

中图分类号: R917; R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)08-0061-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.08.014



五味藤茎皮高效液相色谱指纹图谱及数据挖掘研究*

韦 玮¹, 巫繁菁¹, 黄大利¹, 韦 萍¹, 潘广娟², 李耀华², 包传红^{2△}

(1. 广西骨伤医院, 广西南宁 530012; 2. 广西中医药大学, 广西南宁 530200)

摘要:目的 建立五味藤茎皮的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法 采用HPLC法, 色谱柱为Shim-pack VP-ODS柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为327 nm(0~45 min)和260 nm(45~105 min), 柱温为25℃, 进样量为10 μL。以1,7-二羟基吡啶酮峰为参照峰, 测定13批药材样品的HPLC指纹图谱, 采用中药指纹图谱相似度评价系统(2012版)进行共有峰确定和相似度评价; 并进行聚类分析和主成分分析。结果 13批药材样品的HPLC图谱有10个共有峰, 相似度为0.951~0.997。聚类分析和主成分分析结果显示, 样品可分为两大类, 主要区别在于贮存时间以4年为限, 原因可能与购买和贮存时间有关。结论 该指纹图谱及聚类分析和主成分分析结果, 可为进一步科学评价五味藤茎皮质量提供参考。

关键词:五味藤; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

HPLC Fingerprints and Data Mining of the Stem Bark of Securidacae Inappendiculatae Cortex

WEI Wei¹, WU Fanjing¹, HUANG Dali¹, WEI Ping¹, PAN Guangjuan², LI Yaohua², BAO Chuanhong²

(1. Guangxi Orthopedic Traumatology Hospital, Nanning, Guangxi, China 530012; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530200)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of Securidacae Inappendiculatae Cortex (SIC). **Methods** HPLC method was adopted, the chromatographic column was Shim-pack VP-ODS column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 327 nm (0-45 min) and 260 nm (45-105 min), the column temperature was 25℃, and the injection volume was 10 μL. The HPLC fingerprints of 13 batches of medicinal materials were determined with 1,7-dihydroxydione peak as the reference peak, and the Similarity Evaluation System for the Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2012 Version) was used to determine the common peak and evaluate the similarity. Cluster analysis and principal component analysis were performed. **Results** There were 10 common peaks in the HPLC chromatograms of 13 batches of medicinal materials, and the similarity was in the range of 0.951-0.997. The results of cluster analysis and principal component analysis show that the samples could be clustered into two categories, with the main difference caused by the storage time (limited to four years), and its reason may be related to the purchase and storage time. **Conclusion** The results of the fingerprint, cluster analysis and principal component analysis can provide a reference for the scientific evaluation of the quality of SIC.

Key words: Securidacae Inappendiculatae Cortex; HPLC; fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

五味藤为远志科植物蝉翼藤 *Securidaca inappendiculata* Hassk. 的干燥全株, 主要分布于我国广西、云南、广东、海南^[1-6]。五味藤有祛风湿、消肿止痛、活血化瘀功效, 可用于风湿骨痛、骨折、跌打损伤、产后恶露不净、妇女体虚、咳嗽、消瘦无力、过敏性皮疹的治疗。现代研究表明, 五味藤药材的主要化学成分为吡啶类、皂苷类、有机酸、糖酯等化合物, 具有抗氧化、抗风湿、抗

炎镇痛、抗肿瘤、保护肝损伤等作用^[7], 尤其是其中的酮类化合物对风湿性关节炎的作用较强, 与五味藤药材祛风湿的功效一致^[8-13]。调查发现, 市售五味藤药材的药用部位多为茎皮。基于此, 本研究中建立五味藤茎皮的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱, 并采用聚类分析和主成分分析对其进行质量评价, 为五味藤药材的质量标准提升提供参考。现报道如下。

*基金项目: 广西壮族自治区中医药管理局自筹经费课题[GZZC2019002]; 广西中医药适宜技术开发与推广项目[GZSY21-08]; 广西中药优秀人才研修项目[桂中医药科教发[2022]14号]; 广西中医药大学自然科学研究青年基金课题[2015MS025]; 广西骨伤医院院级课题[GXGSZD-2019004]。

第一作者: 韦玮, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为民族药研发, (电子信箱)wei3101695@qq.com。

△通信作者: 包传红, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药药效筛选, (电子信箱)247567397@qq.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent科技有限公司);Diret-Q 5UV型纯水仪(德国Merck Millipore实验室设备有限公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);PRACTUM224-1CN型电子分析天平(德国Sartorius公司);TGL-16G型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试药

1,7-二羟基吡酮对照品(自制,含量98.50%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。五味藤茎皮饮片(均购自广西壮族自治区玉林市玉州区宇海中药材购销部,样品信息见表1),经广西中医药大学郭敏副教授鉴定为正品。

表1 药材样品信息

Tab. 1 Information of medicinal material samples

编号	购买时间	批号	产地
S1	2016年12月	20161101	玉林市陆川县乌石镇
S2	2018年10月	20180901	玉林市福绵区樟木镇
S3	2016年5月	20160501	玉林市陆川县乌石镇
S4	2017年8月	20170801	玉林市福绵区樟木镇
S5	2015年1月	20141201	玉林市福绵区樟木镇
S6	2019年9月	20190801	玉林市福绵区樟木镇
S7	2020年5月	20200401	玉林市福绵区樟木镇
S8	2019年4月	20190301	玉林市陆川县乌石镇
S9	2015年5月	20150401	百色市田东县思林镇
S10	2017年12月	20171101	玉林市福绵区樟木镇
S11	2018年5月	20180401	百色市田东县思林镇
S12	2016年2月	20151101	百色市田东县思林镇
S13	2020年8月	20200701	玉林市福绵区樟木镇

2 方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Shim-pack VP-ODS柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~7 min时15%A→18%A,7~12 min时18%A→21%A,12~22 min时21%A,22~55 min时21%A→36%A,55~75 min时36%A,75~90 min时36%A→39%A,90~95 min时39%A→43%A,95~100 min时43%A→52%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:327 nm(0~45 min)和260 nm(45~105 min);柱温:25℃;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液制备

取1,7-二羟基吡酮对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,制成质量浓度为100 μg/mL的对照品溶液。取

样品粉末(过4号筛,下同)约1.0 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加入甲醇20 mL,称定质量,超声(功率100 W,频率50 kHz)处理45 min,放冷后再次称定质量,再用甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

精密度试验:取2.1.2项下供试品溶液(编号为S8)适量,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,以1,7-二羟基吡酮峰为参照峰,计算各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.5%,相对峰面积的RSD均小于2.6%(n=6),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取2.1.2项下供试品溶液(编号为S8)适量,分别于室温下放置0,2,4,8,12,24 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,以1,7-二羟基吡酮峰为参照峰,计算各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.5%,相对峰面积的RSD均小于2.5%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(编号为S8)粉末适量,共6份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,以1,7-二羟基吡酮峰为参照峰,计算各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积。结果各色谱峰相对保留时间的RSD均小于0.3%,相对峰面积的RSD均小于2.7%(n=6),表明方法重复性良好。

2.1.4 指纹图谱建立与相似度评价

取13批样品粉末各适量,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,将色谱图数据导入中药指纹图谱相似度评价系统(2012版),以S8药材样品色谱为参照色谱图,时间窗口设置为0.4 min,平均数法生成对照图谱(R),经多点校正后进行色谱峰匹配,生成叠加指纹图谱(图1)及共有模式对照指纹图谱(图2)。共标定10个共有峰,通过与对照品图谱(图3)比对,确认8号峰为1,7-二羟基吡酮。以8号峰为参照峰(s)计算得到各共有峰相对保留时间的RSD为0.05%~0.64%,13批药材样品的相似度为0.951~0.997。

2.2 聚类分析

将13批药材样品的色谱图数据导入SPSS 26.0统计学软件进行聚类分析,结果见图4。可见,当分类距离(d)=15时,13批样品可分为两大类,Ⅰ类包括编号为S1,S3,S4,S5,S9,S10,S12样品,Ⅱ类包括编号为S2,S6,S7,S8,S11,S13样品;当d=4时,可分为五大类,Ⅰ类包括S5,S9,购买时间均为2015年;Ⅱ类包括S4,

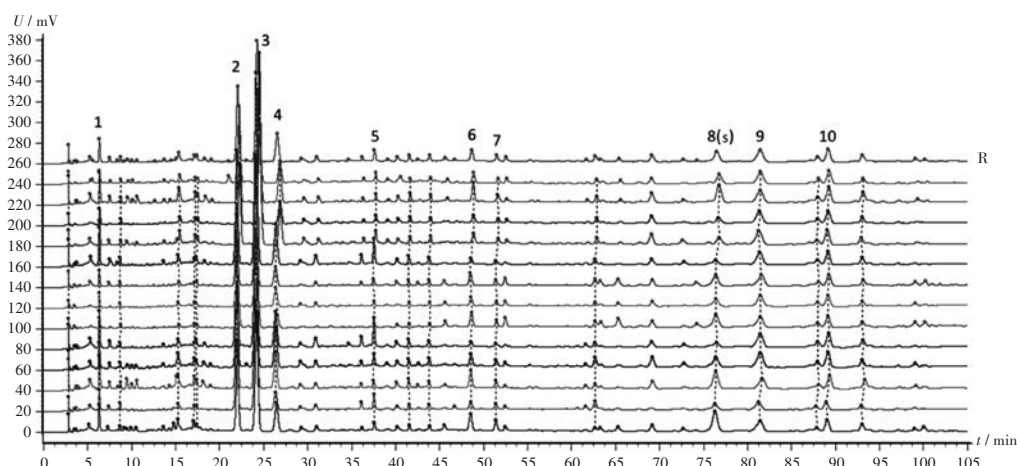


图1 13批药材样品高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprints of 13 batches of medicinal material samples

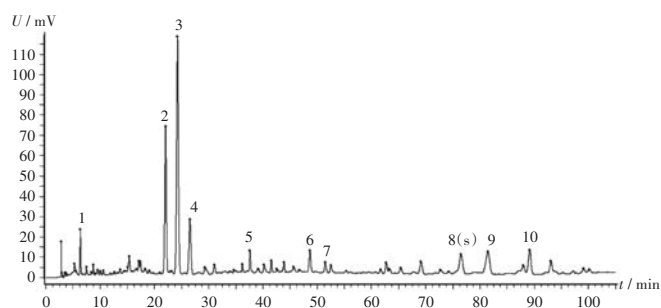
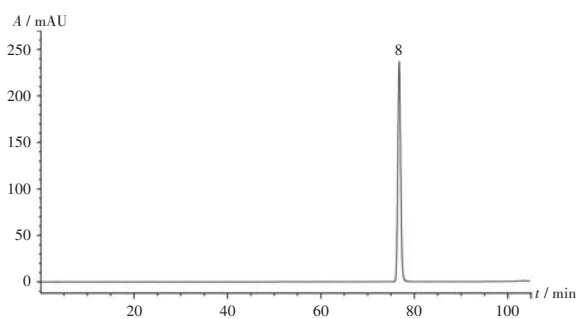


图2 药材样品高效液相色谱对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC reference fingerprint of medicinal material samples



8. 1, 7 - 二羟基吡酮

图3 对照品高效液相色谱图

8. 1, 7 - Dihydroxyxanthone

Fig. 3 HPLC chromatogram of reference substance

S10, 购买时间均为2017年; III类包括S1, S3, S12, 购买时间均为2016年; IV类包括S11, S6, S8, S7, S13, 购买时间分别为2018年、2019年、2020年; V类仅包括S2, 购买时间为2018年。故推测聚类分析结果可能与购买和贮存时间有关。

2.3 主成分分析

以所建立的HPLC指纹图谱中10个共有峰的峰面积为变量, 建立13 × 10的原始数据矩阵, 采用SPSS 26.0统计学软件对数据标准化后进行主成分分析。主成分特征值与贡献率见表2, 可知, 前3个主成分特征值均

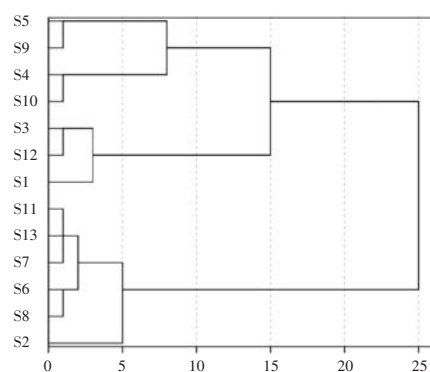


图4 13批药材样品聚类树形图

Fig. 4 Tree diagram of cluster analysis of 13 batches of medicinal material samples

大于1, 其累积的方差贡献率超95.58%, 即涵盖了大部分信息。以主成分1, 2, 3建立坐标系得到13批药材样品的三维投影图(图5 A), 以主成分第1, 2建立坐标系得到主成分分析平面图(图5 B)。经分析可知, 投影后均可将13批样品分为两类, 结果和聚类分析结果一致。

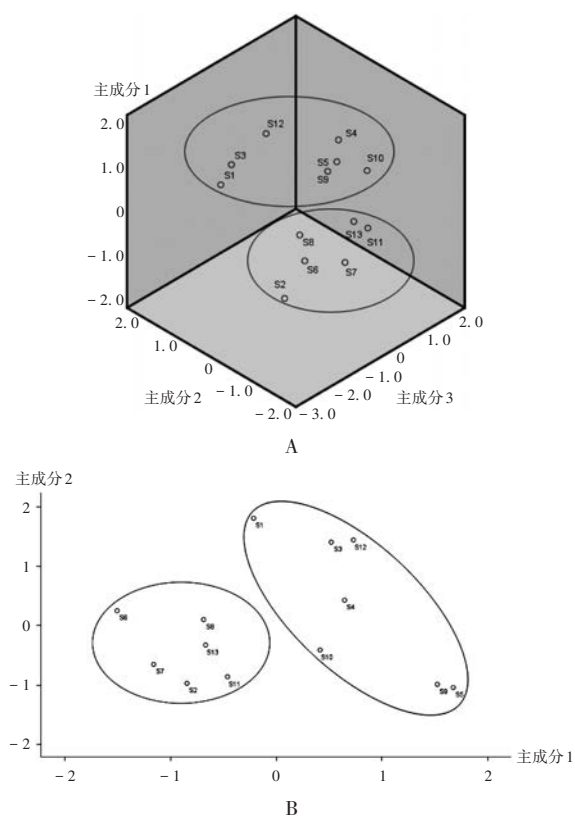
表2 药材样品主成分特征值及方差贡献率

Tab. 2 Principal component characteristic value and variance contribution rate of medicinal material samples

主成分	特征值	方差贡献率(%)	累积方差贡献率(%)
1	5.041	50.409	50.409
2	3.125	31.251	81.661
3	1.392	13.925	95.585

3 讨论

五味藤茎皮的主要成分为皂苷和吡酮, 利用二极管阵列检测器对样品进行扫描发现, 在图谱前45 min 色谱峰的最大吸收波长为327 nm, 结合文献[14]可推断此类成分主要是皂苷; 45 min 后的色谱峰在260 nm 波长处均有较大的吸收, 与对照品1, 7 - 二羟基吡酮紫外吸收特性一致, 归属为吡酮类化合物。考虑指纹图谱的



A. 三维投影图 B. 平面图

图5 13批药材样品主成分分析图

A 3D projection picture B Plane picture

Fig. 5 Principal component analysis of 13 batches of medicinal material samples

全面性,本研究中采用了双波长切换检测技术^[15],在0~45 min采用327 nm 波长检测,45 min后切换至260 nm 波长进行检测。

本研究中收集了13批药材样品,HPLC指纹图谱相似度在0.951~0.997之间,说明13批广西产五味藤茎皮药材样品的化学成分特征相对一致。指纹图谱中的1,2,3号共有色谱峰为主成分,可提供共有峰95.585%的差异信息量。根据文献推测1,2,3号色谱峰为齐墩果酸型皂苷,此类皂苷的稳定性较差,在室温下会发生降解^[16]。聚类分析和主成分分析显示,13批药材样品以4年的贮存界限分为两类,表明五味藤茎皮的皂苷类成分会随着贮存时间的延长而减少,与文献报道的不稳定性相符,贮存4年对药材质量有显著影响。提示五味藤茎皮在使用中要注意贮存时间,以不长于4年为宜。

综上所述,本研究中建立的五味藤茎皮HPLC指纹图谱能较好地反映其内在成分及潜在质量差异,对评价五味藤药材质量及进一步完善其质量标准具有参考价值。

参考文献

[1] 贾敏如,李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京:中国医药科

技出版社,2005:557.

[2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准(第二册)[M]. 南宁:广西科学技术出版社,1996:58.

[3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准(第一卷)[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2008:56-57.

[4] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区瑶药材质量标准(第一卷)[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2014:49-50.

[5] 徐荔,姜明辉,卯明霞,等. 傣药材蝉翼藤质量标准研究[J]. 中国民族医药杂志,2012,18(11):39-41.

[6] 杨世林,郭绍荣,郑品昌. 基诺族医药[M]. 昆明:云南科学技术出版社,2001:43.

[7] 王起文,马赞,马程遥,等. 蝉翼藤化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药,2016,38(9):2013-2017.

[8] ZUO J,TAO MQ,WU XY, et al. *Securidaca inappendiculata* - Derived Xanthones Protected Joints from Degradation in Male Rats with Collagen - Induced Arthritis by Regulating PPAR - γ Signaling[J]. J Inflamm Res,2021,16(14):395-411.

[9] ZUO J,JI CL,OLATUNJI OJ, et al. Bioactive fractions from *Securidaca inappendiculata* alleviated collagen - induced arthritis in rats by regulating metabolism - related signaling[J]. Kaohsiung J Med Sci,2020,36(7):523-534.

[10] 陶梦倩. 蝉翼藤基于代谢-免疫反馈治疗类风湿关节炎机制研究[D]. 芜湖:皖南医学院,2021.

[11] TAO MQ,JI CL,WU YJ, et al. 1,7 - Dihydroxy - 3,4 - Dimethoxyxanthone Inhibits Lipopolysaccharide - Induced Inflammation in RAW264.7 Macrophages by Suppressing TLR4 / NF - κ B Signaling Cascades[J]. Inflammation,2020,43(5):1821-1831.

[12] ZUO J,DOU DY,WANG HF, et al. Reactive oxygen species mediated NF - κ B / p38 feedback loop implicated in proliferation inhibition of HFLS - RA cells induced by 1,7 - dihydroxy - 3,4 - dimethoxyxanthone [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy,2017,94:1002-1009.

[13] JI CL,JIANG H,TAO MQ, et al. Selective regulation of IKK β / NF - κ B pathway involved in proliferation inhibition of HFLS - RA cells induced by 1,7 - dihydroxyl - 3,4 - dimethoxyxanthone[J]. Kaohsiung Journal of Medical Sciences,2017,33(10):486-495.

[14] 张丽杰. 蝉翼藤根及茎化学成分的研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2005.

[15] 黄良永,刘佳丽,杜士明. 妇安消疹洗液高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中国药业,2022,31(6):73-76.

[16] TRAN HQ,PHAM TC,DUONG THY, et al. Triterpenoid saponins and phenylpropanoid glycosides from the roots of *Polygala japonica* Houtt. with anti - inflammatory activity[J]. Phytochemistry Letters,2018,24:60-66.

(收稿日期:2022-03-30;修回日期:2022-10-19)