

吴茱萸 HPLC 指纹图谱的建立及基原鉴别研究

戚华文¹, 徐鑫¹, 高德嵩¹, 王引¹, 金红利^{1,2*}, 王超然^{1,2}, 刘艳芳^{1,2}, 梁鑫淼^{1,2}

1. 中国科学院大连化学物理研究所中国医药城生物医药创新研究院, 江苏 泰州 225300

2. 中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023

摘要: **目的** 建立吴茱萸药材 HPLC 定量指纹图谱, 为其基原鉴别及质量评价提供依据。**方法** 针对 29 批 3 种基原吴茱萸药材, 建立吴茱萸 HPLC 定量指纹图谱, 并通过 HPLC-ESI-MS 技术对指纹图谱中的色谱峰进行鉴定, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》计算相似度, 同时运用化学模式识别技术对 3 种基原吴茱萸药材进行区分, 并对吴茱萸中指标性成分进行含量测定。**结果** 建立了吴茱萸药材的 HPLC 定量指纹图谱, 标定 13 个共有峰, 并通过液质联用进行了共有峰的鉴定。聚类分析和正交最小二乘判别分析实现了 3 种吴茱萸基原药材的鉴别。3 种基原吴茱萸药材中吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和水仙苷 4 个指标性成分含量存在一定差异。**结论** 通过吴茱萸 HPLC 定量指纹图谱与化学模式识别技术相结合, 可以实现对不同基原的吴茱萸药材的有效区分, 为吴茱萸药材的质量控制提供参考依据。

关键词: 吴茱萸; 定量指纹图谱; 聚类分析; 正交偏最小二乘判别分析; 质谱; 定性分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)14-4341-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.14.026

Study on quantitative HPLC fingerprint and species differentiation of *Evodia Rutaecarpa*

QI Hua-wen¹, XU Xin¹, GAO De-song¹, WANG Yin¹, JIN Hong-li^{1,2}, WANG Chao-ran^{1,2}, LIU Yan-fang^{1,2}, LIANG Xin-miao^{1,2}

1. DICP-CMC Innovation Institute of Medicine, Taizhou 225300, China

2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China

Abstract: Objective To establish HPLC quantitative fingerprint of Wuzhuyu (*Evodia rutaecarpa*), so as to provide basis for its species differentiation and quality evaluation. **Methods** The HPLC quantitative fingerprint of 29 batches of *E. rutaecarpa* was established from three species of *E. rutaecarpa*. The chromatographic peaks in the fingerprint were identified by HPLC-ESI-MS technology. The similarity was calculated by the similarity evaluation system of traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint. Chemical pattern recognition technology was used to distinguish three kinds of *E. rutaecarpa*, and the content of the index components in *E. rutaecarpa* was determined. **Results** In this study, the HPLC quantitative fingerprint of *E. rutaecarpa* was established, 13 common peaks were identified, and the structure of common peaks was identified by liquid chromatography-mass spectrometry. Cluster analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis were used to identify the three species of *E. rutaecarpa*. The contents of evodiamine, rutaecarpine, dehydroevodiamine and narcissoside in *E. rutaecarpa* from three species are different. **Conclusion** The effective distinguishment of different species of *E. rutaecarpa* can be achieved through the combination of HPLC quantitative fingerprint and chemical pattern recognition technology, which will provide reference for the quality control of *E. rutaecarpa*.

Key words: *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.; quantitative fingerprint; cluster analysis; orthogonal partial least squares discriminant analysis; mass spectrometry; qualitative analysis

收稿日期: 2020-11-09

基金项目: 中药质量标准制定规范化及国际化研究 (GZY-KJS-2018-016-6)

作者简介: 戚华文 (1993—), 女, 江苏省泰州市人, 硕士, 从事中药分析与中药质量标准研究。E-mail: qihuawen2016@163.com

*通信作者: 金红利 (1986—), 男, 吉林省吉林市人, 博士, 副研究员, 从事中药质量控制与药效物质基础研究。

Tel: 13644241669 E-mail: jinhongli@castim.cn

吴茱萸为常用温里药之一,具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻的功效,临床上常用于治疗厥阴头痛、寒疝腹痛、寒湿脚气,经行腹痛等症^[1]。吴茱萸所含的化学成分类型较多,包括生物碱、柠檬苦素、萜类、黄酮等,其中生物碱和柠檬苦素类化合物是其主要活性成分。目前《中国药典》2020年版中收录了芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实作为吴茱萸的3种基原药材^[2-4]。这3种药材在中国南部各地均有广泛分布,是吴茱萸商品药材中的主流品种,但吴茱萸的质量品质与不同基原的相关性还缺少充分的实验研究,不同产地的生长环境、气候条件可能会造成不同基原吴茱萸药材的质量差异^[5-6]。

对于吴茱萸药材的质量控制多集中于吴茱萸碱、吴茱萸次碱和柠檬苦素的含量测定,《中国药典》2020年版中将这三者的含量作为质量评价的指标,但3种吴茱萸药材的化学成分极为相似,仅通过个别成分的含量测定很难实现吴茱萸药材基原的鉴别,也难以对其内在品质进行客观评价,因此建立一种准确全面的质量控制方法尤为重要。定量指纹图谱是目前中药质量评价的主要方向之一,将指纹图谱与多指标成分定量结合起来,从而实现对中药质量的有效全面控制^[7-8]。目前有关吴茱萸指纹图谱的研究已有部分报道^[9-11],而采用HPLC定量指纹图谱结合化学计量学分析吴茱萸基原的报道较少。

本实验采用HPLC建立29批吴茱萸的定量指纹图谱,并利用液质联用技术对共用峰的化学结构

进行鉴定,结合相似度评价和化学计量学方法,对不同基原的吴茱萸进行分析,为吴茱萸的质量控制及科学的临床使用提供更多依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Alliance 高效液相色谱系统,包括2695梯度泵,2998二极管阵列检测器,自动进样器,柱恒温系统,Empower 色谱工作站。MS204TS 电子分析天平(梅特勒-托利多有限公司),岛津超高效液相色谱系统,SPD-20A 紫外检测器,AB SCIEX X500 系列 QTOF 质谱仪。

色谱柱: Tnature-ACCHROM C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国沃特世公司)和 Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国安捷伦公司)

1.2 试剂

对照品吴茱萸碱(批号 B266,规格 20 mg,质量分数 99.20%)、吴茱萸次碱(批号 B935,规格 20 mg,质量分数 99.40%)、去氢吴茱萸碱(批号 5451,规格 20 mg,质量分数 98.0%)、水仙苷(批号 4016,规格 20 mg,质量分数 98.0%)购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。对照药材吴茱萸(批号 120909-201510,0.5 g/支)购自中国食品药品检定研究院;吴茱萸药材共 29 批,采自湖南、江西省峡江县、江西省刘公庙等地,质量符合《中国药典》2015 年版。经中国科学院大连化学物理研究所杨小平鉴定为芸香科植物吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实。具体信息见表 1。

表 1 29 批吴茱萸样品信息

Table 1 Samples information from 29 batches of *Evodiae Fructus*

序号	基原	产地	批号	序号	基原	产地	批号
S1	吴茱萸	湖南省	Y-1808035-1	S16	石虎	江西省刘公庙	A1709003-1
S2	吴茱萸	湖南省	Y-1808035-2	S17	石虎	江西省刘公庙	A1709004-1
S3	吴茱萸	湖南省	Y-1808035-3	S18	石虎	江西省刘公庙	A1809001-1
S4	吴茱萸	湖南省	Y-1808035-4	S19	石虎	江西省刘公庙	A1809002-1
S5	吴茱萸	湖南省	Y-1808035-5	S20	石虎	江西省刘公庙	A1809002-5
S6	吴茱萸	江西省峡江县	WZY191018-1	S21	石虎	江西省刘公庙	A1809003-1
S7	吴茱萸	江西省峡江县	WZY191018-2	S22	石虎	江西省刘公庙	A1809003-3
S8	吴茱萸	江西省峡江县	WZY191018-3	S23	石虎	江西省刘公庙	A1809003-4
S9	石虎	江西省刘公庙	A1609003-4	S24	石虎	江西省刘公庙	A1809004-1
S10	石虎	江西省刘公庙	A1609002-1	S25	疏毛吴茱萸	湖南省祁东县	SMWZY01
S11	石虎	江西省刘公庙	A1609001-1	S26	疏毛吴茱萸	湖南省祁东县	SMWZY02
S12	石虎	江西省刘公庙	A1609003-1	S27	疏毛吴茱萸	湖南省祁东县	SMWZY03
S13	石虎	江西省刘公庙	A1609004-1	S28	疏毛吴茱萸	湖南省祁东县	SMWZY04
S14	石虎	江西省刘公庙	A1709001-1	S29	疏毛吴茱萸	湖南省祁东县	SMWZY05
S15	石虎	江西省刘公庙	A1709002-1				

乙腈(4 L, 色谱级)、甲醇(4 L, 色谱级)均购自 Sigma-Aldrich。甲酸(500 mL, 色谱级)购自 Aladdin。实验室用水来自 Milli-Q 超纯水净化系统(Billerica 公司, 美国)。

2 方法

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 HPLC-DAD 色谱条件 色谱柱为 Tnature-ACCHROM C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国沃特世公司), 流动相乙腈(A)-0.5%甲酸溶液(B)洗脱, 0~21 min, 5%~27% A; 21~24 min, 27%~48% A; 24~35 min, 48%~55% A; 35~50 min, 55%~90% A; 50~60 min, 95% A; 体积流量 1.5 mL/min; 进样量为 10 μL; 柱温为 30 ℃; 检测波长为 252 nm。

2.1.2 HPLC-QTOF-MS 质谱条件 液相条件与上述相同。离子源: ESI 离子源; 正离子模式; 气帘气 241 kPa; Gas 1: 448 kPa; Gas 2: 448 kPa; 温度 620 ℃; 离子化压力 5500 V, 去簇电压 80 V; 全扫描范围: *m/z* 50~1500; 裂解电压 40 V。CE Spread: 20 eV。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱、去氢吴茱萸碱对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含吴茱萸碱 80 μg/mL、吴茱萸次碱 80 μg/mL、去氢吴茱萸碱 80 μg/mL 和水仙苷 80 μg/mL 的混合溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 取吴茱萸药材粉末(过 3 号筛)约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75%甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 60 min, 放冷, 再称定质量, 用 75%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取同一批(S1)次吴茱萸药材, 制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录特征图谱。各特征峰的相对保留时间 RSD 均小于 1%, 主要特征峰的相对峰面积 RSD 小于 5%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取同一批(S1)次吴茱萸药材, 制备供试品溶液, 分别于 0、6、12、18、24 h 注入液相色谱仪, 记录特征图谱。各特征峰的相对保留时间 RSD 均小于 1%, 主要特征峰的相对峰面积 RSD 小于 5%, 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批(S1)次吴茱萸药材, 制备 6 份供试品溶液, 进样, 记录特征图谱。各特征峰的相对保留时间 RSD 均小于 1%, 主要特征峰的相对峰面积 RSD 小于 5%。

3 结果与分析

3.1 吴茱萸指纹图谱的建立

取 29 批吴茱萸样指纹图谱供试品溶液, 分别按“2.2.2”项制备供试品溶液, 每份样品平行 2 次, 按“2.1.1”项的方法依次进样检测, 获得吴茱萸药材的 HPLC 指纹图谱(图 1)。将统一积分后的数据全部导入《中药色谱特征图谱相似度评价系统软件》(2012 版), 以 S1 批药材的图谱为参照图谱, 使用中位数进行自动匹配, 加以多点校正, 确定 13 个共有色谱峰, 建立吴茱萸药材的对照图谱(图 2)。

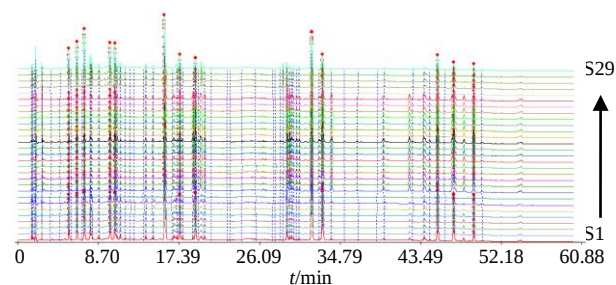
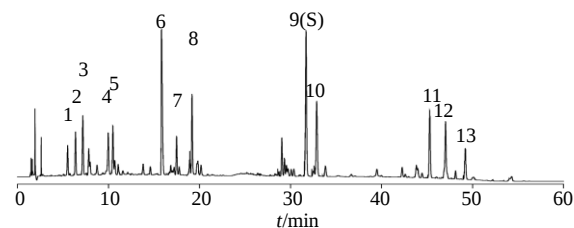


图 1 29 批吴茱萸药材的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 29 batches of *Evodiae Fructus*



6-去氢吴茱萸碱 8-水仙苷 9-吴茱萸碱 10-吴茱萸次碱
6-dehydroevodiamine 8-narcissin 9-evodiamine 10-rutaecarpine

图 2 吴茱萸 HPLC 指纹图谱共有模式

Fig. 2 Common pattern of HPLC fingerprints of *Evodiae Fructus*

3.2 特征峰的确证与指认

采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 通过分析化合物的保留时间、一级离子质荷比以及二级离子碎片信息, 并与相关文献报道信息进行匹配, 共鉴定出吴茱萸指纹图谱中 13 个特征峰, 包括 4 种葡萄糖酸, 1 种有机酸, 2 种黄酮类化合物、3 种吲哚喹啉类生物碱和 3 种喹诺酮类生物碱(表 2)。为进一步研究吴茱萸的化学成分组成及阐明其药效物质基础提供参考依据。

表 2 吴茱萸指纹图谱特征峰的鉴定

Table 2 Identification of characteristic peaks of *Evodiae Fructus* fingerprint

峰号	MS ¹ (m/z)	碎片离子	鉴定或推测的化合物名称
1	359.0960	163.0355[M+H-gluconic acid] ⁺ , 135.0417[M+H-gluconic acid-CO] ⁺	2-O-反式-咖啡酰葡萄糖酸
2	359.0956	163.0354[M+H-gluconic acid] ⁺ , 135.0418[M+H-gluconic acid-CO] ⁺	3-O-反式-咖啡酰葡萄糖酸
3	359.0959	163.0352[M+H-gluconic acid] ⁺ , 135.0414[M+H-gluconic acid-CO] ⁺	4-O-反式-咖啡酰葡萄糖酸
4	359.0967	163.0357[M+H-gluconic acid] ⁺ , 135.0262[M+H-gluconic acid-CO] ⁺	5-O-反式-咖啡酰葡萄糖酸
5	355.1050	135.0449[M+H-QA-CO] ⁺	绿原酸
6	302.1301	286.1021[M+H-CH ₃ -H] ⁺	去氢吴茱萸碱
7	465.1063	303.0500[M+H-Glc] ⁺	金丝桃苷
8	625.2203	317.0658[M+H-Glc-Rha] ⁺	水仙苷
9	304.1457	171.0916[M+H-C ₈ H ₇ NO] ⁺ , 144.0808[M+H-C ₉ H ₈ N ₂ O] ⁺	吴茱萸碱
10	288.0621	273.0902[M+H-NH] ⁺	吴茱萸次碱
11	340.2651	242.1549[M+H-C ₇ H ₁₄] ⁺ , 228.1393[M+H-C ₈ H ₁₈] ⁺ , 186.0945[M+H-C ₁₁ H ₂₂] ⁺	吴茱萸卡品碱
12	366.2774	268.1646[M+H-C ₇ H ₁₄] ⁺ , 200.1028[M+H-C ₁₂ H ₂₂] ⁺ , 186.0862[M+H-C ₁₃ H ₂₄] ⁺	1-甲基-2-[(6Z, 9Z)-6, 9-十五碳二烯]-4-(1H)-喹诺酮
13	342.2071	214.1248[M+H-C ₉ H ₂₀] ⁺ , 200.1079[M+H-C ₁₀ H ₂₂] ⁺ , 186.0919[M+H-C ₁₁ H ₂₄] ⁺	二氢吴茱萸卡品碱

3.3 指纹图谱相似度计算

将 29 批吴茱萸谱图数据导入《中药色谱特征图谱相似度评价系统软件》(2012 版), 计算相似度, 结果见表 3。29 批吴茱萸药材的相似度大于 0.917, 不同基原的吴茱萸指纹图谱轮廓相似, 但存在一定差异。其中, 吴茱萸的相似度范围大于 0.934; 石虎吴茱萸相似度范围为 0.917~0.945; 疏毛吴茱萸的范围为 0.920~0.952。

3.4 聚类分析

为了进一步分析不同基原吴茱萸的远近关系, 以吴茱萸指纹图谱中 13 个共有峰峰面积为变量, 导

入 SPSS 22.0 软件, 采用组间均连法, 选择平方欧式距离为测度对其进行系统聚类分析, 结果见图 3。由聚类结果可知 29 批样品在平方欧式距离为 5~10 时, 29 批吴茱萸药材分为 3 大类, 不同产地不同批号的 S1~S8 (吴茱萸药材) 聚为一类, 不同批号的 S9~S24 (石虎) 聚为一类; S25~S29 批 (疏毛吴茱萸) 聚为一类。由此可以看出, 不同基原吴茱萸药材具有较为明显的分类趋势。当平方欧式距离为

表 3 29 批吴茱萸样品的相似度分析结果

Table 3 Similarity evaluation of 29 batches of *Evodiae Fructus*

批号	相似度	批号	相似度
S1	1.000	S16	0.924
S2	0.993	S17	0.938
S3	0.989	S18	0.934
S4	0.991	S19	0.932
S5	0.985	S20	0.945
S6	0.961	S21	0.937
S7	0.973	S22	0.939
S8	0.934	S23	0.937
S9	0.926	S24	0.938
S10	0.917	S25	0.93
S11	0.926	S26	0.952
S12	0.92	S27	0.925
S13	0.918	S28	0.922
S14	0.929	S29	0.920
S15	0.926		

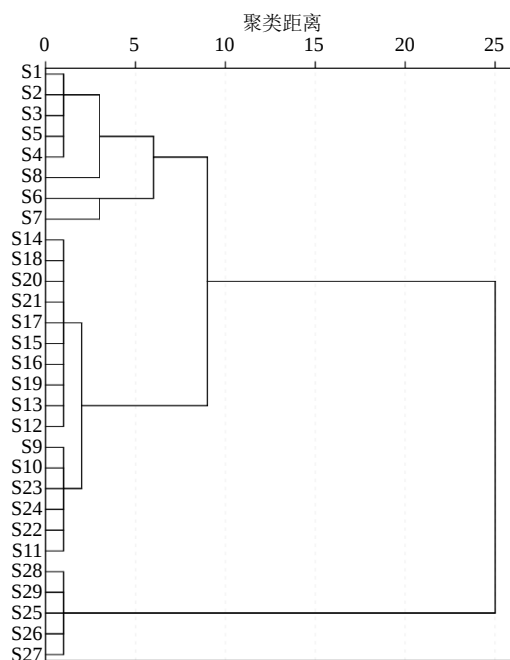


图 3 吴茱萸药材聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis dendrogram of 29 batches of *Evodiae Fructus*

10~25 时, 吴茱萸和石虎可以进一步聚为一类, 这 2 种基原药材的质量概貌更为相似。

3.5 正交偏最小二乘判别分析 (partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)

以 29 批不同基原吴茱萸指纹图谱中的 13 个共有峰峰面积为变量, 将其导入 SIMICA 14.0 软件, 进行 OPLS-DA。如图 4, OPLS-DA 分析结果表明, 吴茱萸 3 个基原品种样本群处于不同的空间聚落, 可以实现较好地区分, 说明 3 种基原吴茱萸的化学成分存在一定的差异。其中, 石虎吴茱萸聚落更为集中紧凑, 说明同一产地的石虎吴茱萸药材质量差异较小; 相反, 吴茱萸聚落较为分散, 离散度大于疏毛吴茱萸样本, 可能是由于不同产地的生长环境、气候条件造成吴茱萸药材质量差异较大。为了进一步确认对药材分组贡献较大的成分, 将 3 种基原吴茱萸药材进行两两分组, 根据变量重要性投影值 (variable importance in project, VIP) 筛选不同基原吴茱萸药材之间的差异性质量标志物^[12-14], 结果显示, 吴茱萸和石虎吴茱萸的差异性质量标志物为峰 8、11、12、10; 石虎吴茱萸和疏毛吴茱萸的差异性

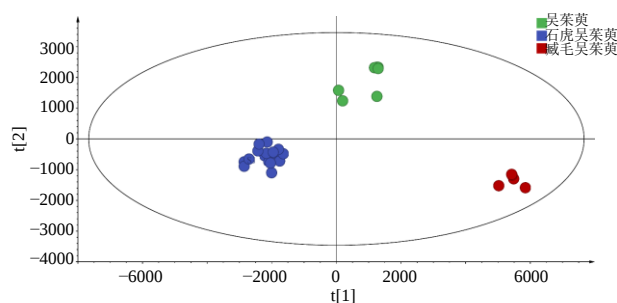


图 4 OPLS-DA 分析

Fig.4 OPLS-DA

质量标志物为峰 6、3、8、10、2、11; 吴茱萸和疏毛吴茱萸的差异性质量标志物为峰 6、3、2。

3.6 含量测定

3.6.1 线性关系考察 精密吸取吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和水仙苷对照品储备液适量, 配制成 7 个质量浓度系列的混合对照品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 以各对照品质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程、相关系数 (R^2) 和线性范围, 结果见表 4。

表 4 4 个指标成分线性关系和线性方程

Table 4 Linear relationship and linear range of four components

指标成分	回归方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
吴茱萸碱	$Y=12\,583\,X+25\,334$	0.999 8	9.523 2~238.08
吴茱萸次碱	$Y=17\,711\,X+7\,950.1$	0.999 9	2.231 0~55.775 3
去氢吴茱萸碱	$Y=19\,722\,X+7\,568.4$	0.999 8	1.577 4~39.435 2
水仙苷	$Y=12\,377\,X+3\,335.9$	0.999 8	1.577 4~39.435 2

3.6.2 精密度试验 取混合对照品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和水仙苷峰面积, 并计算峰面积 RSD, 结果显示吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和水仙苷的峰面积 RSD 值分别为 0.21%、0.08%、0.29%、0.31%, 表明仪器精密度良好。

3.6.3 稳定性试验 取同一供试品溶液 (批号 S1), 在制备后的 0、6、12、18、24 h 分别进样, 记录吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和水仙苷的峰面积, 计算各指标成分峰面积 RSD 为 0.58%、0.01%、0.78%、1.20%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.6.4 重复性试验 取同一吴茱萸样品粉末 6 份 (S1), 按照“2.2.2”项下样品处理方法制备, 按照“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 记录吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和水仙苷的峰面积, 计

算峰面积 RSD 分别为 1.98%、1.40%、1.82%、1.92%, 表明本方法重复性较好。

3.6.5 加样回收率试验 精密称取吴茱萸粉末 (批号 S1) 6 份, 每份 0.05 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 分别加入吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和水仙苷对照品 1.6、0.45、0.33、0.33 mg, 精密加入 75% 甲醇适量, 定容至 25 mL 量瓶, 后续处理同“2.2.2”项。按照“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 结果显示, 吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和水仙苷的回收率分别为 96.94%、92.52%、91.79%、97.76%, RSD 分别为 3.19%、3.04%、4.28%、3.09%。

3.6.6 样品含量测定 通过对 29 批吴茱萸药材进行分析, 测定不同基原吴茱萸药材中吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱萸碱和水仙苷含量, 含量测定结果见表 5。结果显示, 29 批吴茱萸药材中吴茱萸

表 5 吴茱萸中 4 种成分定量结果

Table 5 Quantitative result of four components in *Evodiae Fructus*

编号	基原	质量分数/%			
		吴茱萸碱	吴茱萸次碱	去氢吴茱萸碱	水仙苷
S1	吴茱萸	1.70	0.49	0.91	0.34
S2	吴茱萸	1.69	0.49	0.90	0.34
S3	吴茱萸	1.69	0.49	0.90	0.33
S4	吴茱萸	1.67	0.49	0.89	0.33
S5	吴茱萸	1.69	0.49	0.90	0.33
S6	吴茱萸	1.55	0.52	0.81	0.14
S7	吴茱萸	2.76	0.54	0.60	0.37
S8	吴茱萸	1.99	0.42	0.70	0.32
S9	石虎吴茱萸	4.35	0.97	0.71	0.62
S10	石虎吴茱萸	4.51	0.98	0.70	0.65
S11	石虎吴茱萸	4.43	0.99	0.76	0.63
S12	石虎吴茱萸	4.15	0.89	0.66	0.60
S13	石虎吴茱萸	4.19	0.89	0.64	0.60
S14	石虎吴茱萸	4.09	0.92	0.71	0.60
S15	石虎吴茱萸	4.33	0.93	0.69	0.61
S16	石虎吴茱萸	4.16	0.87	0.65	0.61
S17	石虎吴茱萸	3.89	0.85	0.70	0.55
S18	石虎吴茱萸	4.01	0.89	0.71	0.60
S19	石虎吴茱萸	4.09	0.91	0.72	0.58
S20	石虎吴茱萸	3.73	0.83	0.69	0.52
S21	石虎吴茱萸	3.99	0.87	0.70	0.57
S22	石虎吴茱萸	3.72	0.82	0.70	0.55
S23	石虎吴茱萸	4.10	0.89	0.74	0.57
S24	石虎吴茱萸	3.97	0.87	0.75	0.60
S25	疏毛吴茱萸	1.16	0.25	0.70	0.15
S26	疏毛吴茱萸	1.19	0.25	0.72	0.16
S27	疏毛吴茱萸	1.12	0.23	0.71	0.15
S28	疏毛吴茱萸	1.11	0.21	0.71	0.15
S29	疏毛吴茱萸	1.10	0.21	0.72	0.15

碱质量分数在 1.10%~4.51%，吴茱萸次碱质量分数在 0.21%~0.99%，去氢吴茱萸碱质量分数在 0.60%~0.91%，水仙苷质量分数在 0.14%~0.65%。

4 讨论

4.1 柱温的选择

在相同色谱柱上，比较 30、35、40、45、50 °C 5 个柱温条件对同一吴茱萸样品的分离效果。结果表明，在柱温 30 °C 条件下，特征图谱的整体分离效果最佳。随着柱温升高，20 min 左右主要色谱峰的分离度不断减小，因此，选定吴茱萸药材特征图谱的柱温为 30 °C。

4.2 体积流量的选择

在 1 mL/min 条件下，吴茱萸药材特征图谱的分析时间较长（80 min），考虑到减小特征图谱分析时间，提高检测效率，考察 1.5 mL/min 条件下特征图谱的分离效果。结果表明，在 1.5 mL/min 条件下，分析时间缩短至 60 min，且色谱峰的数目和分离度

基本相同。因此，选定吴茱萸药材特征图谱的体积流量为 1.5 mL/min。

吴茱萸具有散寒止痛、助阳止泻的功效，在治疗和预防心血管疾病、抗菌消炎、抗过敏、抗肿瘤收缩血管等方面有显著疗效，其活性成分主要包括生物碱、黄酮、有机酸等^[2]。因此，比较甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇、70% 乙醇对吴茱萸药材的提取效果。从峰的数目和峰面积等方面综合比较色谱图发现，75% 甲醇作为提取溶剂得到的样品，其色谱峰数较多，峰面积相对较高，基线平稳，较好地反映吴茱萸药材的质量概貌。综合考虑，选定 75% 甲醇作为吴茱萸药材特征图谱的提取溶剂。

在相同色谱条件下，比较 Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Tnature C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 等 2 种色谱柱对同一吴茱萸样品的分离效果。结果表明，吴茱萸样品在两根不同品牌 C₁₈ 色谱柱上的分离效果差别较大，其中在 Tnature C₁₈ 色谱柱上的峰形和分离度相对较好。这主要是由于吴茱萸样品中含有吴茱萸碱和吴茱萸次碱等生物碱类化合物，而 Tnature C₁₈ 色谱柱表面带有一定量的正电荷，有利于生物碱类化合物的分离。综合考虑，选定吴茱萸药材特征图谱的分析色谱柱为 Tnature C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

本实验对收集的 29 批不同基原吴茱萸药材进行了研究，建立了 3 种基原吴茱萸药材的定量指纹图谱，标定了 13 个共有峰，并通过液质联用进行峰指认，明确了吴茱萸药材的物质基础。在指纹图谱的基础上，通过聚类分析和正交偏最小二乘判别分析对 3 种基原吴茱萸进行了区分。结果显示：两种方法的分类效果均较为明显；OPLS-DA 结果中，不同基原吴茱萸药材之间的差异性质量标志物也存在差异。此外，对吴茱萸药材中 4 种指标性成分同时进行测定。由定量结果可知，3 种基原吴茱萸药材中，去氢吴茱萸碱的含量较为接近；石虎吴茱萸中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和水仙苷的含量最高，其次是吴茱萸药材，疏毛吴茱萸最低。由此看出，吴茱萸各化学成分的含量与基原品种密切相关，不同基原的吴茱萸药材质量具有明显差异。本实验建立的吴茱萸定量指纹图谱简单可靠，可为吴茱萸药材质量的综合评价提供一定的参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张恒斌. 吴茱萸化学成分及测定方法研究进展 [J]. 中

- 国现代中药, 2008, 10(11): 9-10.
- [2] 文丽梅, 马超英, 余德林, 等. 吴茱萸的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(9): 1976-1977.
- [3] 龚慕辛, 王智民, 张启伟, 等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(2): 183-187.
- [4] 戴媛媛, 刘保林, 窦昌贵. 吴茱萸及其有效成分的药理研究进展 [J]. 中药材, 2003, 26(4): 295-298.
- [5] 石典花, 张军, 孙立立. 基于 3 种多基原饮片质量考察谈等量性研究的必要性 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(1): 320-324.
- [6] 李秦晋, 魏宝阳. 品种、产地和采收年份对吴茱萸主要活性成分含量的影响 [J]. 激光生物学报, 2015, 24(3): 279-285.
- [7] 丰加涛, 金郁, 王金成, 等. 基于定量指纹图谱技术的中药质量控制 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 180-185.
- [8] 梁鑫淼, 丰加涛, 金郁, 等. 中药质量控制技术发展展望 [J]. 色谱, 2008, 26(2): 130-135.
- [9] 张红梅, 李国, 宋龙, 等. 贵州和浙江产吴茱萸指纹图谱分析及含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(17): 69-73.
- [10] 曾金祥, 刘勇, 黄碧涛, 等. 吴茱萸 HPLC 指纹图谱的建立及 3 种成分含量的测定 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(14): 8273-8275.
- [11] 温慧玲, 程齐来, 吴龙火, 等. 基于指纹图谱探讨吴茱萸不同炮制品成分的差异 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 76-80.
- [12] 郭威, 孙蓉, 王亮, 等. 基于指纹图谱和 OPLS-DA 的越南和国产土茯苓差异性化合物探索 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 62-67.
- [13] 周欣, 张琳, 毛婵, 等. 基于化学计量学方法结合正交偏最小二乘判别分析的陈皮饮片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2194-2200.
- [14] 董雷, 冯美柔, 陈晓颖, 等. 沉香形成对白木香果皮化学组成的影响研究 [J]. 广州化工, 2016, 44(4): 46-50.

[责任编辑 时圣明]