

· 基础研究 ·

基于指纹图谱与聚类分析评价 不同产地关升麻质量[△]

焦光磊¹, 李军山^{1,2*}, 孙福仁¹, 常云凤¹, 李雪丽¹, 李振江¹

(1. 神威药业集团有限公司, 河北 石家庄 051430;

2. 河北省中药配方颗粒工程技术研究中心, 河北 石家庄 050200)

[摘要] 目的: 建立关升麻药材指纹图谱方法, 评价不同产地关升麻药材质量。方法: 色谱柱为 GL Sciences Inertsustain AQ-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 柱温为 30 °C, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 317 nm。采用相似度评价、聚类分析、主成分分析方法, 对 15 批样品进行了比较与分析。结果: 15 批关升麻样品中确定了 10 个共有峰, 相似度在 0.80 以上, 并分为 2 类。结论: 该方法简便、可靠, 可以用于不同产地关升麻的质量控制与评价。3 个产区中以辽宁省产的关升麻质量最好, 同一产区中不同产地间关升麻质量差异较大。

[关键词] 关升麻; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

Study on Evaluation of Quality of *Cimicifuga heracleifolia* Kom. in Different Areas Based on HPLC Fingerprinting and Cluster Analysis

JIAO Guang-lei¹, LI Jun-shan^{1,2*}, SUN Fu-ren¹, CHANG Yun-feng¹, LI Xue-li¹, LI Zhen-jiang¹

(1. Shineway Pharmaceutical Group Ltd., Shijiazhuang 051430, China;

2. TCM Formula Granule Engineering Technology Research Center of Hebei, Shijiazhuang 050200, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of HPLC fingerprinting and to analyze the quality of *Cimicifuga heracleifolia* Kom. in different areas. **Methods:** The column was a GL Sciences Inertsustain AQ-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution. The column temperature was 30 °C, the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and the detection wavelength was 317 nm. Ten peaks were extracted as the common peaks of 15 batches of samples. The similarity evaluation, cluster analysis and principal component analysis were used to compare and analyze 15 batches of samples. **Results:** Ten peaks were extracted as the common peaks of 15 batches of samples. the similarity was 0.80 or more. 15 batches of samples were divided into two categories, and the quality in Liaoning producing areas were better. **Conclusion:** The method is simple and reliable, and can be used for quality control and evaluation of *Cimicifuga heracleifolia* Kom. in different areas. The quality of *Cimicifuga heracleifolia* Kom. in Liaoning producing areas are best and from different places in the same producing areas are different.

[Keywords] *Cimicifuga heracleifolia* Kom.; HPLC fingerprint; clustering analysis; principal component analysis

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180104005

升麻为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom.、兴安升麻 *C. dahurica* (Turcz.) Maxim. 或升麻 *C. foetida* L. 的干燥根茎, 具有发表透疹、清热解毒、升举阳气功能^[1]。升麻属为多基原、多年生草本植物, 3 种基原升麻对生长环境要求不同, 其中, 大三叶升麻仅产于辽宁、吉林、黑龙江地区, 习称“关升麻”^[2]。大三叶升麻主要化学成分为三

萜及其苷类、有机酸类等成分, 并含一个色原酮类化合物 Norkhellolide^[3,4]。升麻水提液具有一定的抗炎活性, 且大三叶升麻 > 升麻 > 兴安升麻^[5]。

肖浩等^[6]应用近红外光谱法对广升麻药材进行快速分析, 并对未知样品进行含量预测。沈保家等^[7]基于指纹图谱对升麻药材进行质量评价。本文以关升麻为研究对象, 通过指纹图谱结合聚类分析,

[△] [基金项目] 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项课题(国中医药科 2013X07)

* [通信作者] 李军山, 高级工程师, 研究方向: 配方颗粒工艺与质量标准; E-mail: lijunshan@shine-way.com

对不同产地关升麻药材进行了全面的分析,评价不同产地关升麻的质量。

1 材料

日本岛津公司 Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱系统,包括在线脱气机、SIL-20A 自动进样器、SPD-M20A 二极管阵列检测器、CTO-20AC 柱温箱;电子分析天平(梅特勒-托利多国际有限公司)。

对照品:异阿魏酸(批号:111698-201103,纯度99.3%)和阿魏酸(批号:110773-201313,纯度99.0%)购于中国食品药品检定研究院;磷酸和乙腈(色谱纯,天津科密欧化学试剂有限公司);水(纯化水)。

关升麻药材共15批,经河北省药品检验研究院孙宝惠主任中药师鉴定为毛茛科植物大三叶升麻 *Cimicifuga heracleifolia* Kom. 的干燥根茎。15批关升麻药材经企业质量检测中心检测,确认各项指标符合《中华人民共和国药典》(2015版)关于升麻的检査项要求,其样品信息见表1。

表1 关升麻药材信息

编号	产地	药材批号	称样量/g
S1	辽宁省本溪	1706126	1.03
S2	辽宁省铁岭	1706132	1.05
S3	吉林省辉南	1706135	1.03
S4	黑龙江省通河县	1706125	1.03
S5	辽宁省西丰	1706128	1.02
S6	吉林省安图	1706133	1.05
S7	黑龙江省孙吴县	1706121	1.06
S8	吉林省松原	1706136	1.07
S9	黑龙江省铁力县	1706123	1.05
S10	黑龙江省密山县	1706124	1.04
S11	辽宁省凤城	1706129	1.04
S12	黑龙江省逊克县	1706122	1.04
S13	吉林省柳河	1706134	1.03
S14	辽宁省新宾	1706127	1.04
S15	辽宁省盖平	1706131	1.05

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 GL Sciences Inertsustain AQ-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸水(B),按程序梯度洗脱(0 min→10 min, 8%→13% A;

10 min→25 min, 13%→16% A; 25 min→30 min, 16%→17.5% A; 30 min→40 min, 17.5%→19% A; 40 min→50 min, 19%→40% A; 50 min→65 min, 40%→80% A; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样体积: 10 μL; 检测波长: 317 nm。

2.2 对照品溶液的制备

取阿魏酸、异阿魏酸对照品适量,精密称定,加10%乙醇水制成每1 mL 各含阿魏酸0.045 mg、异阿魏酸0.021 mg 的混合溶液,置冰箱中保存,备用。

2.3 供试品溶液的制备

取关升麻药材,粉碎成粗粉,精密称定,转移至圆底烧瓶中,加入50 mL 10%乙醇水溶液,称质量,加热回流提取2.5 h,取出,放凉,称质量,用10%乙醇水补足失质量,过0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度考察 取吉林省柳河关升麻药材粗粉约0.5 g,精密称定,转移至圆底烧瓶中,加入10%乙醇水溶液50 mL,称质量,加热回流提取2.5 h,取出,放凉,称质量,用10%乙醇水补足失质量,过0.22 μm 微孔滤膜。样品重复测定6次,计算相对保留时间与相对峰面积的RSD 分别为0.01%~0.18%和0.12%~2.07%,说明各主要色谱峰保留时间与峰面积基本一致,符合指纹图谱要求。

2.4.2 稳定性考察 取吉林省柳河关升麻药材粗粉约0.5 g,精密称定,转移至圆底烧瓶中,加入10%乙醇水溶液50 mL,称质量,加热回流提取2.5 h,取出,放凉,称质量,用10%乙醇水补足失质量,过0.22 μm 微孔滤膜。样品分别于0、2、4、6、8、10 h 测定,计算相对保留时间与相对峰面积的RSD 分别为0.03%~0.15%和0.12%~1.87%。说明各主要色谱峰保留时间与峰面积基本一致,符合指纹图谱要求。

2.4.3 重复性考察 分别取吉林省柳河关升麻药材粗粉约0.5 g,共5份,精密称定,转移至圆底烧瓶中,加入10%乙醇水溶液50 mL,称质量,加热回流提取2.5 h,取出,放凉,称质量,用10%乙醇水补足失质量,过0.22 μm 微孔滤膜。5个样品分别测定,计算相对保留时间与相对峰面积的RSD 分别为0.02%~0.62%和0.98%~2.45%。说明各主要色谱峰保留时间与峰面积基本一致,符合指纹图谱要求。

2.5 供试品溶液测定

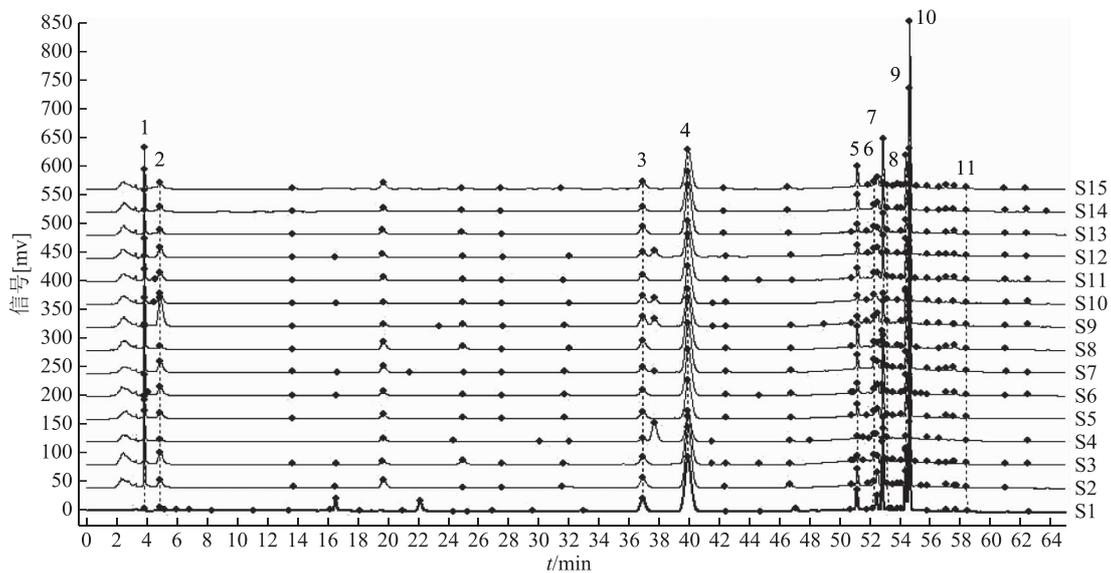
按照2.3方法制备15批供试品溶液,分别精密吸取对照品和供试品溶液各10 μL,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件进行测定,记录色谱图(见图1)。确定了10个共有峰,通过与对照品保留时间和紫外最大吸收波长的比对,指认了2个成分,为阿魏酸(3)和异阿魏酸(4),见图2。

2.6 指纹图谱的建立与分析

2.6.1 参比峰选择 在各样品指纹图谱共有峰中,异阿魏酸(4)紫外吸收强,峰形对称,无拖尾,分

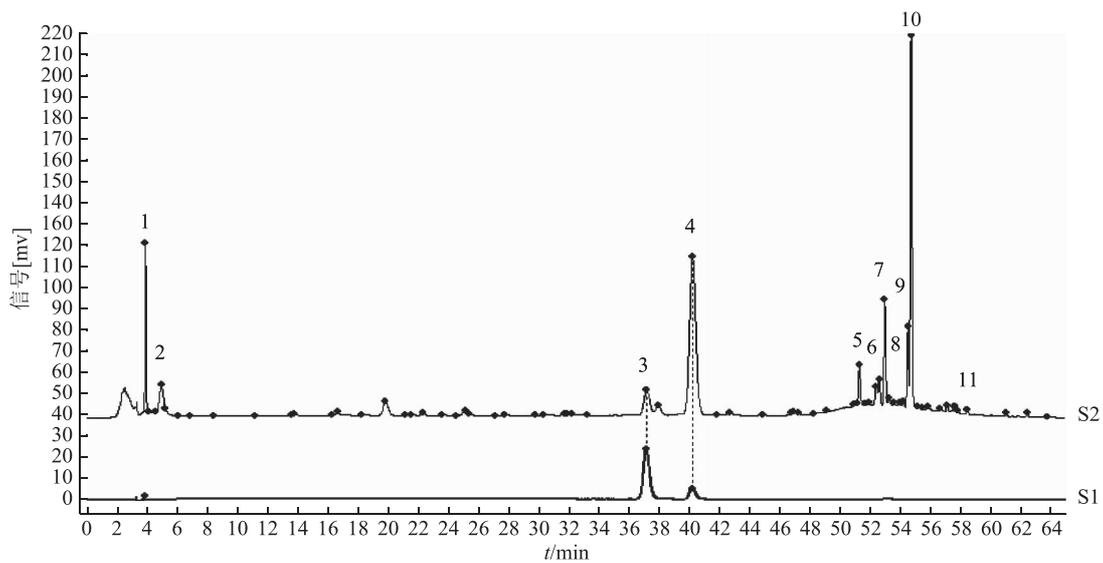
离度好,确定为参比峰。

2.6.2 指纹图谱的建立及相似度评价 将15批关升麻样品色谱图导入《中药色谱指纹图谱和相似度评价系统》(2012版),选取时间窗宽度为0.1 min,以中位数生成对照色谱图,经过多点校正后自动匹配,生成关升麻药材指纹图谱共有模式,见图1。由表2相似度计算结果可知,15批样品与对照谱图比较,13批样品相似度均大于0.90,两批样品指纹图谱相似度小于0.90,说明15批样品整体的相似度较好,但不同产地的关升麻药材差异是存在的。



注: 3. 阿魏酸; 4. 异阿魏酸。

图1 15批关升麻药材指纹图谱



注: S1. 阿魏酸和异阿魏酸对照品; S2. 关升麻药材; 3. 阿魏酸; 4. 异阿魏酸。

图2 关升麻药材指纹图谱

表2 15批关升麻药材指纹图谱相似度计算结果

编号	相似度
S1	0.970
S2	0.990
S3	0.980
S4	0.823
S5	0.992
S6	0.992
S7	0.995
S8	0.988
S9	0.897
S10	0.958
S11	0.994
S12	0.990
S13	0.973
S14	0.989
S15	0.959

2.7 关升麻药材的聚类分析及主成分分析

2.7.1 关升麻药材聚类分析 运用 SPSS 软件, 对 15 批关升麻样品指纹图谱 10 个共有峰进行筛选, 其中 6 号峰与 8 号峰峰面积小、分离度差, 故舍去。选用其他 8 个峰的峰面积作为聚类分析的源数据, 经过标准化处理, 聚类方法为组间连接, 样品距离度标准采用平均 Euclidean 距离, 进行聚类, 结果见图 3。

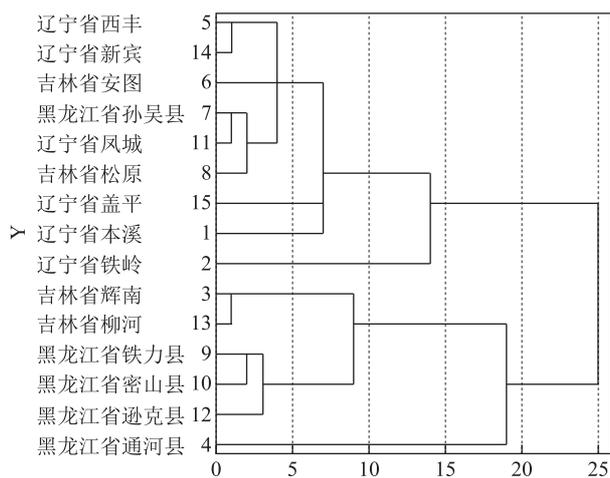


图3 15批关升麻药材聚类分析

从图 3 中可知, 15 批样品被分成 2 个大类, 第一大类包括: 辽宁省西丰、辽宁省新宾、黑龙江省孙吴县、辽宁省凤城、吉林省安图、辽宁省本溪、吉林省松原、辽宁省盖平、辽宁省铁岭; 第二大类

包括: 吉林省辉南、吉林省柳河、黑龙江省密山县、黑龙江省逊克县、黑龙江省铁力县、黑龙江省通河县。在第一大类里, 辽宁省本溪、辽宁省盖平、辽宁省铁岭被单独分成一类, 辽宁省西丰县、辽宁省新宾县被分成一组, 说明虽然产地接近, 但土壤、环境、水分等自然因素不尽相同, 造成化学成分上的差异。

2.7.2 关升麻药材的主成分分析 对 15 批关升麻药材指纹图谱中 8 个共有峰峰面积(峰 1、2、3、4、5、6、7、9、10)进行主成分分析, 提取出 3 个主成分。方差累积贡献率达到 84.20%, 可以代表整个样品的基本信息。

依据主成分中主成分 1 与主成分 2 矩阵系数做图可知(图 4), 主成分分析将 15 个产地的关升麻分成了两个部分, 即黑龙江省逊克县、黑龙江省通河县、黑龙江省密山县、黑龙江省铁力县、吉林省辉南、吉林省柳河为一大类, 其余产地为一大类, 与聚类分析结果一致, 验证了聚类分析的可靠性。

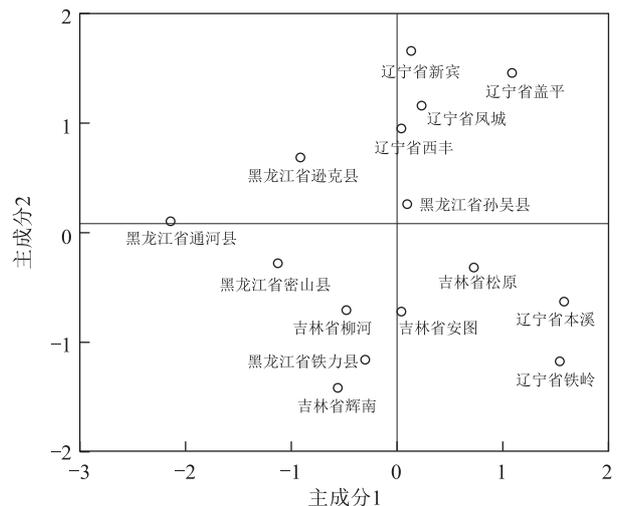


图4 各产地关升麻药材在主成分 1、2 上二维分布

3 讨论

3.1 提取溶剂和方法的比较

对 10%、30%、60% 乙醇水进行比较, 以 10% 乙醇水提取的样品中色谱峰个数较多, 峰型较好, 故提取溶剂选择 10% 乙醇水。对比了超声与回流提取方式, 超声提取样品中峰个数少、峰面积较小, 回流提取则峰面积较大、峰个数较多, 因此选用回流提取。同时对提取溶剂用量考察, 分别为 25、50、70 mL, 最终确定了 2.3 供试品溶液的制备方法。

3.2 色谱条件的考察

分别考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-

0.5%磷酸水3个流动相体系,结果表明,采用乙腈-0.1%磷酸水溶液时,指纹图谱中主要色谱峰分离较好,基线波动小,有利于指纹图谱的数据采集,有效确保数据的可重现性,因此,确定乙腈-0.1%磷酸水溶液作为流动相。

3.3 检测波长筛选

分别选用203、254、317 nm作为检测波长,结果发现在317 nm下各色谱峰分离度较好,杂质峰干扰最小,故选择317 nm作为检测波长。

东北三省为关升麻道地产区,15批关升麻药材收购于黑龙江、吉林、辽宁3个省不同产地,经过企业质量控制中心检测,各项指标符合《中华人民共和国药典》(2015版)关于升麻项下的要求,确保所选关升麻药材合规性,且对东北产区关升麻具有代表性。

相比较于含量测定,指纹图谱方法可全面地展示药材中的化学信息。经过方法学考察,本文所用方法符合指纹图谱方法学要求,通过关升麻指纹图谱方法的建立,可获得关升麻药材中的多种化学信息,提取、筛选出符合要求的数据作为不同产地关升麻药材的标签,应用聚类分析、主成分分析方法,进一步挖掘数据内部的联系,以此对关升麻不同的产地进行分析、评价。

由于中药指纹图谱统计软件计算相似度时,只对化合物保留时间做相似度分析,而忽略了化合物峰面积,因此,15批关升麻样品中13批指纹图谱相似度在0.90以上,仅仅对不同产地关升麻药材做出

一个整体性的评价。而应用聚类分析对15批关升麻样品进行数据分析时,发现不同产地间关升麻药材有着较明显的差异,15批样品被分成两个大类,继而,应用主成分分析的方法对数据再次统计分析,且与聚类分析结果一致。

通过指纹图谱与聚类分析结合使用的方式,对不同产地关升麻药材进行分析、评价,不同产地的关升麻样品间表现出差异性,说明不同产地间土壤、气候、环境、人为因素等差异对多年生关升麻质量有一定的影响。

参考文献

- [1] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:73-74.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典:上册[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:621.
- [3] 林玉萍,邱明华,李忠荣. 升麻属植物的化学成分与生物活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2002,14(6):58.
- [4] Akiko K, Makio S, Daisuke T, et al. Studies on the constituents of cimicifuga species X X VIII. Four new cyloart-7-enol glycosides from the underground parts of Cimicifuga simplex Wormsk[J]. Chem Pharm Bull, 2001, 49(4):437.
- [5] 曾晓辉,丁斐,秦昆明,等. 三个不同品种升麻抗炎作用及药效物质基础研究[J]. 江苏中医药,2017,49(5):75.
- [6] 肖浩,严小红,江英桥. 近红外光谱快速分析广升麻药材[J]. 中药新药与临床药理,2013,24(5):506-509.
- [7] 沈保家,秦昆明,张星海,等. 基于HPLC指纹图谱的不同产地升麻质量评价研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(13):2155-2158.

(收稿日期 2018-01-04)