甘肃的药材质量也较满意。

本实验建立了藏药桃儿七指纹图谱,并对其参数进行主成分分析和系统聚类分析,探讨药材质量与产地的关系,为桃儿七的 GAP 种植奠定了基础,同时也为桃儿七的质量控制与品质评价提供一定的参考。今后还需进一步对桃儿七的生长环境以及物种多样性进行考察,以保证桃儿七的质量控制模式更具有代表性和特征性,为珍惜濒危藏药人工栽培提供支持,以保障桃儿七及其制剂质量的稳定。

[参考文献]

- [1] 林瑞超. 中国药材标准名录[M]. 北京:科学出版社,2011.
- [2] 尚明英,徐璐珊,李萍,等. 鬼臼类中药及其木脂素类成分的药效学研究[J]. 中草药,2002,33(8):722.
- [3] 马越兴,张文雪,贺瑾,等. 藏药桃儿七鬼臼成分提取分离及抗癌作用研究进展[J]. 赣南医学院学报,2012,32(6):959.
- [4] 熊文勇,魏朔南,岳明. 桃儿七 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2010,32(11):1850.
- [5] 秦杨. 桃儿七化学成分研究[D]. 吉林:吉林大学,2009.
- [6] 陈燕,德吉,刘云华,等. 藏药材桃儿七果实 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中成药,2010,32(5):7.
- [7] 粟晓黎,林瑞超,王兆基,等. 中药鬼臼毒性成分 HPLC/UV 指纹图谱分析方法研究及与威灵仙、龙胆 HPLC 图谱比较[J]. 中成药,2000,22(12):819.
- [8] 曹红翠,吴启勋. 中药甘草中微量元素的主成分分析和系统聚类分析[J]. 甘肃联合大学学报:自然科学版,2010,24(2):61.

[责任编辑 顾雪竹]