

基于 UPLC 指纹图谱和多成分定量的辛夷药材产地差异性研究

李振雨, 何嘉莹, 童培珍, 魏 梅, 孙冬梅, 邓淙友, 陈向东*

广东一方制药有限公司, 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244

摘要: 目的 采用超高效液相色谱 (UPLC) 法建立辛夷花 *Magnolia biondii* 药材指纹图谱, 并同时测定 3 种有效成分的含量, 评价不同产地辛夷药材质量的差异。方法 采用 UPLC 法进行测定, 色谱柱为 YMC Triart C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 0.3 mL/min, 波长为 230 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 1 μL; 建立 15 批辛夷药材指纹图谱, 通过对照品比对, 对共有峰进行指认, 并对 3 种有效成分的含量进行测定; 对 15 批辛夷药材指纹图谱进行相似度评价、聚类分析 (HCA) 和主成分分析 (PCA), 并利用正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 寻找不同产地辛夷药材的差异性成分。结果 辛夷药材指纹图谱有 10 个共有峰, 指认出其中 3 个峰, 分别为松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱; 湖北、四川与河南产区药材的相似度为 0.585~0.793; HCA 和 PCA 分析将 15 批辛夷药材划分为 3 类, 分别对应 3 个不同的产区, OPLS-DA 法确定 7 个差异标志物, 差异显著性排序为木兰脂素>峰 4>松脂素二甲醚>峰 3>峰 8>峰 9>峰 10。河南产区辛夷木兰脂素和松脂素二甲醚含量最高, 湖北产区辛夷木兰花碱含量最高。结论 该方法能有效地分析不同产地辛夷药材质量的差异性, 为不同产地辛夷药材质量的评价提供参考。

关键词: 辛夷; UPLC 指纹图谱; 多成分定量; 差异标志物; 木兰脂素; 松脂素二甲醚

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)01-0234-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.028

Differences of *Magnoliae Flos* from different producing areas based on fingerprint and multi-components determination

LI Zhen-yu, HE Jia-ying, TONG Pei-zhen, WEI Mei, SUN Dong-mei, DENG Cong-you, CHEN Xiang-dong
Guangdong Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Guangdong Yifeng Pharmaceutical Co., Ltd.,
Foshan 528244, China

Abstract: Objective To evaluate the difference of *Magnoliae Flos* from different producing areas by establishing UPLC fingerprint and determining contents of three effective components of *Magnoliae Flos*. **Methods** UPLC method was adopted. The determination was performed on YMC Triart C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm) with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as the mobile phase by gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min. The detective wavelength was 230 nm, the column temperature was 30 ℃, the injection volume was 1 μL. The UPLC fingerprints of 15 batches of *Magnoliae Flos* were established and the common peaks were identified by reference substances. The contents of three effective components were determined. Similarity evaluation, cluster analysis (HCA), and principal component analysis (PCA) were carried out on the fingerprints and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) was used to find the different components of *Magnoliae Flos* from different producing areas. **Results** There were 10 common peaks in the fingerprints of *Magnoliae Flos*. By comparing with the reference substances, three common peaks were identified, namely, magnolin, pinosresinol dimethyl ether, and magnolflorine. The similarity among Hubei, Sichuan and Henan was 0.585—0.793. According to the analysis of HCA and PCA, 15 batches of *Magnoliae Flos* were divided into three categories, corresponding to three different producing areas. Seven kinds of biomarkers were determined by OPLS-DA method. The order of significance was magnolin > peak 4 > pinosresinol dimethyl ether > peak 3 > peak 8 > peak 9 > peak 10, respectively. The contents of magnolin and pinosresinol dimethyl ether in *Magnoliae Flos* of Henan Province were the highest and the content of magnolflorine in *Magnoliae Flos* of Hubei Province was the highest. **Conclusion** This method can effectively analyze the quality differences of *Magnoliae Flos* from different producing areas and provide reference for the quality evaluation.

Keywords: *Magnoliae Flos*; UPLC fingerprints; multi-components determination; differential marker; magnolin; pinosresinol dimethyl ether

收稿日期: 2020-05-10

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (2018B030323004)

作者简介: 李振雨 (1989—), 主管中药师, 从事中药饮片及中药配方颗粒研究。

*通信作者: 陈向东, 高级工程师, 从事中药饮片及中药配方颗粒研究。E-mail: 1083656123@qq.com

辛夷为木兰科植物望春花 *Magnolia biondii* Pamp.、玉兰 *Magnolia denudata* Desr.或武当玉兰 *Magnolia sprengeri* Pamp.的干燥花蕾,具有散风寒、通鼻窍的作用,用于治疗风寒头痛、鼻塞流涕、鼻渊、鼻渊^[1]。历代本草都有关于辛夷的记载,《神农本草经》将其列为上品。现代化学和药理学研究表明,辛夷主要含挥发油、木脂素、黄酮、生物碱等多种有效成分,具有抗炎、抗过敏、降压、兴奋子宫等药理作用,临床上多用于治疗鼻炎及鼻窦炎^[2-5]。目前,辛夷药材的质量评价多集中在对挥发油和木脂素类成分的测定上^[6-8],对一些水溶性较大的有效成分研究较少。中药成分复杂,针对不同的疾病,发挥作用的有效成分不同,本实验以超高效液相色谱法(UPLC)指纹图谱结合多成分定量,增加对水溶性生物碱的测定,分析不同产地辛夷药材的质量差异,为不同产地辛夷药材的质量评价提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters H-Class 型超高效液相色谱仪(美国沃特世公司);YMC Triart C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm, 日本 YMC 公司),万分之一天平(ME204E, 梅特勒-托利多公司);百万分之一天平(XP26, 梅特勒-托利多公司);JJ600 型百分之一天平(常熟市双杰测试仪器厂);KQ500D 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HWS28 型恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司);超纯水系统(Milli-Q 级, 德国默克股份有限公司)。

1.2 试剂与试药

除液相用甲醇、乙腈(默克股份有限公司),磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司)为色谱级,其余试剂皆为分析纯。对照品木兰脂素(批号 110882-201708, 质量分数为 96.5%, 中国食品药品检定研究院);木兰花碱(批号 wkq17063003, 质量分数为 98.0%, 四川维克奇生物科技有限公司);松脂素二甲醚(批号 1506434, 质量分数为 100.0%, 伊普赛诺公司);辛夷对照药材(批号 121079-200704, 中国食品药品检定研究院);15 批辛夷药材经广东一方制药有限公司魏梅主任药师鉴定均为木兰科植物望春花 *Magnolia biondii* Pamp. 的干燥花蕾,经检验,均符合《中国药典》2015 年版的規定,药材信息见表 1。

表 1 15 批辛夷药材来源信息

Table 1 Origin information of 15 batches of *Magnoliae Flos*

编号	药材批号	产地
S1	G1703119	湖北省宜昌市
S2	G1703120	湖北省宜昌市
S3	G1703121	湖北省宜昌市
S4	G1703147	河南省平顶山市
S5	G1703148	河南省平顶山市
S6	G1703149	河南省平顶山市
S7	G1703182	河南省南阳市
S8	G1703183	河南省南阳市
S9	G1703184	河南省南阳市
S10	G1808113	河南省洛阳市
S11	G1808114	河南省洛阳市
S12	G1808115	河南省洛阳市
S13	G1703022	四川省广元市
S14	G1703023	四川省广元市
S15	G1703024	四川省广元市

2 方法与结果

2.1 辛夷药材 UPLC 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱:YMC Triart C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B);梯度洗脱(0~15 min, 10%~15% A; 15~25 min, 15%~38% A; 25~35 min, 38%~44% A; 35~39 min, 44%~100% A; 39~40 min, 100% A),体积流量 0.30 mL/min;检测波长为 230 nm;柱温为 30 ℃;进样量为 1 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 取松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱对照品适量,加 50%乙醇制成含松脂素二甲醚 50 μg/mL、木兰脂素 80 μg/mL、木兰花碱 100 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 对照药材参照物溶液的制备 取辛夷对照药材约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%乙醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)45 min,放冷,再称定质量,用 50%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 供试品溶液的制备 取辛夷药材粉末(过二号筛)约 0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50%乙醇 50 mL,称定质量,超声处理(功率 300 W、频率 40 kHz)45 min,放冷,再称定质量,用 50%乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.5 精密度试验 取辛夷药材(批号 G1703182)供试品溶液,按“2.1.1”项下确定的色谱条件连续进样 6 次,检测指纹图谱,以木兰脂

素色谱峰为参照峰 (S), 计算各共有指纹峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 取同一批次的辛夷药材粉末 (批号 G1703182) 共计 6 份, 按“2.1.4”项下确定的供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液, 分别进样测定, 检测指纹图谱, 以木兰脂素色谱峰为参照峰, 计算各共有指纹峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 取辛夷药材 (批号 G1703182) 供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析, 检测指纹图谱, 以木兰脂素色谱峰为参照峰, 计算各共有指纹峰与参照峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3.0%, 说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.8 指纹图谱的建立及共有峰标定 取 15 批辛夷药材样品, 按“2.1.4”项下确定的供试品溶液制备方法制备供试品溶液, 另取辛夷对照药材, 按“2.1.3”项下方法制备对照药材参照物溶液, 分别按“2.1.1”项下确定的色谱条件, 进样测定, 记录各样品的色谱图, 并导出指纹图谱, 将 15 批辛夷药材指纹图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件中, 以编号为 S1 样品 (批号 G1703052) 的指纹图谱为参照图谱, 以 2 号峰为 Mark 峰进行保留时间校正, 同时进行全峰匹配, 15 批辛夷药材指纹图谱叠加图见图 1, 以平均数法生成辛夷药材对照指纹图谱, 见图 2。查阅相关文献报道^[9], 以及与对照品的保留时间进行比对, 并结合紫外吸收光谱图, 确定峰 2 为木兰花碱, 峰 5 为松脂素二甲醚, 峰 6 为木兰脂素。由于木兰脂素为辛夷的主要有效成分之一, 对照品易得, 并且该成分色谱峰面积最大, 分离度较好, 因此选择木兰脂素色谱峰为参照峰, 标定出 10 个共有指纹峰, 计算各指纹峰的相对保留时间和相对峰面积, 各指纹峰的相对保留时间 RSD 值在 0.05%~1.39%, 相对峰面积 RSD 值在 14.86%~107.18%, 结果见表 2、3。以辛夷对照药材为参照, 辛夷药材样品指纹图谱的 10 个共有指纹峰与对照药材色谱中相应的色谱峰能够一一对应, 说明 15 批辛夷药材与对照药材基原的一致性, 10 个共有指纹峰能很好地表征辛夷药材的特征。

2.1.9 相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似

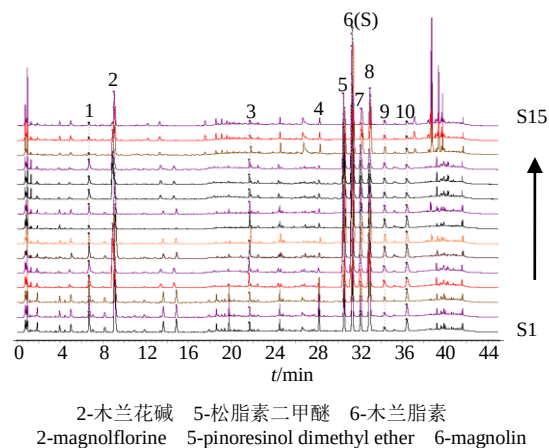


图 1 15 批辛夷药材 UPLC 指纹图谱
Fig. 1 UPLC fingerprints of 15 batches of *Magnoliae Flos*

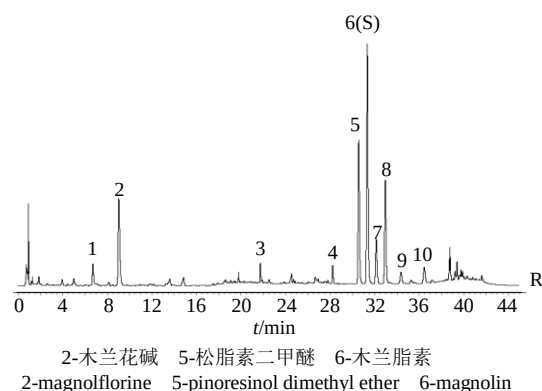


图 2 辛夷药材对照指纹图谱
Fig. 2 Reference fingerprint of *Magnoliae Flos*

度评价系统”计算 15 批辛夷药材指纹图谱的相似度 (表 4), 结果显示, 以省划分产区, 同一产区的辛夷药材指纹图谱的相似度值均大于 0.90, 不同的产区的四川和湖北 2 地采集的辛夷药材, 指纹图谱的相似度也大于 0.90, 但与河南产区药材的相似度只有 0.585~0.793, 说明四川、湖北的辛夷药材在化学成分上与河南存在较大的差异。

2.1.10 聚类分析 使用 SPSS 20.0 软件, 以 10 个共有指纹峰的峰面积为变量, 采用 Z 得分法进行数据标准化处理, 以组间联接法进行系统聚类, 结果见图 3, 15 批辛夷药材被聚成 3 类, 湖北、四川和河南 3 个产区的辛夷药材各自聚为一类, 分类结果明显与药材产地密切相关, 聚类分析的结果与指纹图谱的相似度计算结果相似。

2.1.11 主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 采用 SIMCA14.1 软件, 以 10 个共有指纹峰峰面积积分值为变量进行 PCA, 共生成 5 个主成分, 累积贡献率达到 99.5%,

表 2 15 批辛夷药材指纹图谱共有峰的相对保留时间

Table 2 Relative retention time of common peaks in fingerprints of 15 batches of *Magnoliae Flos*

编号	相对保留时间									
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10
S1	0.211	0.286	0.694	0.901	0.976	1.000	1.026	1.051	1.094	1.160
S2	0.215	0.291	0.694	0.901	0.976	1.000	1.025	1.052	1.097	1.164
S3	0.218	0.297	0.695	0.902	0.976	1.000	1.025	1.051	1.097	1.163
S4	0.216	0.292	0.694	0.902	0.976	1.000	1.026	1.052	1.097	1.164
S5	0.218	0.296	0.695	0.902	0.976	1.000	1.025	1.051	1.097	1.164
S6	0.215	0.291	0.694	0.902	0.976	1.000	1.026	1.052	1.097	1.163
S7	0.214	0.291	0.694	0.902	0.976	1.000	1.026	1.052	1.096	1.163
S8	0.215	0.291	0.694	0.902	0.976	1.000	1.026	1.052	1.097	1.164
S9	0.209	0.285	0.694	0.902	0.975	1.000	1.026	1.051	1.094	1.161
S10	0.215	0.291	0.694	0.901	0.976	1.000	1.026	1.052	1.096	1.163
S11	0.215	0.291	0.694	0.901	0.976	1.000	1.025	1.052	1.097	1.164
S12	0.209	0.284	0.694	0.901	0.975	1.000	1.026	1.051	1.094	1.160
S13	0.215	0.292	0.694	0.901	0.976	1.000	1.025	1.052	1.097	1.164
S14	0.214	0.285	0.693	0.901	0.975	1.000	1.026	1.052	1.097	1.165
S15	0.214	0.285	0.693	0.901	0.975	1.000	1.026	1.052	1.097	1.165
RSD/%	1.25	1.39	0.08	0.06	0.05	1.00	0.05	0.05	0.11	0.14

表 3 15 批辛夷药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 3 Relative peak area of common peaks in fingerprints of 15 batches of *Magnoliae Flos*

编号	相对峰面积									
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 10
S1	0.267	1.028	0.066	0.240	0.519	1.000	0.290	1.603	0.055	0.222
S2	0.193	0.955	0.059	0.241	0.500	1.000	0.290	1.584	0.055	0.222
S3	0.244	0.919	0.059	0.236	0.498	1.000	0.285	1.537	0.054	0.218
S4	0.010	0.066	0.042	0.020	0.591	1.000	0.123	0.255	0.050	0.073
S5	0.008	0.077	0.045	0.018	0.603	1.000	0.131	0.219	0.052	0.065
S6	0.060	0.277	0.039	0.015	0.517	1.000	0.122	0.229	0.055	0.072
S7	0.050	0.227	0.038	0.021	0.589	1.000	0.131	0.268	0.048	0.078
S8	0.012	0.087	0.041	0.016	0.565	1.000	0.131	0.251	0.052	0.077
S9	0.051	0.276	0.034	0.018	0.516	1.000	0.178	0.215	0.047	0.055
S10	0.072	0.390	0.032	0.027	0.538	1.000	0.202	0.226	0.053	0.050
S11	0.069	0.355	0.034	0.024	0.555	1.000	0.214	0.197	0.055	0.044
S12	0.074	0.380	0.032	0.019	0.578	1.000	0.196	0.168	0.050	0.036
S13	0.043	0.677	0.062	0.139	0.402	1.000	0.580	1.334	0.142	0.129
S14	0.049	0.801	0.034	0.103	0.390	1.000	0.594	1.277	0.145	0.131
S15	0.043	0.762	0.060	0.131	0.356	1.000	0.657	1.290	0.150	0.126
RSD/%	99.39	69.87	27.51	107.18	14.86	0.00	66.97	87.56	54.79	61.98

表 4 15 批辛夷药材相似度

Table 4 Similarity analysis forms of *Magnoliae Flos*

相似度	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
S1	1.000	0.994	0.994	0.588	0.744	0.699	0.699	0.645	0.692	0.723	0.701	0.689	0.961	0.956	0.959
S2	0.994	1.000	0.985	0.586	0.743	0.696	0.697	0.643	0.689	0.721	0.698	0.687	0.955	0.950	0.960
S3	0.994	0.985	1.000	0.585	0.740	0.694	0.695	0.641	0.688	0.719	0.696	0.685	0.956	0.951	0.961
S4	0.588	0.586	0.585	1.000	0.939	0.973	0.978	0.993	0.976	0.953	0.961	0.954	0.712	0.636	0.708
S5	0.744	0.743	0.740	0.939	1.000	0.990	0.989	0.965	0.988	0.993	0.992	0.992	0.792	0.772	0.790
S6	0.699	0.696	0.694	0.973	0.990	1.000	0.997	0.985	0.999	0.994	0.995	0.993	0.773	0.734	0.770
S7	0.699	0.697	0.695	0.978	0.989	0.997	1.000	0.993	0.996	0.988	0.990	0.987	0.775	0.725	0.772
S8	0.645	0.643	0.641	0.993	0.965	0.985	0.993	1.000	0.985	0.966	0.972	0.966	0.742	0.669	0.738
S9	0.692	0.689	0.688	0.976	0.988	0.999	0.996	0.985	1.000	0.996	0.997	0.995	0.776	0.740	0.773
S10	0.723	0.721	0.719	0.953	0.993	0.994	0.988	0.966	0.996	1.000	0.999	0.998	0.793	0.777	0.791
S11	0.701	0.698	0.696	0.961	0.992	0.995	0.990	0.972	0.997	0.999	1.000	0.999	0.777	0.758	0.775
S12	0.689	0.687	0.685	0.954	0.992	0.993	0.987	0.966	0.995	0.998	0.999	1.000	0.761	0.747	0.758
S13	0.961	0.955	0.956	0.712	0.792	0.773	0.775	0.742	0.776	0.793	0.777	0.761	1.000	0.972	0.997
S14	0.956	0.950	0.951	0.636	0.772	0.734	0.725	0.669	0.740	0.777	0.758	0.747	0.972	1.000	0.972
S15	0.959	0.960	0.961	0.708	0.790	0.770	0.772	0.738	0.773	0.791	0.775	0.758	0.997	0.972	1.000

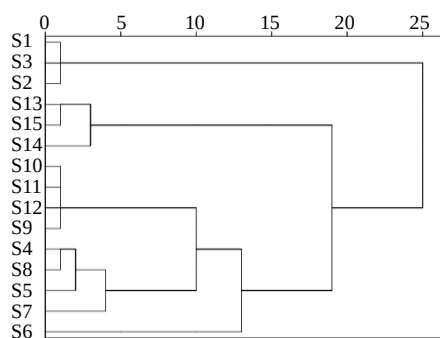


图 3 系统聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram for systematic clustering

其中前 2 个主成分累积贡献率达到 81.2%，Q2 为 0.919，证明模型有效。以 PCA 得分和峰面积变量得到 Scores 图和 Loading 图（图 4、5），结果显示，湖北、四川和河南 3 个产区的药材分别聚集在 3 个不同的区域，得到较好地区分，说明不同产地辛夷药材化学成分具有较大差异。根据变量离原点的距离判断变量对主成分的影响权重，距离原点越远，变量对主成分的影响权重越大，分析变量对主成分 1 的影响权重大小依次为峰 4、9、8、木兰脂素和松脂素二甲醚，变量对主成分 2 的影响权重大小依次为峰 10、1、3。根据 PCA 分析结果，将湖北、四川和河南 3 个产区的药材分 3 组，以 10 个共有指纹峰峰面积积分值为变量进行 OPLS-DA 分析，得到 10 个变量的 VIP 图（图 6），以 $VIP > 1.0$ 为显著影响，共找到 7 个差异标志物，对其影响显著性排序，分别为木兰脂素 > 峰 4 > 松脂素二甲醚 > 峰 3 > 峰 8 > 峰 9 > 峰 10，说明不同产区的辛夷药材木兰脂素和松脂素二甲醚的含量存在显著差异。

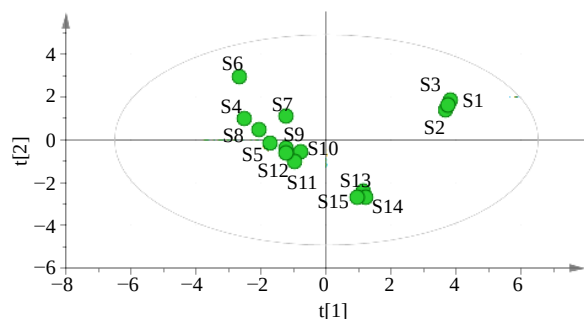


图 4 15 批辛夷药材 Scores 图

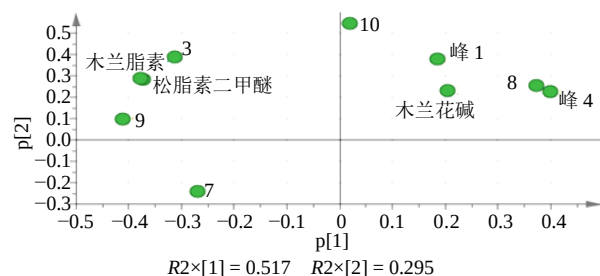
Fig. 4 Scores scatter plot of 15 batches of *Magnoliae Flos*

图 5 辛夷药材色谱峰变量 Loading 图

Fig. 5 Loading scatter plot of peak variable of *Magnoliae Flos*

小依次为峰 10、1、3。根据 PCA 分析结果，将湖北、四川和河南 3 个产区的药材分 3 组，以 10 个共有指纹峰峰面积积分值为变量进行 OPLS-DA 分析，得到 10 个变量的 VIP 图（图 6），以 $VIP > 1.0$ 为显著影响，共找到 7 个差异标志物，对其影响显著性排序，分别为木兰脂素 > 峰 4 > 松脂素二甲醚 > 峰 3 > 峰 8 > 峰 9 > 峰 10，说明不同产区的辛夷药材木兰脂素和松脂素二甲醚的含量存在显著差异。

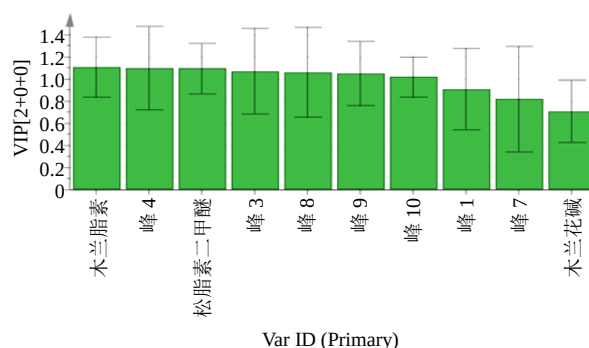


图 6 辛夷药材 VIP 图

Fig. 6 VTP plot of *Magnoliae Flos*

2.2 有效成分的测定

2.2.1 线性关系考察 取松脂素二甲醚、木兰脂素及木兰花碱对照品适量，精密称定，加 50%乙醇制成含对照品松脂素二甲醚 10.1054 $\mu\text{g/mL}$ ，木兰脂素 1439.281 $\mu\text{g/mL}$ ，木兰花碱 739.753 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品储备液。精密移取混合对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1.5、2.5、5.0 mL，分别置 10 mL 量瓶中，加 50%乙醇至刻度，摇匀，得到分别含松脂素二甲醚 10.105、20.211、50.527、151.581、252.635、505.270 $\mu\text{g/mL}$ ，木兰脂素 14.393、28.786、57.571、143.928、431.784、719.641 $\mu\text{g/mL}$ 、木兰花碱 7.398、14.795、36.988、110.963、184.938、369.877 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液，分别精密吸取上述 6 个不同质量浓度的对照品溶液各 1 μL ，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，以色谱峰峰面积为纵坐标（Y），对照品质量浓度为横坐标（X）进行线性回归，绘制标准曲线，3 种成分的线性回归方程和线性范围见表 5。

2.2.2 精密度试验 取“2.1.4”项下供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱方法连续进样 6 次，记录松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱的峰面积，并计算松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱峰面积 RSD 值。

表 5 3 种成分的线性回归方程及线性范围

Table 5 Regression equations coefficient correlation of references and linear ranges of three effective components

对照品	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	标准曲线	R^2
松脂素二甲醚	10.11~505.27	$Y=10\,027\,X+2245$	0.999 9
木兰脂素	14.39~719.64	$Y=7016\,X+19\,545$	0.999 5
木兰花碱	7.40~369.88	$Y=7221\,X+6316$	0.999 9

分别为 0.57%、0.68%、0.29%，结果表明仪器精密程度良好。

2.2.3 稳定性试验 取“2.1.4”项下供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析，记录松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱的峰面积，并计算不同时间点松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱峰面积 RSD 值，分别为 0.81%、1.26%、0.95%。

2.2.4 重复性试验 取同批次辛夷药材粉末，按“2.1.4”项下确定的供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液，并按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，计算松脂素二甲醚、木兰脂素、木兰花碱的质量分数分别为 20.02、50.10、4.92 mg/g，RSD 值分别为 1.52%、0.27%和 1.95%，说明该方法重复性良好。

2.2.5 加样回收率试验 取辛夷药材粉末（批号 G1703182，过二号筛）约 0.1 g，精密称定，按样品与对照品松脂素二甲醚、木兰脂素、木兰花碱的含量比为 1:0.5、1:1 及 1:1.5 加入松脂素二甲醚、木兰脂素、木兰花碱对照品，每种比例平行 3 份，按“2.1.4”项下方法制备 9 份供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，计算 3 种成分的回收率范围及 RSD 值，松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱的加样回收率分别为 95.20%~99.71%、95.94%~101.99%、90.42%~99.65%，平均加样回收率分别为 98.16%、99.42%、96.99%，RSD 分别为 1.60%、2.15%、和 3.00%，均小于 4.0%，表明该分析方法准确度良好。

2.2.6 中间精密度试验 由本项目组其他分析人员在不同日期和不同色谱仪下操作，取同一批辛夷药材粉末（过二号筛）约 0.2 g，精密称定，平行 6 份，按“2.1.4”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，计算松脂素二甲醚、木兰脂素、木兰花碱的质量分数分别为 20.18、50.87、4.99 mg/g，与 6 份重复性试验样品的 RSD 分别为 0.56%、1.27%和 1.69%，表明该方法中间精密度良好。

2.2.7 样品测定 取 15 批辛夷药材粉末，按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，按外标法计算各批次样品松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱的含量，结果见表 6，15 批辛夷药材松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱的总量在 1.71%~8.02%。

表 6 样品测定结果 (n=15)

Table 6 Determination results of samples (n = 15)

批号	松脂素二甲醚/%	木兰脂素/%	木兰花碱/%	总量/%
S1	0.69	1.54	0.86	3.09
S2	0.67	1.45	0.80	2.92
S3	0.64	1.43	0.78	2.85
S4	2.42	4.35	0.17	6.94
S5	1.97	3.79	0.14	5.90
S6	2.49	4.43	0.80	7.72
S7	2.12	5.40	0.50	8.02
S8	2.09	4.62	0.19	6.90
S9	1.69	3.83	0.55	6.07
S10	1.61	2.77	0.67	5.05
S11	1.54	3.07	0.60	5.21
S12	1.84	2.32	0.72	4.88
S13	0.36	1.03	0.38	1.77
S14	0.33	0.99	0.43	1.75
S15	0.31	0.99	0.41	1.71

《中国药典》2015 年版辛夷药材项下规定木兰脂素的含量应不低于 0.40%，15 批样品均符合药典的规定，其中湖北产地的 3 批药材木兰脂素的含量是药典限度的 3~4 倍，河南产地的 9 批药材木兰脂素的含量是药典限度的 6~14 倍，四川产地的 3 批药材木兰脂素的含量是药典限度的 2~3 倍，此外，木兰花碱的含量以湖北最高，松脂素二甲醚的含量以河南最高，3 种有效成分的总含量，以河南最高，分别为湖北的 2~3 倍，四川的 3~5 倍。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

与 HPLC 相比，UPLC 法因分辨率高、分离能力强、分析时间缩短，在中药指纹/特征图谱的建立方面优势明显^[10]。本实验采用 UPLC 谱，在 45 min 内，即完成主要色谱峰的良好分离，其中松脂素二甲醚、木兰脂素和木兰花碱 3 种有效成分的分

离度和峰纯度符合定量要求, 3 种化合物均在 230 nm 附近有最大吸收, 且指纹图谱研究发现, 230 nm 处色谱峰数目较多, 响应值较大, 基线平稳, 因此选择 230 nm 作为指纹图谱和含量测定的检测波长。流动相的筛选考察了甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液和甲醇-水 3 种溶剂系统的洗脱和分离效果, 结果显示, 以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相, 各色谱峰出峰时间短, 分离度较好。色谱柱的选择, 分别考察了 YMC Triart C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 色谱柱、Waters HSS T3 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱、Waters Acquity BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱和 Waters Cortecs T3 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱这 4 种不同品牌和柱填料的柱子对指纹图谱和含量测定各色谱峰的分离效果, 结果显示, 采用 YMC Triart C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 柱, 各色谱峰分离效果最佳。

3.2 供试品溶液制备方法考察

在方法的建立过程中, 分别对不同的提取溶剂(甲醇、50%甲醇、30%甲醇和 50%乙醇)、提取方式(超声、回流)、提取时间(30、45、60 min)进行考察, 以各色谱峰的总峰面积/称样量以及 3 种有效成分的含量为考察指标, 优选最佳的提取方法, 结果显示, 以 50%乙醇超声提取 45 min, 提取效率最高。

3.3 指纹图谱的构建及分析评价

辛夷(望春花 *Magnolia biondii* Pamp.) 为落叶乔木, 生于海拔 400~2400 m 的山坡林中, 多为家种, 野生资源较少, 主要分布于河南、湖北及四川等地^[11], 15 批辛夷药材指纹图谱共标识出 10 个共有指纹峰, 通过对照品指认出 3 个有效成分, 分别为木兰脂素、松脂素二甲醚和木兰花碱。相似度评价结果显示, 同省区的药材, 相似度较高, 不同的省区, 湖北、四川与河南存在明显的差异, HCA 和 PCA 分析将 15 批药材分为 3 类, 并对应不同的产区, OPLS-DA 分析找到 7 个差异标志物, 说明不同产区辛夷药材的化学成分存在较大差异, 这种差异可能与药材的生长环境、采收加工等因素密切相关。

3.4 有效成分的测定与分析

15 批药材 3 种有效成分的测定结果显示, 木

兰脂素和木兰花碱的含量, 河南均明显高于湖北与四川, 木兰脂素的含量更是药典限度的 6~14 倍, 而湖北辛夷木兰花碱的含量最高, 且 3 批药材木兰花碱的含量较稳定。《中国药典》2015 年版辛夷药材项下以木兰脂素为含测指标, 但是单一的成分测定, 尚不足以全面评价辛夷药材的质量。中药成分复杂, 针对不同的功能主治, 发挥作用的有效成分不同, 因此, 有必要增加多指标的含量测定, 并根据发挥作用的药效物质不同, 选择合适的药材产地。本文在指纹图谱的基础上, 增加对有效成分木兰脂素、木兰花碱和松脂素二甲醚的同时测定, 从多角度研究不同产地辛夷药材质量的差异性, 该方法简便, 专属性强, 重复性良好, 分析时间短, 能有效地分析不同产地辛夷药材质量的差异性, 为不同产地辛夷药材的质量评价提供参考。

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, 2015, 182.
- [2] 罗会畏. 辛夷化学成分及药理活性研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2013.
- [3] 王永慧, 叶方, 张秀华. 辛夷药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(16): 12-14.
- [4] 管政. 辛夷挥发油抗变应性鼻炎的药理研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2011.
- [5] 陈静. 辛夷治疗鼻病的作用探析 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2008.
- [6] 曹纬国, 陶燕铎, 颜学伟, 等. 辛夷中辛夷脂素与木兰脂素高效液相色谱含量测定方法的建立与优化 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1598-1599.
- [7] 杨雁芸, 张艳丽, 何玉环, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定辛夷中 12 种木脂素 [J]. 中成药, 2019, 41(5): 1069-1073.
- [8] 杨琼梁, 欧阳婷, 杨仁义, 等. 市售不同产地辛夷中挥发油成分分析及木兰脂素的含量测定 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(10): 39-44.
- [9] 陈真新. 辛夷木脂素成分的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 大家健康学术版, 2014, 8(11): 7-9.
- [10] 杨艳, 陈旭冰, 陈光勇, 等. 超高效液相色谱在中药研究中的应用 [J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33(6): 70-72.
- [11] 南京中医药大学. 中药大辞典 (上册) [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1616-1619.

[责任编辑 时圣明]