

· 中药基础 ·

基于指纹图谱与聚类分析评价不同产地白鲜皮药材质量[△]冀艳花¹, 李军山^{1,2*}, 田方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: 考察不同产地白鲜皮药材质量, 为白鲜皮药材质量控制提供参考。方法: 采用 HPLC 法, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 在 210 ~ 500 nm 检测, 提取 228 nm 波长处的色谱图计算相似度, 以白鲜碱峰为参照峰, 计算相对峰面积, 进行聚类分析。结果: 15 批次白鲜皮药材的相似度均大于 0.9, 确定 13 个共有峰, 指出白鲜碱、黄柏酮、梣酮 3 个峰, 聚类分成 3 类。结论: 该方法为白鲜皮药材质量全面评价体系的建立提供了参考。

[关键词] 白鲜皮; HPLC 指纹图谱; 相似度; 聚类分析

Clustering Analysis on HPLC Fingerprint Characteristics of *Dictamnus dasycarpus* from Different AreasJI Yan-hua¹, LI Jun-shan^{1,2*}, TIAN Fang¹

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

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

[Abstract] **Objective:** To evaluate the quality of root cortex of *Dictamnus dasycarpus* from different areas. **Methods:** The HPLC fingerprint of root cortex of *D. dasycarpus* were eluted with the mobile phase consisted of acetonitrile and water in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was 228 nm. Hierarchical cluster analysis was applied. **Results:** Thirteen common peaks were selected in the standard fingerprint and the similarity was over 0.9. The root cortex of *D. dasycarpus* from 15 different batches could be divided into three grades through the results of hierarchical cluster analysis. **Conclusion:** The fingerprint study and hierarchical cluster analysis method can be applied for quality assessment of the root cortex of *D. dasycarpus*.

[Keywords] Root cortex of *Dictamnus dasycarpus*; HPLC fingerprint; similarity; hierarchical cluster analysis

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171218003

白鲜皮, 出自《药性论》, 载于《神农本草经》, 列为中品, 别名羊躅草、山牡丹、八股牛、白奶秧根、臭根皮等^[1], 为芸香科植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 的干燥根皮, 具有清热燥湿、祛风解毒之功效, 临床用于湿热疮毒、黄水淋漓、湿疹、风疹、疥癣疮癞、风湿热痹、黄疸尿赤等症^[2]。现代研究表明, 白鲜皮主要含生物碱、柠檬苦素、黄酮、香豆素及挥发油等类化学成分^[3-6]。基于中药材化学成分复杂, 且易受产地、气候、生态环境影响的特点, 仅仅依据某一种或几种指标化学成分的控制, 并不能全面反映中药材的质量。中药指纹图谱技术源于指纹鉴定学, 已成为目前国际公认的控制

中药及天然药物质量的有效手段^[7]。本实验利用中药指纹图谱相似度评价系统评估整体相似度, 并以每批共有峰面积为指标对购自不同主产地的 15 批白鲜皮药材进行考察分析, 以期对白鲜皮药材质量的控制提供参考。

1 材料与仪器

1.1 样品

15 批白鲜皮药材均购自主产地(具体见表 1), 经原河北省药品检验研究院孙宝惠主任中药师鉴定为芸香科植物白鲜 *Dictamnus dasycarpus* Turcz. 的干燥根皮, 依据《中华人民共和国药典》进行检测,

[△] [基金项目] 河北省中医药管理局中医药类科研计划课题(2016297)

* [通信作者] 李军山, 正高级工程师, 研究方向: 药物制剂工艺及质量标准; E-mail: swljs@sina.com.

各项指标均符合规定。

表1 白鲜皮药材产地

药材编号	产地
S1	黑龙江黑河
S2	黑龙江通河
S3	黑龙江牡丹江
S4	黑龙江五常
S5	吉林尚志
S6	吉林松原
S7	河北承德
S8	河北围场
S9	河北隆化
S10	内蒙古翁牛特旗
S11	内蒙古扎鲁特旗
S12	内蒙古宁城
S13	辽宁恒仁
S14	辽宁西丰
S15	辽宁朝阳

1.2 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(岛津仪器设备有限公司), CPA225D 分析天平(赛多利斯), JM-A5002 电子天平(余姚市纪铭称重校验设备有限公司), KH3200E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.3 试药

黄柏酮对照品(批号: 111923-201604)、枳酮对照品(批号: 111700-201603)购自中国食品药品检定研究院; 白鲜碱对照品(批号: 161104)购自成都普菲德生物技术有限公司; 色谱纯乙腈(批号: 20170505)、分析纯甲醇(批号: 20170509)购自天津科密欧化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: 日本 GL Science 公司 InertSustain C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B)作为流动相进行梯度洗脱(0 ~ 25 min, 5% ~ 28% A; 25 ~ 30 min, 28% A; 30 ~ 40 min, 28% ~

50% A; 40 ~ 45 min, 50% A; 45 ~ 55 min, 50% ~ 65% A; 55 ~ 70 min, 65% ~ 100% A; 70 ~ 80 min, 100% A); 检测波长: 228 nm; 流速: 1 mL · min⁻¹; 柱温为: 30 ℃; 进样量: 10 μL, 分析时间: 80 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取枳酮、黄柏酮、白鲜碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成每 1 mL 含枳酮 60 μg、黄柏酮 0.1 mg、白鲜碱 0.1 mg 的溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末(过四号筛)约 2.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声 30 min, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 经孔径 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 指纹图谱方法学考察

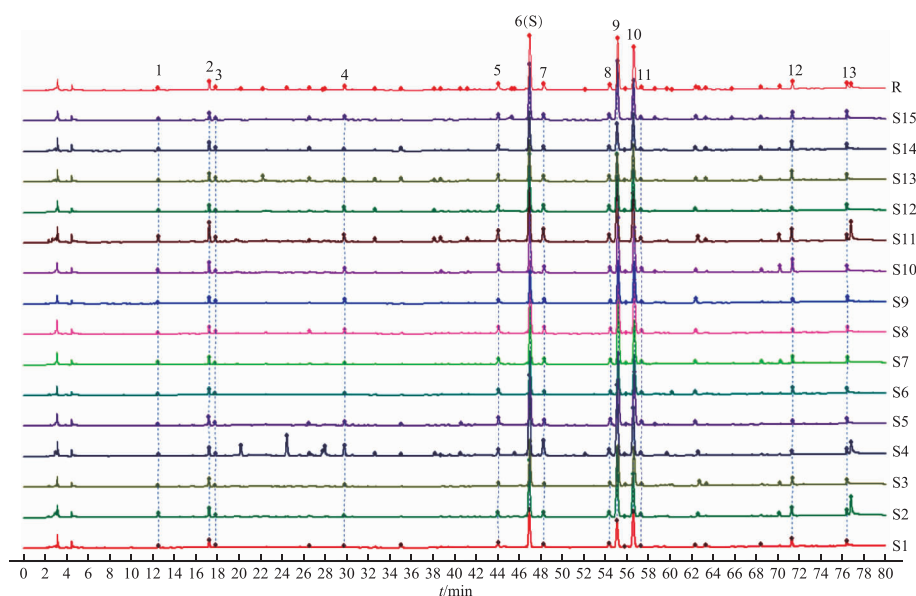
2.3.1 精密度试验 按 2.2.2 项下方法制备同一批供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 以 6 号峰的保留时间和峰面积作为参照, 计算 13 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 考察仪器精密度。结果显示, 各共有峰保留时间的 RSD < 1.0%, 各共有峰峰面积的 RSD < 2.8%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同批次样品, 按 2.2.2 项下方法分别制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件平行测定。以 6 号峰的保留时间和峰面积作为参照, 计算 13 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果显示, 各共有峰相对保留时间 RSD < 0.9%, 各共有峰相对峰面积 RSD < 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 按 2.2.2 项下方法制备同一批供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件, 分别在 0、2、4、6、8、12 h 进样分析。以 6 号峰的保留时间和峰面积作为参照, 计算 13 个共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 结果显示, 各共有峰相对保留时间 RSD < 1.2%, 各共有峰峰面 RSD < 3.0%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4 样品测定

将 15 批白鲜皮样品, 按照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样检测, 色谱图见图 1。以峰 6(S 峰)作为参照峰, 其余各共有峰的相对保留时间、相对峰面积见表 2 和表 3, 相似度结果见表 4。



注: S1 ~ S15. 1 ~ 15 批白鲜皮; R. 白鲜皮共有模式。

图 1 15 批白鲜皮的 HPLC 指纹图谱叠加图

表 2 相对保留时间

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	RSD(%)
1	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	0.267	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.267	0.267	0.11
2	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.367	0.367	0.366	0.366	0.366	0.366	0.366	0.368	0.368	0.10
3	0.379	0.379	0.379	0.379	0.379	0.379	0.379	0.379	0.379	0.020	0.379	0.379	0.379	0.379	0.379	0.03
4	0.635	0.635	0.635	0.635	0.635	0.635	0.634	0.634	0.634	0.000	0.634	0.634	0.634	0.635	0.634	0.06
5	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.938	0.01
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.00
7	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	1.028	0.00
8	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	1.158	0.01
9	1.174	1.174	1.174	1.174	1.174	1.174	1.174	1.174	1.174	1.174	1.174	1.174	1.172	1.174	1.174	0.05
10	1.207	1.207	1.189	1.207	1.207	1.207	1.207	1.207	1.207	1.207	1.189	1.189	1.189	1.189	1.189	0.91
11	1.221	1.221	1.207	1.221	1.221	1.221	1.221	1.221	1.221	1.221	1.221	1.221	1.221	1.221	1.221	0.37
12	1.521	1.520	1.520	1.520	1.520	1.520	1.519	1.519	1.519	1.519	1.519	1.519	1.519	1.520	1.520	0.07
13	1.629	1.629	1.629	1.629	1.629	1.629	1.626	1.626	1.626	1.626	1.626	1.626	1.626	1.629	1.629	0.14

表 3 共有峰相对峰面积

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	RSD(%)
1	0.014	0.044	0.026	0.040	0.060	0.022	0.028	0.037	0.032	0.032	0.071	0.069	0.021	0.019	0.022	1.80
2	0.075	0.121	0.126	0.093	0.120	0.097	0.110	0.162	0.142	0.146	0.135	0.209	0.089	0.078	0.100	3.55
3	0.019	0.028	0.025	0.015	0.019	0.025	0.033	0.065	0.073	0.064	0.030	0.044	0.019	0.018	0.024	1.91
4	0.128	0.076	0.041	0.029	0.030	0.055	0.034	0.041	0.056	0.135	0.059	0.096	0.074	0.057	0.058	3.27
5	0.075	0.145	0.072	0.129	0.087	0.139	0.160	0.146	0.156	0.159	0.121	0.161	0.117	0.113	0.094	3.12
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.00
7	0.221	0.115	0.071	0.121	0.089	0.101	0.105	0.124	0.164	0.175	0.115	0.213	0.132	0.115	0.114	4.31
8	0.110	0.121	0.096	0.116	0.112	0.123	0.119	0.140	0.161	0.100	0.131	0.133	0.125	0.099	0.110	1.71
9	0.952	0.978	0.931	1.378	1.265	1.147	0.853	0.782	0.709	1.429	0.716	1.028	1.088	1.011	1.167	22.12
10	0.669	0.821	0.913	0.841	0.852	0.894	1.035	1.067	0.983	1.449	0.791	0.790	0.777	0.855	0.789	18.39
11	0.042	0.076	0.056	0.064	0.063	0.054	0.064	0.030	0.029	0.052	0.084	0.063	0.044	0.046	0.046	1.54
12	0.039	0.181	0.132	0.108	0.135	0.048	0.130	0.195	0.204	0.087	0.126	0.152	0.045	0.042	0.102	5.51
13	0.055	0.076	0.099	0.082	0.078	0.068	0.110	0.127	0.120	0.152	0.100	0.064	0.081	0.066	0.105	2.71

表 4 相似度分析结果

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	对照指 纹图谱
S1	1	0.933	0.981	0.929	0.984	0.965	0.992	0.938	0.972	0.965	0.975	0.949	0.958	0.994	0.954	0.975
S2	0.933	1	0.966	0.965	0.947	0.977	0.950	0.980	0.973	0.954	0.972	0.985	0.977	0.923	0.977	0.982
S3	0.981	0.966	1	0.954	0.987	0.987	0.989	0.973	0.991	0.972	0.991	0.968	0.985	0.973	0.981	0.992
S4	0.929	0.965	0.954	1	0.951	0.964	0.942	0.956	0.967	0.928	0.962	0.971	0.970	0.929	0.962	0.973
S5	0.984	0.947	0.987	0.951	1	0.971	0.985	0.950	0.980	0.947	0.986	0.965	0.972	0.981	0.965	0.983
S6	0.965	0.977	0.987	0.964	0.971	1	0.980	0.993	0.998	0.980	0.991	0.971	0.997	0.956	0.994	0.996
S7	0.992	0.950	0.989	0.942	0.985	0.980	1	0.957	0.986	0.978	0.985	0.957	0.975	0.985	0.968	0.986
S8	0.938	0.980	0.973	0.956	0.950	0.993	0.957	1	0.986	0.970	0.983	0.965	0.992	0.927	0.993	0.987
S9	0.972	0.973	0.991	0.967	0.98	0.998	0.986	0.986	1	0.977	0.993	0.972	0.997	0.964	0.992	0.997
S10	0.965	0.954	0.972	0.928	0.947	0.980	0.978	0.97	0.977	1	0.969	0.946	0.970	0.95	0.968	0.977
S11	0.975	0.972	0.991	0.962	0.986	0.991	0.985	0.983	0.993	0.969	1	0.978	0.991	0.971	0.988	0.996
S12	0.949	0.985	0.968	0.971	0.965	0.971	0.957	0.965	0.972	0.946	0.978	1	0.974	0.949	0.970	0.984
S13	0.958	0.977	0.985	0.970	0.972	0.997	0.975	0.992	0.997	0.970	0.991	0.974	1	0.953	0.995	0.996
S14	0.994	0.923	0.973	0.929	0.981	0.956	0.985	0.927	0.964	0.950	0.971	0.949	0.953	1	0.946	0.969
S15	0.954	0.977	0.981	0.962	0.965	0.994	0.968	0.993	0.992	0.968	0.988	0.970	0.995	0.946	1	0.992
对照指 纹图谱	0.975	0.982	0.992	0.973	0.983	0.996	0.986	0.987	0.997	0.977	0.996	0.984	0.996	0.969	0.992	1

2.5 指纹图谱分析与评价

2.5.1 共有峰的确定 将 15 批白鲜皮药材依照 2.2.2 项下方法制备成供试品溶液，并按 2.1 项下方法进行测定。将所得的 15 批白鲜皮 HPLC 指纹图谱依次导入到“中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件”（2012 版）进行全峰匹配，对比色谱图确定共有峰为 13 个。将白鲜碱、黄柏酮、枞酮对照品色谱图与样品色谱图中相应位置的色谱峰进行比较，确认样品指纹图谱中 6 号峰为白鲜碱，9 号峰为黄柏酮，10 号峰为枞酮（见图 2）。

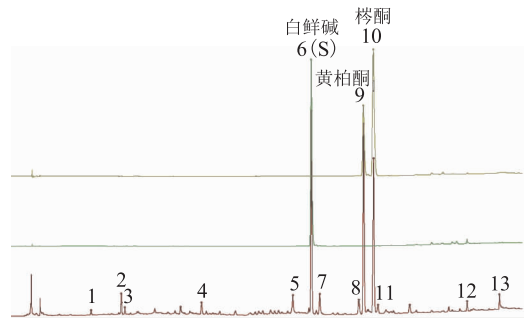


图 2 白鲜皮 HPLC 指纹图谱共有峰

2.5.2 参比峰的选择 通过对比各批样品图谱发现，白鲜碱的色谱峰（6 号峰）峰位较居中、分离度良

好，峰面积较大且为所有样品共有，故将白鲜碱峰设为参照峰。

2.5.3 聚类分析 将 15 批白鲜皮色谱峰相对内参比峰的峰面积量化，得到 15 × 13 阶原始数据矩阵，运用 SPSS 分析软件，以欧式距离（Euclidean distance）为测度，采用组间联结法（between-group-linkage）对样品进行聚类分析^[8]。聚类分析谱系图如图 3 所示，15 个产地的白鲜皮大体分为三类，S1、S2、S3、S4、S5、S6、S12、S13、S14、S15 为第一类，S7、S8、S9、S11 为第二类，S10 为第三类。

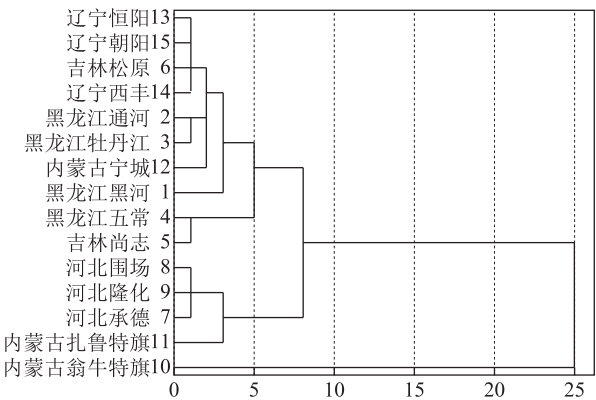


图 3 不同产地白鲜皮聚类分析谱系图

表5 聚类后样品分类表

类别	样品编号
1	S1、S2、S3、S4、S5、S6、S12、S13、S14、S15
2	S7、S8、S9、S11
3	S10

2.5.4 指纹图谱综合评价 通过对15批不同来源的白鲜皮药材整体观察并结合指纹图谱综合评价,发现不同产地和购买地的药材所含主要化学成分相似,但指标成分黄柏酮、梣酮含量差异较大,RSD值高达22.12%。此外,编号S4(黑龙江五常)白鲜皮药材图谱在保留时间20、24、28 min处各出现一个较为明显且其他批次均无的峰,具体是何种化学成分有待进一步研究。由聚类分析结果可以看出,白鲜皮药材质量受地域影响较为显著,而通过聚类分析能够直观地将不同产地白鲜皮药材成分与品质加以区分。

3 讨论

中药材化学成分复杂,且产品质量受多种因素的影响,如产地、生态环境、采收季节、储存条件等,而中药指纹图谱技术能够全面反映中药材质量,成为目前国际公认的控制手段^[9-10]。本研究收集5个白鲜皮主产地15批白鲜皮药材,测定HPLC指纹图谱,评价其相似度,并对15批药材进行了聚类分析,发现白鲜皮药材质量受地域影响较为显著,提示在中药材质量控制上需给予重视。

本实验考察了提取溶剂(95%乙醇、水、不同浓度甲醇)、提取方式(回流、超声)对指纹图谱的影响,综合考虑提取的全面性、稳定性以及操作简便性等,选取100%甲醇作为白鲜皮的提取溶剂、超声提取30 min。

本实验使用LC-20AT的PDA检测器进行紫外区全波长扫描,以228 nm为检测波长时,各色谱峰响

应较大,且峰稳定。故确定228 nm为检测波长。

此外,本实验参考文献^[11-13]色谱条件,并对色谱条件中的流动相体系进行考察,分别采用甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.1%甲酸水进行梯度洗脱,结果表明,以乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱,所得图谱基线平直,峰形较好且分离度良好。

参考文献

- [1] 徐珞珊,徐国钧,金蓉鸾. 中国药理学[M]. 1996:801-802.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:110-111.
- [3] 郭丽娜,王芮,裴月湖,等. 白鲜皮化学成分的研究[J]. 中成药,2016,38(11):2409-2413.
- [4] 白媛媛,唐文照,王晓静. 白鲜皮化学成分研究[J]. 中药材,2014,37(2):263-265.
- [5] 杜程芳,杨欣欣,屠鹏飞. 白鲜皮的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(21):1663-1666.
- [6] 李翔,汤华钊,苟小军,等. 白鲜皮的化学成分研究[J]. 中药材,2008,31(12):1816-1819.
- [7] 马珠凤,张万峰. 中药化学成分与指纹图谱研究的相关性[J]. 中国药业,2006,15(7):60-62.
- [8] 罗洁,范旭航,崔思娇,等. 知母 UPLC 指纹图谱及聚类分析[J]. 中国现代应用药学,2013,30(1):28-31.
- [9] 陶金华,狄留庆,文红梅,等. 中药指纹图谱谱效相关性研究思路探讨[J]. 中国中药杂志,2009,34(18):2410-2413.
- [10] 郭洪祝,果德安. 中药指纹图谱在质量评价中的作用[C]// 中药指纹图谱学术研讨会论文集. 上海,2000.
- [11] 曹娟,王福刚,刘克,等. 白鲜皮药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中成药,2011,33(9):1469-1472.
- [12] 杜程芳,屠鹏飞. 白鲜皮药材指纹图谱研究[J]. 中国天然药物,2003,1(2):94-98.
- [13] 王蓓,张云天,李松. 白鲜皮配方颗粒高效液相色谱特征图谱研究[J]. 海峡药学,2015,27(2):47-50.

(收稿日期 2017-12-18)