

基于 HPLC 指纹图谱、多成分定量结合化学计量学方法评价不同产地三棱药材的质量

徐 男^{1,2}, 孙 蓉³, 李元媛⁴, 黄 欣⁴, 王 亮¹, 张成博², 时海燕^{4*}

1. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

2. 山东中医药大学 中医学博士后流动站, 山东 济南 250355

3. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

4. 山东省千佛山医院, 山东 济南 250014

摘 要: **目的** 基于 HPLC 指纹图谱、多成分定量与化学计量学相结合的方法建立不同产地三棱质量评价方法。**方法** 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)对 7 省 12 批不同产地的三棱药材的 HPLC 指纹图谱进行相似度评价; 通过对照品比对指认 9 种化学成分, 并测定样品中 9 种成分含量; 使用 SPSS 20.0 软件进行聚类分析和主成分分析。**结果** 选取了 12 个色谱峰作为指纹图谱共有峰, 12 批样品的相似度计算结果均大于 0.800, 说明各产地的药材有较好的一致性; 测定了 5-羟甲基糠醛、香草酸、阿魏酸、对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸、香兰素、原儿茶酸、对香豆酸、异阿魏酸 9 种成分的含量; 通过聚类分析可将 12 批样品聚为 4 类; 主成分分析用 4 个主成分对三棱药材进行综合评价, 综合得分结果显示, 河南新乡、江苏镇江、河北沧州、湖南岳阳、浙江金华、河南郑州的三棱药材在所有样品中的综合得分位于前 6 名; 12 批饮片主成分综合得分与含量测定结果存在相关性。**结论** 建立的三棱质量评价方法操作简便、重复性好、结果可靠, 可用于全面评价三棱药材的质量。**关键词:** 三棱; 指纹图谱; 多成分定量; 化学计量学; 质量控制; 5-羟甲基糠醛; 香草酸; 阿魏酸; 对羟基苯甲醛; 对羟基苯甲酸; 香兰素; 原儿茶酸; 对香豆酸; 异阿魏酸

中图分类号: R282.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)07-1682-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.028

Quality evaluation of *Sparganii Rhizoma* based on combinative method of HPLC fingerprint, multi-component assay, and chemometrics

XU Nan^{1,2}, SUN Rong³, LI Yuan-yuan⁴, HUANG Xin⁴, WANG Liang¹, ZHANG Cheng-bo², SHI Hai-yan⁴

1. Shandong Research Academy of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Chinese Medicine Postdoctoral Mobile Station, Ji'nan 250355, China

3. Shandong University, Institute of Advanced Medical Sciences, Ji'nan 250012, China

4. Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Ji'nan 250014, China

Abstract: Objective To establish a combinative method based on HPLC fingerprint, multi-component assay, and pattern recognition for quality evaluation of *Sparganii Rhizoma*. **Methods** The similarity analyzed with "Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese Materia Medica 2004A", Nine kinds of components were identified by comparison with reference substances and their content in samples were determined and hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were performed by SPSS 20.0. **Results** There were 12 common peaks, and the similarity degrees of 12 batches of samples were more than 0.800, which showed that all the samples from different origins were of good consistency. Nine of them were identified as 5-hydroxymethylfurfural, vanillic acid, ferulic acid, *p*-hydroxybenzaldehyde, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillin, protocatechuic acid, *p*-coumaric acid, and isoferulic acid; The samples were divided into four clusters by HCA. The result of PCA showed, the quality of samples could be evaluated basically. According to the composite score, the quality of *Sparganii Rhizoma*

收稿日期: 2018-09-05

基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(2017-165); 山东省自然科学基金项目(ZR2015HL117); 山东省重点研发计划项目(2017CXGC1308); 山东省泰山学者工程专项(ts201511107)

作者简介: 徐 男(1982—), 男, 中药学博士, 中药新药开发与药效物质研究。E-mail: 93679706@qq.com

*通信作者 时海燕, 生药学博士, 中药药效物质基础研究。E-mail: shihaiyan123@163.com

from different origins, Henan Xinxiang, Jiangsu Zhenjiang, Hebei Cangzhou, Hunan Yueyang, Zhejiang Jinhua, and Henan Zhengzhou were better than others. There was a correlation between the scores of the main components of the 12 batches of decoction pieces and the results of the content determination. **Conclusion** The method is simple, reproducible, and reliable, it can be used for quality control and evaluation of *Sparganii Rhizoma* from different origins.

Key words: *Sparganii Rhizoma*; fingerprint; assay of multi-component; chemometrics; quality evaluation; 5-hydroxymethylfurfural; vanillic acid; ferulic acid; *p*-hydroxybenzaldehyde; *p*-hydroxybenzoic acid; vanillin; protocatechuic acid; *p*-coumaric acid; isoferulic acid

三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* (Graebn.) Buch. 的干燥块茎，可破血行气、消肿止痛，用于癥瘕痞块、痛经、瘀血经闭、胸痹心痛、食积胀痛。现代研究表明，三棱中主要含挥发油类、苯丙素类、黄酮类等化学成分，具有抗血栓、抗炎、镇痛、抗肿瘤等药理作用^[1]。众多学者对三棱的质量评价方法进行了大量的研究，包括总黄酮含量测定^[2]、指纹图谱分析^[3]、标准物质含量测定^[4-6]、生物效价测定^[7]等，但截至《中国药典》2015 年版三棱项下仍无定量分析方法。

指纹图谱作为一种综合的、可量化的色谱鉴定手段，能体现中药“多成分、多靶点”的作用特点，但指纹图谱提供的信息量过大，不利于统计分析，而聚类分析、主成分分析等可以对复杂的化学测量数据信息进行充分整合、正确表达，能真实、形象地反映中药质量差异，揭示复杂化合物之间的隐藏规律。课题组前期构建了三棱醋酸乙酯部位 HPLC 指纹图谱的分析方法^[8]。为了进一步研究并评价不同产地三棱的质量差异，本实验共收集了 7 省 12 批不同地区的三棱药材，收集的范围基本涵盖了三棱的主要产区。采用 HPLC 法建立了 12 批三棱的指纹图谱，利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2004A 版）对其进行相似度评价；指认并测定了其中 9 种成分的含量，分别为 5-羟甲基糠醛^[9]、香草酸^[9]、阿魏酸^[10]、对羟基苯甲醛^[9]、对羟基苯甲酸^[11]、香兰素^[11]、原儿茶酸^[11]、对香豆酸^[6]、异阿魏酸；运用 SPSS 软件对指纹图谱进行聚类分析和主成分分析研究，为探讨三棱质量评价方法提供指导和参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ-250E 型医用超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；FA1100 型电子分析天平（上海精密科学仪器有限公司）；METTLER AE 240 型电子分析天平（瑞士梅特勒公司）；PHS2-3C 型精密 pH 计（上海雷磁仪器厂）；LXJ-II 型离心沉淀机（上海医疗器械三厂）；箱式电阻炉（上海申光仪器仪表有限公司）；高效液相色谱仪、工作站及紫外检测器

（日本岛津公司）。

1.2 材料

对照品 5-羟甲基糠醛（批号 wkq16032605）、香草酸（批号 wkq16072801）、对羟基苯甲醛（批号 wkq16063004）、对羟基苯甲酸（批号 wkq16031704），购于四川省维克奇生物科技有限公司；阿魏酸（批号 HL-160518）、香兰素（批号 HL-160518）、原儿茶酸（批号 HL-160518）、对香豆酸（批号 HL-160518）、异阿魏酸（批号 HL-160518），购于西安汇林生物科技有限公司，所有对照品经 HPLC 峰面积归一化法检测质量分数均在 98% 以上；甲醇色谱纯，其他试剂均为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司，水为杭州娃哈哈纯净水；三棱药材样品分别来源于河北、河南、湖北、湖南、浙江、广西、江苏等地，见表 1。所有药材均经山东大学孙蓉教授鉴定为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* (Graebn.) Buch. 的干燥块茎，符合《中国药典》2015 年版一部规定。

表 1 12 批三棱样品的产地

Table 1 Sources of 12 batches of *Sparganii Rhizoma*

编号	产地	编号	产地
S1	河北安国	S7	广西玉林
S2	河南安阳	S8	河南新乡
S3	湖北荆门	S9	河南郑州
S4	湖北黄石	S10	江苏镇江
S5	浙江金华	S11	广西桂林
S6	湖南岳阳	S12	河北沧州

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别精密称取 5-羟甲基糠醛、香草酸、阿魏酸、对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸、香兰素、原儿茶酸、对香豆酸、异阿魏酸对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 444.4、59.8、171.6、444.4、83.6、261.3、266.2、224.0、233.8 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取三棱样品适量，粉碎后过 4 号筛，取 3 g，精密称定，置 250 mL 圆底烧瓶中，加入 80% 甲醇 100 mL，加热回流 60 min，滤过，水浴蒸干，加甲醇溶解定容至 5 mL，0.45 μm

微孔滤膜滤过, 即得。

2.2 色谱条件

InertSustain C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 40 ℃; 检测波长 254 nm; 体积流量为 0.8 mL/min; 进样量 25 μL; 流动相甲醇-0.1%甲酸溶液, 梯度洗脱: 0~60 min, 5%~100%甲醇。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一供试品溶液 (S1), 按“2.2”项下色谱条件, 重复进样 5 次, 测定, 结果各共有指纹色谱峰相对保留时间的平均 RSD 为 0.17%, 相对峰面积的平均 RSD 为 0.42%, 均小于 3%, 表明仪器精密度较好。

2.3.2 稳定性试验 取同一供试品溶液 (S1), 按“2.2”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、8、13、24 h 进样测定, 结果各共有指纹色谱峰相对保留时间的平均 RSD 为 0.34%, 相对峰面积的平均 RSD 为 2.49%, 均小于 3%。

2.3.3 重复性试验 取同一批三棱样品 (S1) 6 份, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进样测定, 结果各共有指纹色谱峰相对保留时间的平均 RSD 为 0.40%, 相对峰面积的平均 RSD 为 2.93%, 均小于 3%。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 三棱药材 HPLC 指纹图谱测定 分别取 12 批不同产地的三棱药材 3 g, 按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图 (图 1)。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A) 对 12 批三棱药材 HPLC 图谱进行处理, 共标定 12 个共有峰, 且该 12 个共有峰的总面积占总峰面积的 85%以上。经与对照品溶液色谱图比对后, 确认样品图谱中 2 号峰是 5-羟甲基糠醛, 4 号峰是香草酸, 6 号峰是阿魏酸, 7 号峰是对羟基苯甲醛, 8 号峰是对羟基苯甲酸, 9 号峰是香兰素, 10 号峰是原儿茶酸, 11 号峰是对香豆酸, 12 号峰是异阿魏酸。从图 1 中可以看出阿魏酸的色谱峰分离度较好, 峰面积所占比例较大且相对稳定, 因此选择阿魏酸 (6 号峰) 为参照峰, 建立三棱药材的指纹图谱, 见图 2。

2.4.2 相似度评价 将 12 批三棱样品指纹图谱数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A), 利用中位数法, 以 S1 号样品色谱图为参照图谱, 采用多点校正后进行自动匹配, 生成对照图谱, 以此作为三棱药材的对照指纹图谱, 进行相

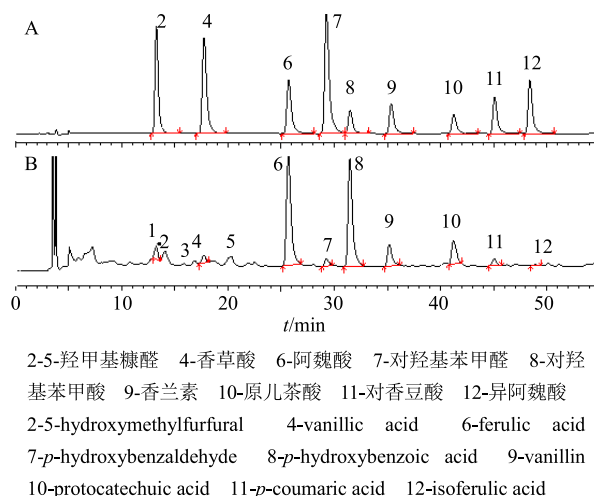


图 1 对照品 (A) 和三棱药材 (B) 色谱图

Fig. 1 HPLC fingerprints of reference (A) and *Sparganii Rhizoma* (B)

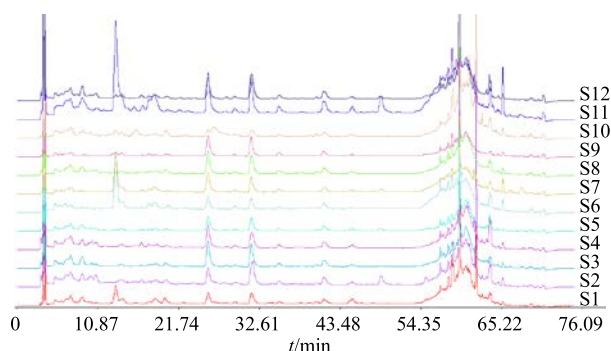


图 2 12 批三棱 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of 12 batches of *Sparganii Rhizoma*

似度评价, 其计算结果见表 2。12 批样品的相似度计算结果均大于 0.80, 说明各产地的药材有较好的一致性, 可以用于综合评价三棱药材的整体质量。

2.5 9 种成分的含量测定^[8]

分别精密吸取混合对照品溶液 1、5、10、15、20、25、50 μL, 按“2.2”项下色谱条件测定, 以对羟基苯甲酸等 9 个成分峰面积 (Y) 对进样量 (X) 进行回归处理, 建立回归方程, 见表 3。将 9 个成分的峰面积代入回归方程计算其在样品中的含量。结果见表 4。

表 2 12 批三棱药材相似度分析结果

Table 2 Results of similarity of 12 batches of *Sparganii Rhizoma*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.958	S7	0.921
S2	0.899	S8	0.878
S3	0.878	S9	0.901
S4	0.882	S10	0.892
S5	0.885	S11	0.890
S6	0.809	S12	0.883

表 3 各被测成分的标准曲线方程、线性范围和相关系数

Table 3 Regressive equations, linear ranges of investigated components and correlation coefficients

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
5-羟甲基糠醛	$Y=4\times 10^7 X-3\ 453$	10.000~4 000.000	0.999 5
香草酸	$Y=3\times 10^8 X-22\ 755$	1.345~ 538.000	0.999 5
阿魏酸	$Y=7\times 10^7 X-28\ 159$	4.130~1 652.000	0.999 6
对羟基苯甲醛	$Y=6\times 10^7 X-13\ 848$	10.000~4 000.000	0.999 5
对羟基苯甲酸	$Y=6\times 10^7 X-17\ 016$	1.880~ 752.000	0.999 6
香兰素	$Y=2\times 10^7 X-15\ 315$	5.880~2 352.000	0.999 5
原儿茶酸	$Y=2\times 10^7 X-15\ 590$	5.990~2 396.000	0.999 5
对香豆酸	$Y=3\times 10^7 X-20\ 027$	5.040~2 016.000	0.999 5
异阿魏酸	$Y=5\times 10^7 X-24\ 640$	5.260~2 104.000	0.999 5

表 4 12 批三棱样品中 9 种成分含量测定结果

Table 4 Results of determination of nine components in 12 batches of *Sparganii Rhizoma*

编号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)								
	5-羟甲基糠醛	香草酸	阿魏酸	对羟基苯甲醛	对羟基苯甲酸	香兰素	原儿茶酸	对香豆酸	异阿魏酸
S1	0.109 0	0.000 9	0.041 5	0.007 3	0.065 7	0.019 4	0.081 9	0.021 5	0.000 2
S2	0.000 4	0.001 2	0.060 0	0.005 8	0.148 0	0.036 6	0.150 2	0.008 1	0.054 7
S3	0.000 2	0.001 1	0.116 2	0.009 3	0.132 6	0.038 5	0.131 6	0.010 0	0.002 6
S4	0.000 5	0.001 4	0.096 6	0.013 7	0.101 5	0.035 2	0.131 7	0.014 6	0.002 3
S5	0.254 8	0.001 1	0.093 1	0.009 5	0.084 2	0.033 9	0.091 5	0.014 0	0.015 4
S6	0.342 0	0.002 1	0.049 5	0.014 1	0.051 1	0.027 3	0.098 6	0.008 8	0.000 6
S7	0.254 8	0.001 1	0.093 1	0.009 5	0.084 2	0.033 9	0.091 5	0.018 3	0.015 4
S8	0.008 0	0.021 6	0.008 1	0.112 3	0.013 6	0.076 3	0.019 0	0.001 9	0.000 1
S9	0.013 9	0.001 1	0.094 7	0.006 7	0.103 8	0.050 6	0.084 1	0.010 7	0.001 3
S10	0.031 5	0.000 8	0.013 4	0.007 2	0.042 3	0.020 3	0.082 1	0.004 2	0.000 1
S11	0.293 3	0.001 8	0.090 6	0.012 9	0.080 3	0.039 2	0.122 4	0.021 6	0.053 9
S12	0.014 2	0.001 1	0.097 4	0.009 1	0.165 3	0.039 9	0.180 2	0.007 8	0.019 6

2.6 聚类分析

将不同产地的三棱药材 HPLC 指纹图谱的 12 个共有峰的峰面积为特征, 得到 15×12 阶原始数据矩阵, 运用 SPSS 20.0 分析软件对其进行聚类分析, 采用组间连接法, 以欧式平方距离为测度, Z 标准化, 对样品进行聚类分析, 结果见图 3。从中可以看出, 12 个三棱药材样品总共可以聚为 4 类, 其中, S2、S3、S4、S12 聚为第 1 类; S1、S5、S6、S7、S9、S11 单独聚为第 2 类; S10 单独聚为第 3 类; S8 单独聚为第 4 类。从聚类分析结果来看, 三棱药材的指纹图谱与其地理位置、外界环境具有一定的相关性, 但不绝对相关。

2.7 主成分分析

采用 SPSS 20.0 统计软件对 12 个产地三棱药材的指纹图谱数据进行主成分分析, 将 12 批次样品 12 个共有峰峰面积导入 SPSS 20.0 软件, 进行主成分分析。对三棱药材共有峰峰面积 Z 标准化处理后, 计算相关系数矩阵, 主成分特征值、累积贡献率及

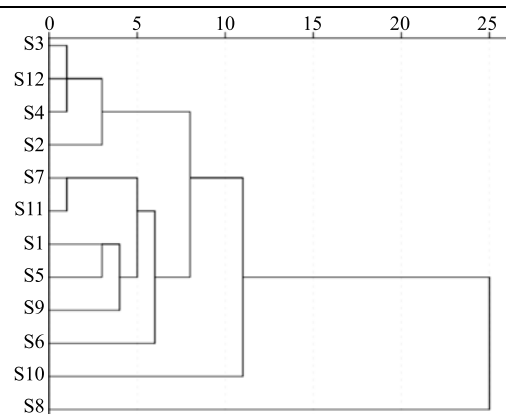


图 3 12 批三棱指纹图谱的聚类分析树状图

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis for 12 batches of *Sparganii Rhizoma*

主成分综合得分等。

2.7.1 相关性分析 相关系数矩阵见表 5。色谱峰 4(香草酸)和色谱峰 7(对羟基苯甲醛)、色谱峰 9(香兰素)相互之间均有较大相关性; 色谱峰 8(对羟基苯甲酸)和色谱峰 10(原儿茶酸)具有较大的正相关性。

表 5 相关系数矩阵

Table 5 Matrix of correlation coefficients

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.000	0.828	-0.202	-0.196	-0.293	-0.009	-0.190	-0.280	-0.309	-0.019	0.485	0.253
2	0.828	1.000	-0.358	-0.200	-0.185	0.087	-0.189	-0.331	-0.314	-0.124	0.503	0.198
3	-0.202	-0.358	1.000	-0.116	0.326	-0.444	-0.115	-0.053	-0.338	0.161	-0.512	-0.053
4	-0.196	-0.200	-0.116	1.000	0.060	-0.549	0.998	-0.547	0.820	-0.651	-0.484	-0.199
5	-0.293	-0.185	0.326	0.060	1.000	-0.006	0.069	0.257	-0.031	0.392	-0.402	-0.009
6	-0.009	0.087	-0.444	-0.549	-0.006	1.000	-0.535	0.722	-0.076	0.627	0.449	0.229
7	-0.190	-0.189	-0.115	0.998	0.069	-0.535	1.000	-0.558	0.812	-0.650	-0.468	-0.219
8	-0.280	-0.331	-0.053	-0.547	0.257	0.722	-0.558	1.000	-0.131	0.892	0.090	0.426
9	-0.309	-0.314	-0.338	0.820	-0.031	-0.076	0.812	-0.131	1.000	-0.369	-0.426	-0.009
10	-0.019	-0.124	0.161	-0.651	0.392	0.627	-0.650	0.892	-0.369	1.000	0.158	0.461
11	0.485	0.503	-0.512	-0.484	-0.402	0.449	-0.468	0.090	-0.426	0.158	1.000	0.270
12	0.253	0.198	-0.053	-0.199	-0.009	0.229	-0.219	0.426	-0.009	0.491	0.270	1.000

2.7.2 特征值、方差贡献率 相关系数的特征值和方差贡献率见表 6 和图 4。以特征值 >1 为提取标准, 得到前 4 个主成分的累积方差贡献率为 86.375% $>$ 85%, 故选取前 4 个主成分即可进行评价, 代表了三

棱药材中 12 个成分量的 86.375%的信息量, 具有很好的代表性, 足以评价三棱药材的品质。

根据因子荷载矩阵, 推测影响三棱药材质量差异的并不是单一成分, 而是多成分(群)的协同作

表 6 特征值和方差贡献率

Table 6 Characteristic value and variance contribution rate

峰号	初始特征值			提取平方和载入		
	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	4.494	37.446	37.446	4.495	37.446	37.446
2	2.860	23.834	61.280	2.860	23.834	61.280
3	1.843	15.362	76.642	1.843	15.362	76.642
4	1.168	9.733	86.375	1.168	9.733	86.375
5	0.795	6.627	93.002			
6	0.382	3.185	96.187			
7	0.222	1.850	98.037			
8	0.163	1.358	99.395			
9	0.047	0.391	99.786			
10	0.015	0.128	99.914			
11	0.010	0.086	100.000			
12	-2.336×10^{-16}	-1.947×10^{-15}	100.000			

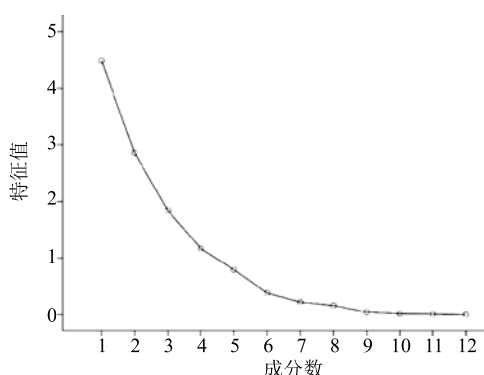


图 4 公共因子碎石图

Fig. 4 Macadam figure of common factor

用的结果。从表 7 和图 5 中可以看出, 第 1 主成分的信息主要来自于色谱峰 6、8、10、11; 第 2 主成分主要来自于色谱峰 3、5; 第 3 主成分主要来自于色谱峰 4、7、9 的信息; 第 4 主成分主要来自于色谱峰 1、2、12 的信息。

2.7.3 不同产地三棱药材的综合评价 用 4 个主成分对三棱药材进行综合评价, 将得到的特征向量与标准化后的数据相乘, 得到主成分表达式, 再以每个主成分所对应的特征值占提取主成分总的特征值之和的比例作为权重得到了主成分综合模型, 根据主成分综合模型计算 12 批三棱药材的主成分得分及综合得分值, 见表 8, 综合得分越高, 表明质

表 7 初始因子荷载矩阵

Table 7 Component matrix

色谱峰	主成分			
	1	2	3	4
1	0.287	-0.777	-0.153	0.393
2	0.276	-0.812	-0.087	0.325
3	-0.078	0.492	-0.769	0.180
4	-0.927	-0.030	0.276	0.212
5	-0.007	0.601	-0.151	0.440
6	0.709	0.113	0.558	-0.190
7	-0.924	-0.038	0.272	0.205
8	0.687	0.593	0.371	0.025
9	-0.675	0.129	0.682	0.123
10	0.792	0.498	0.095	0.259
11	0.605	-0.602	0.195	-0.162
12	0.438	-0.008	0.297	0.670

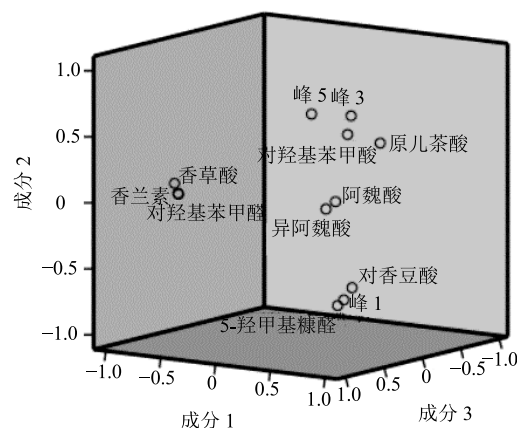


图 5 样本在 4 个主成分的平面分布图

Fig. 5 Samples in planar distribution of four main components

表 8 主成分得分、综合得分排序

Table 8 Rank of principal component scores and comprehensive scores

序号	主成分 1 得分	主成分 2 得分	主成分 3 得分	主成分 4 得分	综合得分	排名
S1	0.064	-0.272	-0.083	0.337	-0.021	9
S2	0.061	-0.284	-0.047	0.278	-0.025	10
S3	-0.017	0.172	-0.417	0.154	-0.014	8
S4	-0.206	-0.010	0.150	0.182	-0.039	11
S5	-0.001	0.210	-0.082	0.377	0.074	5
S6	0.158	0.039	0.303	-0.163	0.099	4
S7	-0.206	-0.013	0.147	0.175	-0.041	12
S8	0.153	0.207	0.201	0.021	0.140	1
S9	-0.150	0.045	0.370	0.106	0.022	6
S10	0.176	0.174	0.052	0.222	0.137	2
S11	0.135	-0.211	0.106	-0.139	0.003	7
S12	0.098	-0.003	0.161	0.574	0.117	3

量越好。综合得分结果显示，S8、S10、S12、S6、S5、S9 的三棱药材在所有样品中的综合得分位于前 6 名，表明该 6 个产地的三棱药材质量较好，对应药材指纹图谱信息，该 6 个产地的三棱药材的指纹图谱中主要成分 2、5、6、8、9、10、11、12 的峰面积值均较大，结果也证明了主成分分析时提取的 4 个主成分能够基本体现指纹图谱的所有信息。以 S1~S12 中阿魏酸等 8 个成分总量角度对样品进行打分，其中 5-羟甲基糠醛作为毒性成分不计入成分总量，发现各样品含量得分与主成分综合得分明显相关，见图 6，两者的相关系数为 0.973，提示香草酸、阿魏酸、对羟基苯甲酸、对羟基苯甲酸、香兰素、原儿茶酸、对香豆

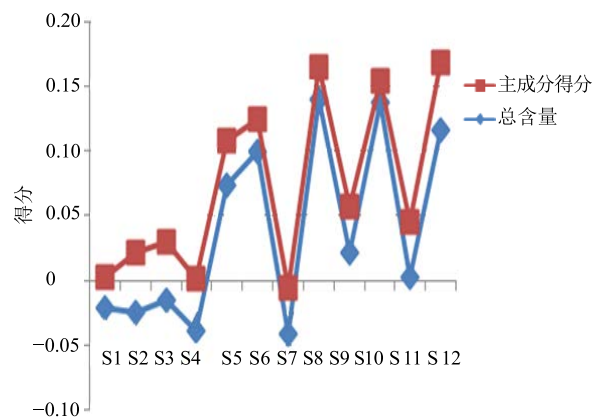


图 6 S1~S12 主成分得分及 9 种成分总量测定结果比较

Fig. 6 Comparison of main component comprehensive score and determination results of nine components

酸和异阿魏酸 8 种成分可作为指标性成分对三棱进行质量控制, 含量越高质量越好。

3 讨论

通过 HPLC-DAD 在 200~400 nm 进行全波段扫描, 综合考虑选取 254 nm 作为本实验的检测波长; 分别比较了甲醇、80%甲醇、50%甲醇、30%甲醇、水等不同溶剂系统的提取效果, 结果表明, 以 80%甲醇提取时各成分含量最高。对超声提取(30、60 min)和回流提取(30、60 min)条件进行考察, 结果回流提取效果最佳, 分离度较好, 故选择 80%回流提取 60 min。

本实验对 12 批不同产地三棱的 HPLC 指纹图谱进行相似度分析、聚类分析和主成分分析。结果发现 12 批不同产地三棱之间相似度较高, 聚类效果明显, 共聚为 4 类。采用 SPSS 20.0 分析软件以共有峰面积原始值为变量进行主成分分析, 确定 4 个主成分, 其方差贡献率依次为 37.446%、23.834%、15.362%、9.733%, 累积方差贡献率为 86.375%。根据初始因子载荷矩阵可知, 第 1 主成分说明了 4 个化合物的主要信息, 其中有已被指认的阿魏酸、对羟基苯甲酸、原儿茶酸和对香豆酸, 占化合物的数量最多, 含量最大。以各主成分的方差贡献率为权重系数, 对各主成分得分、综合得分进行计算, 通过综合得分对不同产地三棱质量进行排序, 结果显示, 河南新乡、江苏镇江、河北沧州、湖南岳阳、浙江金华、河南郑州的三棱药材在所有样品中的综合得分位于前 6 名; 另外, 河南安阳、新乡、郑州 3 地三棱药材主成分综合得分为-0.025、0.140、0.022, 说明即使来源于同一省份, 但在种植、采收、加工、储存、运输等环节中均会对其质量变化产生影响。

化学成分检测是目前绝大多数中药质量控制的主要手段, 但很多成分既缺乏专属性, 也没有生物活性, 这势必大大降低了中药质量标准的实际价值, 而且也很难真实反映中药的质量^[12]。中药质量标志物(Q-Marker)是在现有科学技术条件下提出的新概念, 对中药质量控制提出了新的要求^[13]。中药 Q-Marker 除了具有可测性的特点, 还应具有生物活性^[14]。本实验指认并测定了三棱中的 9 种成分, 其中 5-羟甲基糠醛有生殖毒性、胚细胞诱变毒性及致癌性等^[15], 不将其作为质量控制的化学成分; 香草酸、阿魏酸、对羟基苯甲醛、原儿茶酸具有抗血小板聚集作用^[16-17]; 对香豆酸具有抗炎和清除自由

基作用^[18-19]; 异阿魏酸能调节脂代谢^[20]; 对羟基苯甲酸、香兰素具有抗菌活性^[9]。将香草酸、阿魏酸、对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸、香兰素、原儿茶酸、对香豆酸、异阿魏酸 8 种成分含量得分与主成分综合得分进行比较, 结果发现二者明显相关, 表明该多成分含量测定方法可用于三棱药材质量的评价和控制, 较单一成分的测定更为全面准确, 对三棱的 Q-Marker 研究也具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 冯娅茹, 张文婷, 李二文, 等. 三棱化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4804-4818.
- [2] 张先洪, 毛春芹, 陆兔林, 等. 三棱饮片质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1384-1385.
- [3] 常乙玲, 吴启南, 梁侨丽, 等. 中药三棱 HPLC 指纹图谱的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(2): 135-136.
- [4] 张海波, 高 羽, 梁侨丽, 等. HPLC 测定中药三棱中游离阿魏酸和总阿魏酸含量 [J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(2): 169-171.
- [5] 吴 昊, 关树光, 朴文博, 等. 中药三棱的化学成分指认和指纹图谱研究 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(34): 431-433.
- [6] Wang X S, Wu Q N, Wu Y F, et al. Determination of seven phenolic compounds in *Rhizoma sparganii* by RP-HPLC [J]. *J Chromatogr Sci*, 2013, 51(4): 371-375.
- [7] 陈广云, 吴启南, 王新胜, 等. 生物效价测定法用于活血化痰中药三棱品质评价的研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2913-2916.
- [8] 徐 男, 曹铭晨, 黄 欣, 等. 三棱乙酸乙酯部位 HPLC 指纹图谱及 4 种酚类成分含量测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(18): 1783-1786.
- [9] 袁 涛, 华会明, 裴月湖. 三棱的化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1607-1610.
- [10] 袁 涛. 中药三棱化学成分的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [11] 王 艳. 中药三棱的化学成分, 质量标准及开发利用研究 [D]. 天津: 天津中医学院, 2005.
- [12] 刘昌孝. 从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3149-3154.
- [13] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [14] 熊 亮, 彭 成. 基于中药质量标志物(Q-Marker)的基本条件研究益母草和赶黄草的 Q-Marker [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2212-2220.
- [15] 潘 卓, 邵禾欣, 刘 婷, 等. 中药注射剂中安全性相

- 关物质 5-羟甲基糠醛的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1842-1846.
- [16] Nadal J M, Gomes M L, Borsato D M, *et al.* Spray-dried solid dispersions containing ferulic acid: Comparative analysis of three carriers, *in vitro* dissolution, antioxidant potential and *in vivo* anti-platelet effect [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42(11): 1813-1824.
- [17] Krga I, Vidovic N, Milenkovic D, *et al.* Effects of anthocyanins and their gut metabolites on adenosine diphosphate-induced platelet activation and their aggregation with monocytes and neutrophils [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 645: 34-41.
- [18] Neog M K, Joshua P S, Krishnan M, *et al.* *p*-Coumaric acid, a dietary polyphenol ameliorates inflammation and curtails cartilage and bone erosion in the rheumatoid arthritis rat model [J]. *Biofactors*, 2017, 43(5): 698-717.
- [19] Adel A M, Ahmed I Y, Abd El-Twab S M, *et al.* Gallic acid and *p*-coumaric acid attenuate type 2 diabetes-induced neurodegeneration in rats [J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32(4): 1279-1286.
- [20] Jairajpuri D S. Isoferulic acid action against glycation-induced changes in structural and functional attributes of human high-density lipoprotein [J]. *Biochemistry*, 2016, 81(3): 289-295.