

• 质量研究 •

# 不同采收期连翘的 HPLC 指纹图谱研究

郑晓珂, 魏悦, 冯卫生\*  
(河南中医学院, 河南 郑州 450008)

[摘要] 目的: 比较不同采收期的连翘药材高效液相指纹图谱, 探索最佳采收期。方法: 采用 RP-HPLC 法, Shim-pack CLC-ODS(150×4.6 mm) 色谱柱, 乙腈和水梯度洗脱, 流速 0.8 mL/min, 检测波长 235 nm, 柱温 25 °C。运用相似度评价法和主成分分析法对各样品指纹图谱进行化学模式识别研究。结果: 连翘成分随采收月份不同而各异, 不同生长期采集的连翘中成分积累具有一定规律。结论: 该方法对连翘质量控制以及实现规范化种植提供了理论基础。

[关键词] 连翘; HPLC 指纹图谱; 主成分分析

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)03-0001-04

## HPLC Fingerprint Analysis of *Forsythia Suspense* (Thunb) Vahl in Different Collecting Seasons

ZHENG Xiao-ke, WEI Yue, FENG Wei-sheng\*  
(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To compare HPLC fingerprint of *Forsythia Suspense* (Thunb) Vahl in different collecting seasons for determining the optimum harvesting time. **Methods:** The experimental condition of the RP-HPLC method was as follows: Shim-pack CLC-ODS column(150×4.6 mm), with linear gradient elution using acetonitrile and water; The flow rate was 0.8 mL/min; Detected wavelength was 235 nm; The column temperature was 25 °C. The HPLC fingerprints were analyzed by similarity evaluation and principle component analysis to conduct the chemical pattern recognition. **Results:** The content of chemical composition of *Forsythia Suspense*(Thunb) Vahl varied according to collecting seasons. The accumulation of constituents showed a regular pattern. **Conclusion:** The study offers the basis of controlling the quality of *Forsythia Suspense*(Thunb) Vahl and the realization of good agricultural practice.

[Key words] *Forsythia Suspense*(Thunb) Vahl; HPLC Fingerprint; Principle component Analysis

连翘为木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb) Vahl 的干燥果实, 具有清热解毒、散结消肿之功效, 主治温热、丹毒、斑疹、痈疡肿毒、瘰疬、小便淋闭等症<sup>[1]</sup>。连翘苷是连翘抗菌和抗病毒作用的活性成分<sup>[2]</sup>, 但是连翘中含有多种有效成分, 并且随着采收期的不同而有所差异, 为了更全面评价连翘药

材质量和控制质量的稳定性, 本研究比较了连翘药材不同采收期的 HPLC 指纹图谱, 运用相似度评价法和主成分分析法对数据进行分析。探索最佳采收期, 从而为实现规范化种植提供理论基础。

### 1 实验材料

Shimadzu LC-10ATvp 高效液相色谱仪, SPD-10Avp 可见紫外检测器及浙江大学 N-2000 双通道色谱工作站。色谱级甲醇(天津四友化学公司), 水为高纯水, 其它试剂为分析纯。SK2200H 超声波提取器(上海科导超声仪器有限公司, 60 KHz), AB204-N 万分之一精密分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公

[收稿日期] 2006-07-31

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2001BA701A62-01); 河南省杰出青年科学基金资助项目(0212001200)

[通讯作者] \* 冯卫生, Tel: 86-371-65680699; E-mail: fwsh@hactcm.edu.cn

司), HENGAO TD 纯水过滤装置(TIANJIN HENGAO TECH NOLOGY DEVELOPMENT CO.LTD)。22 批连翘药材, 均由栾川连翘规范化种植基地提供, 经河南中医学院陈随清教授鉴定。来源见表 1。对照品: 连翘苷, 购自河南省药检所。

表 1 连翘药材来源

编号	采收时间	种植条件	花柱类型	编号	采收时间	种植条件	花柱类型
1	04.07.01	阳坡	长花柱	12	04.08.29	阳坡	短花柱
2	04.07.10	阳坡	短花柱	13	04.08.30	阴坡	长花柱
3	04.07.15	阴坡	长花柱	14	04.08.30	阴坡	短花柱
4	04.07.20	阴坡	短花柱	15	04.08.31	阳坡	短花柱
5	04.08.01	阳坡	长花柱	16	04.09.04	阳坡	长花柱
6	04.08.02	阳坡	短花柱	17	04.09.06	阳坡	短花柱
7	04.08.04	阴坡	长花柱	18	04.09.15	阴坡	长花柱
8	04.08.06	阴坡	短花柱	19	04.09.20	阴坡	短花柱
9	04.08.08	阴坡	长花柱	20	04.10.05	阳坡	长花柱
10	04.08.10	阴坡	短花柱	21	04.10.15	阳坡	短花柱
11	04.08.28	阳坡	长花柱	22	04.10.20	阴坡	长花柱

## 2 实验方法

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Shim-pack CLC-ODS(150 × 4.6 mm); 检测波长: 235 nm; 柱温: 25 °C; 流速: 0.8 mL/min; 流动相: 乙腈(A)/水(B) 梯度洗脱。线性梯度程序: 0~10 min, 10%~17% (A); 10~30 min, 17%~35% (A); 30.01 min, 50% (A); 45 min, 80% (A); 50 min, STOP。

**2.2 对照品溶液的制备** 分别精密称取连翘苷和连翘酯苷对照品, 用甲醇溶解稀释、定容, 配制成浓度为 0.208 mg/mL 和 0.719 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密称取过 40 目筛的连翘粉末 1 g, 精密加入甲醇 50 mL, 称定重量, 超声提取 30 min, 取出静置, 放置室温, 加甲醇补足损失的重量, 取续滤液, 备用。用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤。

**2.4 精密度实验** 精密吸取同一连翘供试品溶液 5 μL, 连续进样 5 次, 记录色谱图。考察色谱峰相似度的一致性。各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.3%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD < 1.5%, 说明仪器精密度良好。

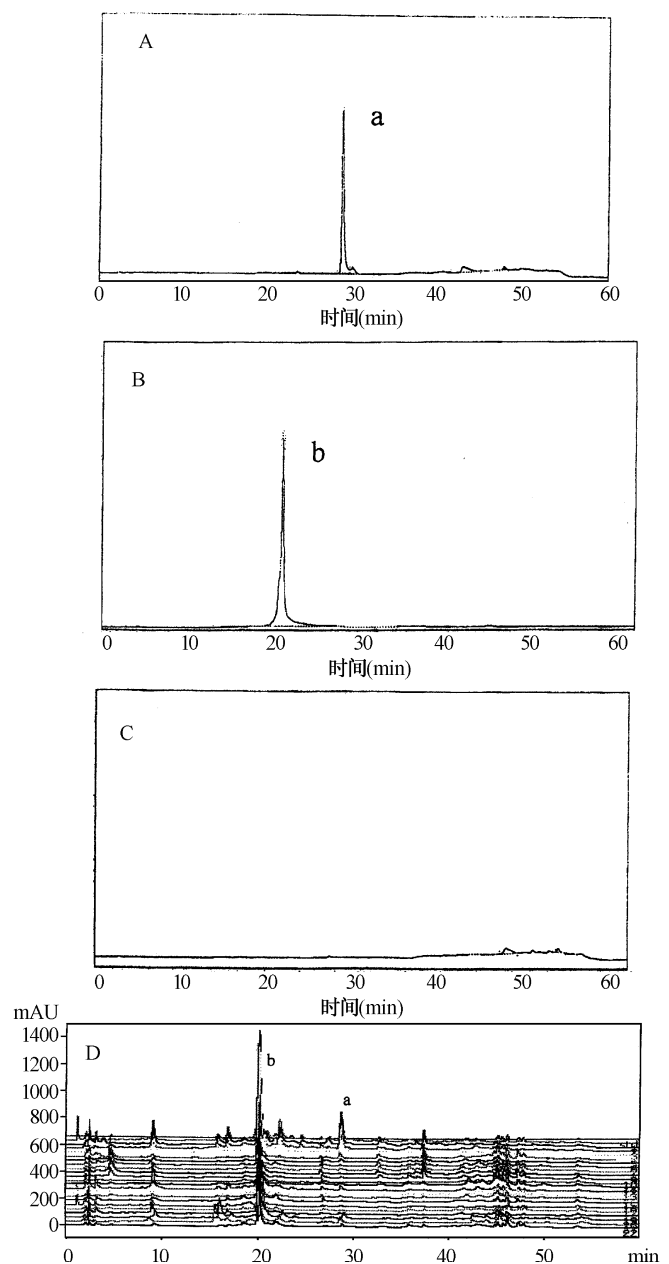
**2.5 重复性实验** 取同一连翘样品 5 份, 按供试品制备方法进行制备, 分别精密吸取溶液 5 μL, 连续进样 5 次, 记录色谱图。考察色谱峰相似度的一致性。各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.5%, 各色谱峰相

对峰面积的 RSD < 2%。说明该方法重复性好。

**2.6 稳定性实验** 取同一连翘供试品溶液, 分别在 0, 1, 4, 8, 12, 48 h 检测, 记录色谱图。考察色谱峰相似度的一致性。各色谱峰相对保留时间的 RSD < 0.5%, 各色谱峰相对峰面积的 RSD < 2%。表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

## 3 实验结果

**3.1 连翘 HPLC 指纹图谱的建立** 分别精密吸取对照品溶液和各供试品溶液以及甲醇液(空白对照) 10 μL, 按“2.1”项下的色谱条件操作, 记录 60 min 色谱图(见图 1)。



a: 连翘苷; b: 连翘酯苷

A: 连翘苷色谱图; B: 连翘酯苷色谱图;

C: 空白对照; D: 连翘药材

图 1 连翘药材 HPLC 指纹图谱

**3.2 共有模式的建立和相似度分析** 将 22 批连翘色谱图采用 Chromafinger 色谱指纹图谱软件进行数据处理: 以各月份代表性样品生成的共有模式为参照(见图 2), 对 7 月份到 10 月份的连翘药材指纹图谱计算相似度, 结果见表 2。

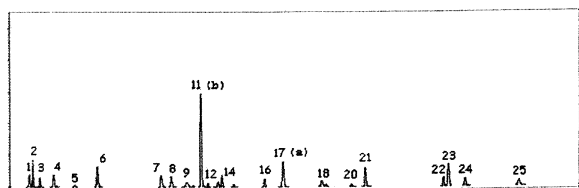


图 2 共有模式色谱图

表 2 各月份连翘 HPLC 指纹图谱相似度

编号	1	2	3	4	5	6	7	8
相关系数	0.978 5	0.980 6	0.983 1	0.987 1	0.711 8	0.828 6	0.684 9	0.762 0
夹角余弦	0.981 4	0.981 4	0.983 8	0.987 0	0.759 9	0.859 6	0.739 1	0.801 2
编号	9	10	11	12	13	14	15	16
相关系数	0.742 6	0.744 7	0.866 2	0.895 9	0.915 5	0.863 6	0.907 6	0.912 1
夹角余弦	0.786 1	0.782 9	0.887 5	0.908 8	0.927 9	0.885 2	0.915 5	0.926 8
编号	17	18	19	20	21	22		
相关系数	0.931 4	0.892 2	0.952 7	0.892 6	0.907 8	0.890 9		
夹角余弦	0.934 0	0.909 1	0.952 5	0.907 3	0.921 9	0.908 2		

表 3 不同采收期连翘主成分分析贡献率及累计贡献率

主成分	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
贡献率	85.42%	9.12%	1.71%	1.13%	1.03	0.57%	0.27%	0.25%	0.10%
累积贡献率	85.42%	94.54%	96.25%	97.38%	98.41%	98.98%	99.25%	99.50%	99.60%
主成分	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16	PC17	PC18
贡献率	0.08%	0.08%	0.06%	0.05%	0.04%	0.03%	0.05%	0.02%	0.01%
累积贡献率	99.68%	99.76%	99.82%	99.87%	99.91%	99.94%	99.96%	99.98%	99.99%
主成分	PC19	PC20	PC21	PC22	PC23	PC24	PC25		
贡献率	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
累积贡献率	99.99%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%		

从主成分分析的贡献率来看: PC1 的贡献率最大为 85.42%, PC2 的贡献率次之, 为 9.12%。其他的贡献率较小。从累积贡献率来看, 取前 2 个特征值时, 累积贡献率为 94.54%, 故取前 2 个为主成分。由表 4 可以看出, 第一主成分主要反映了来自原始指标的 11 号色谱峰、17 号色谱峰和 21 号色谱峰的信息, 也就是说, PC1 得分值是 11、17 和 21 号色谱峰面积值的综合作用。第二主成分主要反映了来自原始指标的 11 号色谱峰、18 号色谱峰和 21 号色谱

从以上不同采收期连翘药材的相似度评价可以看出, 七月份采收的连翘药材和十月份采收的连翘药材相似度最为集中(相关系数分别为 0.97~ 1.00 和 0.89~ 0.92), 其次是八月底和九月份的连翘(相关系数分别为 0.86~ 0.92 和 0.89~ 0.95), 变化最大的是八月初采收的药材(相关系数为 0.71~ 0.85)。提示连翘在 7~ 10 月不同的采收期所含成分的组成和比例有不同程度的变化。其中八月初的所有样品与对照药材的相似度均较低, 相关系数在 0.83 以下, 夹角余弦值在 0.86 以下。

**3.3 连翘 HPLC 指纹图谱主成分分析** 无论是采用相关系数还是矢量夹角余弦来计算相似度, 它们比较的只是色谱指纹图谱的整体相似, 并没考虑提取物的“量”的不同。如果采用化学模式识别(主成分分析)的方法, 对此给出适当评价是可能的<sup>[3]</sup>。

主成分分析是从多个数值变量之间的相互关系入手, 利用降维的思想, 将多个变量化为少数几个互不相关的综合变量, 最大限度地保留原样本集所含的原始信息, 使新变量成为原变量的线性组合, 并寻求主成分来研究样本的一种方法<sup>[4]</sup>。本实验对 7 月份到 10 月份的不同采收期的连翘样本采用 Chromafinger 色谱指纹图谱软件进行主成分分析, 其结果见表 3、4。

峰的信息, 即, PC2 得分值是 11、18 和 21 号色谱峰峰面积值的综合作用。

图 3 为样本在 2 个主成分的二维平面分布图。

从上图可以看出, 7 月份、8 月底至 9 月份连翘样本较为集中的分布于 PC1 轴的正半轴, 其 PC1 值均较大, 11 号色谱峰(连翘脂苷)对应特征向量最大, 17 号色谱峰(连翘苷)对应特征向量次之, 说明在对连翘质量评价时应综合考察连翘脂苷和连翘苷的含量, 同时 21 号色谱峰代表的未知化合物也不能

表 4 标准化特征向量

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
X1	0.010 0	-0.027 8	0.170 8	-0.091 5	0.027 8	0.053 4
X2	0.003 7	-0.038 8	-0.073 4	-0.010 3	0.076 6	-0.044 7
X3	0.125 9	0.166 4	0.160 6	-0.217 9	0.092 8	0.162 4
X4	0.126 7	0.186 0	0.293 6	-0.258 9	0.137 5	-0.141 5
X5	0.003 9	-0.014 3	-0.021 5	0.025 3	-0.012 2	0.095 6
X6	0.177 3	0.113 2	0.204 9	-0.306 3	0.152 3	0.482 7
X7	0.018 5	-0.213 1	-0.360 0	-0.351 9	0.792 4	-0.122 3
X8	0.037 4	-0.134 5	-0.081 5	0.079 2	0.029 2	0.479 5
X9	0.001 3	-0.004 8	-0.005 2	0.006 6	-0.002 5	0.028 5
X10	-0.001 6	-0.022 2	0.009 1	0.039 1	-0.052 8	0.108 9
X11	0.846 8	-0.350 7	-0.150 0	-0.172 0	-0.292 1	-0.079 6
X12	0.011 9	-0.054 9	0.000 8	0.176 3	0.093 4	0.443 7
X13	-0.000 5	-0.027 9	-0.012 2	0.100 3	0.033 0	0.234 8
X14	0.146 0	-0.113 9	-0.053 9	0.537 4	0.211 7	0.216 2
X15	0.114 4	0.217 1	-0.105 6	-0.044 8	-0.002 7	-0.024 2
X16	0.002 6	-0.027 6	-0.039 5	0.064 5	-0.007 9	0.108 2
X17	0.313 5	0.006 8	0.563 3	0.288 8	0.386 2	-0.269 0
X18	0.122 3	0.325 9	-0.200 7	0.050 4	0.035 1	0.112 3
X19	0.008 5	-0.039 7	-0.033 3	0.108 2	-0.019 8	0.072 9
X20	0.000 4	-0.002 1	-0.018 9	0.025 9	-0.007 7	0.061 4
X21	0.260 5	0.747 9	-0.341 4	0.057 8	0.047 1	-0.009 8
X22	-0.009 9	0.018 2	0.013 1	0.018 8	-0.043 2	0.003 5
X23	-0.034 6	0.025 7	0.006 4	0.052 2	-0.114 4	-0.132 4
X24	-0.022 8	0.050 2	0.038 4	0.095 8	-0.034 5	0.055 0
X25	-0.014 5	-0.009 1	0.024 7	-0.073 4	-0.041 8	0.130 3

注: PC1~ PC6 表示综合 25 个原始指标的独立指标; X1~ X25 表示连翘共有模式中的 25 个共有峰。

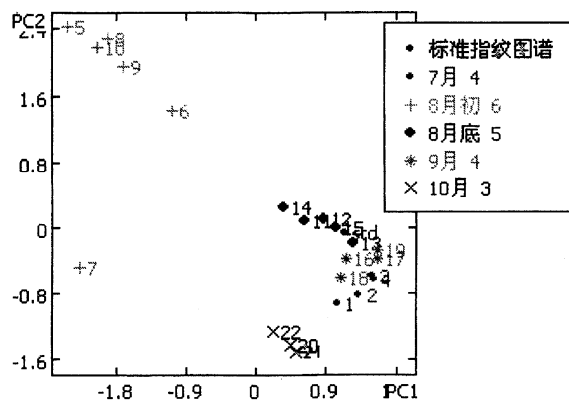


图 3 样本在 2 个主成分的二维平面分布图

忽略,这样才能得出正确的结果。

综上所述,根据各样本 PC1 和 PC2 得分和相似度分析结果,进行综合评价,可以确定连翘在 8 月底至 9 月份采收为佳。7 月份连翘各主要成分含量也很高,但此时是果实生长初期,10 月份连翘大都已经成熟,表皮开始发黄,传统上采收入药为老翘。

#### 4 讨论

本实验选择连翘苷作为对照品,同时考虑到连翘酯苷也具有抗菌及抗病毒活性,为主要有效成分之一,且含量较大,但连翘酯苷,不稳定,易分解。本实验仅将其作为对照品来定性指认其色谱峰。

对各月份连翘 HPLC 指纹图谱的进行了主成分分析,研究结果显示,采收季节对连翘的质量产生显著差异,单一的连翘苷指标不足以反映和区分样本间的差异,本论文是运用多元模式识别分析多指标的指纹图谱信息以确定最佳采收期的一种尝试。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部,北京:化学工业出版社,2000. 117-118.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 第二卷,北京:化学工业出版社,2002. 280.
- [3] 梁逸曾,谢培山. 指纹图谱的化学模式识别分析——若干实质性问题的探讨(三)[J]. 世界科学技术,2002,4(5):47-51.
- [4] 崔红花,王振月,王宗权,等. 主成分分析考察毛脉酸模最佳采收期[J]. 中国中药杂志,2005,30(11):808-811.

### 本刊投稿要求

来稿应为打印稿,一式两份,并附光盘或软盘等电子文件;实验性文章应附单位介绍信。

投稿同时请从邮局汇寄稿件处理费 50 元/篇,汇款时请注明文章第一作者姓名及稿件题目。本刊将于收到稿件后的一个月之内给予回执及收款发票。