

基于HPLC多成分定量结合化学模式识别分析不同产地蒺藜质量差异

武琴园¹, 王 琴¹, 董 梅¹, 罗叶丽¹, 张建萍², 李 倩^{3*}

1. 渭南市检验检测研究院 食品药品检验中心, 陕西 渭南 714000

2. 兰州大学第一医院 药剂科, 甘肃 兰州 730030

3. 西安交通大学附属红会医院 药剂科, 陕西 西安 710000

摘要: 目的 建立同时测定蒺藜中槲皮素、山柰酚、异鼠李素、白杨素、蒺藜皂苷、蒺藜皂苷K、蒺藜皂苷D、蒺藜呋甙皂苷B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元含量的方法, 探索主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)及灰色关联度分析(GRA)模型在蒺藜质量差异评价中的应用。方法 采用HPLC法, 以乙腈-0.05%磷酸为流动相, 梯度洗脱; 检测波长为360、203 nm; 通过对多指标成分含量结果进行PCA、OPLS-DA分析, 同时建立GRA模型, 综合分析不同产地蒺藜质量差异。结果 方法学验证结果均符合《中国药典》要求; 12种成分在各自范围内线性关系良好($r > 0.999$), 平均加样回收率($n=9$) 在96.92%~100.18% ($RSD < 2.0\%$)。PCA、OPLS-DA分析显示蒺藜苷元、异鼠李素、山柰酚和槲皮素是影响蒺藜产品质量的主要潜在标志物。GRA相对关联度0.339 7~0.597 1, 蒺藜质量存在一定产地差异。结论 HPLC同时测定蒺藜中12个成分, 简便可靠, PCA、OPLS-DA和GRA可用于不同产地蒺藜质量差异分析。

关键词: 蒺藜; 灰色关联度分析法; 主成分分析(PCA); 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA); 质量差异分析; 蒺藜苷元; 异鼠李素; 山柰酚; 槲皮素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)04-0792-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.04.012

Quality difference analysis of *Tribuli Fructus* from different producing areas based on HPLC multi-component quantitative combined with chemical pattern recognition

WU Qinyuan¹, WANG Qin¹, DONG Mei¹, LUO Yeli¹, ZHANG Jianping², LI Qian³

1. Food and Drug Inspection Center, Weinan Inspection and Testing Institute, Weinan 714000, China

2. Department of Pharmacy, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China

3. Department of Pharmacy, Honghui Hospital Affiliated to Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710000, China

Abstract: Objective To establish a method for the simultaneous determination of quercetin, kaempferol, isorhamnetin, chrysin, tribuloside, terrestrosin K, terrestrosin D, terrestrosin B, (25R)-spirost-4-ene-3, 12-dione, hecogenin, diosgenin and tigogenin in *Tribuli Fructus*, and to explore the application of principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) and grey relational analysis (GRA) in the quality difference evaluation of *Tribuli Fructus*. **Method** HPLC method was used with acetonitrile as mobile phase A and 0.05% phosphate acid solution as mobile phase B in gradient elution mode; the detection wavelengths were 360 and 203 nm. Through the chemometric analysis of the results of multi-index component content, the GRA model was established to comprehensively analysis the quality differences of *Tribuli Fructus* from different producing areas. **Results** The results of methodological verification were in line with the requirements of Chinese Pharmacopoeia; There were good linear relationships ($r > 0.999$) when the 12 components were in their respective ranges, and the average recovery rate ($n = 9$) were 96.92%—100.18% ($RSD < 2.0\%$). Chemometric analysis showed that (25R)-spirost-4-ene-3, 12-dione, isorhamnetin, kaempferol and quercetin were the main potential markers affecting the quality of *Tribuli Fructus*. The relative correlation degree of

收稿日期: 2023-12-27

基金项目: 甘肃省科技计划(自筹经费-自然科学基金)项目(编号23JRRA1595)

第一作者: 武琴园(1984—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为药品化妆品质量安全检测。E-mail: vrvr96@163.com

*通信作者: 李 倩(1984—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为药物制剂。E-mail: vrvr96@163.com

GRA were 0.3397—0.5971, and there was a certain difference between producing areas of *Tribuli Fructus*. **Conclusion** The HPLC method can simultaneously determine the 12 components in *Tribuli Fructus*, which is simple and practical, PCA, OPLS-DA and GRA can be used to analyze the quality differences of *Tribuli Fructus* from different producing areas.

Key words: *Tribuli Fructus*; HPLC; grey relational analysis (GRA); principal component analysis (PCA); orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA); quality difference analysis; (25*R*)-spirost-4-ene-3, 12-dione; isorhamnetin; kaempferol; quercetin

蒺藜为蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥成熟果实, 主要含有皂苷类、黄酮类、生物碱类、多糖类等化合物, 还含甾醇类、氨基酸类、萜类、脂肪酸、无机盐等成分^[1-4], 具有活血祛风、平肝解郁的作用, 用于目赤翳障、胸胁胀痛、头痛眩晕、乳闭乳痛、风疹瘙痒等症的治疗^[5]。现代医学研究证明, 蒺藜及蒺藜皂苷通过提高睾丸激素水平、抗氧化、控制血糖、调节血脂及抗动脉硬化等作用改善勃起功能^[6]; 蒺藜总皂苷可以降低脂多糖条件下巨噬细胞中 Toll 样受体 4 的表达水平, 从而减轻脂多糖诱导的巨噬细胞炎症^[7]; 还可通过止痒、抗炎、修复皮肤屏障、调控细胞的凋亡与增殖过程以及对体内免疫功能的调节作用而治疗银屑病^[8]; 此外, 蒺藜还具有抗氧化^[9]、治疗肝炎^[10]、改善血管内皮功能、缓解动脉粥样硬化、治疗高血压^[11]等作用。蒺藜被收载于《中国药典》2020 年版一部, 标准以蒺藜苷元为指标进行了定量分析, 中药材成分繁杂、药效成分众多, 一种成分不能表征中药材的内在整体质量, 因而多指标综合评价模式是中药质量评价的主要研究方向。主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 是化学识别模式的最常用分析方法, 通过降维的方式对多变量进行分析, 预测精度高, 越来越多地用于评价中药质量^[12-13]。灰色关联度分析 (GRA) 法是解决多目标之间复杂关系问题的有力工具^[14], 可根据因素间相互关联度的比较来确定哪些因素是影响大的主导因素, 对各指标的综合评判值表达直观, 避免了人为判断^[15]。本研究利用 HPLC 法对 7 个省 18 个批次的蒺藜样品中槲皮素、山柰酚、异鼠李素、白杨素、蒺藜皂苷、蒺藜皂苷 K、蒺藜皂苷 D、蒺藜呋甾皂苷 B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元含量进行测定, 这 12 个成分涵盖了黄酮类、皂苷类及其苷元类, 而黄酮类成分及皂苷类成分被认为是蒺藜中的活性成分^[16], 再借助于 PCA、OPLS-DA 联合 GRA 法对测定的含量数据进行挖掘, 对不同产地的蒺藜质量进行排序, 旨在蒺藜的道地性开发和内在质量的全面控制提供科学依据。

1 材料

1.1 主要试剂

蒺藜药材按照采集地所在省份以及各省份区域位置依次编号, 具体样品信息见表 1。经渭南市检验检测研究院食品药品检验中心董梅高级工程师鉴定为蒺藜科植物蒺藜 *Tribulus terrestris* L. 的干燥成熟果实。对照品槲皮素、白杨素、异鼠李素、山柰酚、蒺藜皂苷 D、薯蓣皂苷元、蒺藜皂苷 K、蒺藜呋甾皂苷 B (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 100081-201610、111701-202102、110860-202012、110861-202214、112022-202202、111539-202303、112023-201601、111961-201301, 质量分数依次为 99.1%、99.6%、99.1%、97.4%、97.0%、96.6%、90.6%、98.0%); 蒺藜皂苷、蒺藜苷元、海柯皂苷元、替告皂苷元 (武汉天植生物科技有限公司, 批号 CFS202201、CFS202001、CFS202201、CFS202001, 质量分数均 ≥ 98.0%); 磷酸 (美国 Tedia 公司, 色谱级), 乙腈 (德国 Merck 公司, 色谱级), 其余试剂为分析纯。

表 1 蒺藜药材信息

Table 1 Medicinal information of *Tribuli Fructus*

编号	采集地	批号	编号	采集地	批号
S1	安徽绩溪县	220810	S10	宁夏同心县	220805
S2	安徽利辛县	220901	S11	贵州凤冈县	220902
S3	安徽霍山县	220903	S12	贵州镇宁县	220903
S4	河南修武县	220802	S13	内蒙古托克托县	220804
S5	河南延津县	220901	S14	内蒙古武川县	220907
S6	河北文安县	221001	S15	内蒙古敖汉旗	220902
S7	河北献县	220905	S16	内蒙古固阳县	220802
S8	河北景县	220902	S17	吉林乾安县	220903
S9	宁夏永宁县	220803	S18	吉林伊通县	220901

1.2 主要仪器

BP211D 型分析天平 (德国 Sartorius 公司); QK-500DA 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备

精密称取槲皮素、山柰酚、异鼠李素、白杨素、蒺藜皂苷、蒺藜皂苷K、蒺藜皂苷D、蒺藜呋甙皂苷B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元对照品适量,甲醇溶解制成每毫升含0.416 mg 槲皮素、0.73 mg 山柰酚、0.852 mg 异鼠李素、0.378 mg 白杨素、0.314 mg 蒺藜皂苷、0.19 mg 蒺藜皂苷K、0.046 mg 蒺藜皂苷D、0.108 mg 蒺藜呋甙皂苷B、5.27 mg 蒺藜苷元、0.136 mg 海柯皂苷元、0.062 mg 薯蓣皂苷元和0.038 mg 替告皂苷元的混合储备液。精密吸取储备液,用甲醇定量稀释成20倍的混合对照品溶液(其中槲皮素、山柰酚、异鼠李素、白杨素、蒺藜皂苷、蒺藜皂苷K、蒺藜皂苷D、蒺藜呋甙皂苷B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元、替告皂苷元的质量浓度分别为20.8、36.5、42.6、18.9、15.7、9.5、2.3、5.4、263.5、6.8、3.1、1.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.2 供试品溶液制备

取粉碎的蒺藜粉末约0.5 g,精密称定,用20 mL 甲醇超声30 min,滤过,甲醇定容至25 mL,密塞,摇匀,滤过,即得。

2.3 色谱条件

采用YMC Pro C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),柱温30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长为360 nm(0~23 min 检测槲皮素、山柰酚、异鼠李素和白杨素)和203 nm(23~60 min 检测蒺藜皂苷、蒺藜皂苷K、蒺藜皂苷D、蒺藜呋甙皂苷B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元);以乙腈(A)-0.05%磷酸(B)为流动相梯度洗脱(0~11 min, 16.0% A; 11~23 min, 16.0% $\rightarrow$ 40.0% A; 23~38 min, 40.0% $\rightarrow$ 65.0% A; 38~53 min, 65.0% $\rightarrow$ 80.0% A; 53~60 min, 80.0% $\rightarrow$

16.0% A);进样体积10 μL ,体积流量1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。在以上条件下得到的混合对照品溶液及供试品溶液色谱图显示指标成分与基线能完全分离,理论板数按各成分计均大于5 500(图1)。

2.4 标准曲线的绘制

精密吸取混合储备液适量,分别用甲醇定容至20 mL,摇匀制得6个浓度从低到高的混合对照品溶液(稀释200、100、40、20、10、4倍),分别精密吸取6个混合液各10 μL 进样,以质量浓度对峰面积作标准曲线,得线性方程和相关系数,结果见表2。

2.5 精密度、稳定性及重复性试验

取蒺藜(S1)按“2.2”项下方法制备供试品溶液1份,连续进样6次,每次10 μL ,结果12个成分峰面积的RSD依次为1.18%、1.03%、0.93%、1.17%、1.25%、1.38%、1.75%、1.52%、0.45%、1.47%、1.69%和1.81%($n=6$),表明仪器精密度能满足检测要求。取1份蒺藜(S1)供试品溶液,于制备后每隔4 h进样检测,至36 h,每次10 μL ,结果峰面积的RSD依次为1.76%、1.05%、1.34%、1.53%、1.71%、1.82%、1.97%、1.67%、0.81%、1.73%、1.98%和1.89%($n=10$),表明各成分峰面积在36 h内无明显变化,稳定性较好。取蒺藜(S1)6份,分别按“2.2”项下方法制成供试品溶液,进样,结果各成分含量的RSD依次为1.79%、1.68%、1.52%、1.85%、1.74%、1.81%、1.97%、1.90%、1.37%、1.83%、1.93%、1.99%($n=6$),表明重复性良好。

2.6 回收率试验

取已知槲皮素、山柰酚、异鼠李素、白杨素、蒺藜皂苷、蒺藜皂苷K、蒺藜皂苷D、蒺藜呋甙皂苷B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元含量的蒺藜粉末(S1)9份,每份约0.25 g,精密称定,

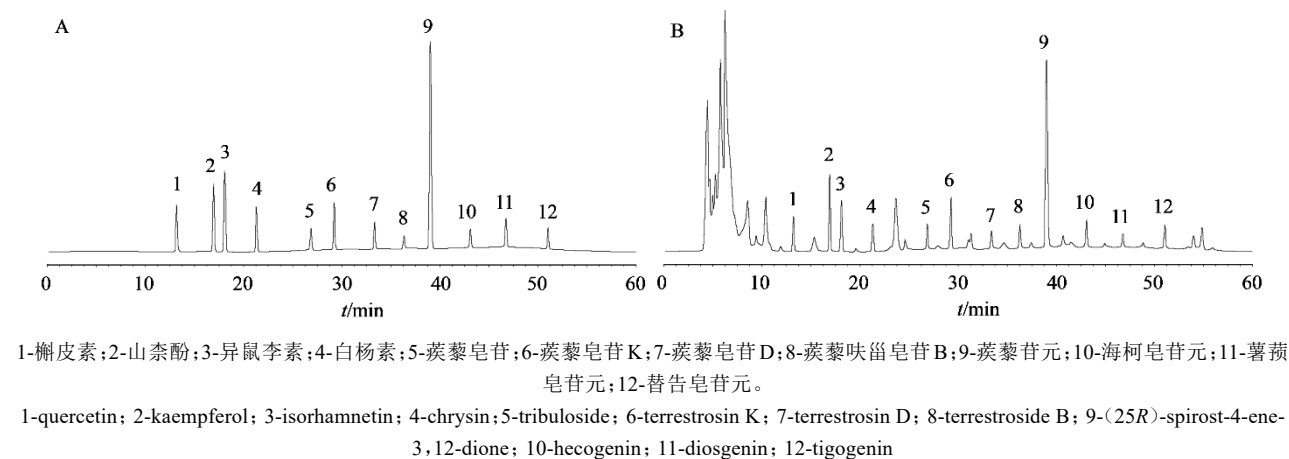


图1 对照品(A)和供试品(B)高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and test substance (B)

表2 12个对照品线性关系($n=6$)Table 2 Linear relationship of 12 reference substances ($n=6$)

对照品	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	回归方程	r
槲皮素	2.08~104.00	$Y=3.903\ 2\times 10^6 X+263.4$	0.999 4
山柰酚	3.65~182.50	$Y=4.501\ 6\times 10^6 X+1\ 096.3$	0.999 1
异鼠李素	4.26~213.00	$Y=4.985\ 3\times 10^6 X+891.5$	0.999 8
白杨素	1.89~94.50	$Y=4.109\ 6\times 10^6 X-694.1$	0.999 3
蒺藜皂苷	1.57~78.50	$Y=3.283\ 5\times 10^6 X-1\ 637.8$	0.999 5
蒺藜皂苷K	0.95~47.50	$Y=3.573\ 2\times 10^6 X+764.2$	0.999 7
蒺藜皂苷D	0.23~11.50	$Y=2.307\ 9\times 10^6 X+961.4$	0.999 9
蒺藜呋甙皂苷B	0.54~27.00	$Y=2.596\ 1\times 10^6 X+256.1$	0.999 3
蒺藜苷元	26.35~1 317.50	$Y=3.730\ 4\times 10^6 X+1\ 196.5$	0.999 8
海柯皂苷元	0.68~34.00	$Y=3.101\ 5\times 10^6 X-914.2$	0.999 5
薯蓣皂苷元	0.31~15.50	$Y=2.854\ 9\times 10^6 X+362.7$	0.999 7
替告皂苷元	0.19~9.50	$Y=1.924\ 7\times 10^6 X+1\ 146.2$	0.999 2

分别加入混合对照品溶液(每毫升溶液含0.237 mg 槲皮素、0.498 mg 山柰酚、0.621 mg 异鼠李素、0.207 mg 白杨素、0.159 mg 蒺藜皂苷、0.104 mg 蒺藜皂苷K、0.024 mg 蒺藜皂苷D、0.058 mg 蒺藜呋甙皂苷B、3.684 mg 蒺藜苷元、0.079 mg 海柯皂苷元、0.036 mg 薯蓣皂苷元和0.017 mg 替告皂苷元)0.8、1.0、1.2 mL,按照“2.2”项下方法制成加样供试品溶液,进样,计算12种成分的平均加样回收率及RSD值。结果显示12个成分平均加样回收率为96.92%~100.18%,RSD值均<2.0%,符合《中国药典》规定要求,表明该方法准确度高。

2.7 含量测定

分别取S1~S18的蒺藜粉末各约0.5 g,精密称定,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样,将峰面积代入标准曲线,计算槲皮素、山柰酚、异鼠李素、白杨素、蒺藜皂苷、蒺藜皂苷K、蒺藜皂苷D、蒺藜呋甙皂苷B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元的含量,结果见表3。

2.8 PCA、OPLS-DA质量评价体系的建立

2.8.1 PCA 以18批蒺藜中槲皮素、山柰酚、异鼠李素、白杨素、蒺藜皂苷、蒺藜皂苷K、蒺藜皂苷D、蒺藜呋甙皂苷B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元含量数据为变量,运用SPSS 26.0软件进行PCA,模型自动拟合选择了2个主成分(特征值>1),累积贡献率达到88.309%,表明2个主成分可以较好地解释原有变量包含的信息,具体数据见表4。PCA得分图(图2)显示18批蒺藜可分为3类,S9~S12为一组,S1~S8为一组,S13~S18为一组。

2.8.2 OPLS-DA 为深入分析查找蒺藜样品组间

差异性成分,运行SIMCA 14.1软件中的OPLS-DA程序,得OPLS-DA模型得分图(图3),结果模型参数 $R^2_x=0.928$, $R^2_y=0.818$, $Q^2=0.728$,均超过0.5,表明模型可用于区分不同产地的蒺藜^[17],18批蒺藜样品明显分布于3个象限。对建立的模型进行置换检验200次,结果见图4,最右侧的 R^2 、 Q^2 值均高于左边的 R^2 、 Q^2 值,表明OPLS-DA不存在过度拟合,可对不同产地的18批蒺藜进行有效判别^[17]。进一步以变量重要性投影(VIP)值>1为筛选标准^[18],筛选出18批蒺藜样品主要差异成分,结果见图5,分别为9号峰(蒺藜苷元,VIP=2.366)、3号峰(异鼠李素,VIP=1.424)、2号峰(山柰酚,VIP=1.176)和1号峰(槲皮素,VIP=1.141)。

2.9 GRA

由于18批蒺藜12个成分含量差异较大,需按照公式 $Y_{ij} = \frac{Z_{ij}}{Z_{vj}}$ (Z_{ij} 为12个评价指标HPLC法含量数据, Z_{vj} 为第 j 个评价指标含量检测结果的均值)进行标准化处理^[19],标准化处理后各成分的最大值为最优参考序列(Y_{bj}),最小值则为最差参考序列(Y_{sj}),再

根据公式 $C_{j(b)}^i = \frac{\Delta_{\min} + \rho\Delta_{\max}}{|Y_{ij} - Y_{bj}| + \rho\Delta_{\max}}$ 、 $C_{j(s)}^i =$

$\frac{\Delta'_{\min} + \rho\Delta'_{\max}}{|Y_{ij} - Y_{sj}| + \rho\Delta'_{\max}}$ (式中 $\Delta_{\min} = \min|Y_{ij} - Y_{bj}|$ 、 $\Delta_{\max} =$

$\max|Y_{ij} - Y_{bj}|$ 、 $\Delta'_{\min} = \min|Y_{ij} - Y_{sj}|$ 、 $\Delta'_{\max} = \max|Y_{ij} - Y_{sj}|$, ρ 为分辨系数,取值0.5)计算各评价单元相对于最

优、最差参考序列关联系数 $C_{j(b)}^i$ 和 $C_{j(s)}^i$ 。按公式

$R_{i(b)} = \frac{1}{12} \sum_{j=1}^{12} C_{j(b)}^i$ 、 $R_{i(s)} = \frac{1}{12} \sum_{j=1}^{12} C_{j(s)}^i$ 分别计算被评

表 3 不同产地蒺藜含量测定结果($n=3$)
Table 3 Determination results of *Tribuli Fructus* from different origins ($n=3$)

编号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)											
	槲皮素	山柰酚	异鼠李素	白杨素	蒺藜皂苷	蒺藜皂苷 K	蒺藜皂苷 D	蒺藜呋甙皂苷 B	蒺藜苷元	海柯皂苷元	薯蓣皂苷元	替告皂苷元
S1	0.957	1.983	2.516	0.812	0.629	0.413	0.091	0.236	14.721	0.312	0.137	0.074
S2	1.226	2.378	2.926	0.936	0.696	0.465	0.105	0.215	13.551	0.338	0.129	0.079
S3	1.366	2.458	1.969	1.045	0.679	0.644	0.089	0.249	11.744	0.329	0.093	0.077
S4	1.103	1.972	2.385	0.923	0.609	0.557	0.101	0.225	15.039	0.372	0.107	0.084
S5	1.181	2.181	2.789	0.998	0.643	0.527	0.099	0.231	14.526	0.346	0.122	0.087
S6	0.99	1.994	2.904	0.775	0.661	0.456	0.090	0.212	13.941	0.259	0.114	0.097
S7	1.148	2.309	2.246	1.020	0.590	0.583	0.084	0.242	16.090	0.358	0.104	0.089
S8	1.026	2.122	2.112	0.906	0.568	0.618	0.096	0.220	15.405	0.407	0.099	0.082
S9	0.779	2.079	1.360	0.580	0.535	0.670	0.078	0.200	12.098	0.284	0.078	0.105
S10	0.844	1.500	1.454	0.571	0.549	0.571	0.080	0.205	12.655	0.319	0.090	0.102
S11	0.599	1.932	1.310	0.627	0.499	0.683	0.076	0.194	11.719	0.293	0.072	0.111
S12	0.549	1.888	1.167	0.479	0.519	0.599	0.079	0.186	11.477	0.272	0.082	0.108
S13	0.882	1.845	3.848	0.890	0.806	0.404	0.144	0.298	17.723	0.400	0.154	0.063
S14	1.068	1.801	3.749	0.683	0.855	0.345	0.134	0.311	18.510	0.498	0.162	0.067
S15	0.746	1.738	3.580	0.951	0.771	0.498	0.139	0.292	18.871	0.422	0.169	0.061
S16	0.922	1.674	4.058	0.787	0.838	0.374	0.150	0.319	19.242	0.482	0.193	0.057
S17	0.719	1.611	4.192	0.522	0.819	0.337	0.129	0.305	18.113	0.448	0.177	0.070
S18	0.812	1.567	3.425	0.862	0.788	0.438	0.123	0.284	16.099	0.435	0.146	0.072

表 4 主成分特征值及方差贡献率
Table 4 Principal component eigenvalues and variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	8.177	68.145	68.145
2	2.420	20.164	88.309
3	0.508	4.233	92.542
4	0.278	2.319	94.862
5	0.212	1.767	96.628
6	0.165	1.378	98.006
7	0.089	0.745	98.751
8	0.068	0.563	99.314
9	0.038	0.313	99.627
10	0.025	0.210	99.837
11	0.012	0.104	99.941
12	0.007	0.059	100.000

价对象相对于最优参考序列和最差参考序列的关联度。再计算被评价对象的相对关联度(R_i), $R_i = \frac{R_{i(b)}}{R_{i(b)} + R_{i(s)}}$ 。按照 GRA 分析中相对关联度大小对 18 批蒺藜样品质量优劣进行排序, 结果见表 5。

GRA 分析中 R_i 值越大, 表明样品的综合质量越

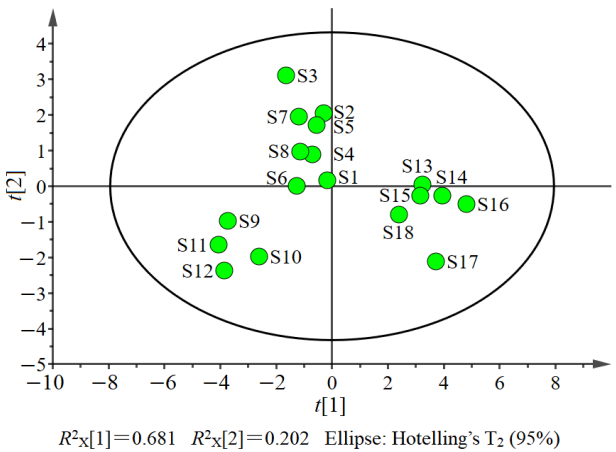


图 2 PCA 得分图
Fig. 2 PCA score chart

好。表 5 显示 R_i 值前 6 名是 $S16 > S14 > S15 > S13 > S17 > S18$, 表明这 6 批蒺藜质量相对较优。

3 讨论

在预试验中, 以各组分提取效果、色谱信息全面性、色谱峰丰度、杂质干扰等为指标, 分别考察了超声提取溶剂(50% 甲醇、75% 甲醇和 100% 甲醇)和提取时间(30、45、60 min), 结果显示甲醇超声提取 30 min 时 12 个成分的提取率较高, 同时杂质较少, 随着提取时间的延长, 含量无明显变化, 但杂质

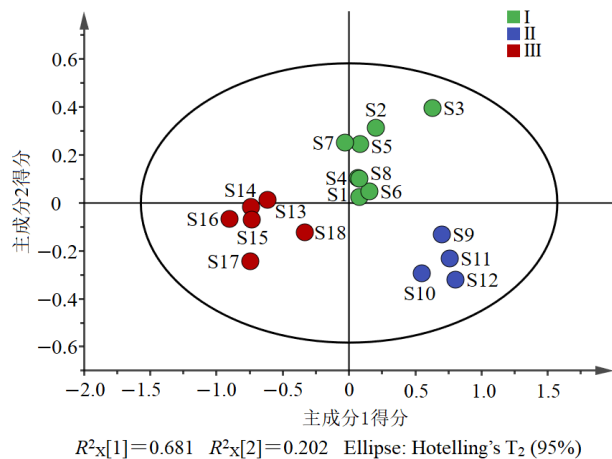


图3 OPLS-DA得分图

Fig. 3 Score chart of OPLS-DA

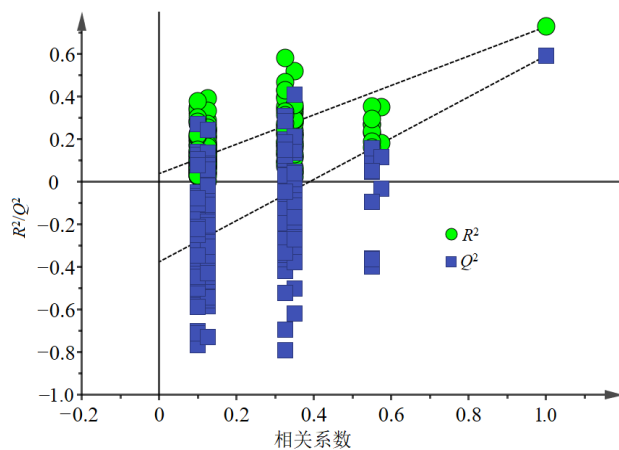


图4 OPLS-DA模型置换检验图

Fig. 4 OPLS-DA model permutation test chart

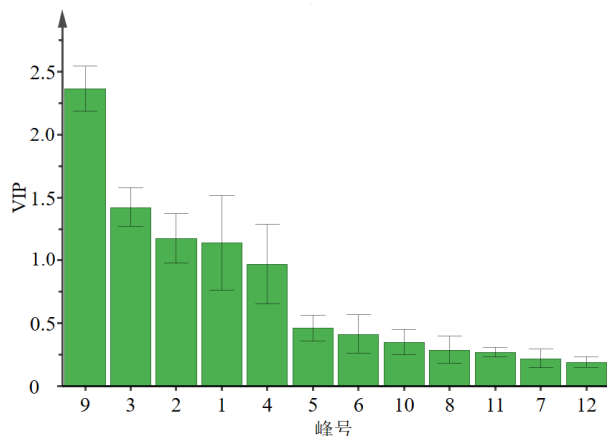


图5 OPLS-DA模型中的VIP图

Fig. 5 VIP plot of OPLS-DA model

干扰明显增加。同时与《中国药典》2020年版一部蒺藜项下蒺藜苷元检测方法进行了对比,结果显示蒺藜苷元含量无明显差异。故选择甲醇超声提取30 min为蒺藜供试品制备的最佳方法。考察了不同流动相系统(甲醇-0.1%磷酸溶液、甲醇-水、乙腈-

表5 18批蒺藜的质量排序

Table 5 Quality sort of 18 batches of *Tribuli Fructus*

编号	R_i	排序	编号	R_i	排序
S1	0.443 6	13	S10	0.370 4	17
S2	0.510 1	10	S11	0.377 9	16
S3	0.518 6	7	S12	0.339 7	18
S4	0.486 1	11	S13	0.560 0	4
S5	0.514 8	8	S14	0.578 3	2
S6	0.441 4	14	S15	0.564 0	3
S7	0.513 2	9	S16	0.597 1	1
S8	0.484 5	12	S17	0.526 8	5
S9	0.391 7	15	S18	0.518 7	6

水、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.05%磷酸溶液)不同洗脱程序对供试品溶液色谱图的影响。结果显示乙腈-0.05%磷酸溶液运行时,所得色谱图中基线平稳且色谱峰对称。

中药材所含化学成分众多,质量受产地、种属、炮制方法等因素影响,其临床疗效是多成分协同作用的结果,同时药效物质含量高低直接影响临床治疗效果。本实验在高效液相色谱多成分定量检测基础上,采用PCA及OPLS-DA法对蒺藜中槲皮素、山柰酚、异鼠李素、白杨素、蒺藜皂苷、蒺藜皂苷K、蒺藜皂苷D、蒺藜呋甾皂苷B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元定量结果进行分析,挖掘出引起蒺藜产品质量差异的主要标志物为蒺藜苷元、异鼠李素、山柰酚和槲皮素。不仅可以从整体角度评价不同产地的蒺藜质量差异,还充分体现不同产地蒺藜之间多种化学成分含量的细微差别。GRA结果显示,内蒙古、吉林产地的蒺藜整体质量较好。而且本实验所考察的样品覆盖地域跨度大,在一定程度上说明建立的方法可用于评价国内各地区蒺藜质量差异。

本试验采用HPLC法对蒺藜中槲皮素、山柰酚、异鼠李素、白杨素、蒺藜皂苷、蒺藜皂苷K、蒺藜皂苷D、蒺藜呋甾皂苷B、蒺藜苷元、海柯皂苷元、薯蓣皂苷元和替告皂苷元含量进行了同时检测,所建立的多组分定量控制模式简单、易推广,同时结合PCA、OPLS-DA及GRA模型对18批不同产地蒺藜各组分含量结果进行了综合分析,方法便捷、结果准确,可用于不同产地蒺藜质量差异分析。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 任洁,周慧,王晨. 蒺藜果实的化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(4): 808-813.

- Ren J, Zhou H, Wang C. Chemical constituents from fruits of *Tribulus terrester* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(4): 808-813.
- [2] 许丹丹, 杨洋, 宝艳儒, 等. 蒺藜化学成分及体内代谢的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4): 1594-1598.
- Xu D D, Yang Y, Bao Y R, et al. Research progress on chemical constituents and metabolism *in vitro* and *in vivo* of *Fructus Tribuli* [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34(4): 1594-1598.
- [3] 王文姣. 蒺藜化学成分及生物活性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- Wang W J. Study on chemical constituents and bio-activities of *Tribulus terrestris* L. [D]. Changchun: Jilin University, 2018.
- [4] 刘晓敏, 赵佳敏, 兰嘉豪, 等. 蒺藜果实化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4774-4779.
- Liu X M, Zhao J M, Lan J H, et al. Chemical constituents from fruits of *Tribulus terrestrer* and their antioxidant activity [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(15): 4774-4779.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 367.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020: 367.
- [6] 肖扬, 管小明, 廖光辉. 蒺藜及蒺藜皂苷治疗勃起功能障碍的研究进展 [J]. 中国性科学, 2023, 32(7): 108-112.
- Xiao Y, Guan X M, Liao G H. *Tribulus terrestris* and gross saponin of *Tribulus terrestris* in treating erectile dysfunction: An update [J]. Chin J Hum Sex, 2023, 32(7): 108-112.
- [7] 朱克春, 马萍. 蒺藜总皂苷对LPS诱导的巨噬细胞分泌IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-2、NO的影响和机制 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(16): 1958-1963.
- Zhu K C, Ma P. Effects and mechanism of gross saponins of tribulus terrestris on IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2 and NO secreted by LPS-induced macrophages [J]. Chin J Immunol, 2021, 37(16): 1958-1963.
- [8] 朱丹丹, 安丽凤, 黄敬文, 等. 基于网络药理学探究蒺藜治疗银屑病的分子作用机制 [J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(3): 396-401.
- Zhu D D, An L F, Huang J W, et al. Exploring the molecular mechanism of tribulus terrestris in the treatment of psoriasis based on network pharmacology [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2023, 32(3): 396-401.
- [9] 宝紫荆. 蒙药蒺藜有效成分的提取工艺、抗氧化作用及炮制品成分变化研究 [D]. 通辽: 内蒙古民族大学, 2023.
- Bao Z J. Study on the extraction process, antioxidant effect, and composition changes of processed products of Mongolian medicine *Tribulus terrestris* [D]. Tongliao: Inner Mongolia University for the Nationalities, 2023.
- [10] 宝紫荆, 王曦烨, 席海山, 等. 基于组学方法的蒺藜炮制前后药效成分变化分析 [J]. 内蒙古民族大学学报: 自然科学版, 2023, 38(2): 114-117.
- Bao Z J, Wang X Y, Xi H S, et al. Analysis of Pharmacodynamic components of *Tribulus Terrestris* before and after processing based on omics method [J]. J Inner Mongolia Minzu Univ (Natural Science Edition), 2023, 38(2): 114-117.
- [11] 姜凌宇. 杜仲-刺蒺藜药对通过调控lncRNA保护血管内皮的机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2018.
- Jiang L Y. The mechanism study of the protective effect of *Eucommia Ulmoides* terrestris herb couples on vascular endothelium by regulating lncRNAs [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [12] 薛起梅, 施海蔚, 钱叶飞, 等. 基于HPLC指纹图谱结合化学模式识别的黄蛭益肾胶囊质量控制 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(5): 956-963.
- Xue Q M, Shi H W, Qian Y F, et al. Quality control of Huangzhi Yishen Capsules based on HPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(5): 956-963.
- [13] 何佳, 黄文康, 马相锋, 等. 基于主成分分析与PLS-DA分析研究浙麦冬道地性与等级评价标准 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(4): 285-292.
- He J, Huang W K, Ma X F, et al. Geoherbalism and grand evaluation of Zhejiang *Ophiopogon japonicas* based on PCA and PLS-DA [J]. Chin Pharm J, 2021, 56(4): 285-292.
- [14] Pandey R K, Panda S S. Optimization of multiple quality characteristics in bone drilling using grey relational analysis [J]. J Orthop, 2014, 12(1): 39-45.
- [15] 李力, 潘倩雯, 刘宏. 灰色关联度分析法在中药谱效学研究中的应用 [J]. 中国药房, 2018, 29(11): 1581-1584.
- Li L, Pan QW, Liu H. Application of grey correlation analysis in the study of spectrum-effect of traditional Chinese medicine [J]. China Pharm, 2018, 29(11): 1581-1584.
- [16] 方惠娟, 毕开顺, 钱忠直, 等. HPLC-DAD-ELSD测定蒺藜中5个活性成分含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(6): 966-969.
- Fang H J, Bi K S, Qian Z Z, et al. HPLC-DAD-ELSD determination of five active components in *Tribulus terrestris* L [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(6): 966-969.
- [17] 王梦, 田伟, 王鑫国, 等. 彝族药姜味草指纹图谱的建立

- 和化学模式识别分析及含量测定 [J]. 中国药学杂志, 2022, 57(5): 342-349.
- Wang M, Tian W, Wang X G, et al. Fingerprint establishment, chemistry pattern recognition analysis and content determination of multicomponent of yi medicine *Micromeria biflora* (buch.-ham. ex D. don) Benth [J]. Chin Pharm J, 2022, 57(5): 342-349.
- [18] 苏建芬. 基于指纹图谱及多元统计分析评价藿香清胃片质量 [J]. 中国药师, 2022, 25(9): 1661-1666.
- Su J F. Quality evaluation of Huoxiang Qingwei Tablets by HPLC fingerprint and multivariate statistical analysis [J]. China Pharm, 2022, 25(9): 1661-1666.
- [19] 夏慧敏, 张慧文, 白云霞, 等. HPLC 指纹图谱技术结合灰色关联度法评价不同批次诃子质量 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(12): 1448-1453.
- Xia H M, Zhang H W, Bai Y X, et al. Evaluation of the quality of different batches of *Terminalia chebula* Retz. based on HPLC fingerprint technology and grey relational analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37 (12): 1448-1453.

[责任编辑 兰新新]