

羽叶鬼灯檠的 HPLC 指纹图谱及模式识别

王燕^{1*}, 鲍家科², 金杨³

(1. 大理学院药学与化学学院, 云南 大理 671000; 2. 贵州省药品检验所, 贵阳 550004;
3. 大理州中医院, 云南 大理 671000)

[摘要] 目的:研究羽叶鬼灯檠药材的质量控制方法。方法:采用高效液相色谱法建立了羽叶鬼灯檠药材的 HPLC 指纹图谱,收集了不同批次的 14 批样品进行测定,并使用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行了模式识别研究。结果:建立了羽叶鬼灯檠药材的指纹图谱。结论:该方法可用于羽叶鬼灯檠质量控制及综合评价。

[关键词] 羽叶鬼灯檠; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)14-0085-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1554.021.html>

[网络出版时间] 2012-05-15 15:54

HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition Method
of *Rodgersia pinnata*

WANG Yan^{1*}, BAO Jia-ke², JIN Yang³

(1. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China;
2. Guizhou Province Institute for Drug Control, Guiyang 550004, China;
3. Chinese Medicine Hospital of Dali Prefecture, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for quality control of *Rodgersia pinnata*. **Method:** A high performance liquid chromatographic method was developed to establish the fingerprint of *R. pinnata* and 14 samples from various batches were analyzed. Cluster analysis and principal component analysis (PCA) were applied to study on HPLC fingerprint and chemical pattern recognition method. **Result:** The fingerprint of *R. pinnata* was set up. **Conclusion:** The method could be used for the quality control and comprehensive evaluation of *R. pinnata*.

[Key words] *Rodgersia pinnata*; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

羽叶鬼灯檠为虎耳草科植物羽叶鬼灯檠 *Rodgersia pinnata* Hemsl. 的干燥根茎^[1],主产于贵州、云南、四川等地,具有收敛、消炎、祛风除湿的功效,对菌痢、肠炎、感冒头痛、外伤出血、风湿骨痛、老年性支气管炎等常见疾病有较好的疗效,因此在民间应用广泛。目前,多用岩白菜素作为羽叶鬼灯檠的质控指标,难以全面控制羽叶鬼灯檠的内在质量,

不能对其真伪优劣做出判断^[2-3]。本实验采用 HPLC 方法建立羽叶鬼灯檠的指纹图谱,并对所得图谱进行分析、解析,建立了羽叶鬼灯檠指纹图谱的指标参数评判标准,为全面控制羽叶鬼灯檠的质量提供了方法。

1 材料

LC-20AD 型 HPLC 系统(日本岛津公司,包括 CTO-20AC 柱温箱、CBM-20A 系统控制器、SPD-M20A 二极管阵列检测器、LC solution 工作站),KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),XS205 型梅特勒电子天平(上海亚荣生化仪器厂),中药材粉碎机(浙江温岭市林大机械有限公司)。

[收稿日期] 20111219(002)
[基金项目] 大理学院青年教师基金项目(KY201136);贵州省中药现代化科技产业研究开发专项项目[(2008)5002]
[通讯作者] *王燕,实验师,理学硕士,从事中药质量标准研究, Tel: 0872-2257415, E-mail: jessica9428@sina.com

甲醇、乙腈为色谱纯,乙醇、磷酸为分析纯,水为重蒸水,岩白菜素对照品(批号 1532-200202),没食子酸对照品(批号 110831-200302)均购自中国药品生物制品检定所。所用羽叶鬼灯檠药材均由贵阳中医学院陈德媛研究员鉴定为正品,药材来源见表 1。

表 1 药材来源

药材编号	产地	采收时间
X1	云南宣威	2010-06
X2	云南大理花甸坝	2010-06
X3	云南剑川	2010-06
X4	云南大理漾濞	2010-06
X5	山西	2010-06
X6	云南大理上关	2010-06
X7	云南鹤庆	2010-06
X8	云南兰坪	2010-06
X9	云南昆明	2010-06
X10	贵州贵阳	2010-09
X11	贵州水城渔塘村	2010-09
X12	贵州水城大坪村	2010-09
X13	贵州威宁	2010-09
X14	贵州水城编组站山	2010-09

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Alltima C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),检测波长 310 nm,柱温 30 ℃,流动相乙腈-0.1% 磷酸溶液,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,洗脱梯度见表 2。

表 2 洗脱梯度

t/min	乙腈/%	0.1% 磷酸/%
0.01	1	99
5.00	5	95
25.00	14	86
60.00	20	80

2.2 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、岩白菜素对照品适量,加 60% 甲醇制成每 1 mL 约含 0.1 mg 的溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取羽叶鬼灯檠药材粉末(过四号筛)约 1 g,精密称定,置锥形瓶中,加 60% 甲醇 50 mL,水浴回流 2 次,每次 60 min,滤过,合并滤液,蒸干,残渣加 60% 甲醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,并加 60% 甲醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

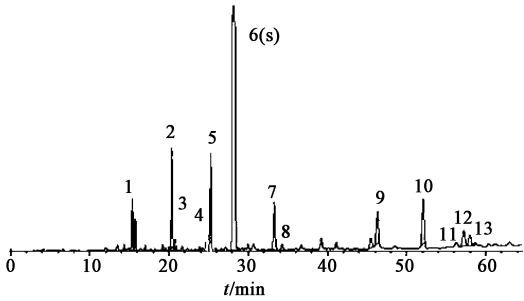
2.4.1 精密度试验 取供试品溶液,连续进样 5 次,考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积比

值的一致性,结果显示各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.024% ~0.115%,相对峰面积比值的 RSD 1.462% ~3.915%,均 <5%,表明该方法的精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一批号的供试品溶液,分别在 0,5,10,15,24 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 为 0.011% ~0.104%,相对峰面积比值的 RSD 1.184% ~3.431%,均 <5%,表明该方法的稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批号的供试品溶液 5 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 RSD 为 0.015% ~0.116%,相对峰面积比值的 RSD 2.277% ~4.319%,均 <5%,表明该方法的重复性较好。

2.5 样品测定 测定了 14 批羽叶鬼灯檠样品,详细比较所有样品的色谱图,确定了 13 个主要的特征峰,构成羽叶鬼灯檠的指纹图谱,其中 6 号峰岩白菜素为羽叶鬼灯檠主要指标成分,将其作为参照峰,1 号峰为没食子酸,代表性色谱图见图 1。



6. 岩白菜素

图 1 羽叶鬼灯檠液相色谱图及主要特征峰

2.6 相似度评价 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》软件,对上述 14 批样品进行相似度评价,以 X1 编号的羽叶鬼灯檠药材色谱图作为参照色谱,利用中位数法进行多点校正自动匹配后生成对照图谱 R。由羽叶鬼灯檠相似度评价结果可以看出,各编号羽叶鬼灯檠药材与对照指纹图谱间的相似度为 0.978 ~0.797,表明羽叶鬼灯檠药材由于产地、气候等原因,内在质量存在很大差异,不能直接建立羽叶鬼灯檠药材指纹图谱的共有模式。需对羽叶鬼灯檠各批药材进行进一步评价样品间差异,进行图谱模式识别分类,以便建立真实可靠的羽叶鬼灯檠药材标准指纹图谱^[4]。

2.7 化学模式识别

2.7.1 主成分分析 该分析方法能够使样本数据从原来的 n 维空间降到 m 维($n > m$),从而使数据更易于处理,并且能在保持数据原有信息不丢失的基础上直观地从投影图上看岀样本的分类情况。运用 SPSS17.0 统计分析软件对 14 个羽叶鬼灯檠样品进行主成分分析,即将它们投影至低维空间来看它们之间的微细差别,先将 14×13 阶原始数据矩阵经标准化处理,再对其进行运算,主成分个数提取原则为主成分对应的特征值 >1 的前 m 个主成分。主成分分析结果如下:第一主成分的特征值 $\lambda_1 = 7.125$,方差贡献率为 44.532%;第二主成分的特征值 $\lambda_2 = 3.245$,方差贡献率为 20.280%;第三主成分的特征值 $\lambda_3 = 2.224$,方差贡献率为 13.903%;第四主成分的特征值 $\lambda_4 = 1.196$,方差贡献率为 7.475%。4 个主成分的累积方差贡献率为 86.190%,故选取前 4 个得分矢量来作图,4 个主成分的得分图见图 2。图中每个点对应 1 个样品。由图 2 可明显看出羽叶鬼灯檠分为两大类,样品编号为 X2,X4,X6,X9 的药材为第一大类,而其余样品编号的为另一大类。

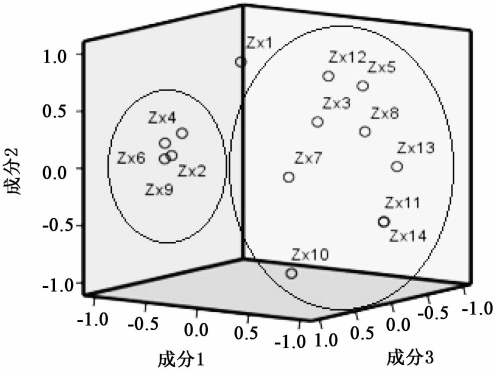


图 2 主成分 3D 得分

2.7.2 系统聚类分析 将 14 个羽叶鬼灯檠样品作为研究对象,进行指纹图谱研究,获得包括岩白菜素(6 号峰)在内的 13 个共有色谱峰。将 6 号峰设为参照峰,规定其相对峰面积为 1,其他各峰面积均按相对峰面积折算,将各色谱峰相对于参照峰的峰面积量化,得到 14×13 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 17.0 统计分析软件对其进行系统聚类分析,采用中位数法 (median clustering),利用欧式距离 (euclidean)作为样品的测度,14 个样品可分为两大类(样品编号为 X2,X4,X6,X9 的药材为第一大类,而其余样品编号的为另一大类),与主成分分析结果一致。聚类分析结果见图 3。

2.8 羽叶鬼灯檠药材标准指纹图谱的建立 经上

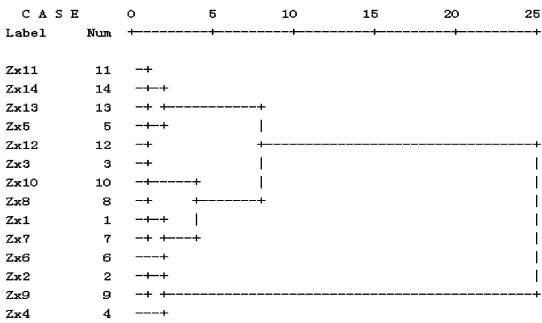


图 3 样品聚类分析结果

述分析,结合主成分分析和系统聚类分析结果,取其中 10 批投影距离最近的羽叶鬼灯檠药材建立其标准指纹图谱,10 批羽叶鬼灯檠的样品编号为 X1,X3,X5,X7,X8,X10,X11,X12,X13,X14。

将上述 10 批样品数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版》软件,经选峰,设定样品 X1 的色谱图作为参照图谱,利用中位数法进行多点校正自动匹配后生成对照指纹图谱(图 4),10 批羽叶鬼灯檠的指纹图谱见图 5,相似度计算结果见表 3。

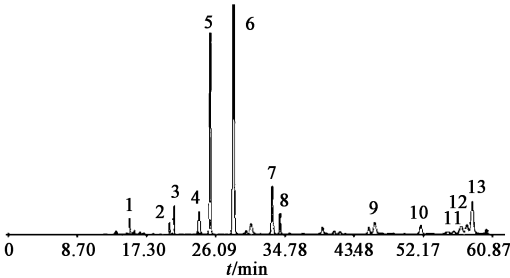


图 4 羽叶鬼灯檠 HPLC 对照指纹图谱

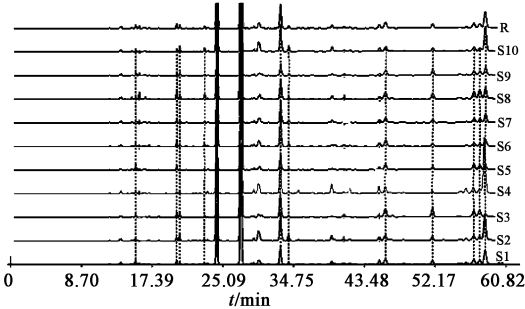


图 5 10 批样品的 HPLC 指纹图谱

表 3 10 批样品相似度评价

编号	参照图谱	对照图谱	编号	参照图谱	对照图谱
X1	1.000	0.980	X10	0.986	0.998
X3	0.991	0.996	X11	0.962	0.997
X5	0.978	0.999	X12	0.981	1.000
X7	0.996	0.982	X13	0.967	0.998
X8	0.991	0.997	X14	0.962	0.997

不同加工工艺对白芷有效成分的影响

金洁,金传山*,吴德玲,刘青青,许玲

(安徽中医学院药学院 安徽省现代中药重点实验室,合肥 230031)

[摘要] **目的:**比较不同加工工艺对白芷中欧前胡素、总香豆素、浸出物含量的影响。**方法:**采用 RP-HPLC 法、紫外分光光度法、重量法对白芷有效成分进行测定。**结果:**不同加工工艺对白芷中有效成分含量有一定影响。白芷在不同加工工艺条件下含量由高到低依次为:鲜白芷烘至一定程度切片>产地趁鲜直接切片>传统工艺切片。**结论:**结合饮片外观,鲜白芷产地烘至一定程度直接切片,其质量较好。该方法结果减少了白芷传统加工方法中的软化环节,节约了成本,保证了药材的质量,是一种能够适用于企业规模化生产的新型工艺。

[关键词] 白芷;加工工艺;欧前胡素;总香豆素;浸出物
[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0088-04
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1529.009.html>
[网络出版时间] 2012-05-15 15:29

[收稿日期] 20111223002
[基金项目] 国际科技合作计划项目(S2012ZR0339)
[第一作者] 金洁,硕士研究生,Tel:13856920334,E-mail:jinjie0244@126.com
[通讯作者] *金传山,硕士,副教授,硕士生导师,从事中药炮制学与中药材加工学教学与科研,Tel:0551-5169044,E-mail:jcs4@sohu.com

相似度计算结果表明,10 批样品均>0.960,符合国家药典委员会的要求。可为羽叶鬼灯檠药材的品质评价、质量标准的制定提供科学依据。

3 讨论

3.1 流动相的选定 选用不同比例的甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸溶液、乙腈-磷酸溶液等流动相体系进行对比。结果表明,使用乙腈-磷酸溶液体系时基线平稳,色谱信息较丰富,各个色谱峰均实现较好分离。因此选择乙腈-磷酸溶液作为流动相。

3.2 供试品溶液的制备 比较了回流提取和超声提取、提取溶剂(水、30% 甲醇、60% 甲醇、甲醇、乙醇)、提取时间(30,60,90 min)和提取次数(1,2 次)的效果。结果表明,60% 甲醇提取时色谱峰总数多且总峰面积大,能最大限度地反映其特征。

3.3 检测波长的选定 使用二极管阵列检测器对样品进行 200~600 nm 全波长扫描,并对各波长下的色谱图进行分析比较。结果表明,在 310 nm 下,各峰分离良好,特征峰明显且峰形较好,从图谱中可以尽可能地获取色谱组分信息以反映体系组成的全貌,因此选定 310 nm 作为检测波长。

3.4 聚类分析与主成分分析 应用了系统聚类分析和主成分分析两种化学计量学方法对羽叶鬼灯檠

色谱积分数据进行了模式识别的探讨,两者判断结果一致,均把羽叶鬼灯檠分为两类,说明各批羽叶鬼灯檠药材之间既存在明显的差异又存在一定程度的相似性,也表明两种分析方法同时使用可相互支持,互为依托。该模式识别方法直观、合理、可行,可作为相似度评价方法的有益补充,以更为客观地评价中药内在质量的真实性和一致性^[5]。将指纹图谱和模式识别结合起来进行中药材质量控制是一种行之有效的方法。

[参考文献]

[1] 贵州省药监局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社,2003.
[2] 黎阳,刘素香,张铁军,等. 枳实的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中草药,2009,40(11):1810.
[3] 王燕,鲍家科,金杨,等. 岩陀药材质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):85.
[4] 王文燕,赵强,张铁军,等. 白芍的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究[J]. 中草药,2009,40(9):1469.
[5] 黄勇,郑林,王爱民,等. 贵州产葶草药材指纹图谱的模式识别研究[J]. 中成药,2008,30(7):945.

[责任编辑 顾雪竹]