

# 结合 HPLC-3D 图谱的不同产地延胡索生物碱指纹图谱分析

徐皓\*, 王哲, 赵桦, 咎丽霞, 蒋景龙

陕西理工学院生物科学与工程学院, 汉中 723000

**摘要:** 采用 HPLC 指纹图谱技术并结合 HPLC-3D 图谱分析 13 个不同产地延胡索药材中生物碱成分, 并以 5 种主要生物碱作为指标, 采用相似度评价和非共有峰的特征进行聚类分析。结果表明: 通过对延胡索 HPLC-3D 图谱和二维指纹图谱的特征分析, 13 个产地延胡索的特征共有峰有 12 个, 图谱相似度均在 90% 以上。非共有峰的系统聚类分析显示不同来源延胡索的三个聚类群, 其中安徽-亳州、广西-河池和辽宁-清原被分为一类; 湖北-郧西、山东-泰安和黑龙江-绥化被分为一类; 河南-辉县、湖南-新化、吉林-通化、浙江-东阳、浙江-磐安、浙江-仙居和汉中-城固被分为一类。HPLC 二维指纹图谱结合 HPLC-3D 图谱能够更全面的反映药材中的成分构成, 在质量控制中有重要意义。

**关键词:** 延胡索; 生物碱; HPLC 指纹图谱; 聚类分析

中图分类号: Q503

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.04.003

## HPLC Fingerprinting Coupled with HPLC-3D Chromatogram Analysis of Alkaloids in *Corydalis yanhusuo* from Different Regions

XU Hao\*, WANG Zhe, ZHAO Hua, ZANG Li-xia, JIANG Jing-long

School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China

**Abstract:** In this study, HPLC fingerprinting coupled with HPLC-3D chromatogram analysis was carried out to investigate the alkaloid components in *Corydalis yanhusuo* from 13 different regions. Cluster analysis was performed based on similarity and uncommon peaks gotten from 5 alkaloids. As the result, 12 characteristic peaks were detected in samples from 13 regions, the similarity of their fingerprinting was higher than 0.9. At the same time, cluster analysis based on uncommon peaks showed that the samples can be clustered into three groups. Among them, samples from Bozhou Anhui, Guangxi Hechi and Liaoning Qingyuan were clustered one group, samples from Yunxi Hubei, Shandong Tonghua, and Heilongjian Suihua joined together in one group, while the last group contained the samples from Zhejiang Dongyang, Zhejiang Panan, Zhejiang Xianju and Hanzhong. The study indicated the components of *C. yanhusuo* can be reflected by HPLC fingerprinting coupled with HPLC-3D chromatogram analysis, which was of great use in the quality control of this Chinese traditional medicine.

**Key words:** *Corydalis yanhusuo*; alkaloid; HPLC fingerprinting; cluster analysis

延胡索是罂粟科 (Papaveraceae) 紫堇属 (*Coydalis*) 植物延胡索 (*Corydalis yanhusuo*) 的干燥块茎, 又名元胡或玄胡。药理研究表明有镇静、镇痛、催眠、抗溃疡等作用, 并且对心血管系统都有较好的药理活性, 目前延胡索药材大量应用中成药的生产和临床处方<sup>[1]</sup>。由于用量大, 全国很多地区都有种植, 主产于浙江, 在陕西、江苏、河南和湖南等地都有种植。关于延胡索指纹图谱的研究主要集中在延胡

索与混品夏天无的鉴别、鲜品与炮制品对比及不同产地延胡索质量差异分析中<sup>[2-5]</sup>, 但结合 3D 图谱与多指标定量分析质量差异的研究还未见报道。本文选取 13 个不同产地延胡索, 以主要的五种生物碱对照品作为指示, 结合 3D 指纹图谱对不同产地延胡索指纹图谱进行分析, 为延胡索的质量控制与评价提供理论依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司), RV 10D S25 旋转蒸发仪 (德国 IKA 公司), Ne-

收稿日期: 2014-09-22

接受日期: 2015-02-15

基金项目: 陕西省教育厅重点实验室科研计划 (13JS020); 陕西理工学院校级科研项目 (slgky13-40); 陕西省重点学科专项建设资金 (2014)

\* 通讯作者 Tel: 86-916-2641661; E-mail: xh2003@126.com

wllassicMF 电子天平(美国梅特勒公司), pH 计(美国梅特勒公司), DK-98-11A 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司), UPH-II-20T 优普超纯水机(成都超纯科技有限公司), SB-52000T 超声波清洗机(宁波新芝科技股份有限公司), FW117 中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

## 1.2 试剂

乙腈、甲醇为色谱纯, 三乙胺、冰乙酸为分析纯, 均为天津科密欧化学试剂有限公司; 流动相用水为超纯水; 标准品紫堇碱(批号 Y-158-121223)、延胡索乙素(批号 Y-005-121026)、原阿片碱(批号 Y-050-121117)、四氢小檗碱(批号 S-089-121208)和脱氢海罂粟碱(批号 T-040-120913)(含量  $\geq 98\%$ ), 均购自成都瑞芬思生物科技有限公司。

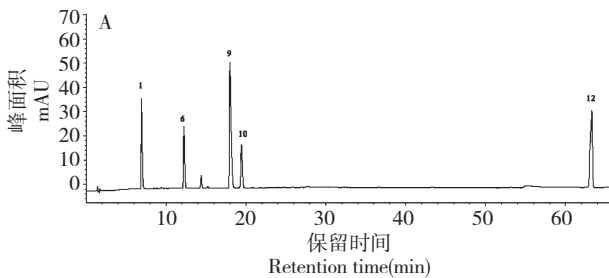
## 1.3 材料

不同产地延胡索材料均为市售干燥药材, 采购于 2012 年 10 月, 产地分别为安徽-亳州(AH-BZ), 广西河池(GX-HC), 湖北-郧西(HB-YX), 河南辉县(HeN-HX), 黑龙江-绥化(HLJ-SH), 湖南-新化(HN-XH), 汉中城固(HZ-CG), 吉林-通化(JL-TH), 辽宁-清原(LN-QY), 山东泰安(SD-TA), 浙江东阳(ZJ-DY), 浙江磐安(ZJ-PA), 浙江仙居(ZJ-XJ), 样品编号依次为 S1 ~ S13。

# 2 实验方法

## 2.1 高效液相色谱分析条件

采用 Agilent 1260 高效液相色谱仪(四元混合泵, 柱温箱, 手动进样器, DAD 检测器), 色谱柱: Poroshell120 EC-C<sub>18</sub> (2.7  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  150mm); 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ; 流速 1 mL/min; 检测波长为 280 nm; 以乙腈(A)-0.1% 冰乙酸溶液(B)为流动相, 梯度洗脱程序如下: 0 ~ 20 min, 20% ~ 25% A; 20 ~ 55 min, 25% ~ 45% A; 55 ~ 65 min, 45% ~ 55% A, 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。



## 2.2 标准液制备

精密称取紫堇碱、延胡索乙素和原阿片碱各 1.25 mg, 四氢小檗碱和脱氢海罂粟碱 0.27 mg, 用色谱甲醇(过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜)超声溶解于 25 mL 容量瓶, 定容得到浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的紫堇碱、延胡索乙素和原阿片碱以及 10.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的四氢小檗碱和脱氢海罂粟碱, 作为混合对照标准溶液。

## 2.3 样品制备

制备 13 种供试样品, 每种样品取 3 份, 粉碎使能过三号筛, 每份以 70% 乙醇 30 mL 为溶剂, 超声 30 min, 回流提取 2 h, 离心, 合并上清后过滤, 滤液蒸干, 残渣用甲醇溶解并定容至 10 mL, 过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜得待测试样。

取制备好的 13 种样品, 分别进样检测, 通过精密度、重复性与稳定性试验, 得到相应色谱图。采用中药指纹图谱相似度评价系统软件, 设定 S12 为指定参照图谱, 谱峰自动匹配, 得到 13 种不同产地延胡索的特征指纹图谱(图 3)。将 13 种不同产地的共有峰定为参照峰, 求得不同产地相对保留时间及相对面积(表 1)。相对保留值计算公式:  $TR = T/T_s$  ( $T$  为待测峰的绝对保留时间,  $T_s$  为共有峰的绝对保留时间), 相对面积计算公式:  $AR = A/A_s$  ( $A$  待测峰峰面积,  $A_s$  共有峰峰面积)。

# 3 结果与分析

## 3.1 不同产地样品指纹图谱分析

取 13 种制备好的样品, 分别进样检测, 可得到 280 nm 处色谱图和对应 3D 色谱图(X: 时间; Y: 吸收强度; Z: 波长)。依据对照品可确认 5 个已知成分特征峰(图 1-A)(峰 1: 原阿片碱, 峰 7: 延胡索乙素, 峰 9: 紫堇碱, 峰 10: 四氢小檗碱, 峰 12: 脱氢海罂粟碱), 以及包含这 5 个峰的 12 个共有峰(图 1-B), 其保留时间和峰面积见表 1。

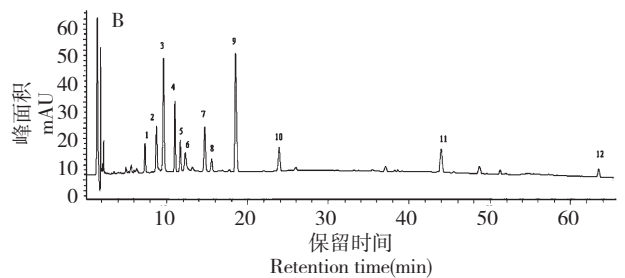


图 1 混合对照品(A)与延胡索样品(B)的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards (A) and *C. yanhusuo* sample (B)

表 1 12 个共有峰的保留时间和峰面积 (280 nm)

Table 1 The retention time and peak area of 12 common peak (280 nm)

| 编号<br>No. | 保留时间<br>Retention<br>time (min) | 峰面积 Peak area |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |         |        |
|-----------|---------------------------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
|           |                                 | S1            | S2     | S3     | S4     | S5     | S6     | S7     | S8     | S9     | S10    | S11    | S12     | S13    |
| 1         | 7.21                            | 48.40         | 43.10  | 60.10  | 41.00  | 63.10  | 58.40  | 110.00 | 33.60  | 86.2   | 62.4   | 65.5   | 103.8   | 80.2   |
| 2         | 8.66                            | 51.40         | 57.20  | 72.10  | 55.10  | 51.60  | 56.00  | 215.90 | 62.00  | 191.4  | 113.8  | 66.1   | 90.4    | 190.2  |
| 3         | 9.52                            | 162.30        | 270.70 | 201.20 | 205.90 | 196.40 | 168.30 | 469.20 | 215.40 | 523.9  | 244.8  | 274.3  | 269.8   | 430.8  |
| 4         | 10.72                           | 204.60        | 338.40 | 245.70 | 212.80 | 260.10 | 203.50 | 230.30 | 137.00 | 375.9  | 212.4  | 272.5  | 235     | 197.5  |
| 5         | 12.11                           | 50.80         | 68.90  | 76.70  | 55.00  | 65.10  | 61.80  | 118.10 | 60.20  | 139.9  | 103.4  | 56.2   | 77.7    | 147.9  |
| 6         | 13.07                           | 7.00          | 9.00   | 13.20  | 4.70   | 7.60   | 8.50   | 33.30  | 14.60  | 31.6   | 22.5   | 9.5    | 11.2    | 24.6   |
| 7         | 14.62                           | 67.60         | 105.80 | 88.80  | 80.90  | 73.00  | 66.80  | 220.00 | 87.80  | 234.1  | 135.9  | 84.9   | 133.3   | 202.1  |
| 8         | 15.45                           | 23.2          | 28.80  | 31.50  | 22.90  | 26.80  | 25.40  | 63.20  | 25.60  | 57.3   | 34.5   | 24.7   | 33.9    | 61.8   |
| 9         | 18.43                           | 314.20        | 470.60 | 423.50 | 374.30 | 375.40 | 327.40 | 609.40 | 372.9  | 879.2  | 629.7  | 382.8  | 581.5   | 732.9  |
| 10        | 22.57                           | 86.10         | 103.00 | 100.90 | 76.20  | 111.40 | 89.30  | 132.80 | 49.6   | 128.1  | 92.8   | 115.5  | 132.9   | 114.3  |
| 11        | 42.95                           | 125.00        | 178.62 | 151.10 | 106.98 | 168.91 | 132.32 | 165.43 | 62.37  | 198.63 | 112.43 | 171.40 | 144.124 | 150.09 |
| 12        | 63.32                           | 8.00          | 16.80  | 14.90  | 13.90  | 6.50   | 8.50   | 48.20  | 17.30  | 70.8   | 26.3   | 13.6   | 66.9    | 50.1   |

经分析不同样品的 3D 图谱,峰 1(原阿片碱)、峰 10(四氢小檗碱)、峰 11(未知成分)和峰 12(脱氢还鞣罂碱)在 264~288 nm 间的吸光度趋势峰与其他峰相比明显具有良好的分离度,其中 280 nm 处出峰最全且分离度最好(见图 2),所以确定 280 nm 为最适检测波长;峰 12 的吸光度趋势峰虽然比较独立,但峰值太弱,所以选择峰 1、峰 10 和峰 11 的吸光度趋势峰作为特征参照峰。

### 3.2 二维色谱图与 3D 色谱图的对比

通过近波长和吸光度端观察分析 3D 色谱图,并与在 280 nm 波长下进行测得的二维色谱图 12 个共有峰对比,参照峰 1、峰 10 和峰 11,得到 3D 色

谱图与二维色谱图的对比图(图 2,以样品 S7 为例)。

该对比图谱分为 I 和 II 两个区, I 区从峰 1 到峰 10,占有 83% 的共有峰,是判定药材合格的关键指标区域,对于延胡索质量控制有很大作用; II 区从峰 10 之后到峰 12,共有峰很少,但非共有峰主要集中在该区,是区别药材来源差异的主要区域。

### 3.3 指纹图谱相似度分析

采用中药指纹图谱相似度评价软件(2004A 版),选择 12 个共有峰自动匹配模式,并以均值法进行全谱相似度分析评价,所有相似度都在 0.90 以上(图 4)。尽管相似度接近,但不同产地的相似度还有一定范围的差异,这些差异,除了指纹图谱的峰面积大小外,还与非共有峰有很大程度上的关系,因为非共有峰是不同来源药材的化学成分的不同造成的。

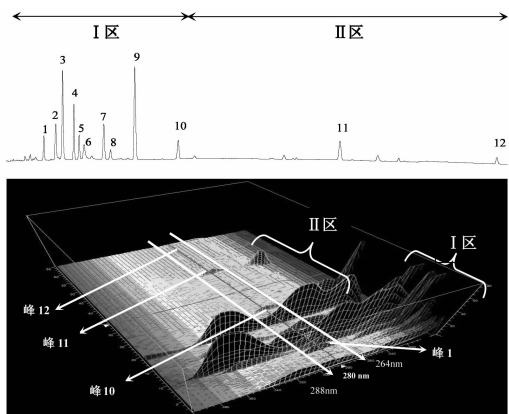


图 2 3D 指纹图谱与二维图谱的对比

Fig. 2 Comparison of 3D fingerprint and two-dimensional chromatogram

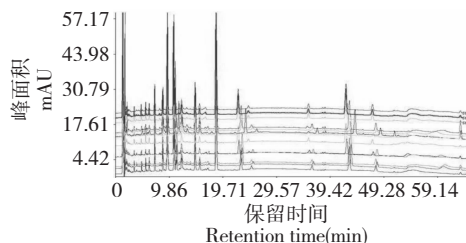


图 3 不同产地延胡索 HPLC 特征图谱重叠图

Fig. 3 Overlapping HPLC chromatograms of *C. yanhusuo* from different regions

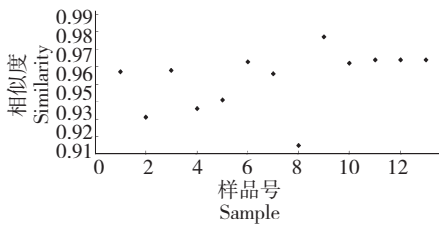


图4 相似度计算结果

Fig. 4 Similarity calculation results

### 3.4 不同产地样品的聚类分析

在不同样品中色谱图的Ⅱ区,有大量的非共有峰(见图5),这些非共有峰的保留时间和峰面积详见表2。本文以280 nm波长下13种不同产地延胡索的非共有峰峰面积数据为变量,采用IBM SPSS statistics 20软件进行系统聚类分析得到树状图(图6)。

由图6看出,安徽-亳州(S1)、广西-河池(S2)和辽宁-清原(S9)被分为一类;湖北-郧西(S3)、山东-泰安(S10)和黑龙江-绥化(S5)被分为一类;河南-辉县(S4)、湖南-新化(S6)、吉林-通化(S8)、浙江-

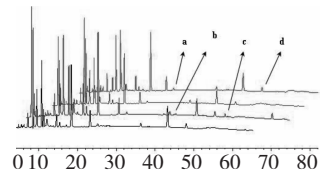


图5 样品中的非共有峰

Fig. 5 The uncommon peaks in different samples

东阳(S11)、浙江-磐安(S12)、浙江-仙居(S13)和汉中-城固(S7)被分为一类。

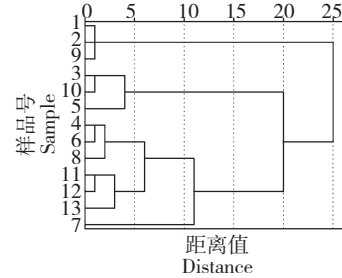


图6 聚类分析树状图

Fig. 6 Cluster analysis of *C. yanhusuo* samples from different regions

表2 非共有峰的保留时间和峰面积

Table 2 The retention time and peak area of uncommon peaks

| 编号<br>No. | 保留时间<br>Retention<br>time (min) | 峰面积 Peak area |        |        |        |        |        |       |       |        |        |        |        |        |
|-----------|---------------------------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
|           |                                 | S1            | S2     | S3     | S4     | S5     | S6     | S7    | S8    | S9     | S10    | S11    | S12    | S13    |
| 1         | 25.23                           | 0.00          | 0.00   | 18.78  | 0.00   | 20.91  | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00   | 14.13  | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| 2         | 35.24                           | 0.00          | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 17.34  | 6.71   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| a         | 35.47                           | 0.00          | 0.00   | 0.00   | 24.93  | 0.00   | 24.96  | 11.43 | 10.23 | 0.00   | 0.00   | 30.19  | 28.36  | 92.71  |
| 4         | 36.08                           | 27.32         | 22.17  | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 30.70  | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| 5         | 36.32                           | 0.00          | 0.00   | 21.78  | 0.00   | 27.49  | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00   | 21.04  | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| 6         | 37.03                           | 0.00          | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 35.49 | 0.00  | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| b         | 42.35                           | 0.00          | 0.00   | 0.00   | 106.87 | 0.00   | 132.26 | 0.00  | 62.37 | 0.00   | 0.00   | 171.41 | 150.03 | 126.54 |
| 8         | 42.95                           | 162.23        | 178.62 | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 198.63 | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| 9         | 43.22                           | 0.00          | 0.00   | 151.10 | 0.00   | 168.91 | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00   | 112.37 | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| c         | 47.22                           | 0.00          | 0.00   | 0.00   | 27.29  | 0.00   | 33.40  | 0.00  | 20.31 | 0.00   | 0.00   | 43.29  | 53.72  | 30.18  |
| 11        | 47.80                           | 41.94         | 43.53  | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 55.56  | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| 12        | 48.02                           | 0.00          | 0.00   | 37.70  | 0.00   | 43.07  | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00   | 34.31  | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| 13        | 51.15                           | 4.11          | 0.00   | 4.73   | 0.00   | 0.00   | 4.01   | 21.88 | 0.00  | 2.66   | 2.37   | 3.55   | 14.60  | 4.72   |
| 14        | 53.70                           | 7.01          | 0.00   | 0.00   | 34.03  | 0.00   | 13.62  | 0.00  | 31.89 | 4.28   | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 0.00   |
| d         | 54.38                           | 0.00          | 0.00   | 0.00   | 0.00   | 80.99  | 0.00   | 0.00  | 0.00  | 0.00   | 0.00   | 98.78  | 61.60  | 81.92  |

## 4 讨论

通过五种主要生物碱成分作为指示,得出12个

共有峰和15个非共有峰,建立了不同产地延胡索药材的HPLC-3D特征指纹图谱,并定义3D特征指纹图谱的特征峰,这些特征峰在13个样品中都有明显

的分离度和稳定的保留时间。综合来看,为客观科学评价不同产地延胡索样品质量提供新角度,在一定程度上可用于延胡索的质量控制。

对于二维指纹图谱,只能看出在一定紫外吸收波长下保留时间相同一种物质,对于色谱峰的纯度不能直接显示出来,单一波长下色谱条件的变化会对其造成很大不稳定性,而在所需条件下 3D 指纹图谱能够比较全面地显示出药材各成分的光吸收特征,并且可以从 3D 指纹图谱中很快选择出合理的二维测定波长。将 3D 指纹图谱分为 I 和 II 两个区, I 区从峰 1 到峰 10,能够明显看出其成分的构成趋势,是判定药材合格的关键指标区域,对于延胡索质量控制有很大作用; II 区从峰 10 之后到峰 12,非共有峰的系统聚类分析显示出不同来源延胡索的聚类群。

Iwao Sakakibara 和岳清洪研究组<sup>[6,7]</sup>对 3D 指纹图谱都有了一定研究,在共有峰以及相似度能够统一的前提下,药材的差异性可从非共有峰出发。本文以非共有峰的面积进行系统聚类分析,得出安徽、广西和辽宁为一类,湖北、黑龙江和山东为一类,吉林、河南、湖南、汉中和浙江(3 个产地)为一类,非共有峰物质差异性可能是产地不同引起的。目前所用的延胡索绝大部分都是栽培品,汉中的延胡索是上世纪七十年代从浙江引进的<sup>[8]</sup>,所以有一定的物质成分相似性,这种分析方法有别于共有峰的聚类分析,能够为延胡索化学型的划分提供科学依据。

不同产地延胡索 3D 指纹图谱相对二维指纹图谱而言,能够更直观地反映出延胡索药材中不同成分比例构成,特征峰也更明显。同时,在本研究色谱条件下,结合多指标定量体现出更多的信息优势,不同产地延胡索包含 5 种指标生物碱在内的所有高含量化学成分都出峰,保留时间都一致,说明该图谱稳

定性好、系统性强。因此该图谱可以为延胡索不同地域产品质量、品质评价提供科学依据,对中药材的质量控制有重要意义。

#### 参考文献

- 1 Dou ZY (窦志英), Sun W (孙巍), Zhang M (张敏), et al. Study of fingerprint of Rhizoma Corydalis by HPLC. *J Tianjin Univ Trad Chin Med* (天津中医药大学学报), 2007, 26: 150-153.
- 2 Wang R (王荣). Analysis of fingerprint of Rhizoma Corydalis fresh products and processed products. *Guide Chin Med* (中国医药指南), 2011, 9(29): 43-44.
- 3 Hu J (胡佳), He T (何涛), Guo DJ (郭冬军). Study on HPLC Fingerprint of Corydalis Decumbens and Rhizoma Chinese Corydalis. *Chin Pharm* (中国药业), 2013, 22(22): 42-43.
- 4 Fei YM (费艳美), Zhang YP (张玉萍), Fang BW (方步武). Study on HPLC-fingerprint and quality assessment of Rhizoma Corydalis. *Chin Med J Res Prac* (现代中药研究与实践), 2012, 26(6): 12-15.
- 5 You XQ (游修琪), Gu XZ (顾雪竹), Mao SJ (毛淑杰), et al. HPLC fingerprints of Rhizoma Corydalis from different processed products. *Chin Trad Pat Med* (中成药), 2009, 31: 1481-1484.
- 6 Sakakibara I. 3D-HPLC fingerprints of Kampo medicines and botanical raw materials. *Folia Pharm Jap*, 2008, 132: 265-269.
- 7 Yue QH (岳清洪), Tang C (唐策), Yang YD (杨永东), et al. Study on 3D-HPLC characteristics fingerprints of Coptidis Rhizoma. *Chin Pharm* (中国药房), 2013, 24: 624-627.
- 8 Bai M (白梅), Hu BX (胡本祥). Experimentation on determination of the best time to harvest Rhizoma Corydalis introduced for trial. *Shaanxi For Sci Tech* (陕西林业科技), 2009, 1: 34-36.