

西南委陵菜质量标志物初步研究及指纹图谱结合多元统计综合评价其质量

李学学^{1,5,6}, 曹亚楠^{2,3}, 苏宏娜^{1,5,6}, 黄艳菲^{4,5,6*}, 李莹^{1,5,6}, 杨正明^{4,5,6}, 蔡晓霞^{1,5,6}, 沈继秀^{1,5,6}, 刘圆^{4,5,6,7*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610225
2. 成都大学食品与生物工程学院, 四川 成都 610106
3. 农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川 成都 610106
4. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川 成都 610225
5. 四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室, 四川 成都 610225
6. 青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 四川 成都 610225
7. 西南民族大学民族医药研究院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 建立基于 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 法初步筛选彝药材西南委陵菜 *Potentilla fulgens* 质量标志物、指纹图谱结合多元统计分析综合评价其药材质量的研究方法, 为西南委陵菜质量评价和质量控制提供依据。方法 采用 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 法定性分析西南委陵菜化学成分组成, 筛选质量标志物; HPLC 法建立 27 批次西南委陵菜药材指纹图谱, 定量分析质量标志物的含量; 采用主成分分析和 TOPSIS 分析综合评价西南委陵菜药材质量。结果 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 法从西南委陵菜中识别了 48 个化合物, 包括原花青素类 34 个、黄酮类 12 个、酚类 1 个、鞣质类 1 个, 筛选出含量较高、可准确测定的表儿茶素作为质量标志物, 西南委陵菜指纹图谱中确定了 10 个共有峰, 含量测定结果表明不同产地药材中表儿茶素的含量有较大差异, 表儿茶素含量与海拔高度呈正相关, 综合主成分分析结合 TOPSIS 分析, 结果表明样品 S11 的质量最佳, S9 的质量最差。结论 指纹图谱结合多元统计分析的药材质量综合评价方法, 可较客观评价西南委陵菜药材质量, 为其药材的质量控制提供科学依据。

关键词: 西南委陵菜; UPLC-Q-Exactive-MS/MS; 高效液相色谱法; TOPSIS 分析; 指纹图谱; 表儿茶素

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3696-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.028

Preliminary discovery of quality marker of herb *Potentilla fulgens* and quality evaluation by using fingerprint combined with multivariate statistical analysis

LI Xue-xue^{1,5,6}, CAO Ya-nan^{2,3}, SU Hong-na^{1,5,6}, HUANG Yan-fei^{4,5,6}, LI Ying^{1,5,6}, YANG Zheng-ming^{4,5,6}, CAI Xiao-xia^{1,5,6}, SHEN Ji-xiu^{1,5,6}, LIU Yuan^{4,5,6,7}

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China
2. School of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China
3. Key Laboratory of Coarse Cereal Processing of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu 610106, China
4. Institute of Tibetan plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610225, China
5. Qiang Yi national medicinal resource protection and utilization technology engineering laboratory of Sichuan province, Chengdu

收稿日期: 2020-11-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1708005); 四川省科技农村领域重点研发(2019YFN0089); 中央高校基本科研业务费专项资金研究类项目(2021PTJS35)

作者简介: 李学学(1992—), 男, 彝族, 四川峨边县人, 硕士研究生, 研究方向为民族药品种、品质评价及新药资源保护与利用研究。

Tel: 18328088970 E-mail: 1259667743@qq.com

*通信作者: 刘圆, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为民族药品种、品质评价及新药资源保护与利用研究。Tel: (028)89165778

E-mail: 499769896@qq.com

黄艳菲, 女, 博士, 研究方向为民族药物研究。Tel: (028)89165778 E-mail: 47118549@qq.com

610225, China

6. Qinghai-Tibetan Plateau Ethnic Medicinal Resources Protection and Utilization Key Laboratory of National Ethnic Affairs Commission of the People's Republic of China, Chengdu 610225, China
7. Ethnic Medicine Institute, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To establish a method for discovering quality marker of herb *Potentilla fulgens*, and quality evaluation by fingerprint combined with multivariate statistical analysis for its quality control. **Methods** UPLC-Q-Exactive-MS/MS was used to qualitatively analyze the chemical constituents and screen quality marker. HPLC method was used to establish fingerprint chromatograms of 27 batches of *P. fulgens* and quantitatively analyze the content of quality marker. Principal component analysis (PCA) and TOPSIS analysis were used to comprehensively evaluate the quality of *P. fulgens*. **Results** Total 48 compounds were identified by UPLC-Q-Exactive-MS/MS, including 34 proanthocyanidins, 12 flavonoids, one phenolic, and one tannin. Epicatechin with high content and accurate content determination was selected as quality marker. *P. fulgens* fingerprint identified 10 common peaks. Epicatechin content of *P. fulgens* was difference among different origin, and it is positively related with altitude. The results of PCA and TOPSIS analysis showed that the quality of sample S11 was the best, and the quality of sample S9 was the least. **Conclusion** The comprehensive quality evaluation method of fingerprint combined with multivariate statistical analysis could be used to objectively evaluate the quality of *P. fulgens*, and provide scientific basis for the quality control of the medicinal materials.

Key words: *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook.; UPLC-Q-Exactive-MS/MS; High performance liquid chromatography; content determination; fingerprint; epicatechin

西南委陵菜 *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook. 为蔷薇科委陵菜属多年生草本植物,以其干燥根入药,是彝医临床常用药材,别名管仲、翻白叶、地檳榔等^[1-2]。西南委陵菜始载于《滇南本草》^[3],味苦、涩,性寒;主治血崩、大肠下血、面寒疼。彝医临床将其用于治疗胃肠道疾病、痢疾、疮、风湿等^[4-5]。现代药理研究发现西南委陵菜具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化、降血糖等药理活性^[6-9]。虽然西南委陵菜在彝医临床应用广泛,但云南省中药材标准^[2]仅对鉴别、检查、浸出物做了要求,未有科学可靠的质量标志物进行质量控制,而质量标志物是目前评价药材质量的基本方法^[10],现有化学成分的研究结果尚不确定西南委陵菜所分离鉴定的成分是否为其提取物的主要成分并保证含量可测性^[11-12],因此,有必要筛选西南委陵菜的质量标志物,为西南委陵菜药材质量评价和质量控制提供科学依据。

本研究通过 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 法定性分析西南委陵菜的化学成分组成,筛选质量标志物;采用 HPLC 法建立不同批次西南委陵菜的指纹图谱,定量分析质量标志物的含量;进而通过主成分分析 (PCA) 和 TOPSIS 分析综合评价西南委陵菜药材质量,为西南委陵菜质量标准提高、质量评价系统研究提供科学依据,同时为其他民族药材的质量评价研究提供参考。

1 材料与仪器

1.1 仪器与试剂

ThermoFisher Scientific Vanquish 超高效液相色谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); ThermoFisher Scientific Q Exactive Focus 超高分辨质谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); 安捷伦 1100 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司); KQ-259DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); METTLER AE240 电子分析天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

表儿茶素 (批号 MUST-20042012)、没食子酸 (批号 MUST-20032802)、紫云英苷 (批号 MUST-15080515) 购自成都曼斯特生物技术有限公司; 儿茶素 (批号 15080412) 购自成都康邦生物科技有限公司,质量分数均大于 98%; 乙腈、甲醇、甲酸、磷酸 (色谱纯, DiKMA); 甲醇 (分析纯, 购于成都市科隆化学品有限公司); 蒸馏水 (屈臣氏)。

1.2 材料

西南委陵菜药材均由课题组和四川省彝医药非物质文化遗产传承人郝应芬 (阿子阿越) 带队自采于四川省凉山州和攀枝花米易县等地,经西南民族大学刘圆教授鉴定为西南委陵菜 *P. fulgens* Wall. ex Hook., 标本保存于西南民族大学民族药材标本馆,样品信息见表 1。

表1 西南委陵菜药材采集信息

Table 1 Collection information of *P. fulgens*

批号	样品采集地	海拔/m	时间
S1	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇洛阿木瓦	2118	2017-10-01
S2	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇洛阿木瓦	2123	2017-10-01
S3	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇四施洛莫	2139	2017-10-01
S4	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇四施洛莫	2138	2017-10-01
S5	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇龙洞河电站	2148	2017-10-03
S6	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇龙洞河电站	2141	2017-10-03
S7	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇龙洞河电站	2132	2017-10-03
S8	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇洛博村	2108	2018-08-06
S9	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇洛博村	2145	2018-08-06
S10	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇洛博村	2138	2018-08-06
S11	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇德育村三组	2238	2019-07-07
S12	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇德育村二组	2256	2019-07-07
S13	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇德育村二组	2232	2019-07-07
S14	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇德育村四组	2215	2019-07-07
S15	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇德育村	2088	2019-07-07
S16	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇龙洞河电站	2167	2019-07-08
S17	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇龙洞河	2298	2019-07-08
S18	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇马厂坪村一组	2022	2019-07-11
S19	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇子热村二组	1892	2019-07-11
S20	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇子热村五组	2033	2019-07-11
S21	四川省凉山彝族自治州普格县螺髻山镇波洛坪村	1778	2019-07-11
S22	四川省凉山彝族自治州西昌市安哈镇摆摆顶村	2493	2019-07-13
S23	四川省凉山彝族自治州西昌市安哈镇大箐村	2477	2019-07-13
S24	四川省凉山彝族自治州西昌市安哈镇大箐梁子	2576	2019-07-13
S25	四川省凉山彝族自治州会理县六华镇肖洞湾	2056	2019-07-11
S26	四川省攀枝花市米易县得石镇草坝彝族村草坝社	2449	2019-08-01
S27	四川省凉山彝族自治州木里县列瓦乡砖瓦坪	2239	2019-09-05

2 方法

2.1 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 分析

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 美国 Waters 公司), 进样量 2 μL, 柱温 35 °C, 体积流量 0.2 mL/min。检测波长 210~400 nm。流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 6%A; 3~10 min, 6%~9%A; 10~25 min, 9%~10%A; 25~34 min, 10%~13%A; 34~37 min, 13%A; 37~45 min, 13%~15%A; 45~50 min, 15%~18%A; 50~55 min, 18%~20%A; 55~60 min, 20%~40%A。

2.1.2 质谱条件 离子源为 ESI 源, 负离子检测模式; 辅助气体积流量 10 mL/min; 辅助气温度 350 °C; 离子传输管温度 320 °C; 锥孔气流量 40 L/h; 喷雾电压 3.5 kV; 扫描模式: Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500, 扫

描范围 m/z 100~1000。

2.1.3 对照品溶液的制备 分别精密称量表儿茶素、儿茶素、没食子酸、紫云英苷于 25 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解稀释至刻度, 得表儿茶素质量浓度为 0.40 mg/mL, 儿茶素质量浓度为 0.40 mg/mL, 没食子酸质量浓度 0.40 mg/mL, 紫云英苷质量浓度 0.40 mg/mL, 即为混合对照品溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备 取 S10 样品 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 100 mL, 密塞, 称定质量, 加热回流 90 min, 放冷, 再称定质量, 用 50% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得分析样品。

2.2 HPLC 指纹图谱及含量测定

2.2.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.2% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 0~15 min, 2%~10% A;

15~25 min, 10%~15% A; 25~45 min, 15%~20% A; 45~65 min, 20%~22% A; 检测波长为 270 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 35 ℃。

2.2.2 对照品溶液的制备 取表儿茶素对照品适量, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶内, 用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 得 1.022 mg/mL 对照品储备。精密量取上述储备液适量, 用 50% 甲醇依次稀释, 得表儿茶素质量浓度分别为 0.204 4、0.153 3、0.102 2、0.051 1、0.020 4 mg/mL 系列混合对照品溶液, 备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 所有待测样品按“2.1.4”项下方法进行制备。

2.2.4 线性关系考察 准确吸取一定量的对照品溶液, 用 50% 甲醇稀释至不同质量浓度的系列对照品溶液, 按照“2.2.1”项下的色谱条件进行测定。以对照品的质量浓度为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性分析, 得回归方程 $Y=4\ 962.2\ X+4.036\ 6$, 线性范围 0.204 4~2.044 0 mg/mL, $r=0.999\ 8$ 。

2.2.5 精密度试验 取适量“2.2.2”项配制的对照品溶液, 按照“2.2.1”项色谱方法连续进样 6 次, 测定峰面积。结果显示表儿茶素峰面积的 RSD 值为 0.45%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 取同一批样品 (S5) 6 份, 按“2.1.4”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定, 测得供试品溶液表儿茶素平均质量浓度分别为 10.43 mg/g, RSD 为 1.48%, 表明实验重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 选取“2.2.2”项下配好的对照品溶液, 按“2.2.1”项下方法, 在放置 0、6、12、18、24 h 后进样测定, 根据表儿茶素峰面积计算其

RSD 值。其 RSD 结果为 0.78%, 说明供试品溶液在制备后 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取同一批样品 (S5) 按照“2.1.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照供试品浓度-对照品大致 1:1 的比例分别加入表儿茶素。表儿茶素的加样回收率为 93.51%, RSD 值为 1.36%。

2.3 数据分析

利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”对 27 批西南委陵菜样品进行相似度分析, 并生成西南委陵菜指纹图谱。利用 SPSS20.0 软件对西南委陵菜进行 TOPSIS 分析; 以表儿茶素含量和采集地海拔为变量, 对两者进行相关性分析。

3 结果与分析

3.1 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 定性分析

对 S10 号样品进行 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 分析, 负离子模式基峰色谱图见图 1。通过与对照品比对、对照品质谱裂解规律结合 SciFinder 等数据库、文献数据比对的方式, 从样品中指出了 48 个化合物, 包括原花青素类 34 个、黄酮类 12 个、酚类 1 个、鞣质类 1 个, 结果见表 2。

通过提取离子的方式与对照品比对确认的 4 个成分, 保留时间 2.96、13.93、22.83、54.83 min 依次为没食子酸、儿茶素、表儿茶素、紫云英苷。

以儿茶素、表儿茶素、阿福豆素聚合形成的原花青素为西南委陵菜样品中的主要成分, 以保留时间为 12.61 min 的 procyanidin B 为例说明解析过程。可见其准分子离子 $m/z\ 577.135\ 0\ [M-H]^-$, 预测分子式 $C_{30}H_{26}O_{12}$, 不饱和度 18。二级质谱中, 与对照品儿茶素的质谱裂解规律对比可知, $m/z\ 289.071\ 5$

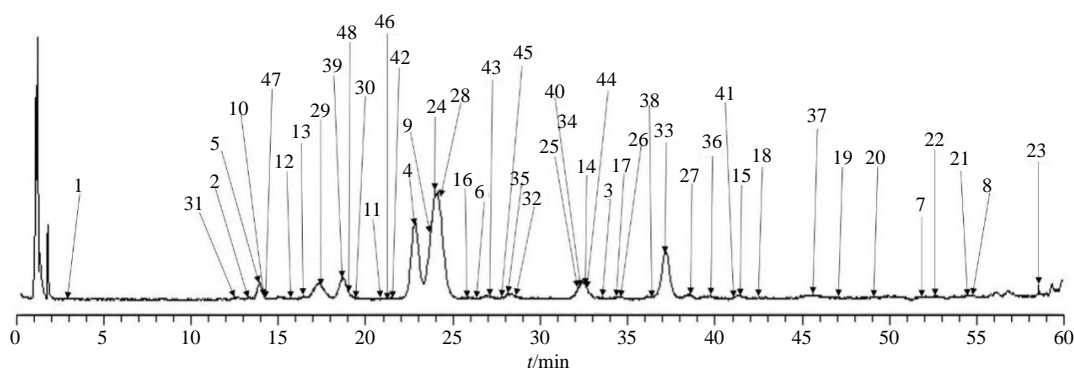


图 1 样品 (S10) 负离子模式基峰色谱图

Fig. 1 Negative ion mode base peak chromatogram of sample (S10)

表2 西南委陵菜 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 化学成分鉴定结果

Table 2 Results of UPLC-Q-Exactive-MS/MS identification of chemical constituents from *P. fulgens*

峰号	t_R /min	[M-H] ⁻	误差($\times 10^{-6}$)	分子式	结构类型	鉴定	HR-MS/MS 特征离子 (m/z)	文献
1	2.96	169.0132	0.48	C ₇ H ₆ O ₅	酚类	没食子酸*	125.023 1	
2	13.25	271.0610	3.32	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	黄酮类	柚皮素或其异构体	227.070 2, 203.070 1, 165.018 2, 137.023 1, 133.028 5, 123.043 9, 109.027 8, 93.033 0	13
3	33.57	273.0767	3.55	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	黄酮类	阿福豆素或其异构体	255.065 3, 229.085 6, 205.086 2, 189.054 7, 187.075 2, 137.023 0, 133.027 9, 123.043 8, 107.048 9, 93.033 0	14
4	22.83	289.0714	2.58	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	黄酮类	表儿茶素*	245.081 4, 221.081 6, 205.049 8, 203.070 3, 187.038 9, 151.038 8, 137.023 0, 125.023 0, 123.043 8, 109.028 1	
5	13.93	289.0715	2.89	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	黄酮类	儿茶素*	245.081 4, 221.081 2, 205.049 7, 203.070 5, 187.039 3, 179.033 8, 151.038 8, 149.023 3, 137.023 1, 125.023 0, 123.043 7, 109.028 1	
6	26.32	435.1292	1.33	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	黄酮类	阿福豆素葡萄糖苷	N	14
7	51.90	435.1292	1.33	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	黄酮类	阿福豆素葡萄糖苷	345.098 3, 315.087 4, 273.076 1, 221.045 8, 209.044 9, 179.033 3, 167.033 9, 125.023 1	14
8	54.83	447.0930	1.73	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	黄酮类	紫云英苷	N	
9	23.46	449.1086	1.65	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	黄酮类	二氢山奈酚葡萄糖苷	287.055 6, 269.045 2, 259.060 7, 243.067 0, 178.997 9, 151.002 5, 125.023 1, 107.012 1	15
10	14.04	451.1242	1.60	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	黄酮类	儿茶素葡萄糖苷	361.092 4, 331.082 2, 245.081 3, 151.039 0, 139.038 8, 125.023 1, 123.043 9, 109.028 0	16
11	21.01	451.1242	1.60	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	黄酮类	儿茶素葡萄糖苷	N	16
12	15.70	451.1243	1.73	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	黄酮类	儿茶素葡萄糖苷	289.071 5, 245.080 8, 203.070 6, 179.032 8, 151.038 7, 137.023 0, 125.022 8, 123.043 6, 109.028 3	17
13	16.34	451.1243	1.73	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	黄酮类	儿茶素葡萄糖苷	361.093 0, 331.081 8, 205.049 6, 179.033 4, 149.022 6, 137.023 1, 123.043 6, 109.028 4	16
14	32.46	545.1450	1.35	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	419.113 6, 273.076 4, 271.061 0, 229.086 2, 205.086 2, 189.054 6, 177.018 2, 137.023 1, 133.028 1, 125.023 0, 123.043 8, 109.028 2	17
15	41.42	545.1450	1.35	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	N	17
16	25.94	545.1451	1.68	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	419.112 5, 273.076 4, 271.060 7, 189.054 7, 177.018 4, 165.018 4, 163.002 5, 137.023 1, 125.023 0, 123.043 7, 109.027 9	17
17	34.27	545.1451	1.68	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	419.112 9, 273.076 6, 271.060 9, 229.086 0, 189.054 7, 177.018 1, 137.023 1, 125.023 0	17
18	42.56	545.1451	1.68	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	N	17
19	47.02	545.1451	1.68	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	N	17
20	49.02	545.1451	1.68	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	409.092 8, 273.076 2, 255.028 9, 151.039 1, 137.023 1, 135.043 8, 125.023 1, 109.028 2	17
21	54.60	545.1451	1.68	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	419.112 6, 289.071 6, 255.066 0, 245.081 3, 203.070 2, 151.038 6, 137.023 4, 125.023 1, 109.028 2	17
22	52.45	545.1452	1.79	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	N	17
23	58.43	545.1452	1.79	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₀	原花青素类	propelargonidin dimer	419.112 4, 289.071 2, 255.066 5, 245.080 2, 203.070 3, 161.059 1, 151.039 4, 137.022 8, 125.023 2, 123.043 7, 109.028 3	17
24	23.95	561.1395	0.70	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	原花青素类	proanthocyanidin dimer	435.107 4, 407.076 8, 289.071 4, 273.076 4, 245.081 2, 203.070 4, 177.018 0, 161.059 7, 151.038 8, 137.023 0, 125.023 0, 123.043 7, 109.028 1	17
25	32.11	561.1399	1.13	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	原花青素类	Proanthocyanidin dimer	435.108 5, 407.077 3, 289.071 6, 273.077 3, 245.081 1, 203.070 1, 177.018 3, 151.038 9, 137.023 1, 125.023 1, 123.043 6, 109.028 1	17
26	34.47	561.1400	1.68	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	原花青素类	proanthocyanidin dimer	435.108 9, 407.075 5, 289.071 4, 271.061 1, 245.081 7, 203.070 6, 177.018 1, 151.038 8, 137.023 1, 125.023 0, 123.043 8, 109.028 0	17
27	38.52	561.1400	1.68	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₁	原花青素类	proanthocyanidin dimer	435.108 7, 407.076 1, 289.071 4, 271.061 2, 245.081 5, 203.070 2, 151.038 9, 137.023 1, 125.023 1, 123.043 7, 109.028 1	17
28	24.13	577.1345	0.81	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素类	procyanidin B	N	18-19
29	17.36	577.1347	1.12	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素类	procyanidin B	407.076 4, 289.071 4, 255.029 5, 245.081 5, 203.070 6, 187.039 1, 179.033 9, 175.038 8, 161.023 2, 151.038 8, 137.023 1, 125.023 0, 123.043 7, 109.028 0	18-19
30	19.34	577.1349	1.56	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素类	procyanidin B	407.077 4, 289.071 0, 161.023 0, 151.038 7, 137.022 6, 125.022 9, 123.043 3, 109.028 1	18-19
31	12.61	577.1350	1.66	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素类	Procyanidin B	451.101 0, 425.087 9, 407.076 4, 381.097 9, 339.086 4, 289.071 5, 245.081 2, 231.028 3, 229.050 2, 227.070 9, 203.070 1, 187.039 5, 179.034 0, 175.038 8, 161.023 2, 151.038 9, 149.023 2, 137.023 1, 125.023 1, 109.028 2	18-19
32	28.84	577.1351	1.76	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	原花青素类	procyanidin B	N	18-19
33	37.09	833.2084	0.91	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	原花青素类	proanthocyanidin trimer	543.129 0, 289.071 3, 271.060 8, 245.081 2, 203.070 3, 177.018 2, 165.018 2, 137.023 1, 125.023 0, 123.043 8, 109.028 1	17
34	32.4	833.2088	1.43	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	原花青素类	proanthocyanidin trimer	543.129 4, 289.071 3, 271.061 0, 245.081 3, 229.050 0, 203.070 1, 177.017 9, 165.018 7, 151.039 1, 137.023 0, 125.023 1, 123.043 7, 109.028 1	17

续表 2

峰号	t_R /min	[M-H] ⁻	误差($\times 10^4$)	分子式	结构类型	鉴定	HR-MS/MS 特征离子 (m/z)	文献
35	28.32	833.208 9	1.57	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	原花青素类	proanthocyanidin trimer	543.129 2, 407.076 6, 289.071 4, 271.060 9, 245.081 6, 203.070 3, 177.018 4, 137.023 1, 125.023 0, 123.043 7, 109.028 1	17
36	39.60	833.209 0	1.73	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	原花青素类	proanthocyanidin trimer	543.129 8, 407.076 2, 289.071 5, 271.060 9, 203.070 1, 177.018 4, 165.018 0, 151.039 0, 137.023 2, 133.028 4, 125.023 1, 123.043 8, 109.028 2	17
37	45.53	833.209 0	1.73	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₆	原花青素类	proanthocyanidin trimer	543.129 7, 407.076 6, 289.071 5, 271.060 7, 245.081 6, 203.070 4, 177.018 4, 165.018 0, 137.023 2, 133.028 2, 125.023 1, 123.043 7, 109.028 1	17
38	36.92	849.202 8	0.35	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇	原花青素类	proanthocyanidin trimer	559.125 7, 407.077 7, 289.072 0, 229.049 1, 187.038 4, 161.022 8, 137.023 3, 125.023 1, 109.028 3	17
39	18.64	849.203 2	0.78	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇	原花青素类	proanthocyanidin trimer	289.071 9, 271.060 6, 203.355 3, 165.017 8, 161.023 0, 151.039 0, 137.022 9, 125.022 9, 123.043 7, 109.028 2	17
40	32.29	849.203 4	0.99	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇	原花青素类	proanthocyanidin trimer	559.123 4, 407.076 2, 289.071 3, 287.055 3, 175.038 9, 161.023 2, 151.038 7, 137.023 0, 125.023 1, 123.044 0, 109.028 2	17
41	41.22	849.203 4	0.99	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇	原花青素类	proanthocyanidin trimer	N	17
42	21.36	849.203 7	1.43	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇	原花青素类	proanthocyanidin trimer	559.124 5, 407.077 7, 289.071 3, 175.038 7, 161.023 1, 151.028 6, 137.023 0, 125.023 0, 123.043 8, 109.079 0	17
43	26.99	849.203 6	1.28	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₇	原花青素类	proanthocyanidin trimer	559.123 8, 407.076 7, 289.071 4, 271.060 7, 243.029 0, 203.070 1, 187.038 5, 177.018 3, 164.010 2, 161.023 1, 151.039 0, 137.023 1, 125.023 1, 123.043 9, 109.028 0	17
44	32.49	865.198 1	0.79	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	原花青素类	procyanidin trimer	N	17
45	27.90	865.198 2	0.86	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	原花青素类	procyanidin trimer	N	17
46	21.24	865.198 4	1.14	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	原花青素类	procyanidin trimer	577.134 6, 407.077 6, 289.071 4, 243.029 4, 177.018 0, 175.038 9, 161.023 5, 151.038 7, 137.023 0, 125.023 0, 109.027 9	17
47	14.07	865.198 5	1.28	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	原花青素类	procyanidin trimer	N	17
48	19.17	935.079 7	1.29	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	鞣质类	galloyl-diHHPD-hexose	633.067 3, 419.066 2, 317.029 1, 299.018 4, 275.019 2, 257.007 8, 249.038 8, 229.013 3, 201.018 7, 169.013 6, 147.044 4	17

“N”表示该离子未打到二级质谱 *表示与对照品对照

“N” secondary mass spectrometry was not detected *compared with reference substance

为儿茶素特征峰，结合儿茶素对照品的特征碎片离子 m/z 245.081 2、231.028 3、203.070 1、187.039 5、179.034 0、151.038 9、137.023 1、125.023 1、109.028 2，故推测该化合物结构母核为儿茶素。二级质谱中， m/z 577.135 0 与 m/z 289.071 5 相差 288.063 5 (C₁₅H₁₄O₆)，元素组成与脱氢儿茶素一致，结合文献数据^[18-19]，故推测该化合物可能是 procyanidin B。黄酮类成分为西南委陵菜样品中的另一类主要成分，除了通过对照品比对的 3 个黄酮类成分，还指认了 9 个黄酮类成分，以保留时间 23.46 min 的化合物为例，说明黄酮类成分的解析过程。负离子模式一级质谱显示准分子离子 m/z 449.108 6 [M-H]⁻，预测分子式为 C₂₁H₂₂O₁₁，不饱和度为 11。二级质谱中， m/z 287.055 6 (C₁₅H₁₁O₆) 与 m/z 449.108 6 相差 162.053 0 (C₆H₁₀O₅)，推测由准分子离子丢失葡萄糖基产生； m/z 287.055 6 丢失 1 分子水，产生 m/z 269.045 2 [M-H-glu-H₂O]，说明化合物含有羟基； m/z 287.055 6 丢失羰基产生 m/z 259.060 7 [M-H-glu-CO]，说明化合物含有羰基； m/z 287.055 6 脱去 CO₂ 产生 m/z 243.067 0 [M-H-glu-CO₂]；特征离子 m/z 178.997 9 (1⁻²A⁻) 和中性丢失 108.057 7 (1⁻²B) 表明，该化合

物为黄酮，且 B 环上有 1 个羟基； m/z 107.012 1 (0⁻⁴A⁻) 表明 A 环有 2 个羟基。综上推测，该化合物为二氢山柰酚葡萄糖苷。液质分析研究结果表明，样品基峰色谱图中峰高较高的峰为表儿茶素、儿茶素聚合物、儿茶素和阿福豆素的聚合物，然而除了表儿茶素，其他成分也均与儿茶素或表儿茶素相关，从质量标志物的可测性来考虑，表儿茶素含量较高、在 HPLC 中分离度好、色谱图中峰纯度高，故西南委陵菜的质量评价研究可初步筛选表儿茶素作为质量标志物，结合指纹图谱和多元统计分析，可科学评价西南委陵菜药材质量。

3.2 HPLC 指纹图谱研究及含量测定

3.2.1 指纹图谱建立与相似度分析 按“2.1.4”项下方法分别制备 27 批西南委陵菜供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样，分别记录其 HPLC 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》(2004 版)对西南委陵菜样品指纹图谱进行全谱峰匹配，设定时间宽度为 0.2，以 S15 药材 HPLC 图谱作为参照图谱进行匹配，按照中位数法生成西南委陵菜对照指纹图谱(图 2)。经色谱峰匹配，西南委陵菜对照指纹图谱有 10 个共有峰，

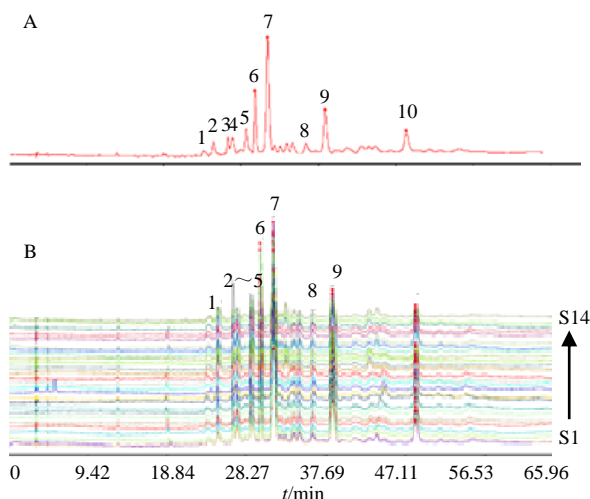


图2 西南委陵菜对照图谱(A)与样品指纹图谱(B)
Fig. 2 Fingerprint map of control (A) and samples of *P. fulgens* (B)

共有峰的峰面积均占总峰面积95%以上,符合特征图谱的技术要求,指认出6号峰为表儿茶素。对27批西南委陵菜药材指纹图谱进行相似度评价,结果西南委陵菜相似度在0.960~0.998,见表3。表明不同产地西南委陵菜指纹图谱相似度较高,药材质量较均一和稳定。

表3 西南委陵菜指纹图谱相似度

Table 3 Fingerprint similarity table

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.993	S15	0.995
S2	0.996	S16	0.978
S3	0.996	S17	0.977
S4	0.998	S18	0.976
S5	0.997	S19	0.976
S6	0.997	S20	0.993
S7	0.996	S21	0.996
S8	0.993	S22	0.997
S9	0.996	S23	0.997
S10	0.993	S24	0.998
S11	0.995	S25	0.977
S12	0.966	S26	0.976
S13	0.996	S27	0.960
S14	0.997		

3.2.2 含量测定结果 按照“2.2.1”项下条件测定西南委陵菜样品,每个样品平行测定3次,从结果可以看出,不同产地和不同批次之间含量有差异。对27批西南委陵菜药材中的表儿茶素含量和采集地海拔进行相关性分析,表儿茶素含量测定结果见表4,由此发现表儿茶素含量和海拔呈正相关(相关系数0.705, $P < 0.01$),表儿茶素含量随海拔高度变化见分析热图(图3),热图结果进一步表明,随海拔的升高,西南委陵菜药材中表儿茶素含量升高,

表4 表儿茶素测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Results of epicatechin determination ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	质量分数(mg·g ⁻¹)	编号	质量分数(mg·g ⁻¹)
S1	8.76±0.08	S15	6.47±0.03
S2	9.66±0.04	S16	16.50±0.03
S3	10.77±0.24	S17	9.88±0.10
S4	10.58±0.31	S18	8.76±0.79
S5	10.55±0.13	S19	8.32±0.33
S6	9.95±0.07	S20	6.78±0.02
S7	9.43±0.04	S21	6.01±0.05
S8	11.48±0.05	S22	14.42±0.08
S9	11.53±0.06	S23	9.11±0.22
S10	10.51±0.49	S24	20.22±1.59
S11	11.48±0.07	S25	6.75±0.07
S12	10.27±0.14	S26	16.55±0.08
S13	10.76±0.13	S27	8.28±0.11
S14	12.13±0.23		

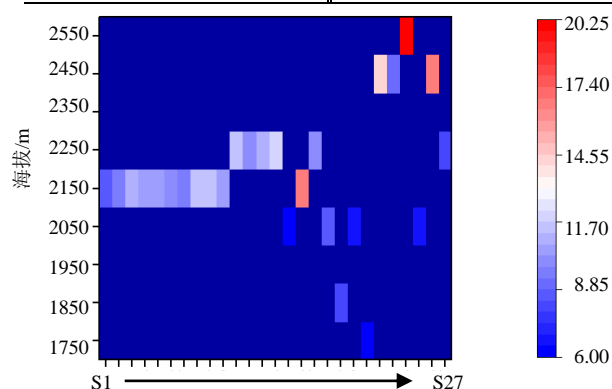


图3 表儿茶素含量随海拔高度变化分析热图

Fig. 3 Heat map analysis of epicatechin content with altitude

说明表儿茶素含量受海拔高度影响。

3.2.3 主成分分析 由于指纹的变量较多,PCA被用于数据压缩和样本分类的信息提取。为了全面评价基于指纹图谱数据的27批西南委陵菜样本的相似性和差异性,用检测到的10个共有峰的峰面积为原始数据,利用SPSS 20.0统计软件进行主成分分析,计算相关矩阵的特征值及其方差贡献率(表5),以特征值>1为提取标准,得到前3个主成分的累计方差贡献率为89.691%(>80%),说明前3个主成分反映了西南委陵菜中所有峰的情况,基本上可以表征西南委陵菜的HPLC指纹图谱特征。同时,本研究对各主成分的权重比例与各共有峰对应的相关系数(表6)进行分析。结果表明,指认出的表儿茶素和其他未知成分均作为主要信息参与了西南委陵菜的质量表达,其中第1主成分主要反映了色谱峰3、6(表儿茶素)、7、8、9、10的信息表达,第2主成分主要反映了色谱峰1、4的信息表达,第3主成分主要反映了色谱峰5的信息表达。

表 5 西南委陵菜指纹图谱主成分信息和方差贡献率

Table 5 Principal component information and variance contribution rate of fingerprint of *P. fulgens*

峰号	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%	合计	方差贡献率/%	累积贡献率/%
1	5.077	50.774	50.774	5.077	50.774	50.774
2	2.622	26.220	76.994	2.622	26.220	76.994
3	1.270	12.697	89.691	1.270	12.697	89.691
4	0.457	4.570				
⋮	⋮	⋮	⋮			
10	0.006	0.056	100.000			

表 6 主要因子载荷矩阵表

Table 6 Main factor load matrix table

色谱峰	成分		
	1	2	3
1	-0.012	0.360	0.004
2	0.063	0.256	-0.512
3	0.148	0.126	-0.001
4	0.134	0.259	0.068
5	-0.036	0.200	0.650
6 (表儿茶素)	0.184	-0.037	0.179
7	0.168	0.101	-0.017
8	0.164	-0.117	0.240
9	0.178	-0.146	-0.054
10	0.177	-0.130	-0.076

表 7 TOPSIS 评价结果

Table 7 TOPSIS evaluation results

编号	正理想解距离 D ⁺	负理想解距离 D ⁻	相对接近度 C	排序结果
S1	244.677	480.150	0.662	15
S2	233.535	513.092	0.687	9
S3	196.772	552.068	0.737	2
S4	239.652	487.365	0.670	13
S5	253.779	487.364	0.658	17
S6	251.314	491.986	0.662	16
S7	244.190	541.947	0.689	8
S8	235.245	487.908	0.675	12
S9	643.762	32.807	0.048	27
S10	217.532	506.565	0.700	7
S11	179.488	567.704	0.760	1
S12	495.335	255.460	0.340	26
S13	247.352	527.839	0.681	10
S14	264.225	487.918	0.649	18
S15	209.901	508.811	0.708	5
S16	319.522	416.516	0.566	19
S17	322.276	412.533	0.561	20
S18	338.319	408.505	0.547	24
S19	335.037	405.851	0.548	23
S20	231.838	491.780	0.680	11
S21	206.956	533.165	0.720	4
S22	206.030	567.342	0.734	3
S23	241.337	485.351	0.668	14
S24	222.015	538.098	0.708	6
S25	330.256	413.170	0.556	21
S26	338.316	410.558	0.548	22
S27	455.781	282.628	0.383	25

3.2.4 TOPSIS 分析 将检测到的 10 个共有峰的峰面积为原始数据，利用 SPSS 20.0 统计软件进行 Zscore 标准化处理后进行 TOPSIS 分析，以分析和比较不同产地西南委陵菜的质量差异，结果如表 7 所示。由表 7 可知，S11 的质量最佳，S9 的质量最次，指纹图谱共有峰数据可作为西南委陵菜药材质量评价的依据，TOPSIS 分析可用于西南委陵菜的质量评价。

4 讨论

本研究通过 UPLC-Q-Exactive-MS/MS 研究，详细分析了西南委陵菜药材中的化学成分，共指认 48 个化学成分，发现原花青素类成分和黄酮类成分为西南委陵菜的主要成分，此外还有含有酚类和鞣质类成分，研究结果较 Choudhary 等^[20]通过 NMR 和 LC-MS/MS 发现鉴定的西南委陵菜 25 个化学成分有了更多发现。通过液质分析初步筛选了含量高、可测性好、原花青素类成分基本组成单元的表儿茶素作为质量标志物，对西南委陵菜药材进行质量评价研究。现代药理研究表明，表儿茶素具有抗炎、抗菌、抗氧化、调脂降糖、防治心血管疾病、提高

免疫力等广泛的生理活性^[21]，与西南委陵菜药理活性具有相关性，因此，选择表儿茶素作为西南委陵菜的质量标志物具有一定科学意义。

通过指纹图谱的定性定量分析，结合多元统计分析综合评价彝药材西南委陵菜的质量评价研究方法，初步阐明了西南委陵菜药材的化学成分，筛选

了与生理活性具有一定相关性、可测性好的成分作为质量标志物,综合评价西南委陵菜药材,研究结果为西南委陵菜质量标准完善、科学合理用药提供科学依据,同时为其他研究基础薄弱的民族药材质量评价研究提供参考。

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, 1985: 261.
- [2] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2008: 99-100.
- [3] 兰茂. 滇南本草 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2004: 179.
- [4] 红河州卫生局. 红河中草药 第一册 [M]. 红河: 红河州卫生局, 1971: 182-183.
- [5] 李采兰. 贵州民间药物-第一辑 [M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 1965: 399.
- [6] Radhika M, Ghoshal N, Chatterjee A. Comparison of effectiveness in antitumor activity between flavonoids and polyphenols of the methanolic extract of roots of *Potentilla fulgens* in breast cancer cells [J]. *J Complement Integr Med*, 2012, 9: 24.
- [7] 向红. 民间草药西南委陵菜抗菌作用的实验 [J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2003, 21(2): 55-57.
- [8] 陈欣, 姜子涛, 李荣. 微波法提取西南委陵菜黄酮及其抗氧化活性的细胞模型法评价 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 123-129.
- [9] Syiem D, Syngai G, Khup P Z, et al. Hypoglycemic effects of *Potentilla fulgens* L in normal and alloxan-induced diabetic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2002, 83(1/2): 55-61.
- [10] 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.
- [11] 陈欣. 西南委陵菜中黄酮的成分分析与性质研究 [D]. 天津: 天津商业大学, 2014.
- [12] Jaitak V, Kaul V K, Himlata, et al. New hopane triterpenes and antioxidant constituents from *Potentilla fulgens* [J]. *Nat Prod Commun*, 2010, 5(10): 1561-1566.
- [13] 樊慧蓉, 李全胜, 张爱杰, 等. 柚皮素在大鼠体内的代谢途径研究 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2093-2099.
- [14] de Souza L M, Cipriani T R, Iacomini M, et al. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(1): 59-67.
- [15] Samoticha J, Wojdyło A, Golis T. Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland [J]. *Food Chem*, 2017, 215: 263-273.
- [16] Overwin H, Wray V, Hofer B. Flavonoid glucosylation by non-Leloir glycosyltransferases: Formation of multiple derivatives of 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone stereoisomers [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(22): 9565-9576.
- [17] la Barbera G, Capriotti A L, Cavaliere C, et al. Comprehensive polyphenol profiling of a strawberry extract (*Fragaria × ananassa*) by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(8): 2127-2142.
- [18] Li X, Zhang Y F, Yang L, et al. Chemical profiling of constituents of *Smilacis glabrae* using ultra-high pressure liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(2): 181-184.
- [19] 刘国强, 董静, 王弘, 等. 4种儿茶素类化合物电喷雾质谱裂解规律的研究 [J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(8): 1566-1570.
- [20] Choudhary A, Radhika M, Chatterjee A, et al. Qualitative and quantitative analysis of *Potentilla fulgens* roots by NMR, matrix-assisted laser desorption/ionisation with time-of-flight MS, electrospray ionisation MS/MS and HPLC/UV [J]. *Phytochem Anal*, 2015, 26(2): 161-170.
- [21] 童观珍, 付晓萍, 杨艳, 等. 表儿茶素的分布及药理活性研究进展 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学, 2018, 33(2): 343-349.

[责任编辑 时圣明]