

- adsorption of tannin from flavonoids by organically modified attapulgite clay [J]. *J Hazard Mater*, 2008, 160(2/3): 382-389.
- [7] JIN Y L, CHEN J, QIAN Y H, et al. Deposition and dispersion of attapulgite clay [J]. *J Nanjing Univ(Nat Sci)*(南京大学学报自然科学版), 2005, 41(4): 429-434.
- [8] ZHANG J W, YUAN Y, WANG C Y. Purification of water-extraction solution of mulberry root bark with chitosan [J]. *J Chem Eng Chin Univ*(高校化学工程学报), 2010, 24(2): 346-349.
- [9] CHEN T H. Study on restriction factors of adsorptivity of palygorskite [J]. *Geol Anhui*(安徽地质), 1999, 9(3): 199-203.
- [10] ZHANG J W, WANG Z Y, XIAO B. Study on the purification effect of bentonite on *S. baicalensis* water extract [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2006, 37(12): 1802-1805.
- [11] ZHANG W Q, LING H J, JIN X R, et al. Study on the chitosan flocculating of tannic acid [J]. *J Func Polym*(功能高分子学报), 1998, 11(3): 375-378.

收稿日期: 2012-03-27

知母的 UPLC 指纹图谱及聚类分析

罗洁^a, 范旭航^a, 崔思娇^a, 石绍淮^a, 毕开顺^b, 贾英^{a*} (沈阳药科大学, a.中药学院; b.药学院, 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立知母的超高效液相指纹图谱。方法 采用 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱; 流动相为乙腈-0.03%磷酸, 梯度洗脱, 流速为 0.5 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 210 nm。结果 建立了知母的 UPLC 指纹图谱共有模式, 标定了 12 个共有峰, 并指认了 6 个主要色谱峰, 各色谱峰有较好的分离。根据聚类分析结果, 可将所收集的知母样品分为两类。结论 本方法快速、高效, 可用于知母的质量评价。

关键词: 知母; 指纹图谱; 超高效液相色谱法; 聚类分析

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0028-04

UPLC Fingerprint of *Anemarrhenae Rhizoma* and Its Hierarchical Cluster Analysis

LUO Jie^a, FAN Xuhang^a, CUI Sijiao^a, SHI Shaohuai^a, BI Kaishun^b, JIA Ying^{a*} (*Shenyang Pharmaceutical University, a.School of Traditional Chinese Materia Medica; b.School of Pharmacy, Shenyang 110016, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish fingerprint of *Anemarrhenae Rhizoma* UPLC. **METHODS** The UPLC fingerprint of *Anemarrhenae Rhizoma* were determined on an HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) eluted with the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.03% phosphoric acid in gradient mode; flow rate: 0.5 mL·min⁻¹; column temperature: 30 ℃ and the detection wavelength was set at 210 nm. **RESULTS** The common mode of the UPLC fingerprint was set up under the established condition. There were 12 common peaks in the fingerprint of 16 samples, six of which were identified. The *Anemarrhenae Rhizoma* from 16 different areas could be divided into 2 grades through the results of hierarchical cluster analysis. **CONCLUSION** The method was fast and accurate. The chromatographic profile of *Anemarrhenae Rhizoma* with high specificity can be used to control the quality of *Anemarrhenae Rhizoma*.

KEY WORDS: *Anemarrhenae Rhizoma*; fingerprint; UPLC; hierarchical cluster analysis

知母为百合科植物知母(*Anemarrhenae asphodeloides* Bge.)的干燥根茎, 具有清热泻火、滋阴润燥的功效, 用于外感热病, 高热烦渴, 肺热咳嗽, 骨蒸潮热, 内热消渴, 肠燥便秘^[1]。知母中富含皂苷、黄酮、双苯吡酮、木质素等多种化学成分。现代药理学研究表明, 知母具有抗病原微生物、抗血小板聚集、降血糖、解热、抗炎、降低转氨酶等多种药理活性。目前知母的质量评价主要以

芒果苷和知母皂苷为考察指标^[1-4], 中药指纹图谱研究对药材的全面控制具有重要作用。本实验建立了 10 min 内快速鉴别知母的 UPLC 指纹图谱方法, 为有效控制和科学评价知母的质量提供了依据。

1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC(美国 Waters 公司, 包括四元高压梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目(2011412004); 辽宁省教育厅创新团队项目(2009T097)

作者简介: 罗洁, 女, 硕士生 Tel: 18809897448 E-mail: luo.jie66@163.com

*通信作者: 贾英, 女, 博士, 副教授 Tel:

(024)23986259420 E-mail: jiayingphy@yahoo.com.cn

二极管阵列检测器、Empower2 色谱工作站), BP210S 电子天平(德国 Sartorius 公司); AB135-S 十万分之一天平(METTLER TOLEDO 仪器有限公司)。

对照品芒果苷、构树宁 B、顺-扁柏树脂酚, 2,6,4'-三羟基-4-甲氧基苯甲酮, 7-羟基-3-(4-甲氧基苯甲基)-色原烷为自制(经核磁和质谱鉴定, 采用峰面积归一化法计算, 纯度均>98%); 新芒果苷(天津马克生物科技有限公司, 纯度>98%)。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司); 磷酸为色谱纯(天津科密欧化学试剂有限公司); 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为色谱纯。16 批知母来源见表 1, 经沈阳药科大学生药教研室贾英副教授鉴定, 均为正品。密封存放于阴凉干燥处。

表 1 知母来源情况

Tab 1 The different resources of Anemarrhenae Rhizoma

批次	产地	特征指纹图谱编号
1	河北	S1
2	河北安国	S2
3	河北石家庄	S3
4	河北青龙县	S4
5	河北博野	S5
6	河北涉县	S6
7	河南辉县市	S7
8	内蒙赤峰	S8
9	安徽亳州十九里	S9
10	安徽亳州	S10
11	安徽合肥	S11
12	安徽阜阳	S12
13	河南新乡	S13
14	山西运城	S14
15	山东德州	S15
16	陕西西安	S16

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱, 流动相 A 为 0.03%磷酸水, B 为乙腈, 梯度洗脱条件: 0~2 min, 5%→12% B; 2~4 min, 12%→15% B; 4~6 min, 15%→60% B; 6~10 min, 60%→100 % B。流速: 0.5 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 210 nm; 进样量: 2 μL。

2.2 供试品溶液的制备

取知母粉末(过 50 目)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75%乙醇 50 mL, 称定

重量, 超声处理(功率 250 W, 频率 33 kHz)30 min, 放冷至室温, 称定重量, 用 75%乙醇补足减失重量, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

取芒果苷、新芒果苷、构树宁 B、顺-扁柏树脂酚、2,6,4'-三羟基-4-甲氧基苯甲酮和 7-羟基-3-(4-甲氧基苯甲基)-色原烷适量, 加 75%乙醇溶解, 制成对照品溶液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.4 方法学考察

2.4.1 运行时间 本实验考查了运行时间为 20 min 的 UPLC 色谱图, 确定 10 min 后再无色谱峰出现, 因此确定每次运行时间为 10 min。

2.4.2 仪器精密度试验 取知母样品(S1)约 0.5 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法操作, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 检测特征指纹图谱。各色谱峰对内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 的值分别为 0.1%~0.7%, 2.0%~4.0%, 表明仪器精密度良好^[5]。

2.4.3 重复性试验 取同一批知母样品(S1)份, 按“2.2”项下方法操作, 按“2.1”项下色谱条件进样, 检测特征指纹图谱。各色谱峰对内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 的值分别为 0.1%~0.9%, 1.9%~2.9%, 表明实验重复性良好。

2.4.4 样品稳定性考察 取知母样品(S1), 按“2.2”项下方法操作, 在 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 检测特征指纹图谱。各色谱峰对内参比峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 的值分别为 0.5%~2.2%, 2.2%~2.4%, 表明样品在 12 h 内稳定。

2.5 样品测定

将 16 批知母样品, 按“2.2”项下方法操作, 按“2.1”项下色谱条件依次进样检测, 色谱图见图 1。

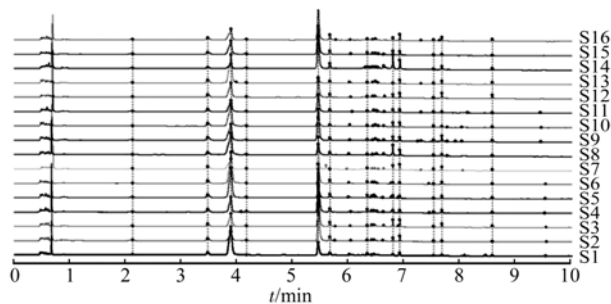


图 1 16 批知母的 UPLC 指纹图谱叠加图

Fig 1 Stacking chart of UPLC fingerprints of Anemarrhenae Rhizoma

2.6 指纹图谱分析与评价

2.6.1 共有峰的确定 根据 16 批供试品溶液 UPLC 指纹图谱给出的参数, 比较供试品图谱, 其中 12 个峰是各批供试品所共有的, 因此, 确定这 12 个峰为 16 个产地知母药材的共有峰, 并指认了其中 6 个共有峰, 分别为新芒果苷(3 号峰)、芒果苷(4 号峰)、2,6,4'-三羟基-4-甲氧基苯甲酮(9 号峰)、构树宁 B(10 号峰)、顺-扁柏树脂酚(11 号峰)、7-羟基-3-(4-甲氧基苯甲基)-色原烷(12 号峰)。

2.6.2 参比峰的选择 在各批次样品图谱中芒果苷的色谱峰(4 号峰)分离良好, 峰位居中, 峰面积较大且为所有样品共有, 所以确定芒果苷的色谱峰为参照峰。

2.6.3 各产地药材指纹图谱的聚类分析 对 16 个产地的知母作指纹图谱的分析, 获得 12 个共有峰, 将各色谱峰相对内参比峰的峰面积量化, 得到 16×12 阶原始数据矩阵, 运用“SPSS 软件”进行系统聚类分析^[6], 采用组间联结法(between-group link-age), 利用欧式距离(Euclidean distance)作为样品的测度。聚类谱系图见图 2。聚类分析将 16 个产地的知母分为两类, 结合形态学鉴定结果, 可判定 I 类为推荐品, II 类为不推荐品。结果见表 2。

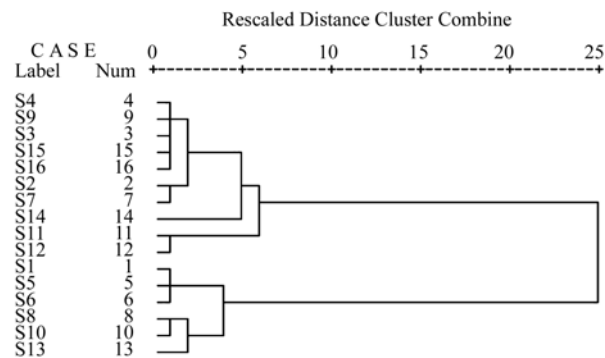


图 2 聚类分析谱系图

Tab 2 Clustering analysis dendritic diagram

表 2 聚类后样品分类表

Tab 2 Samples classification after clustering

类别	样品标号
I	S2, S3, S4, S7, S9, S11, S12, S14, S15, S16
II	S1, S5, S6, S8, S10, S13

2.6.4 指纹图谱共有模式的建立 结合聚类分析和形态学鉴定结果, 从 16 批知母中选择 10 批具有代表性的推荐药材建立共有模式。将推荐样品色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2009 版》软件^[7], 建立了知母的指纹图谱的共有

模式图。结果见图 3。

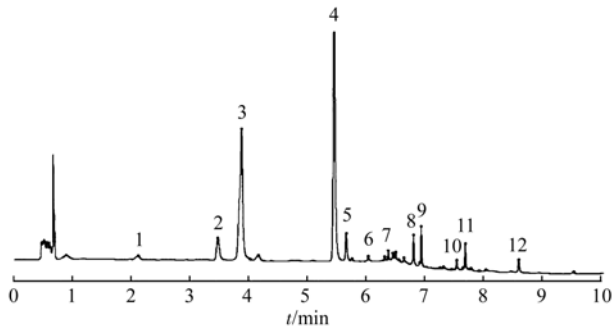


图 3 知母的指纹图谱共有模式图

3-新芒果苷; 4-芒果苷; 9-2,6,4'-三羟基-4-甲氧基苯甲酮; 10-构树宁 B; 11-顺-扁柏树脂酚; 12-7-羟基-3-(4-甲氧基苯甲基)-色原烷

Fig 3 Common UPLC fingerprint of Anemarrhenae Rhizoma 3-7-O-glucopyranosylmangiferin; 4-mangiferin; 9-2,6,4'-trihydroxy-4-methoxybenzophenone; 10-broussonin B; 11-cis-hinokire-sinol; 12-7-hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)-chroman

2.6.5 指纹图谱相似度评价 将所得的共有模式图和 16 批知母的 UPLC 图谱依次导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2009 版》软件, 以共有模式图作为参照谱进行指纹匹配, 并进行了相似度计算。I 类药材的相似度均在 0.90~1.00 之间。

II 类药材相似度在 0.9 以下。

3 讨论

3.1 供试品溶液的制备

本实验对提取溶剂进行考察, 比较了 50%甲醇、75%甲醇、甲醇、50%乙醇、75%乙醇、95%乙醇, 结果表明, 以 75%乙醇提取的样品, 色谱峰个数较多, 峰面积较大, 故提取溶剂选择 75%乙醇。对超声及回流 2 种不同提取方法的考察结果表明, 2 种提取方法提取效率相当, 考虑到超声操作较简便, 故提取方法选择超声。对不同的提取时间进行考察, 分别超声 20, 30, 45 min, 结果表明 30 min 后各时间点的提取效率基本一致, 故选择超声时间为 30 min。对提取次数进行考察, 结果 1 次可将大部分成分提出。最终确定用 75%乙醇超声 30 min 提取 1 次的方法。

3.2 色谱条件的优化

本实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸水和乙腈-磷酸水、乙腈-甲酸水 5 个流动相系统。由于大比例甲醇会导致 UPLC 色谱柱柱压升高, 故选择乙腈。又考察了乙腈-磷酸水、乙腈-甲酸水, 结果发现采用乙腈-磷酸水流动相系统, 各峰的分离度较好, 且基线平稳, 因此最终采用乙腈-磷酸水系统作为流动相系统。

3.3 检测波长的选择

本实验使用 Waters 的 PDA 检测器进行紫外区全波长扫描,以 210 nm 为检测波长时,各色谱峰响应较大,小峰稳定。故确定 210 nm 为检测波长。

3.4 色谱柱的考察和优化

本实验考察了 ACQUITY UPLC HSS T3 和 HSS C₁₈ 色谱柱,结果表明 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱,各色谱峰分布均匀,分离度较好,柱效高,故选用此色谱柱。

3.5 知母的指纹图谱

本实验建立了 10 min 内快速鉴定知母的 UPLC 指纹图谱方法。本实验从指纹图谱的整体入手,选取了 12 个共有峰进行分析,大多数批次的药材所含成分基本一致,但各成分比例不尽相同。分析未知样品时,只需测定该样品的指纹图谱,计算未知样品与共有模式间的相似度,即可对样品进行鉴定、分类和评价。该方法快速,操作性强,可为控制和评价知母的整体质量提供依据。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版.一部) [S]. 2010: 197.
- [2] HAN J. Simultaneous determination of contents of mangiferin, neo-mangiferin and timosaponin B II in Rhizoma Anemarrhenae by HPLC- ELSD method [J]. Pharm Care Res(药学服务与研究), 2011, 11(1): 39-41.
- [3] CHEN Q L. Comparison research on quality of cultivated and wild Anemarrhena Rhizoma from Yi county [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 17(36): 2316-2300.
- [4] CHEN Q L. Study on assay revision of Anemarrhenae Rhizoma [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 30(11): 2075-2080.
- [5] ZHOU X Y. Technology of Chinese Herbal Medicines Fingerprints(中药指纹图谱技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003: 131.
- [6] XU A R, HU X W, MA W C, et al. GC identification and cluster analysis of *Saigae tataricae* Cornu and its adulterants [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(6): 523-527.
- [7] FAN X H. UPLC Characteristic chromatographic profile of Moutan Cortex [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36(6): 715-717.

收稿日期: 2012-04-18

野菊花化学成分研究

周虹云¹, 吴长顺^{2a}, 程存归^{2b} (1.浙江省金华市中心医院药剂科, 浙江 金华 321000; 2.浙江师范大学, a.初阳学院; b.化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004)

摘要: 目的 研究野菊花的化学成分。方法 用 80%乙醇提取野菊花化学成分,通过硅胶反复柱层析、纯化,用各种波谱数据分析鉴定化合物的结构。结果 从野菊花头状花序中的乙酸乙酯提取物、氯仿提取物及正丁醇提取物中分离得到 11 个化合物,分别鉴定为香叶木素(I),木犀草素(II),木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷(III),芹菜素(IV), β -谷甾醇(V),山奈酚(VI),大黄酚(VII),蒙花苷(VIII),金合欢素(IX),金合欢素-7-O-(6"-O-乙酰基)- β -D-葡萄糖苷(X)和金合欢素-7-O- β -D-芦丁糖苷(XI)。结论 其中化合物 X~XI 为首次从野菊花中分离得到。

关键词: 菊花; 化学成分; 结构鉴定

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0031-05

Studies on Chemical Constituents from *Chrysanthemum Indicum* L.

ZHOU Hongyun¹, WU Changshun^{2a}, CHENG Cungui^{2b} (1.Department of Pharmacy, Zhejiang Jinhua Municipal Central Hospital, Jinhua 321000, China; 2.Zhejiang Normal University, a.Chuyang Honors College; b.College of Chemistry and Life Science, Jinhua 321004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the chemical constituents in *Chrysanthemum indicum* L. **METHODS** Extract chemical constituents from *Chrysanthemum indicum* L. by using 80% alcohol and silica gel column chromatography methods. The structure of the isolated compounds were identified by physicochemical identification and spectral analysis methods, such as UV, FTIR, EI-MS, ESI-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and so on. **RESULTS** Eleven compounds were isolated from the ethyl acetate extracts, chloroform extracts and the *n*-butanol extracts of *Chrysanthemum indicum* L. They were chrysoeriol (I), luteolin (II),

作者简介: 周虹云,男,主管药师 Tel: 13735765848 E-mail: zhy665848@163.com