

东北苦菜 UPLC 指纹图谱建立及化学模式识别

姚广哲¹, 马文娟¹, 贾琪¹, 欧阳慧子², 常艳旭¹, 何俊^{1*}
(1. 天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室, 天津 301617; 2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

摘要: **目的** 建立东北苦菜 *Ixeris vesicolor* DC. UPLC 指纹图谱, 并进行化学模式识别。**方法** 东北苦菜甲醇提取物的分析采用 CORTECS C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.6 μm); 流动相 0.1% 磷酸水-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.1 mL/min; 检测波长 (1~15 min, 327 nm; 15~50 min, 360 nm); 柱温 35 ℃; 进样量 2 μL。采用相似度分析和化学模式识别技术相结合的方法对其进行质量评价。**结果** 10 批样品指纹图谱中有 19 个共有峰, 相似度均大于 0.953。通过聚类分析将样品分成 2 类, 主成分分析结果支持聚类分析结果, 采用正交偏最小二乘法-判别分析筛选出了导致不同批次药材质量差异的 3 个共有峰, 指出 2 号峰 (绿原酸) 和 12 号峰 (木犀草素)。**结论** 该方法稳定可靠, 可系统、全面地评价东北苦菜的药材质量。

关键词: 东北苦菜; 指纹图谱; UPLC; 聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)02-0392-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.02.023

Establishment of UPLC fingerprints of *Ixeris vesicolor* and chemical pattern recognition

YAO Guang-zhe¹, MA Wen-juan¹, JIA Qi¹, OUYANG Hui-zi², CHANG Yan-xu¹, HE Jun^{1*}
(1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

KEY WORDS: *Ixeris vesicolor* DC.; fingerprints; UPLC; cluster analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares - discriminant analysis

东北苦菜为菊科苦苣菜属植物变色苦菜 *Ixeris vesicolor* DC. 的干燥全草。在 2015 年第 20 号公告中, 吉林省食品药品监督管理局将 1977 年版《吉林省药品标准》中的北败酱修订为东北苦菜^[1]。东北苦菜味苦、性寒, 具有清热解毒、清痈、化瘀排脓等功效, 临床上常用于肠炎、急性咽炎、产后瘀血腹痛、急性细菌性痢疾等疾病的治疗^[2-4]。据相关报道^[5-6], 东北苦菜中主要含有黄酮类、多糖类、挥发油和有机酸类等成分, 但仅测定单一成分 (绿原酸) 的含有量, 并不能有效的对其进行质量控制。因此, 需要建立高效、快速的分析检测方法, 以便能够更加全面的评价东北苦菜药材的质量。

中药指纹图谱是能够标示化学成分特征的色谱图, 其中潜藏着大量数据和变量, 对其进行挖掘和评价, 可以有效的反映出中药内在的化学成分信息。但目前对中药成分的处理仅使用相似度评价系统, 存在一定的弊端, 不能多层次、全方面地对药材进行整体分析, 很难准确地评价药材的内在真实质量^[7-8]。化学模式识别方法能对中药指纹图谱信息进行深入分析, 快速筛选出需要重点关注的标志性成分, 能有效的弥补指纹图谱评价方法中的不足, 将二者有机结合, 对中药的质量在整体性的基础上得以有效的控制, 更快速的识别出中药复杂成分信息, 达到区分药物质量差异的目的^[9-10]。因此, 本实验采用 UPLC 法建立东北苦菜指纹图谱,

收稿日期: 2019-04-20
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673824)
作者简介: 姚广哲 (1992—), 男, 硕士生, 研究方向为中药学。Tel: 15373407884, E-mail: yaoguangzhezy@163.com
*通信作者: 何俊 (1981—), 男, 研究员, 研究方向为药物分析。Tel: (022) 59596163, E-mail: hejun673@163.com

并结合化学模式识别方法对所得指纹图谱进行综合分析,判断结果能直观地反映不同产地样品之间的质量差异,以期为东北苦菜药材的质量评价研究提供参考。

1 材料

Agilent1290 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水制备仪 (天津信睿生物科技有限公司); AS 60/220. R2 型天平 (十万分之一,苏州培科实验室仪器科技有限公司); G3KT18273 型旋涡混合器 (赛默飞世尔科技公司); 5424R 型高速控温离心机 (德国 Eppendorf 公司)。对照品绿原酸 (批号 MUST-18030620)、异槲皮苷 (批号 MUST-17051005)、木犀草苷 (批号 MUST-17121210)、木犀草素 (批号 MUST-17102605) 均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 咖啡酸 (批号 110885-200102) 购自中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇 (色谱纯,美国赛默飞世尔科技公司); 超纯水由 Milli-Q 制备。

东北苦菜采自吉林省不同地区,经天津中医药大学何俊研究员鉴定为菊科苦苣菜属植物变色苦菜 *Ixeris vesicolor* DC. 的干燥全草。药材经粉碎后,过 3 号筛,保存于天津中医药大学中医药研究院。信息见表 1。

表 1 样品信息
Tab. 1 Information of samples

| 编号 | 批次 | 来源 |
|-----|----------|-------|
| S1 | 20170526 | 长春市 1 |
| S2 | 20170528 | 梅河口市 |
| S3 | 20170527 | 白城市 |
| S4 | 20170526 | 长春市 2 |
| S5 | 20170527 | 松原市 1 |
| S6 | 20170528 | 松原市 2 |
| S7 | 20170527 | 松原市 3 |
| S8 | 20170528 | 松原市 4 |
| S9 | 20170526 | 辽源市 |
| S10 | 20170527 | 松原市 5 |

注:S1 采自长春市农安县,S4 采自长春市南关区,S5 采自松原市乾安区(城北),S6 采自松原市前郭县(万宝山服务区),S7 采自松原市前郭县(王府服务区),S8 采自采自松原市乾安区(城南),S10 采自松原市前郭县(白依拉嘎乡)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 CORTECS C₁₈ 柱 (2.1 mm × 150 mm, 1.6 μm); 流动相 0.1% 磷酸水 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~8 min, 90%~81.5% A; 8~20 min, 81.5%~81.3% A; 20~25 min, 81.3%~81.3% A; 25~35 min, 81.3%~60% A; 35~

40 min, 60%~40% A; 40~50 min, 40%~25% A); 体积流量 0.1 mL/min; 柱温 35 ℃; 进样量 2 μL; 检测波长 1~15 min, 327 nm; 15~50 min, 360 nm。

2.2 对照品溶液制备 分别精密称定对照品 (绿原酸、木犀草素、异槲皮苷、木犀草苷、咖啡酸) 各 5 mg, 加甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的贮备液, 于 4 ℃ 冰箱保存待用。

2.3 供试品溶液制备 精密称取东北苦菜粉末 0.1 g, 加甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 超声提取 (300 W, 50 kHz) 30 min, 静置室温后, 加甲醇补足至刻度线, 摇匀, 14 000 r/min 高速离心 10 min, 吸取上清液, 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 于 4 ℃ 冰箱保存待用。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密称取样品 S4 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下进样, 测得各共有色谱峰相对保留时间及峰面积 RSD 达到规定要求, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取样品 S4 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下进样, 测得各共有色谱峰相对保留时间及峰面积 RSD 达到规定要求, 表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 对样品 S4 供试品溶液进行精密吸取, 在“2.1”项条件下, 分别于 0、2、4、6、12、24 h 进样, 测得各共有色谱峰相对保留时间及峰面积 RSD 达到规定要求, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 结果与分析

2.5.1 指纹图谱建立及相似度分析 使用中药色谱指纹图谱相似度评价软件对所得的不同批次药材的指纹图谱数据进行分析, 以 S4 为参照色谱图, 采用多点校正法建立指纹图谱^[11], 得到 10 个东北苦菜指纹图谱见图 1, 从该软件分析得出, 10 批东北苦菜样品相对标准指纹图谱 (R) 的相似度均在 0.953 以上。结果表明, 各产地的东北苦菜指纹图谱具有较高的一致性。相似度分析结果见表 2。

2.5.2 色谱峰指认 本研究根据相对保留时间标定特征指纹峰, 通过对照品对各共有色谱峰进行指认, 最终共确认了 5 个色谱峰, 分别为 2 号峰 (绿原酸)、3 号峰 (咖啡酸)、11 号峰 (异槲皮苷)、12 号峰 (木犀草苷)、19 号峰 (木犀草素), 结果见图 2。

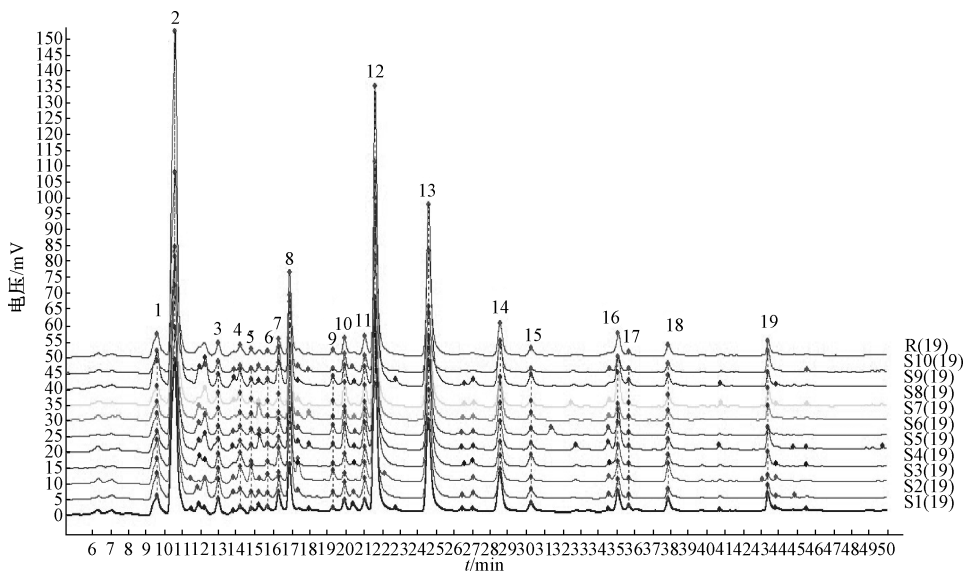


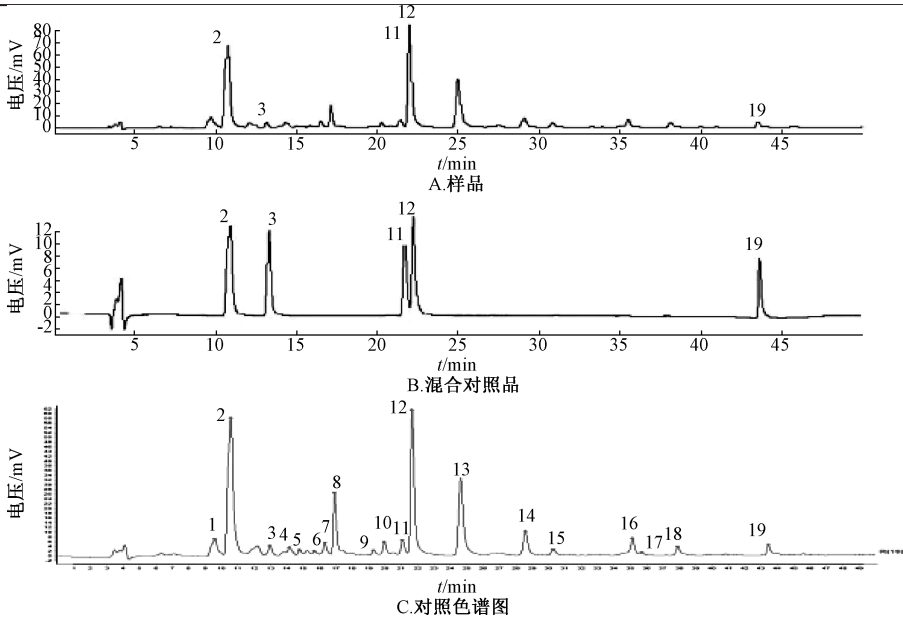
图 1 10 批样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of ten batches of samples

表 2 10 批样品相似度

Tab. 2 Similarities of ten batches of samples

| 相似度 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | R |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|
| S1 | 1 | | | | | | | | | | |
| S2 | 0.991 | 1 | | | | | | | | | |
| S3 | 0.894 | 0.94 | 1 | | | | | | | | |
| S4 | 0.993 | 0.994 | 0.911 | 1 | | | | | | | |
| S5 | 0.986 | 0.994 | 0.935 | 0.987 | 1 | | | | | | |
| S6 | 0.987 | 0.998 | 0.948 | 0.991 | 0.993 | 1 | | | | | |
| S7 | 0.99 | 0.997 | 0.935 | 0.989 | 0.988 | 0.994 | 1 | | | | |
| S8 | 0.979 | 0.994 | 0.959 | 0.985 | 0.993 | 0.995 | 0.992 | 1 | | | |
| S9 | 0.967 | 0.983 | 0.953 | 0.983 | 0.976 | 0.988 | 0.976 | 0.989 | 1 | | |
| S10 | 0.971 | 0.987 | 0.965 | 0.972 | 0.991 | 0.991 | 0.983 | 0.992 | 0.98 | 1 | |
| R | 0.986 | 0.998 | 0.953 | 0.992 | 0.994 | 0.999 | 0.994 | 0.998 | 0.991 | 0.992 | 1 |



2. 绿原酸 3. 咖啡酸 11. 异槲皮素 12. 木犀草苷 19. 木犀草素
2. chlorogenic acid 3. caffeic acid 11. hyperoside 12. cynaroside 19. luteoloside

图 2 各成分 UPLC 色谱图

Fig. 2 UPLC chromatograms of various constituents

2.6 化学模式识别方法

2.6.1 聚类分析 本研究应用 SPSS 24.0 软件，以共有峰的相对峰面积为变量，对东北苦菜样品的数据进行聚类分析，方法为组间平均连接法，度量标准为欧氏距离^[12]，结果见图 3。当距离刻度为 25 时，10 批样品主要分为 2 大类，S9 为第 1 类，S10、S3、S4、S7、S1、S8、S5、S6、S2 为第 2 类。

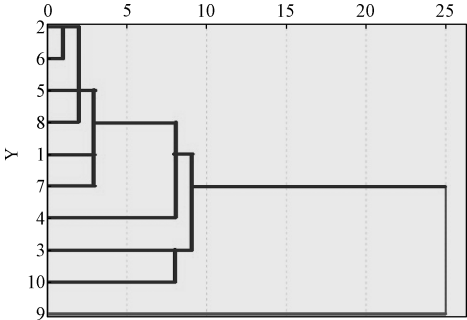


图 3 10 批样品聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram of ten batches of samples

2.6.2 主成分分析 本研究中的变量为指纹图谱中所得到的共有峰的峰面积，以此构建 10×19 的原始数据矩阵，并使用变量统计分析软件 (SIMCA14.1) 对 10 批东北苦菜样品进行主成分分析，Par 作为标度化方式，绘制出主成分分析图，见图 4。结果表明，不同批次的东北苦菜样品呈现出明显的分类，证实了聚类分析的结果。图 5 表明，载荷图中的每一个点表示为一个色谱峰，其与原点 (0, 0) 距离的远近，代表该色谱峰对样品整体分布贡献程度的大小^[13-14]。2 号、12 号和 13 号色谱峰在坐标系中距离原点较远，表明其对东北苦菜药物的整体质量起到了重要影响作用。

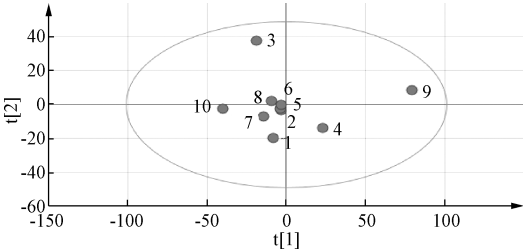


图 4 10 批样品主成分分析图

Fig. 4 Principal component analysis plot for ten batches of samples

2.6.3 正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA)

本研究采用有监督的 OPLS-DA 模型进一步对样品的数据进行分析，得到各批次样品间的差异性成

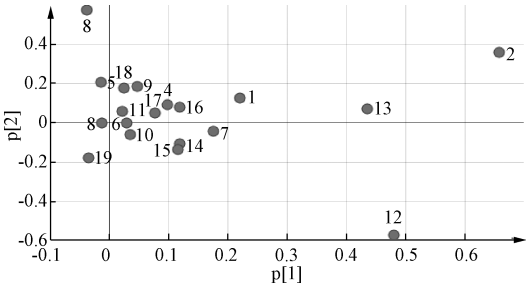


图 5 10 批样品主成分分析载荷图

Fig. 5 Load scatter diagram of ten batches of samples

分，见图 6。由模型分析验证参数可知，结实率参数 R2X 为 0.871，区分参数 R2Y 为 0.984，预测参数 Q2 为 0.748，以上数据均大于 0.5，表明模型稳定并且具有较好的预测准确性^[15]。为进一步筛选出对上述样品分类贡献较大的成分，本研究以变量投影重要度 (Variable Importance for the Projection, VIP) >1.0 为筛选标准^[16]，对数据进行处理分析。共得到 3 个有意义变量，按照变量投影重要度值大小依次为 2 号峰 (绿原酸) >12 号峰 (木犀草苷) >13 号峰，见图 7。这些成分是 10 批样品之间产生差异的主要原因，具有一定的标志性作用，该结果与主成分分析中载荷图的分析结果一致。为了更加全面、高效地评价药物质量，在以后对东北苦菜的研究中应重点关注上述成分的质量变化。

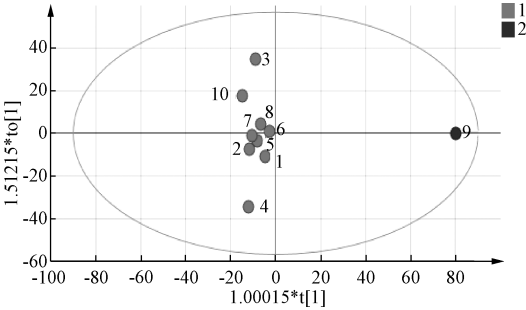


图 6 10 批样品 OPLS-DA 分析散点图

Fig. 6 Scatter diagram of OPLS-DA of ten batches of samples

3 讨论

实验通过对东北苦菜药材进行全波长 DAD 检测器扫描，比较不同波长下的图谱信息发现，绿原酸在 360 nm 处的吸收值远远低于 327 nm 处，其他成分在 360 nm 均有较好的吸收值，为了不影响各成分的紫外检测，且满足各成分在最大吸收波长范围内均有稳定的紫外吸收，因此，选用 327、360 nm 为检测波长^[17-18]。建立了东北苦菜的 UPLC 指纹图谱，并对 10 批样品进行了相似度评价，结

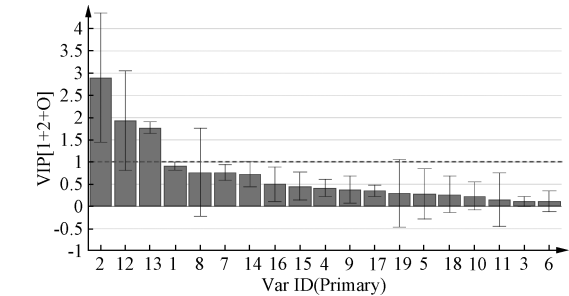


图 7 10 批样品各成分 VIP 图

Fig. 7 VIP diagram of various constituents from ten batches of samples

果显示 10 批样品相似度均在 0.953 以上；图谱中有 19 个共有峰，标定了 5 个化合物，经指认为绿原酸、咖啡酸、异槲皮素、木犀草苷、木犀草素。

为了改进相似度评价系统对指纹图谱数据处理的不足，采用化学模式识别技术对指纹图谱的数据进行分析，可以更加客观的评价中药真伪与优劣^[19-20]。本实验采用指纹图谱相似度评价和化学模式识别技术相结合的方法对不同产地的东北苦菜进行研究，3 种分析结果相互验证，系统地阐明东北苦菜药材内在质量特征，以期为今后其质量控制提供参考。

参考文献：

[1] 柳莹,刘海洋,姜启娟,等.东北苦菜质量标准探索[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(98):142;146.

[2] 李慧峰,荆然,程艳刚,等.北败酱(苣荬菜)药材质量标准研究[J].中国药师,2016,19(5):842-845.

[3] 孔增科,李利军,傅正良,等.败酱草、北败酱的鉴别与临床合理应用[J].河北中医,2009,31(2):270-271;325.

[4] 姜苗松,李井涛.HPLC 法测定北败酱中绿原酸含量[J].长春中医药大学学报,2016,32(2):259-260.

[5] 王焕芸,李俊平,李晓霞,等.蒙药材北败酱的质量标准研究[J].内蒙古医学院学报,2009,31(2):135-139.

[6] 肖培根.新编中药志(第三卷)[M].北京:化学工业出版社,2002:55-61.

[7] 刘万仓,孙磊,于孟琦,等.中药指纹图谱模式识别研究进展[J].国际药学研究杂志,2010,37(6):446-450.

[8] 褚延斌,苏小琴,周学谦,等.基于液质指纹图谱和化学模式识别的注射用益气复脉(冻干)质量综合评价研究[J].中草药,2018,49(10):2410-2419.

[9] 周霖,孙志,薛文华,等.基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的丹灯通脑软胶囊质量控制研究[J].中国中药杂志,2018,43(16):3279-3284.

[10] 李强,朱晓红,王强,等.三黄颗粒 HPLC 指纹图谱与化学模式识别分析[J].解放军药学学报,2015,31(3):194-198.

[11] 游景瑞,熊丹丹,刘春花,等.HPLC 结合化学计量学法的毛大丁草指纹图谱研究[J].中药材,2019,42(1):126-130.

[12] 杨园珍,王雅琪,胡恋琪,等.不同产地葛根与粉葛的 HPLC 指纹图谱及其多成分化学模式识别分析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(4):162-166.

[13] 康建,周霖,孙志,等.基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的冠心丹参胶囊质量控制研究[J].中草药,2018,49(17):4051-4057.

[14] 刘颖,王青,王放,等.苦碟子注射液 HPLC 指纹图谱与化学模式识别分析[J].中国药学杂志,2013,48(24):2097-2101.

[15] 徐彤,黄萌萌,陈家进,等.安宫牛黄丸 HPLC 指纹图谱及化学模式识别分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(20):14-19.

[16] 潘玄玄,宋粉云,林秀莲,等.沉香化气丸的 UPLC 指纹图谱与化学模式识别[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(19):105-110.

[17] 辛华,丰杰,程若敏,等.HPLC 测定不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):60-63.

[18] 陈言.HPLC 法测定不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷的含量[J].北方药学,2019,16(2):3-4.

[19] 杨秀娟,李硕,杨志军,等.甘肃不同产地红芪的 HPLC 指纹图谱及化学模式识别[J].中华中医药杂志,2018,33(7):3070-3073.

[20] 彭亮,杨冰月,张琳,等.野生与栽培远志 HPLC 指纹图谱及化学模式识别研究[J].中草药,2018,49(21):4998-5003.