

西南鬼灯檠的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

王燕^{1*}, 鲍家科², 金杨³, 罗曼², 熊慧林²

(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: 研究西南鬼灯檠药材 HPLC 指纹图谱及模式识别方法。方法: 采用 HPLC, 以贵州、云南两省不同产地、不同采收期的西南鬼灯檠药材为对象, 对 10 批药材进行指纹图谱研究, 运用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行模式识别研究。结果: 10 批样品中有 10 个共有峰, 10 批药材相似度较高, 色谱峰强度不同是药材的主要差别。通过聚类分析和主成分分析将 10 批样品按采收期不同分为 2 类。结论: 该方法能很好分离西南鬼灯檠的各类成分, HPLC 指纹图谱具有良好的稳定性、重复性, 可用于西南鬼灯檠药材的质量控制。

[关键词] 西南鬼灯檠; 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(2011)23-0054-04

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

WANG Yan^{1*}, BAO Jia-ke², JIN Yang³, LUO Man², XIONG Hui-lin²

(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 study the HPLC fingerprint and chemical pattern recognition method of *R. sambucifolia*. **Method:** Ten batches of samples, *R. sambucifolia*, come from different producing areas and harvest time of Guizhou and Yunnan were carried out to gain fingerprints by HPLC. The chemical pattern recognition of the characteristic fingerprint of *R. sambucifolia*, known as cluster analysis and principal component analysis, formed. **Result:** The fingerprint of 10 batches of *R. sambucifolia* showed 10 characteristic peaks. The chromatographic profiles of 10 batches of samples were similar. The major difference resulted from intensity of chromatographic peaks. The samples were grouped into 2 types of harvest time. **Conclusion:** The components of *R. sambucifolia* were well separated on HPLC. The results showed that this method had a good repeatability and stability. The fingerprint established can be used for quality control of *R. sambucifolia*.

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

西南鬼灯檠为虎耳草科植物西南鬼灯檠 *Rodgersia sambucifolia* Hemsl 的干燥根茎^[1], 主产于

贵州、云南、四川等地, 药材名通称岩陀, 俗名毛青冈。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^[2], 因此在民间应用广泛。西南鬼灯檠的主要化学成分有多酚类、糖类、黄酮类等^[3-4]。目前其质量控制方法多以测定岩白菜素含量为主, 难以全面控制西南鬼灯檠的内在质量, 不能对其真伪优劣做出判断, 关于西南鬼灯檠的指纹图

[收稿日期] 20110722(010)

[基金项目] 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项
([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

谱研究未见报道。本实验采用 HPLC 对西南鬼灯檠进行指纹图谱及其模式识别初步研究,为全面控制西南鬼灯檠的质量提供依据。

1 材料

1.1 仪器 日本岛津 LC-20AD 型 HPLC 系统 (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)。

1.2 试药 乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为重蒸水;岩白菜素对照品(批号 1532-200202)购自中国药品生物制品检定所,没食子酸对照品(批号 110831-200302)购自中国药品生物制品检定所。所用西南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 药材来源及相似度

No.	产地	收集日期	相似度
1	贵州水城县纸厂乡	2007-06	0.998
2	贵州兴义	2007-07	0.983
3	贵州威宁	2008-07	0.992
4	贵州水城	2008-07	0.995
5	贵州水城	2010-06	0.983
6	云南昆明	2007-06	0.958
7	云南宣威	2007-08	0.996
8	云南大理	2010-06	0.974
9	云南剑川	2010-06	0.995
10	云南鹤庆	2010-06	0.993

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% 磷酸溶液梯度洗脱,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% 甲醇分别制成每 1 mL 约含 0.25 mg,每 1 mL 约含 0.5 mg 的溶液,摇匀,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取各批药材粉末(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 2 号西南鬼灯檠药材 1 份,按 2.3 项下制备供试品溶液,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 0.061% ~ 0.206%,相对峰面积比值的 RSD 0.407% ~ 2.703%,均 < 3%,同时考察各色谱峰的相似度,用相似度软件计算,相似度均 > 0.999。表明该方法的精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取 2 号西南鬼灯檠药材 1 份,按 2.3 项下制备供试品溶液,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 0.042% ~ 0.177%,相对峰面积比值的 RSD 0.938% ~ 2.027%,均 < 3%,同时考察各色谱峰的相似度,用相似度软件计算,相似度均 > 0.999。表明供试品在 24 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验 取 2 号的西南鬼灯檠药材各 5 份,按 2.3 项下制备供试品溶液,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 0.110% ~ 0.200%,相对峰面积比值的 RSD 2.277% ~ 2.319%,均 < 3%,同时考察各色谱峰的相似度,用相似度软件计算,相似度均 > 0.999。表明该方法的重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立及模式识别分析

2.5.1 指纹图谱的建立 取 10 批西南鬼灯檠样品,按 2.3 项下制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,详细比较所有样品的色谱图,确定了 10 个共有峰。10 个共有峰的峰面积之和占总峰面积的 90% 以上,符合指纹图谱相关规定。

2.5.2 参照峰的确定 4 号峰峰面积较大,分离度

较好,出峰时间适中,峰形稳定,因此设为参照峰(S)。

2.5.3 共有峰的相对保留时间和相对峰面积 根据 10 批样品的测定结果,以 4 号峰为参照峰(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,由结果,10 批药材共有峰相对保留时间的 RSD 较小,而相对峰面积的 RSD 较大,说明西南鬼灯檠药材指纹图谱中主要峰群的整体图貌基本一致,但各成分含量有较大的差别。

2.5.4 相似度计算 将 10 批西南鬼灯檠样品的测试结果导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”,利用中位数法进行多点校正自动匹配后生成指纹图谱共有模式见图 1,并与共有模式为参照图谱,计算 10 批样品的相似度(表 1)。10 批西南鬼灯檠 HPLC 指纹图谱叠加图见图 2。

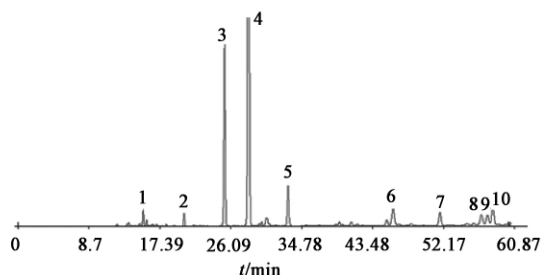


图 1 西南鬼灯檠 HPLC 指纹图谱共有模式

2.5.5 系统聚类分析 以 10 批西南鬼灯檠药材进行指纹图谱研究,获得 10 个共有峰,得到 10 × 10 阶原始数据矩阵,以相对峰面积为变量,运用 SPSS

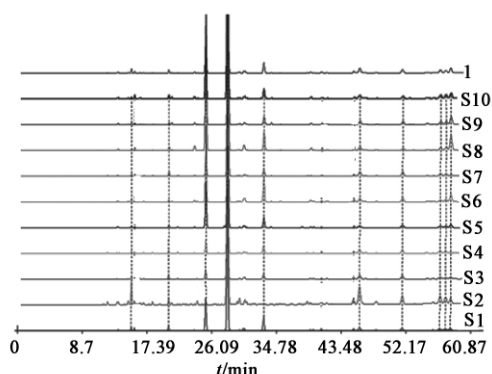


图 2 10 西南鬼灯檠 HPLC 指纹图谱叠加图

17.0 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,10 个样品基本可分为两大类:样品 4,7,2,3 号为第一大类,其余的样品为第二大类。聚类分析结果见图 3。

2.5.6 主成分分析 运用 SPSS 17.0 统计分析软件对 10 个西南鬼灯檠样品进行了主成分分析,即将他们投影至低维空间来看他们之间的微细差别,先将 10 × 10 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。结果 3 个主成分累积方差贡献率为 76.279%,基本可以表征原始因子代表的全部信息(表 3)。以主成分 PC1,PC2,PC3 所组成的投影图见图 4。图中每个点对应 1 个样本,10 个样本可分为两类,与聚类分析的结果一致。

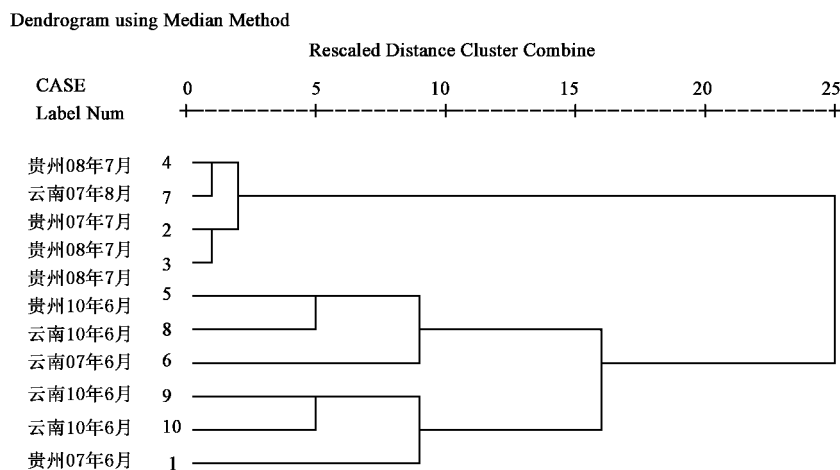


图 3 10 批样品聚类分析

表 3 10 批样品主成分分析数据

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.395	41.498	41.498
2	2.838	21.829	63.327
3	1.684	12.952	76.279

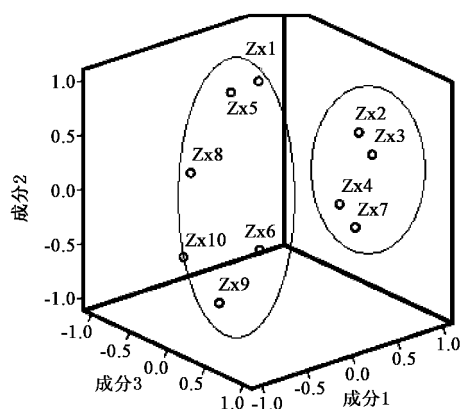


图 4 10 批主成分分析投影

3 讨论

本实验建立了西南鬼灯檠 HPLC 指纹图谱研究方法,标定了 10 个共有峰,10 批药材的相似度均在 0.95 以上,说明质量比较稳定。通过对照品和样品 HPLC-DAD 指纹图谱中色谱峰的紫外光谱图及保留时间对比可知,1 号峰为没食子酸,4 号峰为岩白菜素。

应用了系统聚类分析和主成分分析 2 种化学计量学方法对西南鬼灯檠进行了模式识别的探讨,两者判断结果一致,均把西南鬼灯檠按采收期的不同分为两类,7~8 月为一类,6 月为另一类,说明西南鬼灯檠药材地域性差别不大,这可能是因为它们生

长的自然环境相似,即温润的亚热带高原气候,加之该药材生长适应性较强,使得不同产地同一采收期的西南鬼灯檠其内在主要化学成分相对稳定;另一方面同一产地不同采收期对西南鬼灯檠药材的质量存在着一定的影响,另外从指纹图谱中还可以看出西南鬼灯檠主要峰群的整体图貌基本一致,但峰面积比值不尽相同,说明各成分含量有较大差别,主要原因可能是受气候、土壤、采收季节等因素影响,有待进一步研究。

系统聚类分析和主成分分析 2 种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] 史彦斌, 胡振英, 董鹏程, 等. 中草药鬼灯檠的现代研究进展[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(9): 23.
- [3] 胡凤莲, 刘宏. 中药材鬼灯檠的研究现状[J]. 陕西农业科学, 2008, 3: 144.
- [4] 张小燕, 李多伟, 王义潮, 等. 鬼灯檠的资源分布、药用价值及开发利用[J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(2): 60.
- [5] 黄勇, 郝林, 王爱民, 等. 贵州产荭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 蔡仲德]