

马甲子总三萜的HPLC指纹图谱建立、聚类分析和主成分分析及含量测定^Δ

陈旺^{1*}, 詹雁², 王美慧¹, 谭镭², 徐超群^{2#} (1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 四川省中医药科学院, 成都 610041)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)02-0201-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.02.13

摘要 目的: 建立马甲子总三萜的指纹图谱, 进行聚类分析和主成分分析, 并测定其中主要成分马甲子素的含量。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC)。色谱柱为 Agilent PheHex, 流动相为甲醇-0.05% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 检测波长为 320 nm, 流速为 1 mL/min, 柱温为 30 ℃, 进样量为 5 μL。以马甲子素为参照, 绘制 10 批马甲子总三萜的 HPLC 指纹图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》进行相似度评价, 确定共有峰; 采用 SPSS 26.0 软件进行聚类分析和主成分分析。采用同一 HPLC 法测定马甲子素的含量。结果: 10 批马甲子总三萜共有 6 个共有峰, 相似度均大于 0.990; 指认马甲子素 1 个特征峰。聚类分析结果显示, 10 批马甲子总三萜样品可聚为 4 类, 其中 S1 为一类、S2 为一类、S3~S6 为一类、S7~S10 为一类。主成分分析结果显示, 前 2 个主成分的累积方差贡献率为 99.430%。综合评分由高到低依次为 S1>S9>S8>S7>S10>S2>S3>S5>S6>S4。马甲子素检测质量浓度的线性范围为 33.7~844.0 μg/mL ($r=0.9999$); 精密性、重复性、稳定性(24 h) 试验的 RSD 均小于 2%, 平均加样回收率为 99.75% (RSD=1.13%, $n=6$); 10 批马甲子总三萜样品中马甲子素的平均含量为 0.576%~0.712%。结论: 所建 HPLC 指纹图谱和含量测定方法稳定、可靠, 可用于马甲子的质量控制。

关键词 马甲子总三萜; 马甲子素; 高效液相色谱法; 相似度评价; 聚类分析; 主成分分析; 指纹图谱; 含量测定

Establishment of HPLC Fingerprint, Cluster Analysis, Principal Component Analysis and Content Determination of *Paliurus ramosissimus* Total Triterpenes

CHEN Wang¹, ZHAN Yan², WANG Meihui¹, TAN Lei², XU Chaoqun² (1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Sichuan Provincial Academy of Chinese Medicine Science, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish fingerprint of *Paliurus ramosissimus* total triterpenes, and to conduct cluster analysis and principal component analysis, and to determine the content of the main component paliurusene. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent PheHex column with mobile phase consisted of methanol-0.05% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The detection wavelength was set at 320 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 5 μL. Using paliurusene as reference, HPLC fingerprints of 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes were drawn. Similarity evaluation was performed by using *TCM Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System* (2012 edition), and the common peaks were confirmed. Cluster analysis and principle component analysis were performed by using SPSS 26.0 software. The content of paliurusene was determined by same HPLC method. RESULTS: There were totally 6 common peaks in HPLC fingerprint of 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes. The similarity was more than 0.990; one of six common peaks was identified as paliurusene. The results of cluster analysis showed that 10 batches of samples could be clustered into 4 categories, including S1, S2, S3-S6 and S7-S10. The results of principal component analysis showed that the accumulative variance contribution rate of primary 2 principal components was 99.430%. Comprehensive score ranking was S1>S9>S8>S7>S10>S2>S3>S5>S6>S4. The linear range of paliurusene concentration was 33.7-844.0 μg/mL ($r=0.9999$). RSDs of precision, reproducibility and stability (24 h) tests were all lower than 2%. Average recovery was 99.75% (RSD=1.13%, $n=6$). The average contents of paliurusene in 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes was 0.576%-0.712%. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint and content determination method are reliable and stable, and can be used for the quality control of *P. ramosissimus*.

Δ 基金项目: 国家科技重大专项(民口)课题(No.2018ZX09731-013); 四川省重大科技专项课题(No.2017SZDZX0005); 四川省省级科研院所基本科研业务费项目

* 硕士研究生。研究方向: 中药新制剂、新剂型、新技术应用。电话: 028-85213973。E-mail: 932980995@qq.com

通信作者: 研究员, 硕士生导师, 博士。研究方向: 靶向给药系统。电话: 028-85213973。E-mail: chaoqun_xu@sina.com

KEYWORDS *Paliurus ramosissimus* total triterpenes; Paliurusene; HPLC; Similarity evaluation; Cluster analysis; Principal component analysis; Fingerprint; Content determination

表1 11批马甲子样品信息来源

Tab 1 Sample source information of 11 batches of *P. ramosissimus*

编号	产地	批号	采收时间
S1	重庆潼南柏梓镇	20191001	2019年10月
S2	广西桂林石塘镇	20190901	2019年9月
S3	四川成都双流东升镇	20190902	2019年9月
S4	四川成都双流公兴镇	20191002	2019年10月
S5	四川成都新津花桥镇	20190903	2019年9月
S6	四川成都新津牧马镇	20190904	2019年9月
S7	四川成都温江柳城镇	20190801	2019年8月
S8	四川彭州天彭镇	20190905	2019年9月
S9	四川德阳罗江县万安镇	20191003	2019年10月
S10	四川德阳广汉三水镇	20190701	2019年7月
S11	广西桂林全州县白宝镇	20190802	2018年8月

得率为0.60%)。取上述马甲子总三萜粉末0.1 g,精密称定,置于25 mL量瓶中,加甲醇定容,称定质量,超声(功率250 W,频率50 kHz)处理10 min,冷却至室温,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 取马甲子素对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为0.8 mg/mL的对照品溶液,置于4 °C冰箱中避光密封保存,备用。

2.1.3 色谱条件 以Agilent PheHex(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)为色谱柱;以甲醇(A)-0.05%磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~30 min, 0→74%A; 30~50 min, 74%A→100%A);检测波长为320 nm;流速为1 mL/min;柱温为30 °C;进样量为5 μL。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.1”项下供试品溶液(编号S1)适量,按“2.1.3”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。以马甲子素峰为参照(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,6个共有峰相对保留时间的RSD为0.056%~0.108%(n=6),相对峰面积的RSD为0.089%~2.308%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取“2.1.1”项下供试品溶液(编号S1)适量,分别于室温下避光放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以马甲子素峰为参照(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,6个共有峰相对保留时间的RSD为0.037%~0.184%(n=6),相对峰面积的RSD为0.066%~2.330%(n=6),表明供试品溶液于室温下避光放置24 h内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取同法制备的马甲子总三萜粉末(编号S1)0.1 g,共6份,精密称定,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以马甲子素峰为参照(S),计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,6个共有峰相对保留时间的RSD为0.089%~0.223%(n=6),相对峰面积的RSD为0.078%~2.381%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.1.7 马甲子总三萜 HPLC 指纹图谱的建立 取同法

马甲子为鼠李科植物马甲子属马甲子 *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir 的叶,在《中华本草》^[1]和《中药大辞典》^[2]中均有记载。其性平、味苦,无毒,具有祛风湿、消肿止痛、解毒等功效,可用于治疗风湿痹痛、跌打损伤、咽喉肿痛、痈疽溃脓等症^[3]。有文献报道,马甲子主要含有三萜类、黄酮类、环肽生物碱类等成分^[4-6],具有抗肿瘤、抗炎、抗溃疡、镇咳祛痰等作用^[7-10]。韦国锋等^[10]研究发现,马甲子乙醇提取物的止咳祛痰效果优于马甲子水提物。何颖等^[11]发现,马甲子叶醇提物的正丁醇部位能显著降低角叉胶致胸膜炎模型大鼠体内的丙二醛(MDA)、前列腺素 E₂ (PGE₂)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、白细胞介素 1β (IL-1β) 水平,具有明显的抗炎作用。本课题组前期对马甲子总三萜类化合物纯化工艺以及生物活性研究的结果显示,其植株中所含的五环三萜类衍生物群是该药产生体外抗肿瘤活性的关键化合物,因此对马甲子总三萜化合物进行质量检测是保证其药理活性的关键^[12-15]。目前,关于马甲子的研究多集中在新剂型^[16-18]、药理作用^[8-11]以及农业园艺^[19-22]等方面,有关其化学成分的研究相对较少;此外,目前尚无马甲子总三萜的质量标准,且该药材尚未被2020版《中国药典》或相关药品标准收录。基于此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)建立了马甲子总三萜的指纹图谱,并进行聚类分析和主成分分析;同时检测其主要成分马甲子素^[7]的含量,旨在为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

分析所用仪器为:Agilent 1260 型 HPLC 仪(包括二极管阵列检测器、二元泵、自动进样器及配套液相色谱工作站,美国 Agilent 公司)、XS205 DualRange 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)、RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、DZF-6050 型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)、SB5200D 型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)、玻璃层析柱(成都市凌云玻璃仪器厂,规格 3.3 cm×60 cm)、AB-8 型大孔吸附树脂(粒径 300~1 250 μm,沧州宝恩吸附材料科技有限公司)等。

1.2 药品与试剂

所用药品与试剂为:马甲子素对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号 20150801,纯度 ≥98%)、马甲子总三萜粉末(由 S11 马甲子药材按前期研究方法^[15]制得,得率为 0.60%,马甲子素含量为 1.269 2%,用于含量测定方法学考察等);甲醇为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯净水。

11 批马甲子药材(编号 S1~S11),经四川省中医药科学院舒光明研究员鉴定为鼠李科马甲子属马甲子 *P. ramosissimus* (Lour.) Poir 的鲜叶。样品信息来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 马甲子总三萜 HPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 供试品溶液的制备 取 10 批药材(编号 S1~S10),按前期研究方法^[15]制得马甲子总三萜粉末(平均

制备的10批马甲子总三萜粉末(编号S1~S10),按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,将色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,得到马甲子总三萜样品的叠加指纹图谱,详见图1。

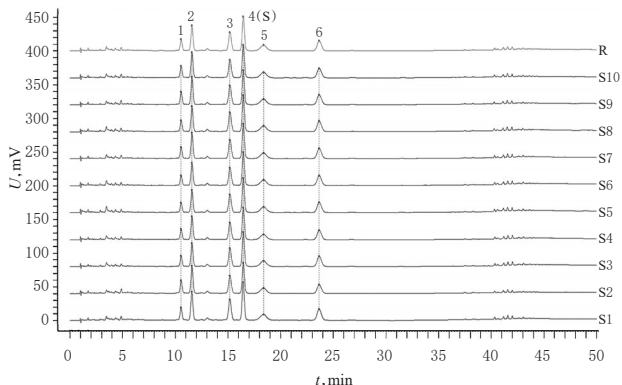


图1 10批马甲子总三萜样品的HPLC叠加指纹图谱
Fig 1 HPLC superimposed fingerprints of 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes

2.1.8 相似度评价 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对10批马甲子总三萜样品(编号S1~S10)的指纹图谱进行相似度评价,采用多点校正方法对色谱峰进行全峰匹配,生成马甲子总三萜对照图谱(图1中的“R”曲线)。结果,10批样品相似度均大于0.990,详见表2。

表2 10批马甲子总三萜样品及对照图谱的相似度评价结果

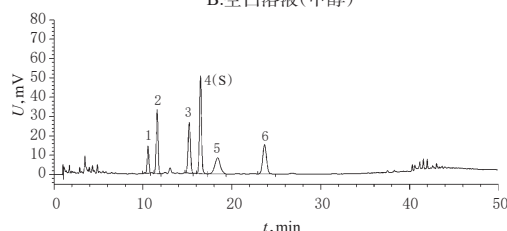
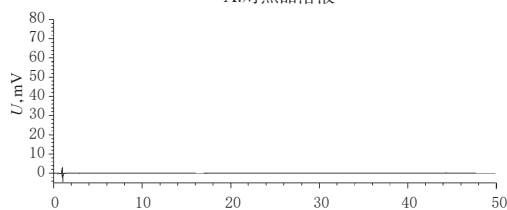
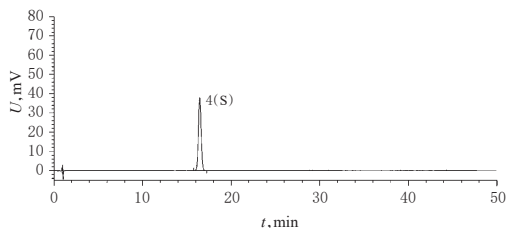
Tab 2 Results of similarity evaluation of 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes and control chromatograms

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.992	0.995	0.991	0.993	0.996	0.994	0.999	0.998	0.998	0.996
S2	0.992	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	0.996	0.998	0.998	0.999
S3	0.995	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	0.998	0.999	0.999	1.000
S4	0.991	1.000	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	0.995	0.997	0.997	0.999
S5	0.993	1.000	1.000	1.000	1.000	0.999	1.000	0.997	0.998	0.998	0.999
S6	0.996	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000
S7	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.998	0.999	0.999	1.000
S8	0.999	0.996	0.998	0.995	0.997	0.999	0.998	1.000	1.000	1.000	0.999
S9	0.998	0.998	0.999	0.997	0.998	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000
S10	0.998	0.998	0.999	0.997	0.998	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000	1.000
R	0.996	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	1.000	1.000	1.000

2.1.9 共有峰指认 根据马甲子总三萜的HPLC叠加指纹图谱生成结果,得到6个共有峰;通过与马甲子素对照品色谱图(图2A)进行对比,指认4号峰为马甲子素。因马甲子素色谱峰分离度较好、峰面积较大,故以其为参照峰(S)计算其余共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表3、表4。

2.2 聚类分析

将10批马甲子总三萜粉末样品(编号S1~S10)指纹图谱中的6个共有峰峰面积经过标准化处理后,采用SPSS 26.0软件,以组间平均数连接法、平方Euclidean



注:4.马甲子素

Note: 4. paliurusene

图2 马甲子总三萜样品的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of *P. ramosissimus* total triterpenes

表3 10批马甲子总三萜样品共有峰的相对保留时间
Tab 3 Relative retention time of common peaks of 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
1	0.644	0.644	0.638	0.638	0.640	0.640	0.640	0.642	0.642	0.641	0.332
2	0.705	0.705	0.699	0.705	0.701	0.701	0.701	0.703	0.703	0.703	0.293
3	0.926	0.926	0.920	0.920	0.926	0.926	0.926	0.927	0.927	0.925	0.285
4(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
5	1.116	1.122	1.116	1.116	1.121	1.121	1.121	1.121	1.121	1.117	0.229
6	1.441	1.441	1.435	1.435	1.439	1.439	1.445	1.442	1.442	1.444	0.233

表4 10批马甲子总三萜样品共有峰的相对峰面积
Tab 4 Relative peak area of common peaks of 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	RSD, %
1	0.274	0.357	0.240	0.261	0.242	0.243	0.267	0.252	0.318	0.302	14.014
2	0.698	0.828	0.616	0.667	0.599	0.633	0.684	0.652	0.755	0.717	10.070
3	0.633	0.667	0.605	0.607	0.605	0.607	0.623	0.620	0.645	0.633	3.275
4(S)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0
5	0.458	0.479	0.458	0.461	0.460	0.460	0.459	0.461	0.466	0.470	1.449
6	0.573	0.563	0.579	0.579	0.580	0.578	0.577	0.578	0.570	0.572	0.936

距离为度量标准进行聚类分析。结果,10批马甲子总三萜样品可聚为4类,其中S1聚为一类、S2聚为一类、S3~S6聚为一类、S7~S10聚为一类,详见图3。

2.3 主成分分析

采用SPSS 26.0软件对10批马甲子总三萜样品的6个共有峰标准化的峰面积进行主成分分析。结果,共提

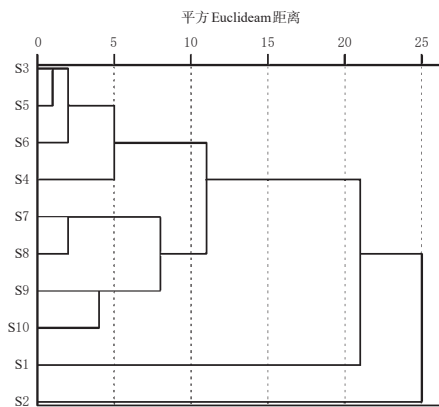


图3 10批马甲子总三萜样品的聚类分析树状图

Fig 3 Cluster analysis tree of 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes

取了2个主成分,这2个主成分的累积方差贡献率为99.430%,提示其可以反映马甲子总三萜样品中的大部分信息,详见表5。

表5 马甲子总三萜样品中前2个主成分的特征值和方差贡献率(%)

Tab 5 Characteristic value and variance contribution rate of *P. ramosissimus* total triterpenes of primary 2 principal components (%)

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	合计	方差贡献率	累积方差贡献率	合计	方差贡献率	累积方差贡献率
1	4.004	66.725	66.725	4.004	66.725	66.725
2	1.962	32.705	99.430	1.962	32.705	99.430

采用SPSS 26.0软件对6个共有峰标准化的峰面积进行因子载荷矩阵。结果,第1主成分特征值为4.004,方差贡献率为66.725%;成分3、4(马甲子素)、5、6在第1主成分上有较高载荷,表明第1主成分主要反映了这4个成分的信息。第2个主成分特征值为1.962,方差贡献率为32.705%,累积方差贡献率为99.430%,主要反映成分1、2的信息,详见表5、表6。

表6 马甲子总三萜样品中6个共有峰的因子载荷矩阵结果

Tab 6 Results of factor load matrix of 6 common peaks in *P. ramosissimus* total triterpenes

峰号	第1主成分	第2主成分	峰号	第1主成分	第2主成分
1	0.328	0.940	4	0.936	-0.351
2	0.559	0.820	5	0.978	-0.200
3	0.984	0.170	6	0.885	-0.463

主成分载荷矩阵(也称主成分系数)不等同于因子载荷矩阵,其可通过因子载荷矩阵计算得到,根据表6结果按公式计算, $U_i = A_i / \lambda^{[23]}$ (式中, U_i 为主成分系数, A_i 为因子载荷矩阵, λ 为特征值),结果见表7。

每一个载荷量表示主成分与对应变量(标准化后的峰面积,以A表示)的系数,第1主成分的线性关系式为 $Y_1 = 0.164A_1 + 0.279A_2 + 0.492A_3 + 0.468A_4 + 0.489A_5 + 0.442A_6$,第2主成分的线性关系式为 $Y_2 = 0.671A_1 + 0.586A_2 + 0.122A_3 - 0.251A_4 - 0.143A_5 - 0.330A_6$;综合得分(Y) =

表7 马甲子总三萜样品中6个共有峰的主成分载荷矩阵结果

Tab 7 Results of principal component loading matrix of 6 common peaks in *P. ramosissimus* total triterpenes

峰号	第1主成分	第2主成分	峰号	第1主成分	第2主成分
1	0.164	0.671	4	0.468	-0.251
2	0.279	0.586	5	0.489	-0.143
3	0.492	0.122	6	0.442	-0.330

$(66.725\% \times Y_1 + 32.705\% \times Y_2) / 99.430\%$;综合得分越高,表示质量越好^[24]。结果,10批样品中,重庆潼南(S1)最优,四川德阳罗江县(S9)和四川彭州(S8)较佳,详见表8。

表8 10批马甲子总三萜样品的综合得分结果

Tab 8 Results of comprehensive scores of 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes

编号	第1主成分得分	第2主成分得分	综合得分	排名
S1	4.060	0.461	2.876	1
S2	-2.165	2.683	-0.570	6
S3	-0.325	-1.417	-0.684	7
S4	-2.546	-0.613	-1.910	10
S5	-0.341	-1.544	-0.737	8
S6	-1.537	-1.222	-1.434	9
S7	0.695	-0.103	0.432	4
S8	1.959	-0.722	1.077	3
S9	0.953	1.677	1.191	2
S10	-0.754	0.800	-0.243	5

2.4 马甲子素的含量测定

2.4.1 溶液的制备 取“1.2”项下马甲子总三萜粉末适量,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.2”项下方法制备对照品溶液,以甲醇为空白溶液。

2.4.2 色谱条件 色谱条件同“2.1.3”项。

2.4.3 系统适用性试验 取上述对照品溶液、空白溶液(甲醇)、供试品溶液适量,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各色谱峰的分离度均大于1.5,理论板数以马甲子素计均不低于5 000,详见图2。

2.4.4 线性关系考察 精密吸取“2.4.1”项下对照品溶液,加甲醇稀释,制成质量浓度分别为33.7、84.4、168.8、422.0、844.0 $\mu\text{g/mL}$ 的线性工作溶液,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果,马甲子素的回归方程为 $Y = 3\ 266.8X + 0.732\ 8$ ($r = 0.999\ 9$),表明马甲子素检测质量浓度的线性范围为33.7~844.0 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.5 精密度试验 取“2.4.1”项下供试品溶液适量,按“2.4.2”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,马甲子素峰面积的RSD为0.79% ($n = 6$),表明本方法精密度良好。

2.4.6 重复性试验 取“1.2”项下马甲子总三萜粉末0.1 g,精密称定,共6份,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积

并按外标法计算样品含量。结果,马甲子素含量的RSD为1.02% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.4.7 稳定性试验 取“2.4.1”项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,马甲子素峰面积的RSD为0.31% ($n=6$),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4.8 加样回收率试验 取“1.2”项下马甲子总三萜粉末0.1 g,共6份,精密称定,置于25 mL量瓶中,加入“2.4.4”项下质量浓度为844 $\mu\text{g/mL}$ 的线性工作溶液10 mL,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表9。

表9 马甲子总三萜样品中马甲子素的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 9 Results of recovery tests of paliurusene in 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes ($n=6$)

已知含量,g	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
0.63	0.67	1.30	100.00		
0.66	0.67	1.32	98.50		
0.60	0.67	1.27	100.00	99.75	1.13
0.58	0.67	1.25	100.00		
0.62	0.67	1.30	101.50		
0.63	0.67	1.29	98.50		

2.4.9 样品含量测定 取10批同法制备的马甲子总三萜样品,按“2.4.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.2”项下色谱条件进样测定(平行测定3次),记录峰面积并按外标法计算样品含量,结果见表10。

表10 10批马甲子总三萜样品的含量测定结果(% , $n=3$)

Tab 10 Results of content determination of sample of 10 batches of *P. ramosissimus* total triterpenes (% , $n=3$)

编号	马甲子素	编号	马甲子素
S1	0.712	S6	0.626
S2	0.576	S7	0.656
S3	0.650	S8	0.682
S4	0.603	S9	0.644
S5	0.650	S10	0.619

3 讨论

本研究前期对Agilent SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm)、Agilent PheHex(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)、Agilent PheHex(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm)等不同色谱柱的分离效果进行了考察。结果,以Agilent PheHex(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)为色谱柱时的色谱峰峰形、分离度均较好,出峰数量较多,色谱信息较全面,故选择Agilent PheHex(100 mm×4.6 mm, 2.7 μm)为色谱柱。同时,本课题组还比较了乙腈-0.1%磷酸水溶液、甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸水溶液、甲醇-0.05%磷酸水溶液等流动相的分离效果。结果,以甲醇-0.05%磷酸水溶液为流动相进行梯度

洗脱时,各色谱峰出现时间适宜且峰形对称、分离度好、基线漂移小,故选择甲醇-0.05%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱。此外,本研究采用二极管阵列检测器对不同检测波长(210、230、260、290、320、350、380 nm)进行了考察。结果,当检测波长为320 nm处时,各色谱峰分离度较好,响应值较高且马甲子素峰在此波长下有较大吸收,故选择320 nm为检测波长。

本研究前期发现,广西桂林全州县白宝镇产马甲子药材中的马甲子素含量相对较高,故以其为样品进行含量测定的方法学考察,对另外10批样品进行指纹图谱、聚类分析和主成分分析以及定量测定。本研究指纹图谱分析结果显示,10批马甲子总三萜中有6个共有峰,且相似度均大于0.990。这提示不同来源的马甲子总三萜样品中的特征峰有较高的一致性。通过与对照品比对,指认4号峰为马甲子素。聚类分析结果显示,10批马甲子总三萜样品可聚为4类,其中S1聚为一类、S2聚为一类、S3~S6聚为一类、S7~S10聚为一类。主成分分析结果显示,2个主成分的累积方差贡献率为99.430%,可代表马甲子总三萜样品指纹图谱的大部分信息;其中,重庆潼南柏梓镇、四川德阳罗江县、四川彭州天彭镇等地区产马甲子药材的综合质量较好。10批马甲子总三萜样品中马甲子素的平均含量为0.576%~0.712%,以重庆潼南柏梓镇产马甲子的马甲子素含量最高,其他地区药材样品中马甲子素含量有所差异,可能与不同产地的环境、气候及采收时间有关^[25]。

综上所述,所建HPLC指纹图谱和含量测定方法稳定、可靠,可用于马甲子药材的质量控制。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:第十三卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:242-245.
- [2] 南京中医药大学.中药大辞典:上册[M].上海:上海科学技术出版社,2014:364-365.
- [3] 朱华,张可锋,高雅,等.马甲子的生药学研究[J].广西中医药,2008,31(1):56-57.
- [4] 于磊,张东明.铁篱巴果化学成分的研究[J].中国中药杂志,2006,31(24):2049-2052.
- [5] LEE SS, SU WC, LIU KC, et al. Cyclopeptide alkaloids from stems of *Paliurus ramosissimus*[J]. Phytochemistry, 2001, 58(8): 1271-1276.
- [6] 陈晨.马甲子化学成分的研究[D].扬州:扬州大学,2016.
- [7] 王京.马甲子总三萜生物学性质研究[D].成都:成都中医药大学,2018.
- [8] 白筱璐,周静,胡竟一,等.马甲子对实验性结肠炎的干预及Th1/Th2漂移相关作用机理研究[J].中药药理与临床,2019,35(4):116-119.
- [9] 余悦,周静,陈健,等.马甲子诱导AGS/人胃腺癌细胞凋亡的研究[J].中药药理与临床,2019,35(5):56-60.
- [10] 韦国锋,覃道光,黄志文.马甲子镇咳祛痰作用的研究[J].数理医药学杂志,1999,20(2):3-5.
- [11] 何颖,辜义陆,欧丽兰,等.马甲子叶抗炎有效部位的筛选

山萸肉及其不同酒制品的UPLC特征图谱建立及色度值的差异性研究^Δ

黄瑶^{1,2*},张雪兰^{1,2},罗宇琴^{1,2},邓李红^{1,2},方朝缙^{1,2},魏梅^{1,2#}(1.广东一方制药有限公司,广东佛山 528244; 2.广东省中药配方颗粒企业重点实验室,广东佛山 528244)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)02-0206-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.02.14

摘要 目的:建立山萸肉及其不同酒制品的特征图谱,探讨其色度值的差异性,并进行化学模式识别分析。方法:采用超高效液相色谱法(UPLC)。以马钱苷为参照,绘制10批山萸肉及其20批不同酒制品(酒炖、酒蒸)的UPLC特征图谱;采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012A)》进行相似度评价,确定共有峰;采用分光测色仪测定其色度值[明暗度(L)、红绿色调值(a)、黄蓝色调值(b)、色差值(ΔE)];采用SPSS 20.0、SIMCA 14.0软件进行聚类分析、主成分分析、偏最小二乘法-判别分析,并以特征峰峰面积、色度值为指标,以变量重要性投影值大于1为标准,筛选影响饮片质量的差异标志物。结果:山萸肉饮片有6个共有峰,酒萸肉(酒炖)饮片和酒萸肉(酒蒸)饮片有7个共有峰;指认了其中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷等4个成分,其中5-羟甲基糠醛为炮制后的新增成分。山萸肉与不同酒制品(酒炖、酒蒸)的相似度较低(0.869~0.937,0.845~0.944),而不同酒制品的相似度均高于0.99。山萸肉饮片与酒萸肉(酒炖)饮片的 ΔL 为-9.42~-3.58、 Δa 为-24.92~-15.00、 Δb 为-11.33~-7.00、 ΔE 为17.01~28.12,山萸肉饮片与酒萸肉(酒蒸)饮片的 ΔL 为-8.58~-2.42、 Δa 为-25.08~-13.83、 Δb 为-10.92~-6.08、 ΔE 为15.58~28.67,酒萸肉(酒炖)饮片与酒萸肉(酒蒸)饮片的 ΔL 为-2.17~3.00、 Δa 为-0.75~2.50、 Δb 为0.25~1.42、 ΔE 为1.25~3.83。聚类分析结果显示,30批样品可聚为两类,S1~S10聚为一类,S11~S30聚为一类。主成分分析结果显示,前两个主成分的累积方差贡献率为83.147%。偏最小二乘法-判别分析结果显示,莫诺苷、5号峰、色度值(L 、 a 、 b)为影响其质量的差异标志物。结论:所建UPLC特征图谱稳定、可行,结合色度值差异可快速鉴别山萸肉及其不同酒制品;所建化学模式可用于区分不同酒制品。

关键词 山萸肉饮片;酒制品;超高效液相色谱法;特征图谱;色度值;聚类分析;主成分分析;偏最小二乘法-判别分析

Establishment of UPLC Characteristic Chromatograms and Study on the Differences of Chromaticity Values among *Cornus officinalis* and Its Different Wine-processed Products

HUANG Yao^{1,2},ZHANG Xuelan^{1,2},LUO Yuqin^{1,2},DENG Lihong^{1,2},FANG Chaozuan^{1,2},WEI Mei^{1,2}(1. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Foshan 528244, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Guangdong Foshan 528244, China)

- 及其机理初探[J].中药材,2015,38(12):2586-2589.
- [12] 武蕊娟,谭镛,詹雁,等.马甲子叶提取物抗肿瘤活性部位的筛选[J].世界中医药,2016,11(2):324-326.
- [13] 高媛,宋联强,樊梅,等.马甲子叶提取物的抗肿瘤活性研究[J].华西药学杂志,2015,30(3):303-305.
- [14] 谢莹.马甲子的提取纯化工艺及其特性研究[D].成都:成都中医药大学,2017.
- [15] 王京,阮佳,徐超群.大孔树脂纯化马甲子五环三萜类成分的工艺研究[J].天然产物研究与开发,2018,30(4):697-701,574.
- [16] 任娟.马甲子总三萜固体分散体的制备与评价[D].成都:成都中医药大学,2019.
- [17] 卢辛未.马甲子抗肿瘤物质基础及其胶囊剂的制备[D].成都:成都中医药大学,2017.
- [18] 武蕊娟.马甲子抗肿瘤活性部位的筛选及其制剂工艺的研究[D].成都:成都中医药大学,2016.
- [19] 邓定洪.果园保护神:马甲刺[J].农村新技术,2009(3):29.
- [20] 供应围园“铁篱笆”:马甲子[J].农村新技术,2008(21):77.
- [21] 张锄亮.马甲子育苗与栽培技术[J].农村新技术,2006(3):10.
- [22] 张锄亮.植物铁篱笆:马甲子[J].农家科技,2006(2):32.
- [23] 康念欣,袁炎炎,张潇,等.酒黄连HPLC特征图谱的建立及聚类分析和主成分分析[J].世界科学技术:中医药现代化,2020,22(8):2790-2798.
- [24] 李国卫,何民友,孙冬梅,等.基于主成分分析及聚类判别模式的积雪草药材UPLC指纹图谱研究[J].广东药科大学学报,2020,36(1):10-17.
- [25] 杨柳,康显杰,杜伟锋,等.产地海拔等对前胡中白花前胡甲、乙含量的影响[J/OL].中华中医药学刊,2020.[2020-11-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.202011-17.1203.004.html>.

^Δ 基金项目:广东省省级科技计划项目(No.2018B030323004)

* 硕士。研究方向:中药饮片及中药配方颗粒质量标准。电话:0757-85128604。E-mail:18819129371@163.com

通信作者:主任药师,硕士。研究方向:中药配方颗粒开发与质量管理。电话:0757-85603332。E-mail:weimei67@126.com

(收稿日期:2020-09-17 修回日期:2020-12-04)

(编辑:陈宏)