

藤茶的 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究

苏素娇¹, 李娜¹, 陈亮¹, 林培玲², 丁春花³, 陈诗强¹, 梁一池^{1*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350122;

2. 漳州卫生职业学院, 福建漳州 363000; 3. 西岸生物科技有限公司, 福建宁德 355300)

[摘要] 目的:建立藤茶药材 HPLC 指纹图谱,并进行主成分聚类分析,为其质量控制提供依据。方法:采用 UltimateXB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈-0.5% 甲酸溶液梯度洗脱,检测波长 365 nm;柱温 40 ℃;应用 SPSS 软件对数据进行统计学分析。结果:建立了藤茶药材 HPLC 指纹图谱共有模式,确定了 11 个共有峰,并指认了 2 个主要共有峰。通过主成分聚类分析,18 个藤茶不同无性系种质可分为 3 类。结论:该方法快速,可较全面的反映藤茶药材中化学成分的信息,为评价藤茶药材提供了科学实验依据。

[关键词] 藤茶; 高效液相色谱指纹图谱; 主成分分析; 聚类分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0144-04

[doi] 10.11653/syjf2013220144

[收稿日期] 20130313(004)

[基金项目] 福建省科技厅社发处重大项目(2011Y4005)

[第一作者] 苏素娇,在读硕士,从事质量控制与品质评价研究,Tel:15806024425,E-mail:583071742@qq.com

[通讯作者] *梁一池,博士生导师,教授,从事中药材品质评价与质量标准研究,Tel:13799399596,E-mail:fafulyc@126.com

间,用 40 倍量提取 0.5 h 效率高。

3.3 结果分析 不同产地的生品和炮制品中,大戟二烯醇和甘遂甾醇的含量比值约为 2:1,炮制前后二者变化趋势一致,其中,炮制前后大戟二烯醇的含量均符合药典标准(不少于 0.6%)。历版药典中,以醋制来降低京大戟毒性,缓和其泻下作用。在本研究中,醋京大戟中 3 种三萜成分略有降低,经过统计学分析,与生品未有显著性差异($P > 0.05$)。所以若要应用抗炎、降压、抗肿瘤等功效,可以以炮制品代替生品使用。

[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,2010:209.
- [2] 张乐林,孙立立. 京大戟现代研究概述[J]. 中华中医药学刊,2011,29(3):577.
- [3] 严亨波,肖新月,马双成,等. 大戟科 5 种有毒中药材的活性成分及质量标准研究进展[J]. 中国药师,2007,10(6):544.
- [4] 曹小迎. 京大戟三萜成分及生物合成途径中关键酶研究[D]. 徐州:中国矿业大学.

- [5] Loizou S, Paraschos S, Mitakou S, et al. Chiosmastic gum extractand isolated phytosterol tirucallol exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234(5):553.
- [6] Singh G B, Singh S, Sharma M L, et al. Hypotensive activity of 8, 24-euphadien-3β-ol (euphol) [J]. Planta Med, 1989, 55(6):498.
- [7] Yasukawa K, Akihisa T, Yoshida Z Y, et al. Inhibitory effect of euphol; a triterpene alcohol from the roots of *Euphorbia kansui* on tumourpro-motion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin [J]. J Pharm Pharmacol, 2000, 52(1):119.
- [8] Era Tavčar, Matej Barbič, Jörg Heilmann, et al. High levels of cycloartenol derivatives from *Euphorbia acanthothamnos* [J]. Biochem Syst, Ecol, 2012, 44:83.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 第一增补本[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:106.

[责任编辑 顾雪竹]

HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition Method of *Ampelopsis grossedentata*

SU Su-jiao¹, LI Na¹, CHEN Liang¹, LIN Pei-ling², DING Chun-hua³, CHEN Shi-qiang¹, LIANG Yi-chi^{1*}

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

2. Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China;

3. Fujian West Coast-Biotechnology Co., Ltd., Ningde 355300, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC fingerprint of *Ampelopsis grossedentata*, and to make evaluation by principal component and cluster analysis for its quality control. **Method:** The HPLC analysis was performed on a UltimateXB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with column temperature at 40 °C. The mobile phase was consisted of water containing 0.5% formic acid and acetonitrile in gradient mode. The detection wavelength was set at 365 nm. All data were analyzed with the SPSS statistical software. **Result:** The mutual mode of HPLC fingerprint has been established. There were 11 common peaks, two of which were identified. 18 samples from different clonal germplasm were classified into three groups based on principal component and cluster analysis. **Conclusion:** The method was time-saving and represent the chemical information and provide a scientific basis for quality control of *Ampelopsis grossedentata*.

[Key words] *Ampelopsis grossedentata*; HPLC fingerprint; principal component analysis; cluster analysis

藤茶系葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄的嫩茎叶,又名甜茶藤、田婆茶、龙须茶、白茶、甘露茶等,主要分布在福建、广东、湖北、贵州等地,其味甘、淡,性凉,具有清热解毒、利湿消肿的功效,主治黄疸型肝炎、感冒风热、咽喉肿痛、目赤肿痛、痈肿疮疖等,夏天泡茶数日不馊,有“神茶”之称^[1-2]。藤茶原植物生长于 400 ~ 1 300 m 的山地灌丛、林中、石上、沟边。藤茶多为民间用药,尚未被列入药典,一些地方标准对藤茶的评价也很不全面,仅以藤茶总黄酮为指标。指纹图谱针对中药多组分、多靶点的特点,从“全成分”角度出发进行质量控制。因此,本实验建立藤茶的不同无性系指纹图谱研究,综合运用相似度评价、主成分分析、聚类分析等识别技术^[3-6],为全面评价藤茶及选择优良无性系提供实验依据。

1 材料

Waters e2695 型高效液相色谱仪 (HPLC) 包括四元泵,在线脱气机,自动进样器,柱温箱,2998PDA 检测器,Empower3 工作站(美国 Waters 公司),THC-10B 型数控超声波提取器(济宁天华超声电子仪器有限公司),Sartorius CP225 D 型电子天平(德国 Sartorius 公司),AR2130(1/千)型电子天平(奥豪斯仪器有限公司制造),Millipore 超纯水机(法国 Millipore 公司)。

二氢杨梅素对照品(批号 MUST-12013108)、杨

梅素对照品(批号 MUST-12020102),均购自成都曼思特生物科技有限公司,纯度 ≥ 98%,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

藤茶药材共 18 个不同无性系种质,同时采自福建中医药大学高新技术产业园尤溪藤茶基地,经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室范世明高级实验师鉴定为葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* (Hand-Mazz) W. T. Wang 的嫩茎叶,来源见表 1。药材在 40 °C 下干燥至恒重,粉碎过 40 目筛,备用。

表 1 藤茶无性系来源

No.	无性系号	No.	无性系号
S1	MM-1	S10	DGL-1
S2	MM-2	S11	DGL-2
S3	MM-3	S12	LYD
S4	PS-1	S13	MY
S5	PS-2	S14	XS-1
S6	QT-1	S15	XS-2
S7	QSK-1	S16	TJ-1
S8	QSK-2	S17	TJ-2
S9	QSK-3	S18	WYT

2 方法与结果

2.1 色谱条件 UltimateXB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-0.5% 甲酸溶液

(B), 梯度洗脱 (0 ~ 50 min, 10% ~ 20% A; 50 ~ 75 min, 20% ~ 30% A), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 365 nm, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL。

2.2 对照品的制备 分别精密称取二氢杨梅素、杨梅素对照品适量, 于 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇至刻度配制质量浓度分别为 1.0, 0.2 g·L⁻¹ 的对照品溶液, 避光保存, 作为对照品溶液。

2.3 供试品的制备 称取各无性系藤茶粉末约 0.5 g, 于 100 mL 锥形瓶中, 量取 60% 的乙醇溶液 15 mL, 称定质量, 浸泡 30 min 后, 超声提取 30 min, 称重, 补足失重, 混匀, 滤过, 滤液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 备用。

2.4 数据处理 利用 EXCEL, SPSS 19.0 对 18 个不同藤茶无性系液相数据进行处理分析。

2.5 指纹图谱方法学考察

2.5.1 精密度试验 取供试品 (S13) 溶液, 按 2.1 项所述色谱条件重复进样 6 次。结果表明, 11 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 0.5%, 相对峰面积的 RSD 均 < 2%, 表明仪器精密度良好, 符合指纹图谱要求。

2.5.2 稳定性试验 取供试品 (S13) 溶液, 在室温下放置, 按 2.1 项所述色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样分析。结果表明, 11 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 2%, 表明该样品在 24 h 内稳定。

2.5.3 重复性试验 精密称取 (S13) 样品 6 份, 按 2.3 项供试品溶液的配制方法处理得供试品溶液, 按 2.1 项所述色谱条件测定, 结果表明, 11 个共有峰的相对保留时间的 RSD 均 < 2%, 相对峰面积的 RSD 均 < 5%, 表明该方法重复性良好, 符合指纹图谱要求。

2.6 不同藤茶无性系指纹图谱的建立

2.6.1 共有峰的确定 精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 按照 2.1 项所述色谱条件进样, 记录其 75 min HPLC 图。以上 18 个藤茶无性系的 HPLC 图均有 11 个共有峰 (图 1), 各共有峰较稳定, 具有指纹图谱特征性, 可初步拟定为藤茶的指标成分群。经对照品对照, 2 号峰为二氢杨梅素, 10 号峰为杨梅素。

2.6.2 相似度评价 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 A 版》, 通过色谱峰多点校正的方法对 18 个藤茶无性系指纹图谱色谱峰进行自动匹配, 得出 18 个藤茶无性系的相似度计算结果, 见表 2, 指纹图谱的叠加图见图 2。

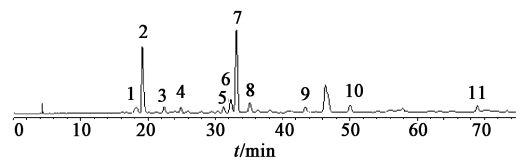


图 1 藤茶的 HPLC 指纹图谱共有模式

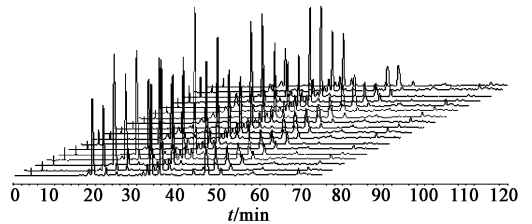


图 2 18 个藤茶无性系指纹图谱叠加

表 2 18 个藤茶无性系 HPLC 指纹图谱相似度

No.	相似度	No.	相似度
S1	1	S10	0.964
S2	0.987	S11	0.908
S3	0.979	S12	0.985
S4	0.992	S13	0.992
S5	0.984	S14	0.962
S6	0.979	S15	0.924
S7	0.942	S16	0.989
S8	0.985	S17	0.94
S9	0.978	S18	0.976

由相似度计算的结果表明, 各个无性系间有良好的相似度, 说明其成分的组成基本上是一致的, 但成分含有量存在差异, 其影响因素可能与生长环境有关, 有待进一步探讨。

2.6.3 主成分分析 通过 SPSS 19.0 软件对 18 个藤茶无性系中共有峰面积进行主成分分析, 结果见图 3。

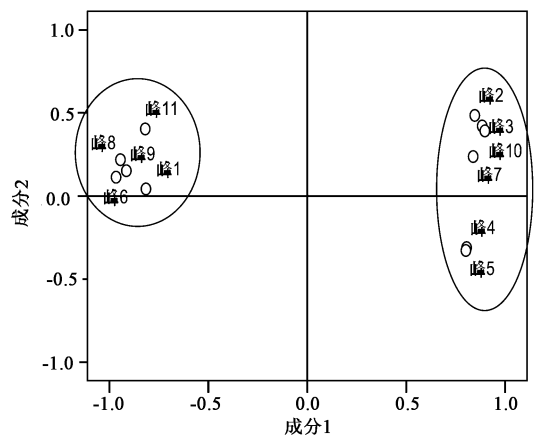


图 3 藤茶指纹图谱二维投影

主成分的特征值及贡献率是选择主成分的依据,特征值 >1 的有因子 1 和因子 2,对总方差的累积贡献率达 85.23%,基本能反映藤茶的总体信息,故抽取前 2 个为主成分,由二维投影可知,第一主成分主要由原始指标色谱峰 2,3,4,5,7,10 决定,这些峰的峰面积均较大,说明成分的含量更高,而藤茶的主要有效成分二氢杨梅素及杨梅素都归在第一主成分上,若第一主成分较第二主成分得分高的藤茶无性系,则认为质量更好;第二主成分由峰 1,6,8,9,11 决定,这些峰的峰面积均较小,贡献率也较低,用这两个主成分就可表示原 HPLC 数据的主要信息。将共有峰面积标准化处理后得 Z 峰 1 ~ Z 峰 11,根据公式可以得到 2 个主成分与原 11 项指标的线性组合如下,计算各个无性系两个主成分的得分 Y_1, Y_2 ,结果见表 3。

表 3 主成分因子得分表

No.	Y_1	Y_2	No.	Y_1	Y_2
S1	0.579	0.432	S10	-1.351	-1.274
S2	0.784	0.381	S11	-2.462	-0.822
S3	5.407	-0.624	S12	2.677	2.119
S4	1.202	0.559	S13	-1.648	0.581
S5	4.571	0.836	S14	-1.908	0.095
S6	4.017	-1.982	S15	-2.314	-0.897
S7	-1.379	1.773	S16	-3.931	-0.028
S8	-3.669	-0.085	S17	2.942	-0.797
S9	-1.615	-0.787	S18	-1.902	0.519

表 4 不同藤茶无性系聚类分析

评价	共有峰峰面积	第一主成分	第二主成分	综合得分
好	12,5	12, 5,3,6, 17	12,7	12,4,2,1
中	1,7,2,4,3,17,6	4,2,1	5,18,13,4,2,1,14,16,8	5,3,17,6
差	18,14,13,16,9,10,8,15,11	16,8,15,11,13,9,10,7,18,14	6,10,3,15,11,17,9	7,16,8,14,18,13,10,9,15,11

制备供试品溶液时,比较了溶剂(水,30%乙醇,60%乙醇,乙醇,甲醇)、时间(20,30,40 min)和温度(30,40,50,60 ℃)的提取效果,结果表明,藤茶药材在 50 ℃下,采用 60% 乙醇提取 30 min 时色谱峰总数多且总峰面积大,能最大限度地反映药材的整体特征。

结合主成分聚类分析 2 种化学计量学方法对藤茶进行了模式识别的探讨,两者的判断结果较一致,均将不同藤茶无性系分为 3 类,即好、中、差 3 个等级,说明藤茶不同无性系间各成分的含量有较大的差别,主要原因可能是受气候、土壤等因素影响,有待考证。主成分分析能够筛选出共有的特征成分,指导发现决定性要素,与聚类分析结合使用,可相互支持,相互依托,弥补了单纯从相似度评价指纹图谱的不足,更为客观地评价中药真伪与优劣,可作为控制药材质量的一种手段。

$$Y_1 = -0.283 Z_{\text{峰}1} + 0.294 Z_{\text{峰}2} + 0.307 Z_{\text{峰}3} + 0.279 Z_{\text{峰}4} + 0.278 Z_{\text{峰}5} - 0.336 Z_{\text{峰}6} + 0.291 Z_{\text{峰}7} - 0.328 Z_{\text{峰}8} - 0.318 Z_{\text{峰}9} + 0.312 Z_{\text{峰}10} - 0.284 Z_{\text{峰}11}$$

$$Y_2 = -0.041 Z_{\text{峰}1} + 0.468 Z_{\text{峰}2} + 0.406 Z_{\text{峰}3} - 0.300 Z_{\text{峰}4} - 0.316 Z_{\text{峰}5} + 0.109 Z_{\text{峰}6} + 0.228 Z_{\text{峰}7} + 0.211 Z_{\text{峰}8} + 0.147 Z_{\text{峰}9} + 0.378 Z_{\text{峰}10} + 0.389 Z_{\text{峰}11}$$

2.6.4 聚类分析 分别以共有峰的峰面积、2 个主成分的得分值 Y_1, Y_2 和 2 个主成分的综合得分为变量,采用 SPSS 19.0 数据统计软件组间平均数联结法,以平方欧氏距离,进行系统聚类分析,见表 4。不同无性系可聚为 3 类,将 18 个藤茶无性系分为 3 个等级:好、中、差,作为质量评价参考。

3 讨论

本实验采用全波长监测,结果显示,在 291 nm 时,由于二氢杨梅素的含量达 20%^[7],将其余峰压低,不能反映药材整体性。以 365 nm 为检测波长,基线较平稳,检出峰各峰比例适中,能基本反映出藤茶提取物中多成分的整体面貌,故选择以 365 nm 作为检测波长。实验采用甲醇-0.5% 甲酸溶液、乙腈-0.5% 甲酸溶液系统梯度洗脱作为流动相,结果以乙腈-0.5% 甲酸系统洗脱效果较好。同时考察了 120 min 的色谱图显示,75 min 后无其他色谱峰出现。

[参考文献]

[1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴. 二册补编[M]. 北京:科学出版社,1983:355.

[2] 中国中医药管理局编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008:4229.

[3] 梁一池,黄铭利. 锥栗优良无性系结实稳定性的研究[J]. 福建林学院学报,1998,18(3):193.

[4] 梁一池,吴志庄,阮少宁. 肉桂多性状综合选优的研究[J]. 林业科学,2001,37(1):159.

[5] 梁一池,黄铭利,郑金炎,等. 锥栗无性系产量变异及选择的研究[J]. 经济林研究,1995,13(1):6.

[6] 林培玲,曾建伟,丁春花,等. 草珊瑚药材 HPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):856.

[7] 范世明,梁一池,王河山. HPLC 法测定闽产显齿蛇葡萄中二氢杨梅素的含量[J]. 福建中医药大学学报,2012,22(1):46.

[责任编辑 顾雪竹]