

穿龙薯蓣 HPLC 指纹图谱及模式识别

尹海波*, 康廷国, 张圉, 杨小乐
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:建立穿龙薯蓣药材 HPLC 指纹图谱。方法:Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm,5 μm) 色谱柱;流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱,检测波长 203 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹。收集了不同产地野生和栽培的 28 批样品进行测定,采用主成分分析筛选出 12 批样品,聚类分析结果与主成分分析结果相似,剔除 1 个距离较远的样品,最终筛选 11 批样品建立指纹图谱共有模式。结果:确立了 14 个共有峰,方法学考察结果良好,11 批样品的相似度均>0.866。结论:该方法可用于穿龙薯蓣质量控制及综合评价。

[关键词] 穿龙薯蓣; 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(2012)22-0145-04

HPLC Fingerprint Analysis and Pattern Recognition
of *Dioscorea nipponica*

YIN Hai-bo*, KANG Ting-guo, ZHANG Nan, YANG Xiao-le
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish *Dioscorea nipponica* HPLC fingerprint. **Method:** The separation was performed on a Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column, with acetonitrile-water as mobile phase for gradient elution; the UV detector was set at 203 nm; the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. There were 28 samples of wild and cultivated from various places to be analyzed. There were 12 samples selected by principal component analysis (PCA), the result of cluster analysis was similar with PCA, except one sample which had been eliminated. 11 samples were selected to establish the common pattern of the fingerprint. **Result:** 14 marked common peaks were established, inspection results of the method were good, the similarities of 11 samples were more than 0.866. **Conclusion:** The method provides an academic reference for the quality control of *Dioscorea nipponica*.

[Key words] *Dioscorea nipponica*; fingerprint; principal component analysis (PCA); cluster analysis

穿龙薯蓣为薯蓣科植物穿龙薯蓣的干燥根茎^[1],收载于2010年版《中国药典》一部^[2],有效成分为甾体皂苷类。其皂苷和皂苷元有抗肿瘤报道^[3-4],具有很好的药用价值,现代已作为甾体激素药物和抗冠心病皂苷类药物的重要工业原料。目前多用薯蓣皂苷作为药材质量控制指标,原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷的同时测定也有报道,但单指标或两指标的含量测定尚不能对药材的质量做出综合判断,必须借助现代分析技术。指纹图谱是中药材及中药制剂质量分析的有效手段,目前已有文献报道采用HPLC指纹图谱并结合主成分分析及聚类分析等统计方法对药材质量进行综合评价^[5-8],且结果稳定可靠。因此本实验通过HPLC建立药材的指纹图谱,并运用主成分分析和聚类分析的方法,对所得图谱进行分析和解析,选择可进入建立共有模式的样品,建立合理的指纹图谱共有模式,为全面控制穿龙薯蓣药材的质量提供方法。

[收稿日期] 20111129(008)

[基金项目] 辽宁省教育厅项目(2009A498);校优秀青年药学人才基金(yxrc0904)

[通讯作者] *尹海波,副教授,硕士研究生导师,从事种质资源鉴定及中药的品质评价研究; Tel: 15998530628, 0411-87586003, E-mail: yhb0528@sina.com

1 材料

Agilent1100 型高效液相色谱仪,VWD 紫外检测器,KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),CP225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

乙腈色谱纯,乙醇(95%)分析纯,水为重蒸水。薯蓣皂苷(自制,纯度≥98%)和原薯蓣皂苷(天津马克生物技术有限公司,纯度≥98%)。所用穿龙薯蓣药材收集于 2009 年 7-9 月,见表 1,经辽宁中医药大学药用植物教研室尹海波副教授鉴定为穿龙薯蓣 *Dioscorea nipponica* Maknio 的干燥根茎,凭证标本保存于本院药用植物教研室。

表 1 穿龙薯蓣药材产地及来源

No.	产地	来源	No.	产地	来源
S1	吉林通化	四年生	S15	辽宁丹东	野生
S2	吉林梅河口	林下野生	S16	辽宁铁岭	二年生苗
S3	吉林梅河口	田间野生	S17	辽宁桓仁	野生
S4	吉林磐石	野生	S18	辽宁本溪	野生
S5	吉林敦化	野生	S19	北京香山	野生
S6	吉林安图	野生	S20	山东泰安	野生
S7	黑龙江牡丹江	移栽四年	S21	吉林通化	四年生
S8	黑龙江牡丹江	野生	S22	辽宁铁岭	三年生
S9	黑龙江鸡西	四年生	S23	中科院植物园	栽培
S10	黑龙江鸡西	三年生	S24	河北易县	野生
S11	黑龙江佳木斯	野生	S25	河北遵化	野生
S12	黑龙江伊春	野生	S26	天津蓟县	野生
S13	黑龙江哈尔滨	野生	S27	山东潍坊	野生
S14	辽宁沈阳	野生	S28	辽宁鞍山	野生

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),检测波长 203 nm,柱温 35 ℃,体积流量 1 mL·min⁻¹,流动相(A)乙腈,(B)水梯度洗脱(0~6 min,23~25A;6~10 min,25~27A;10~20 min,27~44A;20~25 min,44~44A;25~30 min,44~54A;30~40 min,54~54A;40~50 min,54~64A;50~60 min,64~66A;60~65 min,66~68A;65~75 min,68~96A;75~84 min,96A),进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取原薯蓣皂苷对照品 27.75 mg,置 25 mL 量瓶中,用 10 mL 蒸馏水溶解,再加入 15 mL 乙腈,稀释至刻度,摇匀制成每 1 mL 含 1.11 mg 的对照品溶液备用;精密称取薯蓣皂苷对照品 35.0 mg,置 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解稀释至刻度,摇匀制成每 1 mL 含 0.7 mg 的对照品

溶液备用。精密吸取两对照品溶液各 5 mL,置于 25 mL 量瓶中,摇匀备用。

2.3 供试品溶液的制备 精密称定穿龙薯蓣药材粉末 0.5 g,,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 30 倍量 75% 乙醇,密塞,称重,超声处理 30 min,过滤后再加 30 倍 75% 乙醇,超声处理 30 min 后过滤,合并过滤液,浓缩定容于 25 mL 量瓶中,作为供试品溶液备用。

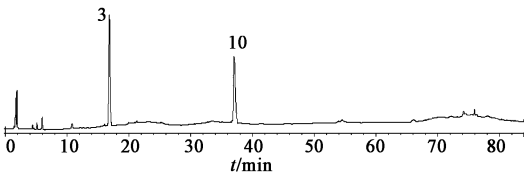
2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液,连续进样 6 次,以薯蓣皂苷为参比峰,各共有峰的相对保留时间和峰面积比值基本一致(RSD<3%),符合指纹图谱的要求。

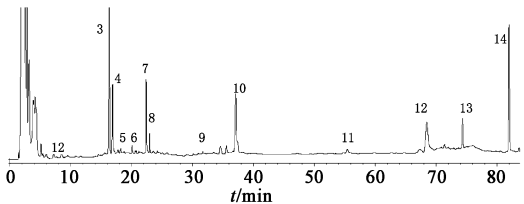
2.4.2 重复性试验 精密称取同一批药材粉末 6 份,按照 2.3 项下方法制备供试品溶液进行测定,以薯蓣皂苷为参比峰,各共有峰的相对保留时间和峰面积比值基本一致(RSD<3%),符合指纹图谱的要求。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液,在室温下放置,分别于 0,4,8,12,24 h 测定,以薯蓣皂苷为参比峰,各共有峰的相对保留时间和峰面积比值基本一致(RSD<3%),符合指纹图谱的要求,供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 样品测定 测定不同产地野生、不同生长年限栽培穿龙薯蓣根茎样品,详细比较各样品的 HPLC 色谱图,确定了 14 个主要特征峰,构成穿龙薯蓣的指纹图谱;其中 3 号峰和 10 号峰分别为原薯蓣皂苷和薯蓣皂苷。以 10 号峰为参照峰,对照品及代表性色谱见图 1,2。



3. 原薯蓣皂苷;10. 薯蓣皂苷
图 1 对照品高效液相色谱



3. 原薯蓣皂苷;10. 薯蓣皂苷

图 2 样品高效液相色谱及主要特征峰

2.6 相似度评价 将 28 个穿龙薯蓣样品指纹图谱的 AIA 数据文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)》软件,对上述药材进行相似度评价,以样品 S1 作为参照图谱,多点校正生成对照图谱 R,计算各样品指纹图谱与生成的对照图谱 R 的相似度,相似度在 0.695 ~ 0.964,大部分样品相似度较高,但是由于产地、生长年限等原因,不能直接建立穿龙薯蓣药材指纹图谱的共有模式。需对各药材进行进一步分析样品间差异,进行图谱模式识别分类,以便最终能够建立真实可靠的穿龙薯蓣药材标准指纹图谱。

2.7 主成分分析 各穿龙薯蓣样本经过上述实验方法获得各自的色谱数据,通过色谱工作站将图谱进行积分后以保留时间和色谱峰面积作为数据的信息,以保留时间定位,以对应的峰面积的积分值作为数据源,采用 SPSS 15.0 统计软件,形成 28 个样本数据矩阵。对数据矩阵进行主成分分析(PCA)后,分别以其第一、第二、第三主成分建立坐标系,进行投影即可得到所有样本的 PCA 平面和 3D 投影图。穿龙薯蓣数据 PCA 的 3D 投影分析见图 3,可见 12, 16,18,20,27,28 号样品与其他样品差距较大,排除在建立共有模式的样品之外;PCA 的平面投影分析见图 4,进一步缩小选择范围,可见 3,5,9 号、10, 11,13,14,17,19,23,24,26 号距离更近一些,作为备选样品。

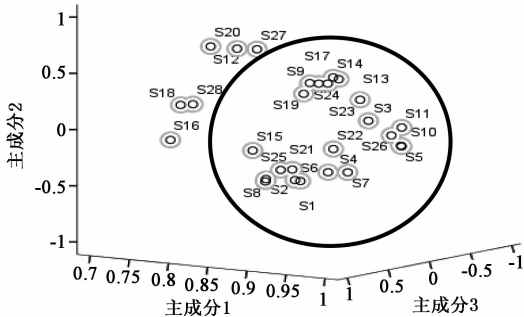


图3 穿龙薯蓣样品主成分分析 3D 投影

2.8 系统聚类分析 同法采用 SPSS 15.0 统计软件对 28 个样品数据进行系统聚类分析,采用重心法(centroid clustering)、欧氏距离的平方(squared Euclidean distance)作为测量的距离变量,聚类树形图见图 5,结合 PCA 分析结果,将距离较远的 17 号样品排除。

2.9 穿龙薯蓣药材标准指纹图谱的建立 经上述分析,参考主成分分析和系统聚类分析结果,取其中 11 批投影距离最近的穿龙薯蓣药材建立药材的标

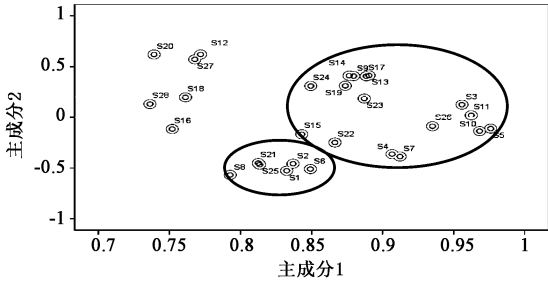


图4 主成分分析平面投影

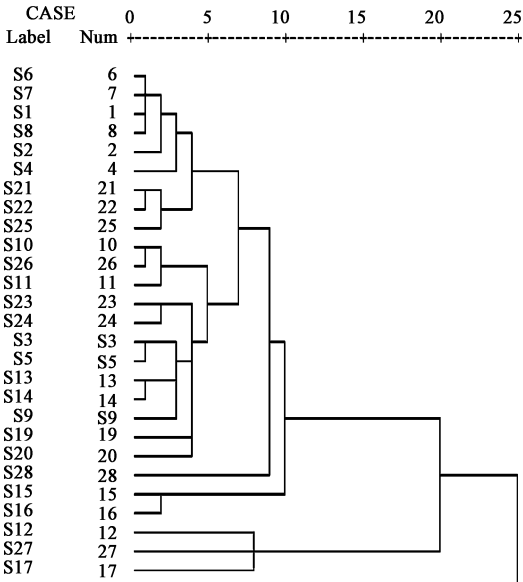


图5 穿龙薯蓣样品聚类分析

准指纹图谱,11 批穿龙薯蓣的编号为:S3,S5,S9,S10,S11,S13,S14,S19,S23,S24,S26。将上述 11 批样品 AIA 数据文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版(2004A)》软件,对上述药材进行相似度评价,设定 S03 为参照,多点校正、匹配,生成对照指纹图谱见图 6,进行谱峰差异性评价和整体相似性评价,建立共有模式见图 7,并进行相似度评价,同时计算夹角余弦和相关系数,相似度计算结果见表 2。相似度计算结果表明,11 批样品与对照图谱比较,相似度均 >0.866,夹角余弦均 >0.928,相关系数均 >0.888。可为穿龙薯蓣药材的品质评价提供科学依据。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 由于皂苷类成分具有末端吸收,因此试验了不同的检测波长,发现在 203 nm 时色谱图所包含的信息量最大,且各色谱峰分离较好,基线较平稳。以乙腈-水为流动相,考察了 60 ~ 100 min 梯度洗脱的不同流动相比,在试验后的最

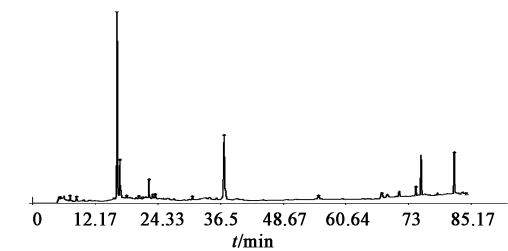


图 6 HPLC 对照指纹图谱

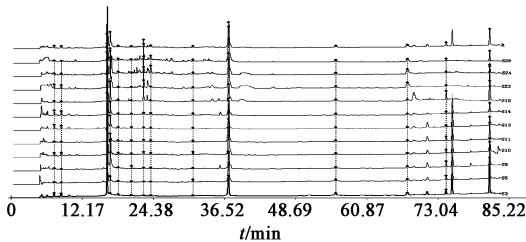


图 7 11 批样品 HPLC 指纹图谱

适梯度下,203 nm 处可检测的全部化合物在84 min 内洗脱完毕。

表 2 11 批样品相似度评价

No.	相似度	夹角余弦	相关系数
S3	0.956	0.965	0.948
S5	0.955	0.969	0.954
S9	0.925	0.945	0.918
S10	0.950	0.965	0.949
S11	0.971	0.975	0.976
S13	0.944	0.965	0.957
S14	0.955	0.968	0.953
S19	0.866	0.928	0.888
S23	0.901	0.961	0.940
S24	0.890	0.941	0.910
S26	0.917	0.960	0.943
对照指纹图谱	1.000	1.000	1.000

3.2 提取工艺的优化 以两皂苷类成分的总量为指标,在单因素考察的基础上优化了提取工艺,通过正交试验,确定了优化提取工艺条件为:30 倍 75%

乙醇提取 2 次,每次 0.5 h。工艺验证性试验表明,其工艺的平均提取率比较高,操作控制容易,节省物料。

3.3 主成分分析和聚类分析 应用 PCA 投影法和聚类分析法两种化学计量学方法对穿龙薯蓣色谱积分数据进行了模式识别的初步分析。从整体分类效果上来看,PCA 投影法更为直观,能一目了然地看出各个穿龙薯蓣药材分类样本之间的聚类关系。运用 PCA 投影技术,根据 PCA 的 3D 和平面投影图,用已检测的色谱数据可对样品逐步筛选;结合聚类分析结果,验证了由 PCA 筛选的样品,同时排除了个别样品,最终确定了入选的样品。结合两种统计方法,选取投影距离较近的样品,建立了该药材科学的共有模式。同时两种分类方法都显示,穿龙薯蓣药材的分类没有明显的区别,各样品分布均匀,说明各样品之间既存在明显的差异又存在一定程度的相关性。

[参考文献]

[1] 肖培根.新编中药志.第 1 卷[M].北京:化学工业出版社,2002;745.

[2] 中国药典.一部[S].2010;250.

[3] 陈信义,高志捷,王玉芝.薯蓣皂苷抗移植性小鼠乳腺癌作用的研究[J].中国中医药信息杂志,2005,12(5):23.

[4] 王丽娟,王岩,陈声武,等.薯蓣皂苷元体内、外的抗肿瘤作用[J].中国中药杂志,2002,27(10):777.

[5] 古锐,钟国跃,罗维早,等.HPLC 指纹图谱法分析不同产地藏药甲地然果(花锚)化学成分差异[J].中国中药杂志,2012,37(12):1793.

[6] 王燕,鲍家科,金阳,等.西南鬼灯檠的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):54.

[7] 闫广利,韩莹,王喜军.基于 LC-MS 分析的中药体内成分辨识技术[J].中国中药杂志,2012,37(12):1765.

[8] 罗光明,曾金祥,朱继孝.车前子综合化学模式识别研究[J].中国中药杂志,2012,37(8):1148.

[责任编辑 顾雪竹]