

石仙桃药材 HPLC 指纹图谱的建立及聚类分析^Δ

张 淼*, 陈 龙, 朱 华#, 黎 理, 笪舫芳, 龙 莉, 何瑞婷(广西中医药大学壮瑶药重点实验室, 南宁 530200)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)13-1792-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.13.13

摘要 目的:建立石仙桃药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱并进行聚类分析,为石仙桃药材的质量评价提供参考。方法:根据《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)建立广西、广东和福建产16批石仙桃药材的HPLC指纹图谱[色谱柱为Agilent SB-aq,流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为220 nm,柱温为30 ℃,进样量为5 μL],并采用SPSS 22.0统计学软件对其进行聚类分析。结果:根据建立的HPLC指纹图谱,共确定了11个共有峰,并指认了其中的共有色谱峰1为天麻素;16批样品的相似度均大于0.9。16批药材样品可聚为2类。结论:建立的HPLC指纹图谱和聚类分析结果可为石仙桃药材的质量控制提供一定的参考。

关键词 石仙桃;高效液相色谱法;指纹图谱;聚类分析

Establishment of HPLC Fingerprint of *Pholidota chinensis* and Its Cluster Analysis

ZHANG Miao, CHEN Long, ZHU Hua, LI Li, DA Fangfang, LONG Li, HE Ruiting (Key Lab of Zhuang Yao Medicine, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of *Pholidota chinensis* and cluster analysis the samples, and to provide reference for quality evaluation of *P. chinensis*. METHODS: HPLC fingerprints of 16 batches of *P. chinensis* from Guangxi, Guangdong and Fujian were established according to 2012 edition of *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM* [chromatographic column was Agilent SB-aq column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution (gradient elution), at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength of 220 nm, the column temperature was 30 ℃ and the sample volume was 5 μL]. The cluster analysis was carried out by using SPSS 22.0 statistical software. RESULTS: According to the established HPLC fingerprint, 11 common peaks were indentified, and the common peak 1 was identified as gastrodin; the similarity of 16 batch of samples was greater than 0.9. 16 batches of medicinal materials could be divided into 2 groups. CONCLUSIONS: The established HPLC fingerprint and cluster analysis can provide reference for the quality control of *P. chinensis*.

KEYWORDS *Pholidota chinensis*; HPLC; Fingerprint; Cluster analysis

石仙桃(*Pholidota chinensis* Lindl.)为兰科石仙桃属植物石仙桃的鳞茎或全草,又名石橄榄、石莼肉等^[1],具有养阴、清肺、利湿、消痰的作用,可用于治疗眩晕、头痛、咳嗽、吐血、梦遗等疾病,民间常用其治疗高血压及其他原因引起的头痛^[2-3]。现代药理研究表明,石仙桃具有镇静、抗氧化、抗癌等活性,并对神经系统有抑制作用^[4-5],如其提取物制成的头痛定糖浆可治疗神经性头痛^[6]。石仙桃作为常用壮药之一^[7],主要分布于广东、广西、福建等地,其中以在广西应用较为广泛。目前,市场上石仙桃药材的品种混乱,导致其质量参差不齐。本课

题组前期对石仙桃进行了生药学鉴别^[8]及天麻素、多糖等的含量测定研究。在此基础上,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)对来自不同产地的16批石仙桃药材展开指纹图谱研究,并进行聚类分析,为其质量评价及进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695型HPLC仪、2489型紫外检测器(美国Waters公司);Agilent 1100型HPLC仪、G1315B型二级管阵列(DAD)检测器(美国Agilent公司);DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);SQP型万分之一电子天平[赛多利科学仪器(北京)有限公司];HH-S6型数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂);H21-HST2106型红外炉[美的(广东)集团];Milli-Q Advantage型A10纯水仪(美国密理博有限责任公司)。

1.2 药品与试剂

16批石仙桃药材采自广西、广东及福建等地,样品原植物采集后经广西中医药大学药用植物园高级园艺师朱意麟鉴定为兰科石仙桃属植物石仙桃(*P. chinensis* Lindl.)的全草,采集到的药材水焯5 min,45 ℃烘干,切

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460587);广西壮瑶药重点实验室(No.桂科基字[2014]32号);广西“2011 协同创新中心”-壮瑶药协同创新中心(No.桂教科研[2013]20号);广西重点学科——壮药学(No.桂教科研[2013]16号);基于海智计划搭建民族医药基础理论平台及海智工作站建立(No.广西民族医药协会2018-10号);广西一流学科——中药学(No.0501802815);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(No.2019KY0349)

* 助教,硕士。研究方向:中药及壮瑶药的品种鉴定与开发。E-mail:676407465@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药壮瑶药鉴定。E-mail:zhuhuagx@163.com

段干燥,打粉过2号筛,备用;天麻素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100080-201409,纯度:91.9%);甲醇(分析纯)、乙醇(分析纯)、磷酸(色谱纯)、醋酸(色谱纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;乙腈、甲醇(美国Fisher公司,色谱纯);水为超纯水。药材来源信息见表1。

表1 石仙桃药材来源信息

Tab 1 Source information of *P. chinensis*

编号	采集时间	采集地点	采集部位	样品状态
S1	2016-03-24	广西来宾市金秀县头排镇	全草	药材
S2	2016-03-25	广西来宾市金秀县桐木镇	全草	药材
S3	2016-03-15	广西防城港市防城区	全草	药材
S4	2016-03-28	广西防城港市那梭镇	全草	药材
S5	2016-03-29	广西防城港市扶隆镇	全草	药材
S6	2016-03-10	广西桂林市源头镇	全草	药材
S7	2016-06-25	广东韶关市翁源县周陂镇	全草	药材
S8	2016-06-30	福建宁德古田县大桥镇	全草	药材
S9	2016-07-08	福建省漳州市漳浦县绥安镇	全草	药材
S10	2016-07-13	广西南宁市钦北区	全草	药材
S11	2016-07-28	广西来宾市金秀县桐木镇	全草	药材
S12	2016-07-30	广西防城港市防城区	全草	药材
S13	2016-08-26	广西桂林市平乐县	全草	药材
S14	2016-10-22	广西河池市天峨县	全草	药材
S15	2016-11-17	广西来宾市金秀县	全草	药材
S16	2017-01-03	广西来宾市金秀县桐木镇	全草	药材

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent SB-aq(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸水溶液(B),梯度洗脱;柱温:25 °C;流速:1.0 mL/min;进样量:5 μL。梯度洗脱程序见表2。

表2 梯度洗脱程序

Tab 2 Gradient elution procedure

时间, min	乙腈(A), %	0.05%磷酸(B), %
0	3.0	97.0
2	3.0	97.0
5	15.0	85.0
16	19.0	81.0
25	27.0	73.0
28	27.0	73.0
35	34.0	66.0
42	40.0	60.0
55	100.0	0.0
60	100.0	0.0

2.2 溶液制备

2.2.1 天麻素对照品储备液 精密称取天麻素对照品6.12 mg,加水定容至25 mL量瓶中,即得。

2.2.2 供试品溶液 取16批药材粉末(过二号筛)0.1 g,精密称定,置于50 mL锥形瓶中,加入甲醇30 mL,称质量,回流提取30 min,再次称质量并补足质量,滤过,取续滤液1 mL至1.5 mL离心管中,以13 000 r/min离心10 min,吸取上清液,备用。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 取“2.2”项下天麻素对照品贮备液及供试品(编号S2)溶液,以甲醇为空白溶液,按“2.1”项

下色谱条件进行测定,记录色谱图。结果显示,天麻素的保留时间为7.554 min,与相邻峰间分离度大于1.5,理论板数不低于5 000,且空白溶液不干扰检测,结果见图1。

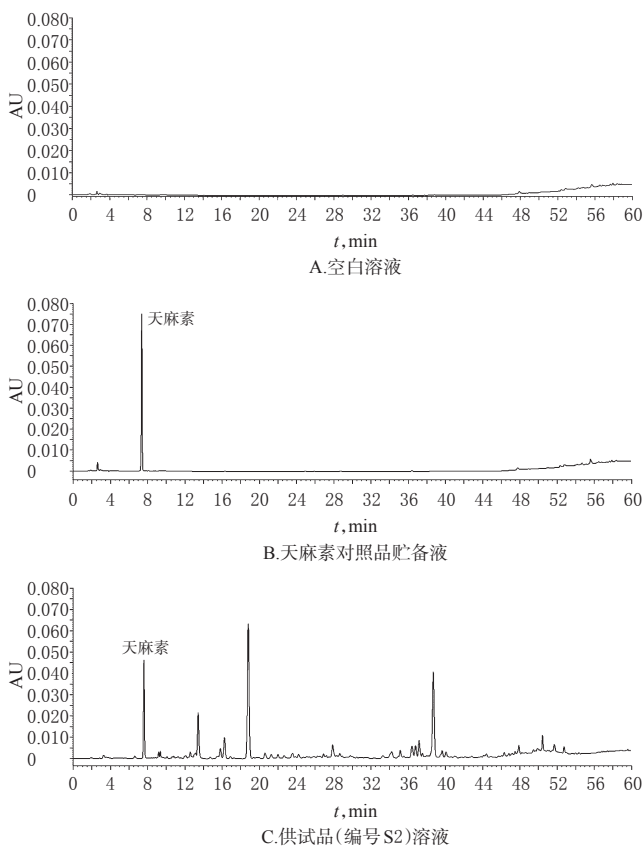


图1 专属性试验考察结果

Fig 1 Results of specificity tests

2.3.2 精密度的试验 取供试品(编号S2)溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以天麻素峰为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,11个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%(n=6),表明仪器精密度的良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批药材(编号S2)适量,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,以天麻素峰为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,11个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取供试品(编号S2)溶液,分别于室温下放置0、1、2、4、8、12、24 h后,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以天麻素峰为参照,记录各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,11个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%(n=7),表明供试品溶液室温条件下放置24 h稳定。

2.4 HPLC指纹图谱的生成与相似度、共有峰的相关分析

2.4.1 HPLC指纹图谱的生成 取16批药材样品各0.1 g,精密称定,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,将所得数据导入“中

药指纹图谱相似性评价系统”(2012)版软件分析,采用中位数法对相关参数进行自动匹配,标出药材的11个共有峰,系统根据药材共有模式生成石仙桃药材的对照指纹图谱R,并生成16批药材的指纹图谱。对照指纹图谱R见图2,16批药材HPLC指纹图谱共有模式见图3。

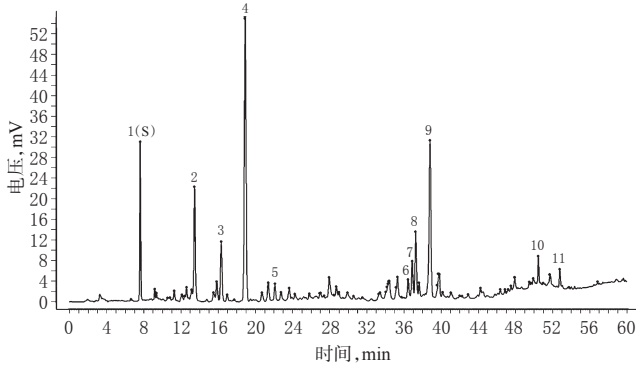


图2 药材样品HPLC对照指纹图谱R

Fig 2 HPLC control fingerprint R of medicinal samples

2.4.2 相似度分析 采用《中药色谱指纹图谱相似度评

表3 16批石仙桃药材指纹图谱相似度评价结果

Tab 3 Evaluation results of fingerprint similarity of 16 batches of *P. chinensis*

药材批次	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	对照指纹图谱R
S1	1	0.949	0.918	0.937	0.957	0.929	0.961	0.931	0.917	0.941	0.936	0.949	0.937	0.947	0.965	0.977	0.973
S2	0.949	1	0.970	0.960	0.963	0.976	0.970	0.976	0.918	0.920	0.964	0.959	0.941	0.962	0.971	0.952	0.986
S3	0.918	0.970	1	0.983	0.957	0.958	0.962	0.982	0.935	0.922	0.938	0.955	0.938	0.931	0.972	0.938	0.979
S4	0.937	0.960	0.983	1	0.969	0.939	0.955	0.979	0.970	0.958	0.927	0.946	0.910	0.929	0.983	0.951	0.984
S5	0.957	0.963	0.957	0.969	1	0.969	0.945	0.943	0.950	0.957	0.970	0.941	0.904	0.922	0.978	0.948	0.981
S6	0.929	0.976	0.958	0.939	0.969	1	0.940	0.938	0.889	0.912	0.987	0.927	0.913	0.913	0.959	0.931	0.966
S7	0.961	0.970	0.962	0.955	0.945	0.940	1	0.971	0.925	0.926	0.934	0.976	0.948	0.950	0.957	0.953	0.980
S8	0.931	0.976	0.982	0.979	0.943	0.938	0.971	1	0.942	0.929	0.917	0.958	0.941	0.952	0.972	0.951	0.982
S9	0.917	0.918	0.935	0.970	0.950	0.909	0.925	0.942	1	0.969	0.903	0.922	0.920	0.905	0.952	0.919	0.956
S10	0.941	0.920	0.922	0.958	0.957	0.912	0.926	0.929	0.969	1	0.946	0.933	0.933	0.912	0.959	0.941	0.961
S11	0.936	0.964	0.938	0.927	0.970	0.987	0.934	0.917	0.913	0.896	1	0.927	0.911	0.907	0.951	0.927	0.961
S12	0.949	0.959	0.955	0.946	0.941	0.927	0.976	0.958	0.922	0.933	0.927	1	0.936	0.969	0.948	0.943	0.974
S13	0.937	0.941	0.918	0.910	0.924	0.913	0.948	0.941	0.900	0.913	0.921	0.936	1	0.955	0.918	0.931	0.943
S14	0.947	0.962	0.931	0.929	0.922	0.913	0.950	0.952	0.905	0.912	0.907	0.969	0.955	1	0.950	0.953	0.966
S15	0.965	0.971	0.972	0.983	0.978	0.959	0.957	0.972	0.952	0.959	0.951	0.948	0.918	0.950	1	0.983	0.992
S16	0.977	0.952	0.938	0.951	0.948	0.931	0.953	0.951	0.919	0.941	0.927	0.943	0.931	0.953	0.983	1	0.977
对照指纹图谱R	0.973	0.986	0.979	0.984	0.981	0.966	0.980	0.982	0.956	0.961	0.961	0.974	0.943	0.966	0.992	0.977	1

个共有峰,通过与对照品比对,指认1号峰为天麻素,由于其分离良好、峰面积较大,且为所有药材样品共有,故设定其为参照峰(S),计算其他峰相对于11号峰的相对保留时间、相对峰面积,结果见表4、表5。

2.5 聚类分析

以16批药材样品11个共有峰的相对峰面积为原始数据,应用SPSS 22.0软件,采用组间平均数联结法进行聚类分析^[9-10]。结果显示,16批药材样品可聚为两大类:S5、S16、S15、S9、S10、S8、S12、S1、S6、S4聚为一类;S2、S7、S14、S13、S3、S11聚为一类。16批石仙桃药材的聚类分析图见图4。

3 讨论

近年来,随着人们健康意识的增强,利用中药进行

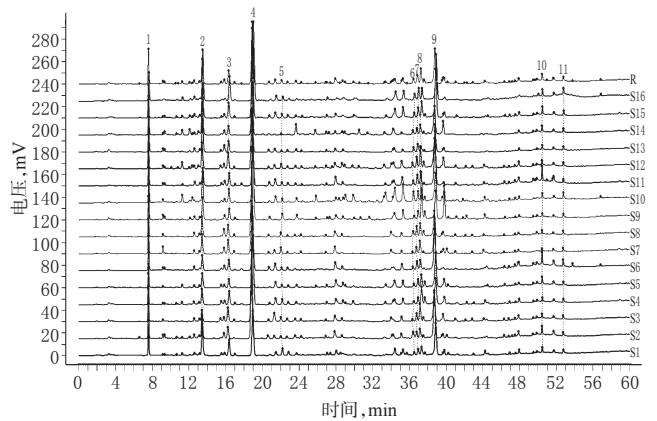


图3 16批药材样品HPLC指纹图谱共有模式

Fig 3 Common pattern of HPLC fingerprints for 16 batches of medicinal samples

价系统》(2012版)分析软件,以样品S4的HPLC图谱为对照,进行整体相似度评价。结果显示,16批药材样品相似度均大于0.9,表明药材样品批间差异较小,质量稳定性良好,结果见表3。

2.4.3 共有峰的指认及相关分析 16批药材样品有11

疾病预防和保健的需求逐年增高。药材质量成为健康市场关注的焦点,寻找有效的中药质量控制方法成为保证药材质量的最有效途径。中药指纹图谱法利用其能够显示药材多种成分含量,并能特征性地表达中药成分复杂性的特殊优势成为当前最有效、最快捷的常用中药质量控制与评价方法。鉴于此,本课题组从整体角度出发,采用HPLC指纹图谱方法分析石仙桃药材所含的多种化学物质,为石仙桃药材质量控制与评价提供了实验基础和参考依据。

构建指纹图谱需要样品具有多个分离度较好的色谱峰,因而样品的制备就显得尤为重要。中药含有多种化学成分,选用不同提取方法提取出来的成分种类或含量就会有所差异,尤其在微量成分方面,因而也会影响

表4 16批石仙桃药材共有峰的相对保留时间

Tab 4 Relative retention time of common peak of 16 batches of *P. chinensis*

峰编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
1(S)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	1.77	1.77	1.76	1.76	1.77	1.78	1.77	1.77	1.77	1.79	1.78	1.77	1.77	1.77	1.77	1.77
3	2.15	2.14	2.14	2.15	2.15	2.17	2.14	2.14	2.15	2.18	2.15	2.14	2.15	2.14	2.15	2.15
4	2.49	2.47	2.47	2.49	2.49	2.50	2.48	2.48	2.49	2.52	2.49	2.48	2.48	2.48	2.48	2.48
5	2.92	2.89	2.89	2.91	2.91	2.93	2.90	2.90	2.92	2.94	2.91	2.90	2.90	2.91	2.91	2.93
6	4.80	4.79	4.78	4.80	4.80	4.81	4.84	4.79	4.80	4.81	4.79	4.78	4.80	4.78	4.80	4.79
7	4.86	4.84	4.84	4.86	4.86	4.87	4.89	4.84	4.86	4.87	4.79	4.84	4.85	4.84	4.86	4.85
8	4.91	4.89	4.89	4.91	4.91	4.92	4.89	4.89	4.91	4.92	4.90	4.89	4.90	4.89	4.91	4.90
9	5.11	5.09	5.09	5.08	5.11	5.12	5.09	5.09	5.11	5.12	5.10	5.09	5.10	5.09	5.11	5.10
10	6.64	6.63	6.63	6.64	6.64	6.64	6.63	6.63	6.64	6.64	6.63	6.63	6.64	6.63	6.64	6.64
11	6.94	6.94	6.94	6.94	6.94	6.94	6.94	6.94	6.94	6.95	6.94	6.94	6.94	6.94	6.94	6.94

表5 16批石仙桃药材共有峰的相对峰面积

Tab 5 Relative peak area of common peak of 16 batches of *P. chinensis*

峰编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16
1(S)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2	1.74	0.67	0.49	0.70	0.83	0.46	0.87	0.73	0.92	1.21	0.70	1.02	0.93	1.38	1.48	1.06
3	0.89	0.13	0.19	0.68	0.58	0.35	0.24	0.45	0.51	0.61	0.15	0.69	0.17	0.13	0.74	0.58
4	2.95	0.33	0.67	4.08	3.93	2.01	0.70	3.14	3.72	3.48	0.58	2.61	0.34	0.36	5.19	3.90
5	0.30	2.51	4.01	0.19	0.09	0.06	2.47	0.13	0.23	0.11	3.45	0.15	1.59	2.74	0.13	0.14
6	0.09	0.21	0.14	0.08	0.14	0.06	0.25	0.21	0.07	0.38	0.09	0.17	0.11	0.11	0.18	0.11
7	0.29	0.17	0.33	0.27	0.48	0.08	0.27	0.36	0.28	0.41	0.15	0.41	0.21	0.20	0.44	0.34
8	0.41	0.26	0.75	0.79	0.77	0.16	0.56	0.45	1.33	1.19	0.54	0.85	0.11	0.35	0.77	0.48
9	2.00	1.53	1.75	0.03	2.78	0.87	1.42	1.13	1.43	1.79	3.27	1.56	0.70	1.49	2.78	2.63
10	0.17	0.15	0.11	0.10	0.30	0.10	0.07	0.08	0.08	0.14	0.40	0.10	0.06	0.14	0.23	0.23
11	0.12	0.07	0.10	0.10	0.14	0.08	0.11	0.08	0.10	0.14	0.10	0.09	0.06	0.09	0.15	0.20

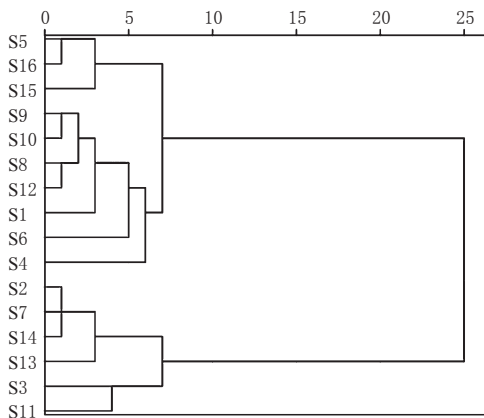


图4 16批石仙桃药材的聚类分析图

Fig 4 Cluster analysis of 16 batches of *P. chinensis*

到后期指纹图谱的构建。笔者通过前期文献研究,初步考察了供试品制备过程中的提取方法(超声提取和加热回流),提取溶剂(水、甲醇、乙醇),溶剂用量(20、30、40 mL)以及提取时间(15、30、45 min)等因素,以HPLC指纹图谱所含共有峰的种类、分离度、峰面积总和等作为评价指标,最终确定了石仙桃供试品制备的最佳提取工艺:药材粗粉0.1 g,加入甲醇30 mL,加热回流提取30 min。

前期,笔者分别考察了不同色谱柱[Agilent ZORBAX SB-aq(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent 5 TC-C₁₈

(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)],不同的流动相系统(乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.05%磷酸水溶液、甲醇-0.05%磷酸水溶液、乙腈-0.05%醋酸水溶液、甲醇-0.05%醋酸水溶液),不同柱温(20、25、30、35 ℃),不同进样量(5、10、15 μL)以及不同流速(0.8、1.0、1.3 mL/min)等色谱条件,最终确定了石仙桃指纹图谱的色谱柱为Agilent SB-aq(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液,进样量为5 μL,柱温为25 ℃,流速为1.0 mL/min。

聚类分析作为一种划分未知类别的分析方法,常用于中药品种和质量分析研究中。但其作为常用的探索性分析,在分类的过程中,采用构建方法不同、选取的参照标准不同、样本数据不同,分类的结果和结论也会不同。由于样本量的限制及变量类型等不同,本研究采用系统聚类法对16批次石仙桃药材指纹图谱进行了聚类分析,并将其聚为两大类:S2、S7、S14、S13、S3、S11聚为一类,另外几批药材聚为一类。其聚类结果与药材假鳞茎的大小及药材的生长年限存在一定的关联度,S2、S7、S14、S13、S3、S11几个批次药材假鳞茎较大,生长年限长,也可能是由于药材的产地、采收季节^[11-12]等原因造成了其差异较大。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社.1999:748-750.
- [2] 李经纬,余瀛鳌,永欣,等.中医大辞典[M].北京:人民卫生出版社,1995:439.
- [3] 王晓燕,黎理,朱华.石仙桃研究进展[J].亚太传统医药,2016,12(1):42-44.
- [4] 刘建新,周青,连其深.石仙桃对中枢神经系统抑制作用[J].赣南医学院学报,2004,24(2):119-121.
- [5] 杨素雄,姜家康,迟文成,等.石仙桃的药理进展[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(69):67-68,70.
- [6] 林曦石,严德志.头痛定糖浆对神经机能性头痛的疗效观察[J].福建医药杂志,1985,7(6):28.
- [7] 朱华.中国壮药志:第1卷[M].南宁:广西民族出版社,2003:171-174.
- [8] 张森,朱华,陈龙,等.石仙桃生药学鉴定[J].时珍国医国药,2018,29(9):2177-2179.
- [9] 黎理,曾祥燕,谢凤凤,等.竹节蓼药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析[J].中国药房,2018,29(12):1640-1643.
- [10] 孙绪,姚成芬,付思红,等.苗药朱砂根的HPLC指纹图谱研究[J].中国药房,2017,28(30):4285-4288.
- [11] 张洪峰,张学强,于丽霞,等.基于HPLC指纹图谱与聚类分析对不同产地连翘质量评价[J].江苏中医药,2018,50(4):78-80.
- [12] 李坤,李明花,秦文杰,等.基于高效液相指纹图谱及聚类分析对不同产地半夏质量评价研究[J].中南药学,2018,16(12):1750-1754.

(收稿日期:2019-02-26 修回日期:2019-04-14)

(编辑:林 静)