

珠子参的 HPLC 指纹图谱及模式识别

宋小妹*, 杨新杰, 王薇, 宋蓓, 崔九成
(陕西中医学院, 西安 712046)

[摘要] 目的:研究珠子参药材 HPLC 指纹图谱的模式识别方法。方法:利用 HPLC 方法,以全国 7 个省份珠子参药材为研究对象,对 12 批药材进行了指纹图谱分析,同时运用聚类分析及主成分分析对其进行模式识别研究。结果:12 批珠子参药材的指纹图谱有 8 个特征共有峰,并指认了 2 个色谱峰。通过聚类分析和主成分分析将 12 批药材分为 2 类。结论:不同的地域环境和气候差异导致珠子参品质之间的差异,珠子参指纹图谱的模式识别直观、可行,为珠子参的生产和质量控制提供了依据。

[关键词] 珠子参;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(2011)11-0059-03

HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition of Rhizoma Panacis Majoris

SONG Xiao-mei*, YANG Xin-jie, WANG Wei, SONG Bei, CUI Jui-cheng
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To study pattern recognition of the HPLC fingerprint of Rhizoma Panacis Majoris. **Method:** Twelve batches of samples, Rhizoma Panacis Majoris, come from seven provinces were carried out to gain fingerprints by HPLC, The pattern recognition of the characteristic fingerprint of Rhizoma Panacis Majoris, known as cluster analysis and principal component analysis formed. **Result:** The fingerprint of 12 batches of Rhizoma Panacis Majoris showed 8 characteristic peaks, in which 2 common peaks were confirmed. the samples were grouped into 2 types. **Conclusion:** Different geographical environment and climates lead to differences between the quality of Rhizoma Panacis Majoris, the pattern recognition of the fingerprint provides the experimental basis for manufacture and quality control of Rhizoma Panacis Majoris.

[Key words] Rhizoma Panacis Majoris; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

珠子参为五加科植物珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 或羽叶三七 *P. japonicus* C. A. Mey. var. *bipinnatifidus* (Seem.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎, 历版《中国药典》均有记载, 具有补肺、养阴、活络、止血

的功效, 用于气阴两虚、烦热口渴、虚劳咳嗽、跌扑损伤、关节疼痛、咳血、吐血、外伤出血等症^[1]。化学研究表明^[2-6], 珠子参含有皂苷、多糖、挥发油及有机酸、甾类等, 药理实验表明, 珠子参提取物或总皂苷具有镇痛、抗炎、免疫调节、抗心律不齐及抗肿瘤等作用^[2,7]。由于受产地、气候和生态环境等的影响, 不同珠子参药材所含主要成分差异较大^[8], 仅以其中的某种化学成分进行质量评价分析, 并不能有效地控制中药材或中成药的质量。本文通过考察陕西、四川、甘肃、湖南、湖北、云南、贵州等全国 7 个省份珠子参药材, 建立指纹图谱, 作为控制其内在质量的标准。

[收稿日期] 2011-01-17

[基金项目] 陕西省教育厅省级重点实验室科研与建设计划项目(09JS016); 陕西省教育厅 2010 年科学研究计划项目(2010JK502)

[通讯作者] * 宋小妹, 教授, 博士, 从事中药药效物质基础及中药炮制研究, Tel: 029-38185166, E-mail: songxiaom@126.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-2010AHT 高效液相色谱仪; Shimadzu LCsolution 工作站; BP-121S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); SB-3200D 型超声清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 试剂 乙腈为色谱纯(SK Chemicals 公司); 磷酸为分析纯(重庆北碚精细化工厂); 水为娃哈哈纯净水。

1.3 对照品、药材 人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa 对照品(陕西中医学院中药化学实验室提供)。珠子参药材来自全国 7 个不同省份, 共 12 批次, 1~12 批次样品分别为四川 080809、甘肃武都 080810、云南永新 080811、贵州兴义 080910、四川成都 080914、陕西眉县 070919、陕西眉县 061015、陕西眉县 061018、陕西太白 081025、陕西眉县 081105、湖南桑植 081022、湖北恩施 080926。来源于陕西的 6~10 号样品, 经陕西中医学院标本馆王继涛高级实验师鉴定为珠子参 *P. japonicus* C. A. Mey. var. major (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎, 其余样品均来自市场或邮购, 具体品种尚无法准确鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Inertsil ODS-sp 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.2% 磷酸, B 为乙腈, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm, 分析时间 75 min, 进样量 20 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

t/min	0.2% 磷酸 A/%	乙腈 B/%
0~15	95~67	5~33
15~30	67~67	33~33
30~40	67~55	33~45
40~50	55~35	45~65
50~60	35~25	65~75
60~70	25~0	75~100
70~75	0	100

2.2 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Ro、竹节参皂苷 IVa 对照品各 5 mg, 用甲醇溶解并定容至 25 mL, 配成 0.2 g·L⁻¹ 的溶液, 再将该溶液稀释 10 倍, 作为对照溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末 0.1 g, 精密称定, 加 60% 乙醇溶液 25 mL, 超声处理 40 min, 取出, 加 60% 乙醇补足质量, 滤过。取续滤液作为供

试品溶液。

2.4 指纹图谱分析与评价

2.4.1 特征共有峰的确定与归属 按上述供试品溶液制备方法和色谱条件对 12 批珠子参药材进行指纹图谱的测定, 典型色谱图见图 1, 分离出 15 个色谱峰, 经比较所有测定的色谱图, 从中选择了稳定性和重复性均较好的 8 个共有峰构成了指纹图谱的特征峰群。

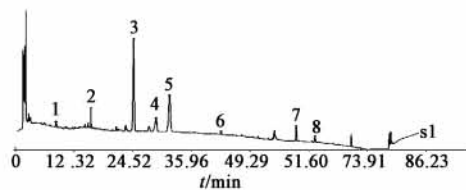


图 1 珠子参药材 HPLC 指纹图谱共有模式

2.4.2 相似度评价 采用《中国药典》“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版”, 将 12 批次珠子参药材图谱数据导入, 经多点校正和数据匹配, 以中位数法生成对照指纹图谱, 结果见图 2。12 批珠子参药材指纹图谱相关系数(中位数)分别为 0.999, 0.901, 0.954, 0.940, 0.833, 0.987, 0.967, 0.939, 0.985, 0.970, 0.945, 0.863, 除 5 号、12 号以外, 不同产地珠子参药材与标准对照图谱的相似度都在 0.9 以上。

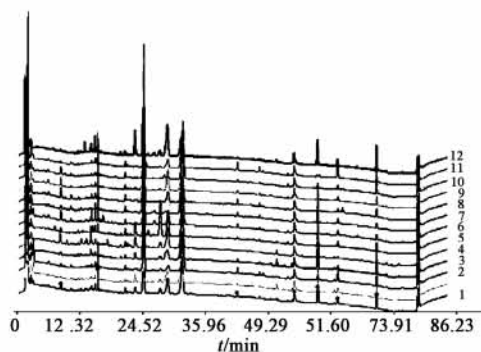


图 2 12 批珠子参药材的 HPLC 指纹图谱

2.5 系统聚类分析 系统聚类分析(CA)又称集群分析, 它是一种无管理、无指导的模式识别方法^[10-11]。聚类分析可将一些观察对象依据某些特征加以归类, 在生物学和医学分类问题中有着广泛的应用, 它可依据所测样品的数据, 对样品进行分类。先把 N 个对象(样品或观察指标)看成 N 类, 然后逐步合并, 直到 N 个对象并成一类为止。本章运用 SPSS 17.0 软件对其进行系统聚类分析, 采用欧几里德平方和距离作为样品的测度; 图 3 为系统聚类分

析的树形图,它直观地显示了整个聚类过程,将 12 批不同产地的珠子参药材划分为两大类。1,3,4,5,12 号样品为 I 类;2,6,7,8,10,11 号样品为 II 类。

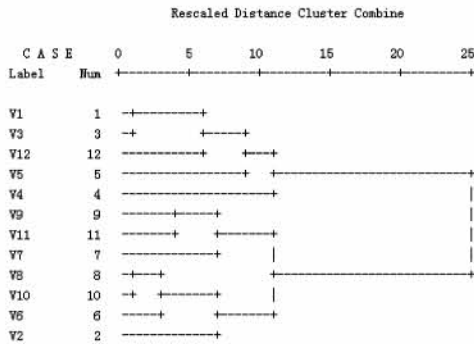


图 3 系统树状聚类分析

2.6 主成分分析(PCA) 主成分分析是从多个数值变量(指标)之间的相互关系入手,利用降维的思想,将多个变量(指标)化为少数几个互不相关的综合变量(指标)的统计方法^[12-13]。采用 SPSS 17.0 软件,对 12 批珠子参药材进行主成分分析。通过主成分求解,分别求得对应于 2 个最大特征值得主成分累积贡献率为 97.248%,完全可以表征原始因子代表的全部信息(见表 2)。以主成分 PC1 和 PC2 所组成的二维投影图见图 4。可以看出,这 12 个样本可分为 2 类,与聚类分析的结果基本一致。

表 2 珠子参中主成分分析

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	11.217	93.476	93.476
2	0.453	3.772	97.248

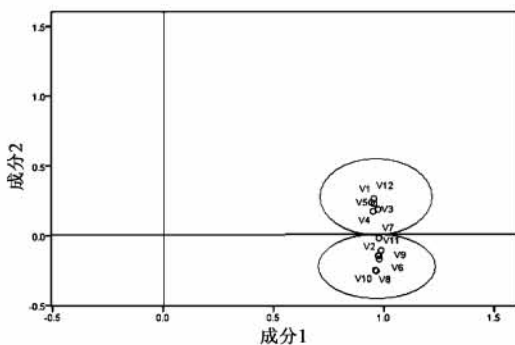


图 4 珠子参不同产地药材差异主成分投影

3 讨论

本研究采用 HPLC-UV 法,以 Inertsil ODS-sp (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱,乙腈-0.2% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱,建立了珠子参药材

的 HPLC 指纹图谱研究方法。标定了 8 个共有指纹峰,获得了 HPLC 指纹图谱的技术参数,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”,对 12 批样品的指纹图谱整体相似度进行考察,相似度结果大多数在 0.9 以上,并自动生成了对照指纹图谱。对 8 个共有指纹峰所属化合物的鉴定结果表明 3 号峰为人参皂苷 Ro,5 号峰为竹节参皂苷 IVa。

曾选用不同厂家或不同型号的色谱柱试验,结果表明 Inertsil ODS-sp(4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱对珠子参洗脱出的色谱峰基线平稳,峰数多且分离度好。流动相分别对乙腈-水,甲醇-水,乙腈-0.5% 磷酸水等进行试验,结果表明乙腈-0.5% 磷酸水梯度洗脱对珠子参的分离效果最好。分析时间 75 min,样品 2 h 图谱显示,75 min 后无特征峰出现。

为了全面反映药材的化学信息,对供试品溶液的提取溶剂和提取方法进行了考察,结果用 60% 甲醇超声提取 40 min 的样品信息量较多。

模式识别(pattern recognition)是一门用计算机代替人对模式即所研究的系统进行描述、分类、判断和识别的学科^[14]。本文利用模式识别技术的聚类分析和主成分分析,分别对四川、甘肃、云南、贵州、陕西、湖南、湖北等不同产地 12 批次的珠子参样品的 HPLC 指纹图谱进行分析研究,根据聚类分析和主成分分析结果可将其分为 2 类,其中四川、云南、贵州、湖北为 1 类,陕西、甘肃、湖南为 1 类。从整体上看,珠子参的品质,存在着地域性的差异,以秦岭为分界线,秦岭以北的陕西、甘肃的所产的珠子参归为 1 类,秦岭以南的四川、云南、贵州、所产的珠子参归为 1 类。秦岭是我国南北的地理分界线,不同的地域环境和气候差异导致珠子参品质之间的差异,环境与品质的相关性有待于进一步分析。

[参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2010:254.
- [2] 包旭,詹常森,肖倬殷.近十年来珠子参皂苷成分及药理研究进展[J].华西药学杂志,1992,7(1):49.
- [3] 池群,郭建文.珠子参的微量元素分析比较[J].西北药学杂志,1993,8(2):61.
- [4] 刘朝霞,潘家荣,邹坤,等.扣子七挥发油成分的研究[J].时珍国医国药,2007,18(2):301.
- [5] 袁菊丽,房方,张璇,等.珠子参多糖提取纯化工艺研究[J].河南中医,2007,27(12):73.