

基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分定量的千斤拔质量评价研究

王宝林¹, 丘海芯¹, 甘金月¹, 杨世林^{1, 2}, 王峥涛³, 高红伟^{1, 2*}, 刘振杰^{1*}, 莫梦欢¹

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530020

2. 广西优势中成药与民族开发工程技术中心, 广西 南宁 530020

3. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203

摘要: 目的 建立千斤拔 *Moghania Radix* HPLC 指纹图谱及多成分定量方法, 为其质量控制提供参考。方法 采用 XBridge[®] C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为固定相, 以乙腈-0.1% 乙酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 260 nm, 柱温 30 °C; 对 24 批千斤拔 (编号为 S1~S24, 其中 S2~S9 为采集的新鲜全株植物, 实验室低温干燥而得, 其余样品为市场购买药材或饮片) 构建指纹图谱, 同时测定相关成分的含量, 并结合聚类分析、主成分分析及正交偏最小二乘法进行全面评价。结果 24 批不同来源千斤拔指纹图谱共标定 11 个共有峰, 指认出染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素。相似度计算结果表明, 各批次相似度在 0.707~0.981; 聚类分析将 24 批千斤拔分为 2 类, S2~S5、S6、S8、S9 号样品 (均为新鲜全株植物) 聚为一类, 其他 17 份样品聚为一类; 经主成分分析, 主成分 1~4 是影响样品质量评价的主要因子, 选取前 4 个主因子对不同产地的千斤拔进行评分, 24 批样品的综合得分在 5.34~3.61, 说明各批次质量差异相对较大; 样品中综合得分最高是 S4, 各饮片样品的综合得分较低。24 批样品中染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素质量分数分别为 0.10~0.57、0.11~2.85、0.15~0.71 mg·g⁻¹, 不同批次之间 3 个成分质量分数差异较大, 批次之间 3 个成分含量总体呈现出二低一高的趋势, 建议使用 3 个成分总和作为质量控制指标。结论 建立的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法稳定、可靠, 可为千斤拔的质量评价提供依据。

关键词: 千斤拔; 指纹图谱; 多成分定量; 化学模式识别; 染料木苷; 6"-O-丙二酰基染料木苷; 染料木素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 12-2464-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.12.009

Determination of multi-components of *Moghania Radix* based on fingerprints and chemical pattern recognition

WANG Baolin¹, QIU Haixin¹, GAN Jinyue¹, YANG Shilin^{1, 2}, WANG Zhengtao³, GAO Hongwei^{1, 2}, LIU Zhenjie¹, MO Menghuan¹

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020, China

2. Guangxi Engineering Technology Research Center of Chinese Patent Drug and Ethnic Drug Development, Nanning 530020, China

3. Shanghai Research Center for Standardization of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: **Objective** To establish the HPLC fingerprint and multi-component analysis of *Moghania Radix* and provide reference for quality control. **Methods** Waters XBridge[®] C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) were performed on HPLC analysis. The mobile phase was acetonitrile (A)-0.1% acetic acid (B) for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the wavelength was 260 nm and the column temperature was 30 °C. The content and fingerprint of relative ingredients of 24 batches (the numbers were S1—S24, in which S2—S9 were fresh whole plants collected and dried at low temperature in the laboratory, and the other samples were medicinal materials or decoction pieces purchased from the market) were measured simultaneously, combined with cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), which were applied in comprehensive analysis. **Results** The similarity calculation results showed that the similarity of each batch was between 0.707—0.981,

收稿日期: 2022-07-18

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1712304); 国家自然科学基金资助项目(81860711); 广西科技基地和人才专项(桂科AD19245124)

第一作者: 王宝林(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为天然产物活性成分及质量控制研究。E-mail: wbl15806025117@163.com

*共同通信作者: 刘振杰(1983—), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事中药质量评价研究工作。E-mail: rainman982@126.com

高红伟(1986—), 男, 博士, 硕士生导师, 副研究员, 主要从事中药药理学研究工作。E-mail: gaohongwei06@126.com

and 11 common peaks were calibrated, genistin, 6"-O-malonyl genistein, genistein were identified. Cluster analysis classified the 24 batches of medicinal materials into two categories, samples S2, S3, S4, S5, S6, S8, S9 (all fresh whole plants) were grouped into one group, and the other 17 samples were grouped into one group. According to the principal component analysis, principal component 1—4 was the main factor affecting the quality evaluation of the samples. The first four principal factors were selected to score the samples from different producing areas, and the comprehensive score of 24 batches of samples was between 5.34 and -3.61, indicating that the quality of each batch was relatively different. The highest composite score of the samples was S4, while the composite score of each piece was lower. The quality fractions of genistein, 6"-O-malondiacylgenistein and genistein in 24 batches of samples ranged from 0.10—0.57 mg·g⁻¹, 0.11—2.85 mg·g⁻¹ and 0.15—0.71 mg·g⁻¹, respectively. The quality fractions of the three batches varied greatly among different batches. The contents of the three items in batches generally show a trend of two low and one high. It was suggested to use the sum of the three items as the quality control index. **Conclusion** The established HPLC fingerprint and multi-component content determination method are stable and reliable, which can provide a reference for the quality evaluation *Moghaniae Radix*.

Key words: *Moghania Radix*; fingerprint; multicomponent quantification; chemical pattern recognition; genistin; 6"-O-malonyl genistein; genistein

千斤拔为豆科植物蔓性千斤拔 *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li.、大叶千斤拔 *M. macrophylla* (Willd.) O. Kuntze 或锈毛千斤拔 *M. ferruginea* (Wall. ex Benth.) Li. 的干燥根^[1];味甘,微涩,性平,补肝肾,用于祛风除湿、消瘀解痛^[2];资源分布广泛,主产于云南、贵州、广西等南方地区^[3]。千斤拔入药始见于《植物名实图考》,称为“千觔拔”,记载:“俚医以补气血,助阳道”^[4]。千斤拔是壮瑶药传统药物,现代应用广泛,市场需求较高,作为正骨水、壮腰健身丸、妇科千金胶囊等多种中成药的重要原料之一^[1]。目前,对千斤拔研究主要在于对千斤拔不同物种之间的区分,对蔓性千斤拔及大叶千斤拔独立进行研究,缺乏统一指标,含量测定成分选择缺少对应的实验依据。《中国药典》2020年版关于千斤拔药材的质量仅规定来源,地方标准收录品种及质控标准未见统一,如广西地方标准收录为蔓性千斤拔、大叶千斤拔,并收录有显微鉴别及薄层^[2],而湖北地方标准收录为蔓性千斤拔,未见显微鉴别^[5]。千斤拔资源分布广泛,受产地及加工条件的影响,导致药材质量参差不齐,因此,建立科学合理的千斤拔药材质量评价方法对于其临床应用具有非常重要的意义。

中药指纹图谱作为中药质量标准模式已被广泛接受,综合反映质量信息,具有整体性和模糊性的特点^[6-7]。HPLC指纹图谱结合化学计量学分析,为更加综合全面地反映中药的质量提供了新的思路与方法^[8]。为合理评价千斤拔质量,本实验收集范围以千斤拔主要使用地广西为核心,收集到24批不同来源的千斤拔药材及饮片,建立千斤拔的HPLC指纹图谱,并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;运用SPSS 26.0、Simca 14.1软件对结果进行统计学分析,筛选其质量控制的特征成分,对其含量进行测定,以期千斤拔指标成分筛选及质量标准的制定提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪、PDA 检测器和 Empower 工作站(美国 Waters 公司);ME204E 型万分之一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];SQP 百万分之一型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];SB-800 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司,功率 800 W,频率 40 kHz)。

1.2 药材及主要试剂

对照品染料木素(质量分数≥98%,批号 PS000784)、染料木苷(质量分数≥98%,批号 PS000781)、6"-O-丙二酰基染料木苷(质量分数≥98%,批号 PS010924)购自成都普思生物科技股份有限公司;甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,Fisher 公司);冰醋酸(色谱纯,天津市大茂化学试剂厂);水为屈臣氏饮用水。

共收集到千斤拔样品 24 批,编号为 S1~S24,其中 S2~S9 为采集的新鲜全株植物,实验室低温干燥而得,由广西中医药大学高红伟副研究员鉴定为豆科千斤拔属植物蔓性千斤拔 *M. philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li.、大叶千斤拔 *M. macrophylla* (Willd.) O. Kuntze,其余样品为市场购买药材或饮片,来源及种类见表 1。

2 方法及结果

2.1 色谱条件

采用 Waters XBridge® C₁₈ 色谱柱(250 mm×

表1 千斤拔样品信息
Table 1 Sample information of *Moghania Radix*

编号	种类	规格	来源
S1	蔓性千斤拔	饮片	广西恭城县瑶医医院
S2	蔓性千斤拔	药材	贵州惠水县
S3	蔓性千斤拔	药材(栽培,1年生)	广西桂林
S4	蔓性千斤拔	药材(栽培,2年生)	广西桂林
S5	蔓性千斤拔	药材(栽培,3年生)	广西桂林
S6	蔓性千斤拔	药材(栽培,4年生)	广西桂林
S7	蔓性千斤拔	药材(野生)	广西来宾金秀瑶族自治县
S8	大叶千斤拔	药材(栽培)	广西中医药药师山
S9	大叶千斤拔	药材(野生)	广西百色
S10	蔓性千斤拔	药材(野生)	广西来宾金秀瑶族自治县
S11	蔓性千斤拔	药材(栽培)	广西来宾金秀瑶族自治县
S12	蔓性千斤拔	药材(野生)	广西来宾金秀瑶族自治县
S13	蔓性千斤拔	药材(栽培)	广西来宾金秀瑶族自治县
S14	蔓性千斤拔	药材(野生)	南宁长塘
S15	大叶千斤拔	药材(野生)	南宁长塘
S16	大叶千斤拔	饮片	桂林毕生药业有限公司
S17	蔓性千斤拔	饮片	广西恭城县
S18	蔓性千斤拔	药材	广西恭城县嘉会镇
S19	蔓性千斤拔	药材	广西恭城县人民医院门口药摊
S20	蔓性千斤拔	药材(岭收,野生)	广西恭城瑶乡药材购销
S21	蔓性千斤拔	饮片	广西张益堂中药饮片有限公司
S22	大叶千斤拔	饮片	广西张益堂中药饮片有限公司
S23	蔓性千斤拔	饮片	桂林香格里拉大药房
S24	蔓性千斤拔	饮片	南宁宾阳县万润本草有限责任公司

4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈(A)-0.1% 乙酸溶液(B), 梯度洗脱 0~5 min, 5% A; 10~20 min, 5%~15% A; 20~40 min, 15%~40% A; 40~45 min, 40%~55% A; 45~85 min, 55%~95% A; 85~90 min, 95%~5% A, 体积流量 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L, 检测波长 260 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称量染料木素、染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷的对照品适量于量瓶, 加70%甲醇配制成质量浓度为0.5 mg $\cdot$ mL⁻¹染料木素对照品储备溶液、0.5 mg $\cdot$ mL⁻¹染料木苷对照品储备溶液、0.2 mg $\cdot$ mL⁻¹ 6"-O-丙二酰基染料木苷对照品储备溶液, 分别精密移取上述对照品储备溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇溶液定容至刻度, 摇匀, 得到混合对照品溶液。

2.2.2 样品前处理 取千斤拔新鲜全株药材根, 洗净于电热鼓风干燥箱 50 $^{\circ}$ C 干燥 4 h, 切片; 干燥药材切片, 所得饮片与收集的饮片样品在同样条件干燥

0.5 h。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.2.2”项下各样品分别粉碎, 精密称取各粉末约 1.0 g 于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 密塞, 称量记录具塞锥形瓶质量, 静置 10 min 后, 超声处理(功率 588 W、频率 40 kHz、时间 30 min), 放冷, 再次称量, 用 70% 甲醇水补足减失的量, 摇匀, 0.22 μ m 滤膜滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液(S1), 照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图。采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2.0 版)(以下简称相似度评价系统)对所得色谱图进行分析。结果显示, 所得色谱图相似度不低于 0.99, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 取同一样品(S1)照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液 6 份, 照“2.1”项下色谱条件连续进样, 记录色谱图。采用相似度评价系统对图

谱进行分析,结果显示,所得色谱图相似度不低于0.99,表明方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(S1),分别于0、2、4、8、12、24 h进行测定,记录色谱图。采用相似度评价系统对图谱进行分析。结果显示,所得色谱图相似度不低于0.99,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4 千斤拔指纹图谱建立及分析

2.4.1 千斤拔指纹图谱的生成 取24批千斤拔药材,按“2.2.2”项下方法分别进行前处理,按“2.2.3”项下制备供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件分别进样10 μ L,将数据导入Origin 14.1软件,记录色谱图,结果见图1。

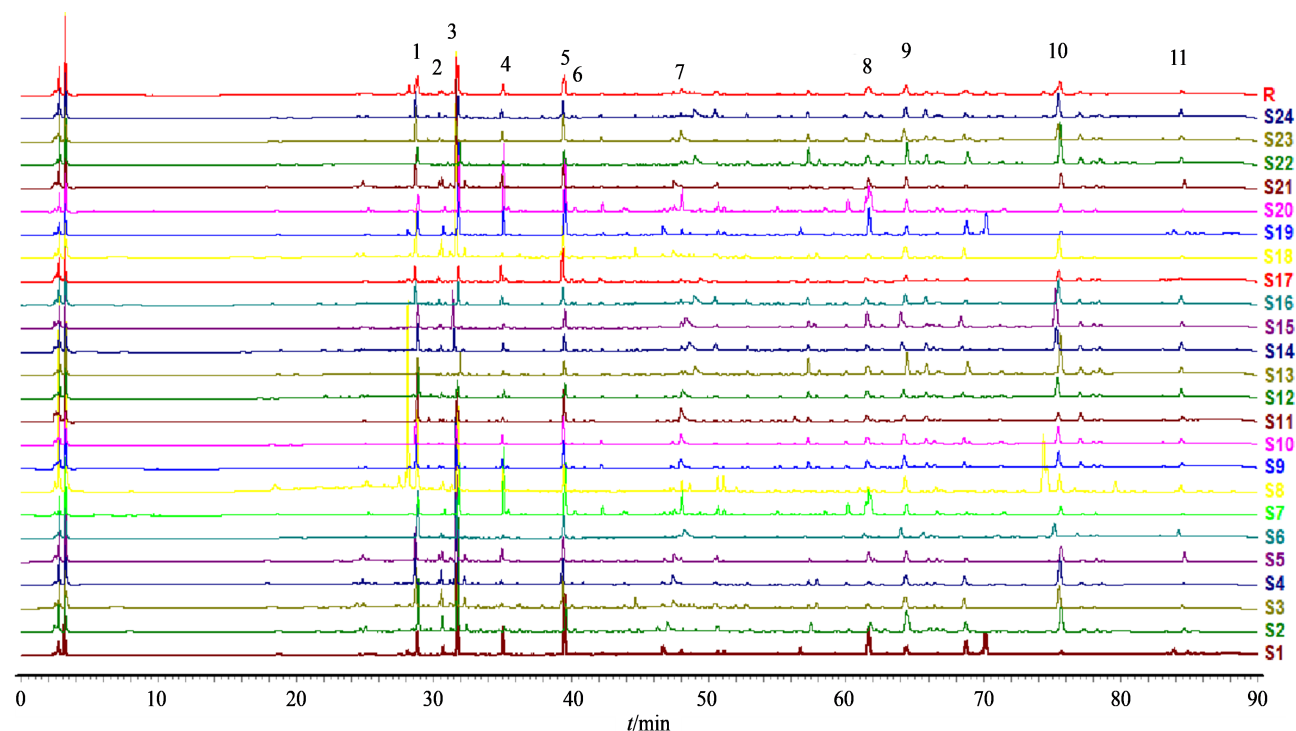


图1 千斤拔24批样品HPLC指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 24 batches of *Moghania Radix* samples

2.4.2 相似度评价 采用相似度评价系统,以S1为参照图谱,按中位数、时间窗宽度为0.5生成对照指纹图谱(R),并进行整体相似度评价,见表2。结果显示24批样品相似度在0.707~0.981,不同批次之间差异较大,不同公司生产的千斤拔饮片之间差异也较大。

2.4.3 特征峰的指认 24批千斤拔指纹图谱共有峰有11个,经与混合对照品色谱比对,指认其中3个主要特征峰:峰1为染料木苷、峰3为6"-O-丙二酰染料木苷、峰5为染料木素,见图2。

2.5 化学识别模式分析

2.5.1 聚类分析(CA) 将24批不同来源的千斤拔标定的11个共有峰面积导入SPSS 26.0软件,以平方欧式距离为测度,采用瓦尔德连接法进行聚类分析^[9]。结果显示,在类间距为10时,24份样品被分为2类。S2~S5、S6、S8、S9号样品聚为一类,其他17份样品聚为一类,具体见图3。

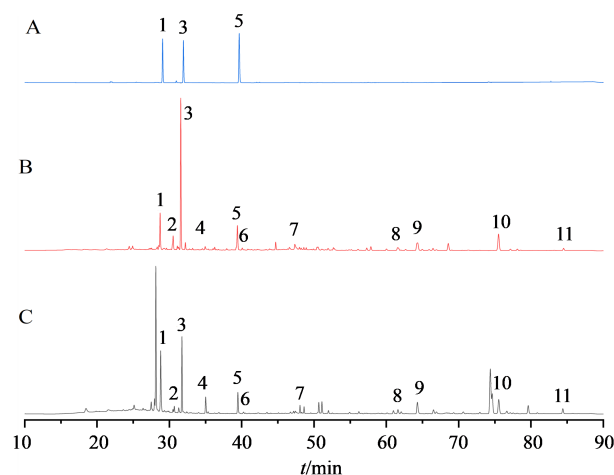
2.5.2 主成分分析(PCA)^[10] 采用SPSS 24.0软件

表2 24批样品相似度

Table 2 Similarity of 24 batches of samples

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.831	S13	0.889
S2	0.862	S14	0.770
S3	0.922	S15	0.793
S4	0.857	S16	0.911
S5	0.894	S17	0.981
S6	0.912	S18	0.914
S7	0.951	S19	0.868
S8	0.762	S20	0.868
S9	0.936	S21	0.770
S10	0.906	S22	0.744
S11	0.871	S23	0.707
S12	0.879	S24	0.715

对24批千斤拔药材的11个共有峰面积原始数据进行标准化处理,以主成分贡献率及特征值为依据^[11],进行PCA。本研究通过考察提取特征值、碎



1-染料木苷;3-6"-O-丙二酰基染料木苷;5-染料木素

1-genistin;3-6"-O-malonyl genistein;5-genistein

图2 对照品(A)、大叶千斤拔(B)、蔓性千斤拔(C)HPLC图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of reference substances (A), *M. macrophylla* (Willd.) O. Kuntze (B); *M. philippinensis* (Merr.et Rolfe) Li. (C)

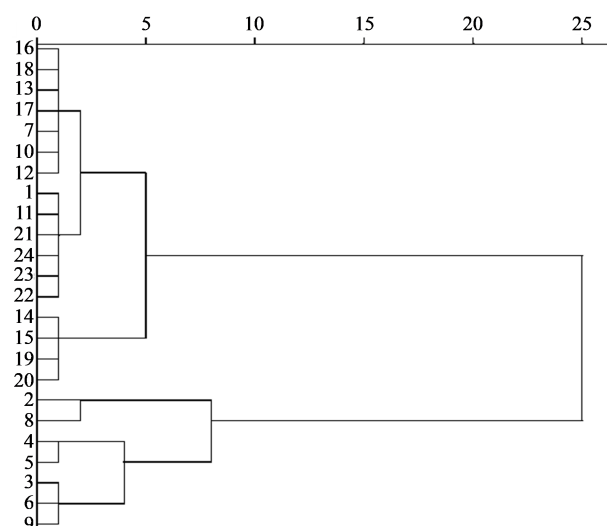


图3 千斤拔指纹图谱聚类树状关系

Fig. 3 Cluster tree diagram of fingerprint of *Moghania Radix*

石图(主成分特征值的连续陡峭部分)、累积方差贡献率来确定最佳主成分数。由图4和表3可知,前4个主成分提取特征值较大($\lambda > 1$),连线较陡峭,对解释变量的贡献最大,提取前4个主成分较为合适。其累积方差贡献率为82.30%,即选取4个主成分涵盖11个成分82.30%的信息量。通过正交旋转,得到11个指标在4个主成分中的旋转成分矩阵,见表4。根据旋转成分矩阵推测,影响千斤拔药材质量差异的成分不是单一成分,而是多成分协同作用的结果,第1主成分信息主要来自峰4、5、6、7、8、11;第2主成分的信息主要来自峰1、2、3;第3主成分的信息主要

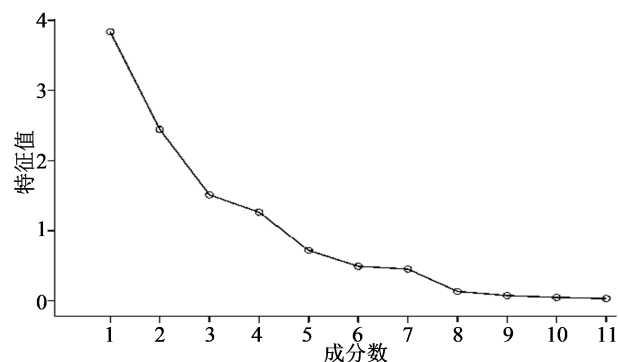


图4 碎石图

Fig. 4 Macadam figure

表3 主成分方差分析

Table 3 Variance analysis of principal component

成分	初始特征值	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	3.84	34.87	34.87
2	2.44	22.22	57.09
3	1.51	13.73	70.82
4	1.26	11.48	82.30

表4 千斤拔成分矩阵

Table 4 Component matrix of *Moghania Radix*

峰号	成分			
	1	2	3	4
1	-0.033	0.670	0.177	-0.461
2	0.029	0.881	0.001	0.091
3	0.275	0.923	0.030	0.134
4	0.912	-0.257	0.057	0.018
5	0.797	0.112	-0.522	-0.089
6	0.905	-0.049	0.243	-0.189
7	0.646	0.171	0.487	-0.040
8	0.795	-0.339	0.425	0.090
9	0.298	-0.047	-0.369	0.726
10	0.252	0.213	0.602	0.650
11	0.519	-0.308	0.477	-0.140

来自色谱峰10;第4主成分的信息主要来自峰9、10。

选取前4个主因子对不同产地的千斤拔进行评分,计算4个主成分的单独得分,然后以每个主成分因子对应的方差相对贡献率为权重得到每个样品的综合得分^[12]。24批样品的综合得分在5.34~3.61,说明各批次之间质量差异相对较大;样品中综合得分最高是S4(5.34),为最好的质量;此外,各饮片样品的综合得分较低,质量较差,因此,控制千斤拔饮片的加工及储存是保证饮片与药材质量一致的关键。结果见表5。

2.5.3 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)^[13]为进一步确定千斤拔质量差异的标志性成分,在

表5 各成分得分及综合得分

编号	主成分1	主成分2	主成分3	主成分4	综合得分
S4	0.50	4.61	0.23	-0.01	5.34
S5	0.26	3.56	0.82	-0.01	4.63
S8	7.23	-1.91	-2.65	-0.05	2.62
S20	0.50	-0.59	0.86	0.98	1.74
S19	-0.41	-0.34	0.31	2.18	1.73
S9	0.41	1.66	0.88	-1.57	1.39
S3	-0.81	1.79	-0.17	0.51	1.33
S2	1.48	0.81	-2.64	1.65	1.29
S15	-0.66	-0.64	1.4	0.97	1.07
S6	-0.34	0.98	0.32	0.05	1.01
S10	0.49	-0.26	0.16	0.18	0.56
S7	-0.01	0.30	1.05	-0.88	0.46
S14	-1.08	-1.13	0.72	1.69	0.20
S13	0.04	-1.10	1.03	0.21	0.18
S16	-0.26	-0.79	0.70	0.09	-0.26
S18	-0.70	-0.63	0.55	0.20	-0.58
S17	-1.13	-0.54	0.07	0.20	-1.41
S12	-1.03	0.26	-0.54	-1.04	-2.35
S22	0	-0.90	0.20	-1.65	-2.35
S1	-0.18	-1.13	-1.10	-0.60	-3.01
S23	-0.25	-1.17	-0.84	-0.84	-3.09
S11	-1.34	-1.12	-0.61	-0.37	-3.44
S21	-1.53	-0.84	-0.55	-0.53	-3.45
S24	-1.18	-0.89	-0.17	-1.37	-3.61

PCA 分析的基础上进一步采用 SIMCA 14.1 软件进行 OPLS-DA 分析。在建立的 OPLS-DA 模型中 $R^2_x(\text{cum})=0.625$, $R^2_y(\text{cum})=0.914$, $Q^2(\text{cum})=0.672$, 均大于 0.5, 说明建立的 OPLS-DA 模型解释率和预测力可靠。OPLS-DA 及 3D 得分图见图 5、6。结果显示 24 批样品整体可分为 2 组, 与 PCA 结果基本一致。结合变量重要性投影值(VIP, 图 7)可知 $VIP>1$ 的色谱峰有峰 2(未知)、峰 3(6"-O-丙二酰基染料木苷)、峰 4(未知)、峰 5(染料木素)、峰 6(未知), 说明峰 2、3、4、5、6 号峰代表的化学成分是不同来源千斤拔样品的差异性标志物。

2.6 千斤拔质量标志成分的含量测定

通过化学模式识别技术客观量化分析, 由 PCA 分析得知指纹图谱中峰 1(染料木苷)、峰 2、峰 3(6"-O-丙二酰基染料木苷)、峰 4、峰 5(染料木素)、峰 6 是影响不同来源千斤拔的特征化学成分。OPLS-DA 指示峰 2~6 的 $VIP>1$, 说明不同来源千斤拔该成分差异较大, 是差异性特征成分, 结合千斤拔样品相对峰面积可知, 峰 1(染料木苷)、峰 3(6"-O-丙二酰基染料木苷)、峰 5(染料木素)含量较高, 并且染料木素为染料木苷黄酮苷元, 存在相互转化关

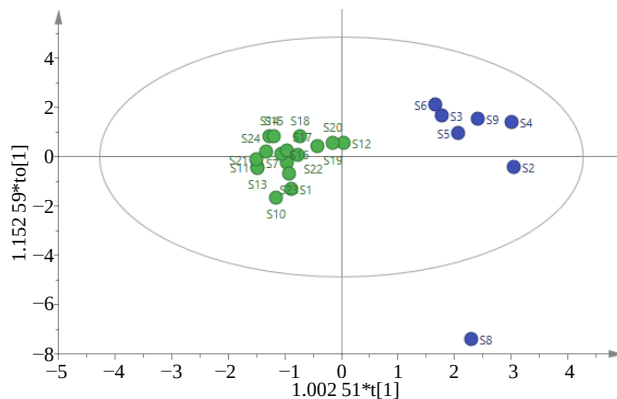


图5 千斤拔样品 OPLS-DA 得分图

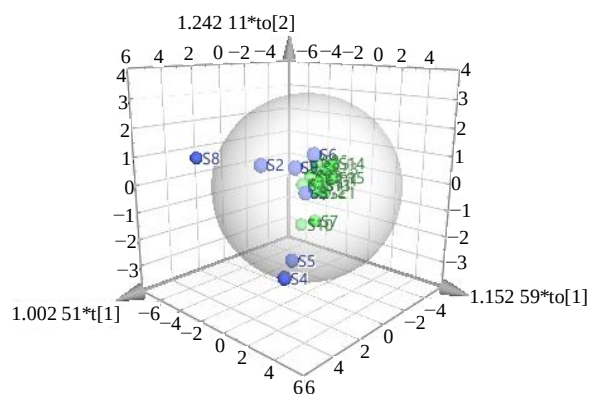
Fig. 5 OPLS-DA scores of *Moghania Radix*

图6 千斤拔样品 OPLS-DA 分析 3D 图

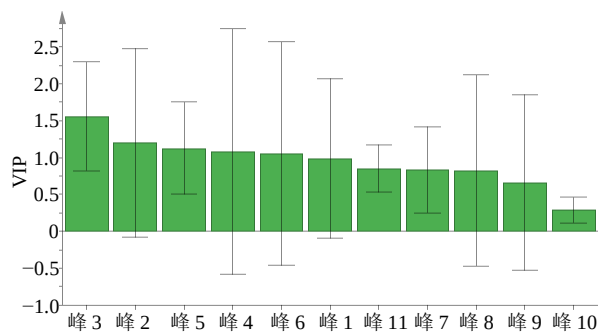
Fig. 6 3D image of *Moghania Radix* by OPLS-DA

图7 千斤拔样品的 OPLS-DA 的 VIP 图

Fig. 7 VIP value from OPLS-DA load diagram of *Moghania Radix*

系^[14-15], 6"-O-丙二酰基染料木苷为染料木素丙二酰基缀合物, 80 °C 下会转化为其异黄酮糖苷^[16], 因此本实验选择峰 1(染料木苷)、峰 3(6"-O-丙二酰基染料木苷)、峰 5(染料木素)作为千斤拔质量标准控制的特征指标。

2.6.1 方法学考察

(1) 线性关系考察 精密吸取染料木苷对照品储备溶液 4、5、6、7、8、9、10 mL 分别置于 25 mL 量瓶, 用 70% 甲醇定容至刻度线; 取 6"-O-丙二酰基染料木苷对照品储备液等比稀释; 取染料木素对照品

储备溶液1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 mL分别置于25 mL量瓶,用70%甲醇定容至刻度线,摇匀。按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品质量

为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线并进行线性回归,染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素3个成分的线性范围、回归方程、相关系数见表6。

表6 3个成分的回归方程、线性范围、LOD和LOQ

Table 6 Regression equations, linear ranges, LOD and LOQ of three components

成分	回归方程	线性范围/ μg	R^2	LOD/ μg	LOQ/ μg
染料木苷	$Y=4.85 \times 10^7 X-1\ 404.4$	2~14	0.999 6	0.017 6	0.440
6"-O-丙二酰基染料木苷	$Y=2.79 \times 10^7 X-33\ 533.7$	0.8~208.0	0.999 5	0.032 0	1.392
染料木素	$Y=6.38 \times 10^7 X-8\ 854.3$	1.16~11.60	0.999 5	0.025 9	1.296

(2)检测限(LOD)与定量限(LOQ) 将“2.2.1”项下染料木苷、染料木素、6"-O-丙二酰基染料木苷对照品储备溶液逐步稀释,进行测定。以信噪比3:1时测得LOD,10:1时测得LOQ,结果见表6。

(3)精密度试验 取“2.2.1”项下混合对照品溶液连续进样6次,染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素峰面积的RSD均为0.6%,表明方法精密度良好。

(4)重复性试验 分别精密称取同一千斤拔样品(S1)6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,以质量分数计算,染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素质量分数的RSD均为0.2%,表明方法重复性良好。

(5)稳定性试验 取同一供试品溶液(样品S1),分别于0、2、4、8、16、24 h进样测定峰面积,染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素峰面积的RSD分别1%、0.9%、0.7%,表明方法稳定性良好。

(6)回收率试验 精密称取已测知3个成分含量的千斤拔(S1)0.5 g共6份,精密加入染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素质量浓度分别为0.230、0.208、0.160 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液各1 mL,精密加入70%甲醇47 mL,按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液6份,进样测定,染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素的平均回收率分别为98.07%、103.6%、102.1%,RSD分别为2.8%、2.2%、1.8%。

2.6.2 样品测定 取24批千斤拔分别按“2.2.2”项下方法进行预处理,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素的质量分数,结果见表7。染料木苷、6"-O-丙二酰基染料木苷、染料木素质量分数范围分别为0.10~0.57 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、0.11~2.85 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、0.15~0.71 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

由聚类分析热图(图8)可以看出,质量分数上24批样品可以分为3类,不同批次之间3个成分质量分数差异较大,批次之间3个成分含量总体呈现出二低

表7 千斤拔中3个成分的质量分数测定($n=6$)

Table 7 Mass fraction of three components in *Moghania Radix* samples ($n=6$)

样本	质量分数/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$		
	染料木苷	6"-O-丙二酰基染料木苷	染料木素
S1	0.33	0.29	0.14
S2	0.57	1.44	0.24
S3	0.21	1.91	0.45
S4	0.24	2.85	0.46
S5	0.28	2.48	0.44
S6	0.21	1.74	0.33
S7	0.22	0.65	0.41
S8	0.45	0.88	0.17
S9	0.23	1.41	0.76
S10	0.24	0.36	0.29
S11	0.23	0.21	0.16
S12	0.27	0.47	0.49
S13	0.14	0.31	0.27
S14	0.12	0.40	0.15
S15	0.10	0.43	0.17
S16	0.29	0.27	0.17
S17	0.12	0.51	0.21
S18	0.16	0.37	0.23
S19	0.17	0.60	0.21
S20	0.18	0.42	0.27
S21	0.21	0.11	0.17
S22	0.23	0.15	0.40
S23	0.31	0.11	0.24
S24	0.22	0.11	0.29

一高的趋势,建议使用3个成分总和作为质量控制指标。

3 讨论

千斤拔种属拉丁名混乱,《中国药典》2020年版四部以 *Moghania* 作为千斤拔属名,而《中国植物志》以 *Flemingia* Roxb. Ex Ait. 作为千斤拔属名,药典收录蔓性千斤拔在《中国植物志》记载品种为千斤拔^[3],大叶千斤拔、绣毛千斤拔已被归为同一物

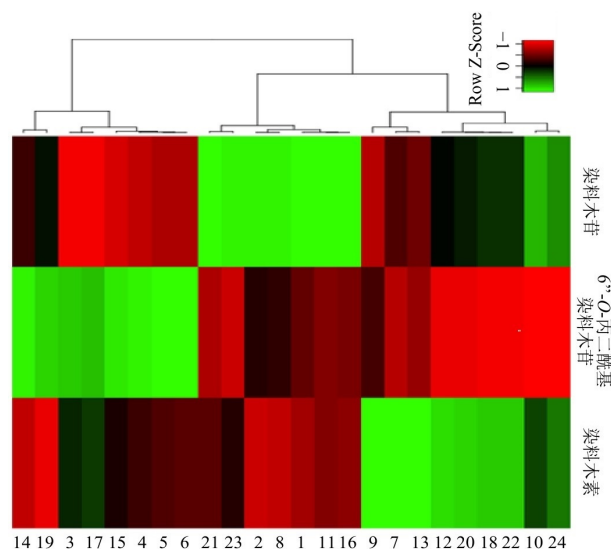


图8 聚类分析图

Fig. 8 Cluster diagram

种^[17], 本研究所使用拉丁名与药典保持一致。

从千斤拔指纹图谱(图1)中可以明显看出峰1(染料木苷)、峰3(6''-O-丙二酰基染料木苷)、峰5(染料木素)相对峰面积较高, 各批次之间含量存在明显差异。通过化学识别模式筛选出千斤拔的质量标志物为峰1(染料木苷)、峰3(6''-O-丙二酰基染料木苷)、峰5(染料木素), 并建立含量测定方法, 以3种化合物的含量反映指纹图谱信息。相似度计算与含量测定结果相互补充, 使图谱信息得到充分利用, 可作为千斤拔质量控制的可行方法。

千斤拔为豆科蝶形花亚科植物, 富含异黄酮类化合物。异黄酮类存在形式为苷元、 β -糖苷、乙酰化糖苷及丙二酰基糖苷^[18]。结合含量测定结果发现, 6''-O-丙二酰基染料木苷的含量在各批次之间的差异显著, 已有研究表明染料木素家族异黄酮结构较为稳定, 但是涉及液体的过程, 如洗涤、浸泡和煮沸^[19], 已被证明可以由于浸出而降低异黄酮的含量, 且损耗随着时间的增加而增加, 而且这种影响与温度有关, 丙二酰基染料木苷加热会脱羧降解^[20]。因此, 对于千斤拔而言, 温度和湿度是保持药材与饮片化学成分一致的关键。

本实验主要通过自采或代采、药物饮片公司和走访市场收集到24批千斤拔样品, 覆盖药典收录品种。相似度计算结果表明饮片与药材存在显著的差异性, 聚类分析和判别分析的结果显示, 新鲜全株药材和市售药材及饮片明显聚为二类, 其中聚为一类的S2、S3、S4、S5、S6、S8、S9号样品为新鲜全株植物, 均在实验室50℃下干燥而得, 结合含量测定结果推测, 在干燥过程中温度会对化学成分造成一

定的影响。因此可建议厂家或来源及加工商采取阴干的方式。在年限上, S3~S6 4个年限样品聚为一类, 且含量上以2~3年生较高, 因此建议蔓性千斤拔采收期为2~3年。且聚类分析结果表明, 药典收录品种大叶千斤拔、蔓性千斤拔聚为一类, 这与药典规定相符, 证明该实验所建立指纹图谱可以作为千斤拔统一标准。

千斤拔属植物富含黄酮及其苷类物质^[20], 因此, 实验采取超声提取, 并对提取溶剂(100%、70%、50% 甲醇)、提取时间(15、30、45、60 min)和提取功率(420、502、588 W)进行考察, 兼顾指纹图谱整体性以及含量测定, 结果表明在70%甲醇、功率588 W、超声时间30 min条件下, 各峰响应值较高, 且各主要成分基本得到分离, 指纹图谱整体性较好。为更全面地反映千斤拔的化学成分信息, 本实验采用梯度洗脱方式, 考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%乙酸溶液3个流动相体系, 并且使用紫外检测器全波长检测, 结果表明甲醇-水系统色谱峰出峰时间早, 分离度不够, 且基线噪音较大, 乙腈-水系统色谱峰分离度好, 但具有明显拖尾现象, 加入0.1%乙酸后峰形得到明显改善, 因此, 综合考虑选择乙腈-0.1%乙酸作为流动相, 选用260 nm作为检测波长。

本实验以HPLC建立千斤拔指纹图谱, 结合化学计量分析综合评价千斤拔质量标准, 避免了以单一成分含量评价中药质量好坏的弊端。在后续研究中, 可以设计药理实验对千斤拔进行谱效关系研究, 采用质谱、核磁共振等技术对千斤拔中的指标成分进行明确, 并对千斤拔质量控制进行全面评价。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2020: 552.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 552.
- [2] 广西壮族自治区食品药品监督管理局, 广西壮族自治区食品药品监督管理局. «广西壮族自治区瑶药材质量标准第一卷(2014年版)»注释[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2016: 31.
Guangxi Food and Drug Administration, Guangxi Institute for Food and Drug Control. Notes of Quality Standard of Yao Medicinal Materials in Guangxi Zhuang Autonomous Region Volume 1 (2014 Edition) [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 2016: 31.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy

- of Sciences. *Flora of China - Volume 39* [M]. Beijing: Science Press, 1988.
- [4] (清)吴淇浚. 植物名实图考 [M]. 上海: 商务印书馆, 1957: 342-343.
- Wu Q J. *Study on Plant Names* [M]. Shanghai: The Commercial Press, 1957:342-343.
- [5] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药材质量标准 2018 年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 15-16.
- Hubei Provincial Drug Administration. *Quality Standard of Chinese Medicinal Materials in Hubei Province 2018 edition* [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2019: 15-16.
- [6] 王苏静, 常世卿. 中药色谱指纹图谱技术与应用 [M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2008: 10-12.
- Wang S J, Chang S Q. *Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Technology and Application* [M]. Zhengzhou: Zhengzhou University Press, 2008:10-12.
- [7] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4085-4094.
- Liu D F, Zhao L N, Li Y F, et al. Research progress and application in fingerprint technology on Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(22): 4085-4094.
- [8] 周冰倩, 高喜梅, 杨颖, 等. 不同来源竹茹药材HPLC指纹图谱和化学计量学分析 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 853-857.
- Zhou B Q, Gao X M, Yang Y, et al. Quality analysis of *Caulis Bambusae In Taeniam* from different origins by HPLC coupled with chemometrics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(3): 853-857.
- [9] 李林杰, 谢谭芳, 王昱涵, 等. 壮药金母颗粒的指纹图谱建立、化学计量学分析及多组分含量测定 [J]. 中国药房, 2022, 33(4): 439-445, 464.
- Li L J, Xie T F, Wang Y H, et al. Establishment of fingerprint, chemometric analysis and multi-component content determination of Zhuang medicine Jinmu Granules [J]. China Pharm, 2022, 33(4): 439-445, 464.
- [10] Ma X, Zou H M, Pan Y W, et al. Quality assessment of pollen typhae by high-performance liquid chromatography fingerprint, hierarchical cluster analysis, and principal component analysis [J]. Pharmacogn Mag, 2019, 15: 177-182.
- [11] 赵宏苏, 赵茹, 乔金为, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别绿萼梅质量标志物的评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1345-1353.
- Zhao H S, Zhao R, Qiao J W, et al. Evaluation of quality markers of *Mume Flos* based on fingerprint and chemical pattern recognition [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(5): 1345-1353.
- [12] 冉金凤, 胡文岳, 吴晓云, 等. 基于聚类分析和主成分分析的黄精无机元素特征图谱研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(10): 3271-3277.
- Ran J F, Hu W Y, Wu X Y, et al. Study on specific spectrum of inorganic elements in *Polygonati Rhizoma* based on cluster analysis and principal component analysis [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(10): 3271-3277.
- [13] Hernadi E, Rohaeti E, Rafi M, et al. HPLC fingerprinting coupled with linear discriminant analysis for the detection of adulteration in *Orthosiphon aristatus* [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2019, 42(15/16): 513-520.
- [14] Yang Y Y, Tsai T H. Enterohepatic circulation and pharmacokinetics of genistin and genistein in rats [J]. ACS Omega, 2019, 4(19): 18428-18433.
- [15] Wang D J, Khan M S, Cui L, et al. A novel method for the highly efficient biotransformation of genistein from genistin using a high-speed counter-current chromatography bioreactor [J]. RSC Adv, 2019, 9(9): 4892-4899.
- [16] 许晶, 张永忠, 付茂辉. 大豆异黄酮的研究进展 [J]. 山西食品工业, 2005(3): 23-25.
- Xu J, Zhang Y Z, Fu M H. Research progress of soybean isoflavones [J]. Shanxi Food Ind, 2005(3): 23-25.
- [17] 刘春生. 药用植物学 [M]. 第4版. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- Liu C S. *Medicinal Botany* [M]. 4th Ed. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2016.
- [18] Kurzer M S, Xu X. Dietary phytoestrogens [J]. Annu Rev Nutr, 1997, 17: 353-381.
- [19] Wang H J, Murphy P. Mass balance study of isoflavones during soybean processing [J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 2377-2383.
- [20] Grün I U, Adhikari K, Li C, et al. Changes in the profile of genistein, daidzein, and their conjugates during thermal processing of tofu [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(6): 2839-2843.

[责任编辑 兰新新]