

## 高效液相色谱指纹图谱法分析南方红豆杉药材的氯仿提取物

李效贤, 熊耀康\*, 余陈欢, 张春椿

(浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053)

**摘要** :建立了南方红豆杉药材氯仿提取物的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱分析方法。采用 Eurospher 100 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4 mm, 5 μm),以甲醇和水为流动相进行梯度洗脱,流速为 1 mL/min,检测波长为 232 nm,柱温为 30 ℃。以 10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ(10-DABⅢ)为参照物,在相同的色谱条件下测定了 10 批不同产地的南方红豆杉药材氯仿提取物的指纹图谱,获得了 11 个共有指纹峰,并利用主成分分析法(PCA)对指纹图谱进行统计分析。结果表明南方红豆杉药材的质量与种植区域有关。该方法稳定、可靠,可用于南方红豆杉药材的质量控制。

**关键词** :高效液相色谱法;指纹图谱;主成分分析;南方红豆杉

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)11-1067-04

## High performance liquid chromatographic fingerprints method for the analysis of chloroform extracts of *Taxus wallichiana*

LI Xiaoxian, XIONG Yaokang\*, YU Chenhuan, ZHANG Chunchun

(School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**Abstract** : A high performance liquid chromatographic (HPLC) fingerprints method was developed for the analysis of the chloroform extracts of *Taxus wallichiana*. The extracts were separated on an Eurospher 100 C<sub>18</sub> column (250 mm × 4 mm, 5 μm) with the gradient elution of methanol and water at a flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was set at 232 nm, and the column temperature was 30 ℃. Under the same conditions, 10 batches of the chloroform extracts of *Taxus wallichiana* from different habitats were analyzed with the reference substance of 10-deacetyl baccatin III (10-DAB III). The 11 peaks were selected as the characteristic peaks, and the method of principal component analysis (PCA) was applied to analyze the fingerprints of the chloroform extracts of *Taxus wallichiana*. The results showed that there was an interrelated relationship between habitat and quality of *Taxus wallichiana*. The method has good repeatability and stability, and can be utilized as an approach for the quality control of *Taxus wallichiana*.

**Key words** : high performance liquid chromatography (HPLC); fingerprint; principal component analysis (PCA); *Taxus wallichiana*

南方红豆杉 [*Taxus wallichiana* Zucc. var. *mairei* (Lemee et Lévl) L. K. Fu et N. Li] 为红豆杉科红豆杉属植物,又名紫杉,是我国传统中药材。据《本草纲目》记载“其性辛、味甘,大温,归胃、肝经”,具有解毒、散结、止痛等功效,临床上用于治疗症瘕积聚、瘀血经闭、食积胀满、霍乱、伤寒等症。现代研究表明,其主要含有紫杉醇、10-脱乙酰

巴卡亭Ⅲ(10-DABⅢ)等紫杉烷类抗癌活性成分<sup>[1,2]</sup>。紫杉醇由于其独特的抗癌机制和显著的疗效<sup>[3]</sup>,被广泛用于治疗肺癌、乳腺癌、卵巢癌和食管癌等恶性肿瘤<sup>[4-7]</sup>。

目前对南方红豆杉药材的质量评价主要以紫杉醇或 10-DABⅢ作为定性、定量的考察指标<sup>[8-10]</sup>。但此法不能有效控制南方红豆杉药材的内在质量。

\* 通讯联系人:熊耀康,教授,博士生导师,主要从事中药资源开发与利用。Tel:(0571)86633118, E-mail: xiongyaokang@tom.com.

基金项目:浙江省中医药管理重大项目(2007ZA002)、浙江省科技厅项目(2008C32020)和浙江省中药现代化项目(浙财企字[2009]B31)。

收稿日期:2010-05-31

中药指纹图谱技术是一种综合的、可量化的质量控制手段,它能够从宏观上整体反映中药材所含化学成分的种类和数量,是目前国际公认的中药或天然药物质量控制的有效手段之一。同时研究发现,氯仿能较为全面地提取红豆杉中的紫杉烷类成分<sup>[11]</sup>。因此本文对浙江省不同地区南方红豆杉药材氯仿提取物进行了高效液相色谱(HPLC)指纹图谱分析和主成分分析(PCA),为南方红豆杉药材的质量控制提供了可靠的方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Waters 1525-2998 高效液相色谱系统,包括二极管阵列检测器(DAD),配置 Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);Eurospheer 100 C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4 mm, 5 μm)(德国 Knauer 公司);K-50U 超纯水仪(美国 Kemflow)。

10-脱乙酰巴卡亭Ⅲ对照品(批号:054K1372,美国 Sigma 公司);甲醇为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯;娃哈哈纯净水(使用前经超纯水仪过滤)。

### 1.2 材料

南方红豆杉药材均经浙江中医药大学姚振生教授鉴定为 *Taxus wallichiana* Zucc. var. *mairei* (Lemee et Lévl) L. K. Fu et N. Li 的枝叶,药材产地和批号见表 1。

表 1 南方红豆杉药材产地及批号

Table 1 origins and batches of *Taxus wallichiana*

Sample No.	Source	Batch No.
1 <sup>#</sup>	Lishui	080315
2 <sup>#</sup>	Lishui	070615
3 <sup>#</sup>	Yuexi	080315
4 <sup>#</sup>	Shuangfeng	080315
5 <sup>#</sup>	Linan	070317
6 <sup>#</sup>	Hangzhou	080401
7 <sup>#</sup>	Shuangfeng	080224
8 <sup>#</sup>	Yuexi	080227
9 <sup>#</sup>	Tonglu	070405
10 <sup>#</sup>	Linan	080405

### 1.3 色谱条件

色谱柱: Eurospheer 100 C<sub>18</sub> 色谱柱。流动相 A: 水;流动相 B: 甲醇;梯度洗脱程序: 0 ~ 15 min, 38% B; 15 ~ 25 min, 38% B ~ 44% B; 25 ~ 40 min, 44% B ~ 50% B。流速为 1.0 mL/min。检测波长: 232 nm。柱温 30 ℃。进样量 5 μL。

### 1.4 参照物溶液的制备

精密称取 10-DAB Ⅲ 对照品 5.22 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成质量浓度为 0.522 g/L

的参照物溶液。避光冷藏备用。

### 1.5 样品溶液的制备

参考文献[12]的方法进行样品制备。精密称取药材粗粉 2.5 g 置于配有 250 mL 圆底烧瓶的索氏抽提器滤筒内, 加入 150 mL 石油醚, 于 60 ℃ 水浴中回流提取 4 h; 共提取 2 次。阴干药材提取物, 然后在其中加入 50 mL 95% 甲醇, 于 40 ℃ 水浴中超声提取 0.5 h; 共提取 2 次; 抽滤, 合并滤液, 于 40 ℃ 水浴挥干后加入 40 mL 水-石油醚(1:1, v/v) 萃取, 取出水层, 并在其中加入 20 mL 石油醚萃取, 弃石油醚层; 共萃取 3 次。再加入 20 mL 氯仿萃取; 共萃取 2 次。合并氯仿层, 于 40 ℃ 水浴中挥干, 用甲醇复溶后定容至 2 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液备用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测波长的确定

使用 DAD 扫描获得的各主要色谱峰紫外吸收光谱集中在 200 ~ 260 nm, 为了尽可能多的反映组分全貌, 选择 232、227 和 254 nm 检测波长下的指纹图谱进行比较。其中在 232 nm 检测波长下得到的色谱峰较多, 各峰吸收均匀, 基线较平稳, 因此确定 232 nm 作为南方红豆杉药材氯仿提取物特征性化学成分的检测波长。

### 2.2 样品溶液制备方法的确定

南方红豆杉药材入药部位为枝叶, 其含有的大量脂溶性色素影响药材中紫杉烷类成分的分析检测, 故需要除去杂质。

考察了不同提取方法(超声与回流)、不同提取溶剂(95% 乙醇、95% 甲醇、乙酸乙酯和氯仿等)及提取次数对药材中紫杉烷类成分的提取效果。研究发现, 氯仿和甲醇的提取效果较好, 但考虑到实验安全性, 选择 50 mL 95% 的甲醇超声提取 2 次。

分别考察了石油醚索氏回流和石油醚液-液萃取法<sup>[12]</sup>去除南方红豆杉药材中色素杂质的效果。实验发现前者处理后的药材组分中仍有大量的叶绿素残留, 而后者石油醚消耗大, 萃取次数较多。因此, 我们采用索氏回流和液-液萃取相结合的方法进行样品处理, 实验结果表明该法可以有效地去除色素。同时, 将石油醚索氏回流提取液以及石油醚液-液萃取液分别在相同色谱条件下进样检测, 结果表明石油醚部分均没有检出紫杉烷类成分, 与文献[13]研究结果一致。由此表明, 该方法可有效去除叶绿素等色素杂质, 并尽可能反映了南方红豆杉药材氯仿提取物中紫杉烷类成分所含的全部信息。因

此,本实验先后 2 次使用石油醚进行杂质去除及脱色,实验证明该法稳定且重复性好。

## 2.3 方法学考察

### 2.3.1 精密度实验

取同一份样品溶液,按 1.3 节色谱条件连续进样测定 6 次,以 4 号峰为内参比峰,计算指纹图谱中各主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明各主要共有峰的相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差(RSD)均小于 3%,参照文献[14]的方法,计算 6 次分析所得的色谱图的相似度,其相似度均大于 0.99,表明仪器的精密度良好。

### 2.3.2 稳定性实验

取同一份样品溶液分别在 0、2、4、6、8、10、12 和 24 h 不同时间点,按照 1.3 节色谱条件进行检测,各色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,参照文献[14]的方法,计算 8 次分析所得的色谱图的相似度,其相似度均大于 0.99,表明样品在 24 h 内稳定。

### 2.3.3 重复性实验

取同一批次(3 号)样品 5 份,按照 1.5 节方法制备样品溶液,并按照 1.3 节色谱条件进行检测,其色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均小于 3%,参照文献[14]的方法,计算 5 次分析所得的色谱图的相似度,其相似度均大于 0.99,表明该提取方法具有良好的稳定性和可靠性。

## 2.4 指纹图谱的建立

### 2.4.1 样品指纹图谱的制备

取 10 批南方红豆杉药材,分别按 1.5 节方法制备样品溶液,精密吸取样品溶液 5  $\mu$ L 进样测定,记录 50 min,得到 HPLC 谱图。

### 2.4.2 共有峰模式的建立

通过对 10 批南方红豆杉药材氯仿提取物样品的测定,比较各批样品色谱图中色谱峰的相对保留时间,从中选定了 11 个共有色谱峰。10 批次南方红豆杉药材氯仿提取物的指纹图谱见图 1。图 1 中 4 号峰为 10-DAB III,其色谱峰面积约占总峰面积的 20% 以上,色谱保留时间和峰面积稳定,与相邻色谱峰分离较好,符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的要求,故确定 10-DAB III 为参照峰(s)。11 个共有指纹峰的相对保留时间的 RSD 在 1.84% ~ 2.84%,相对峰面积的 RSD 在 0.87% ~ 2.94%。利用 Excel 2003 软件,采用平均矢量法<sup>[14]</sup>计算南方红豆杉药材氯仿提取物指纹图谱保留时间和峰面积的共有模式,建立对照指纹图谱,其保留时间和相对峰面积见表 2。

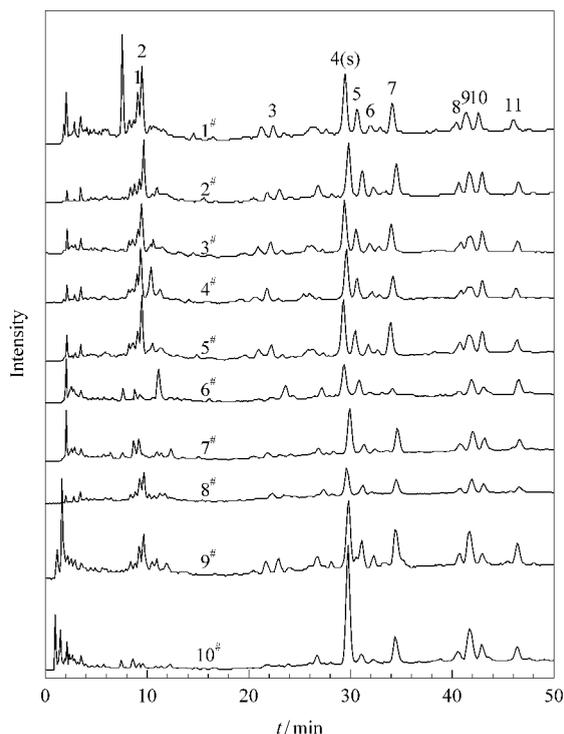


图 1 10 批次南方红豆杉药材氯仿提取物的指纹图谱  
Fig. 1 Fingerprints of 10 batches of the chloroform extracts of *Taxus wallichiana* s. 10-DAB III.

表 2 南方红豆杉药材氯仿提取物指纹图谱共有峰的保留时间和相对峰面积

Table 2 Retention times and relative peak areas of common peaks for fingerprint of chloroform extracts of *Taxus wallichiana*

Peak No. in Fig. 1	Retention time/min	Relative peak area
1	9.30	0.15
2	9.51	0.55
3	22.33	0.27
4(s)	28.72	1.00
5	29.64	0.45
6	31.19	0.19
7	33.29	0.58
8	40.34	0.18
9	41.58	0.53
10	42.54	0.23
11	45.91	0.25

## 2.5 指纹图谱的评价

### 2.5.1 相似度计算

利用 Excel 2003 软件,采用相关系数和夹角余弦两个统计量作为测度,以全部样品统计量的平均值作为共有模式<sup>[14]</sup>,对 10 批南方红豆杉药材氯仿提取物样品的相似度进行了计算,结果见表 3。从表 3 可以看出,各批次样品之间的指纹图谱相似度除了 2 号样品均值相关系数计算的相似度为 0.77 外,其余均大于 0.90,说明所建立的南方红豆杉药材氯仿提取物指纹图谱的技术指标稳定,重现性好。

表 3 10 批次南方红豆杉药材氯仿提取物指纹图谱的相似度  
Table 3 Similarity of fingerprint of chloroform extracts of 10 batches of *Taxus wallichiana*

Sample No.	Mean correlation coefficient	Mean cosine ratio
1 <sup>#</sup>	0.90	0.97
2 <sup>#</sup>	0.77	0.91
3 <sup>#</sup>	0.94	0.98
4 <sup>#</sup>	0.94	0.98
5 <sup>#</sup>	0.97	0.99
6 <sup>#</sup>	0.96	0.98
7 <sup>#</sup>	0.95	0.98
8 <sup>#</sup>	0.96	0.98
9 <sup>#</sup>	0.97	0.99
10 <sup>#</sup>	0.94	0.90

### 2.5.2 主成分分析

主成分分析<sup>[15]</sup>是一种应用广泛的多元统计方法,用于简化数据,快速实现模式或关系的可视化识别。以南方红豆杉药材氯仿提取物指纹图谱中共有峰峰面积与药材编号组成矩阵,以特征值大于1为提取标准,得到2个主成分,这2个主成分的累计贡献率大于85%。从基于2个主成分的得分图(图2)看出:产于浙江省北部的8批药材(3、4、5、6、7、8、9和10<sup>#</sup>)聚集在一起,提示南方红豆杉药材的质量与地域分布有关。在载荷图(图3)中选取距离原点较

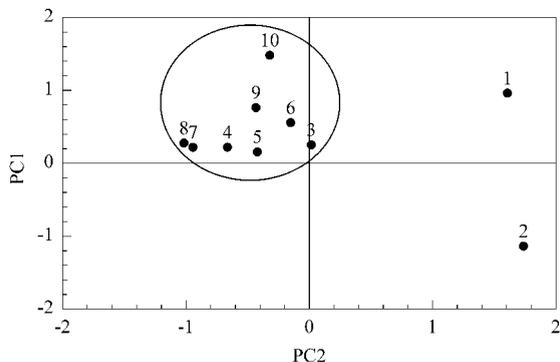


图 2 基于前两个主成分的南方红豆杉药材得分图  
Fig. 2 PCA score plot of *Taxus wallichiana* on the first two principal components

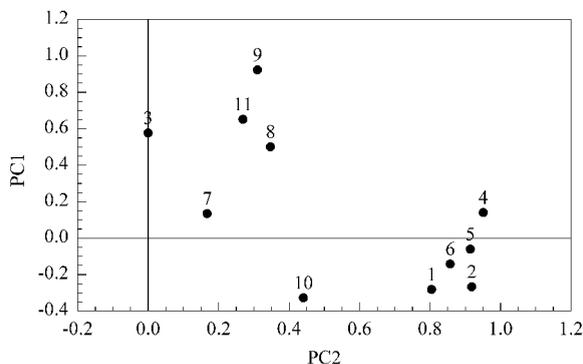


图 3 基于前两个主成分的南方红豆杉药材载荷图  
Fig. 3 PCA loading plot of *Taxus wallichiana* on the first two principal components

远的几个点,得到主成分1中变量的权重值,权重值越大表明该成分在决定样品区分中的作用越大,其中前3名变量的权重值分别为0.975、0.92和0.92,分别对应指纹图谱中的4、2和5号色谱峰,其中贡献值最大的是4号峰(10-DAB III),其对药材分类的影响最大。2和5号峰为未知化合物,有待于进一步分析确证。

### 3 结论

本文建立了南方红豆杉药材氯仿提取物的高效液相色谱指纹图谱分析方法。所得的10批南方红豆杉药材氯仿提取物的指纹图谱中,各共有指纹峰相似度较高,说明所建立的指纹图谱稳定、可靠。利用主成分分析法对指纹图谱进行统计分析,结果表明南方红豆杉药材的质量与种植区域有关。该方法稳定、可靠,可用于南方红豆杉药材的质量控制。

### 参考文献:

- [1] Zu Y, Wang Y, Fu Y, et al. Sep Purif Technol, 2009, 68(2): 238
- [2] Li C, Huo C, Zhang M, et al. Biochem Syst Ecol, 2008, 36: 266
- [3] Schiff P B, Fant J, Horwitz S B. Nature, 1979, 277(22): 655
- [4] Panno M L, Giordano F, Mastroianni F, et al. FEBS Letters, 2006, 580(9): 2371
- [5] Pandi M, Manikandan R, Muthumary J, et al. Biomed Pharmacother, 2010, 64(1): 48
- [6] Nguyen D M, Chen G A, Reddy R, et al. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004, 127(2): 365
- [7] Yahata T, Nishikawa N, Aoki Y, et al. Gynecol Oncol, 2006, 103(2): 752
- [8] Gangadevi V, Murugan M, Muthumary J. Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报), 2008, 24(8): 1433
- [9] Qiao L J, Man R L, Ni W D, et al. China Journal of Chinese Materia Medica (乔亮杰, 满瑞林, 倪网东, 等. 中国中药杂志), 2009, 34(8): 973
- [10] Zhen H, Pu S R, Zhang X Y. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (甄铨, 蒲尚绕, 张学毅. 药物分析杂志), 2008, 28(3): 358
- [11] Rao K V. Pharmaceut Res, 1993(10): 521
- [12] An C Z. [MS Thesis]. Guangzhou: Southern Medical University (安春志. [硕士学位论文]. 广州: 第一军医大学), 2006
- [13] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, et al. J Am Chem Soc, 1971, 93: 2325
- [14] Miao A D, Sun D J. Progress in Pharmaceutical Sciences (苗爱东, 孙殿甲. 药学进展), 2003, 27(1): 51
- [15] Ni Y N. Chemometrics in Analytical Chemistry Application. Beijing: Science Press (倪永年. 化学计量学在分析化学中的应用. 北京: 科学出版社), 2004: 233