

基于多指标结合化学计量学的龙葵果质量评价研究

赵雯雯¹, 张锦超², 孙秀蕊¹, 张哲¹, 韩洪翠¹, 王雪¹, 荆紫琪¹, 李楚¹, 魏锋^{3*}, 张玉杰^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 吉林创岐生态农业技术开发有限公司, 吉林 吉林 136000

3. 中国食品药品检定研究院 中药民族药检定所, 北京 100050

摘要: **目的** 采用多指标结合化学计量学的方法综合分析龙葵 *Solanum nigrum* 果质量及关键指标, 为其质量评价提供科学依据。**方法** 采用 HPLC 法建立龙葵果特征指纹图谱及澳洲茄碱、澳洲茄边碱含量测定方法, 并测定浸出物含量, 使用 SAS 14.0、SIMCA14.1 软件对上述指标进行聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及偏最小二乘判别分析 (discriminant analysis of partial least squares analysis, PLS-DA), 通过对吉林产地 25 批不同产区、不同采收期药材的分析, 综合评价龙葵果质量及标志性成分。**结果** 建立的特征指纹图谱及澳洲茄碱、澳洲茄边碱含量测定方法稳定性较好。HCA 分析可将 25 批样品聚为 2 大类, 分类主要与产区有关, I 类药材为铁东区及梨树县的孤家子、榆树台产区; II 类药材为梨树县的杏山、北夏家、泉眼沟、獾子洞产区。用 3 个主成分对龙葵果药材进行综合评价, 结果表明 I 类药材综合得分及排名较高, 质量较优。根据 PLS-DA 分析, 造成两类药材质量差异的指标为醇溶性浸出物含量及指纹图谱相似度。色谱峰 2、3 (澳洲茄碱)、4 (澳洲茄边碱)、14、15 (薯蓣皂苷元)、16 所代表的成分是 2 类龙葵果药材质量差异的标志性物质。**结论** 建立的龙葵果质量综合评价方法操作简便、重复性好、稳定可靠, 可为龙葵果质量评价提供基础。

关键词: 龙葵果; 指纹图谱; 澳洲茄碱; 澳洲茄边碱; 薯蓣皂苷元; 化学计量学; 质量评价

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)09-2803-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.024

Quality evaluation of fruits of *Solanum nigrum* based on multiple index and chemometrics

ZHAO Wen-wen¹, ZHANG Jin-chao², SUN Xiu-rui¹, ZHANG Zhe¹, HAN Hong-cui¹, WANG Xue¹, JING Zi-qi¹, LI Chu¹, WEI Feng³, ZHANG Yu-jie¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Jilin Chuang Qi Ecological Agricultural Technology Development Co., Ltd., Jilin 136000, China

3. Institute of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective To establish a method for the comprehensive evaluation of the quality of fruits of *Solanum nigrum* by multiple index and chemometrics, so as to provide the scientific basis for its quality evaluation. **Methods** HPLC was used to establish the fingerprint and the content of solasonine and solamargine. The determination of extract was carried out. According to the above method, the quality and index components of 25 batches of medicinal materials from different producing areas and different harvest time in Jilin Province were determined and analyzed by hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and discriminant analysis of partial least squares analysis (PLS-DA) by SAS 14.0 and SIMCA14.1 software. **Results** The fingerprint and the determination method of solasonine and solamargine were stable. The results showed that 25 samples were classified into two categories by HCA analysis, and the classification was mainly related to the origin. In class I, S1—S10 was from Tiedong District, S11—S13 from Gujiazai Town, Lishu County, and S14—S15 from Yushutai Town, Lishu County; The class II all came from Lishu County. The results showed that the comprehensive score and ranking of the class I were higher and the quality was

收稿日期: 2021-09-09

作者简介: 赵雯雯, 硕士研究生, 从事中药质量评价研究。E-mail: zhaoww0430@163.com

*通信作者: 张玉杰, 教授, 博士生导师, 从事中药质量评价研究。E-mail: zhyj227@126.com

魏锋, 博士, 研究员, 从事中药质量控制研究。E-mail: weifeng@nifdc.org.cn

better. According to PLS-DA analysis, the indexes of quality difference between the two kinds were alcohol soluble extract content and fingerprint similarity. The components represented by peaks 2, 3 (solanine), 4 (solamargine), 14, 15 (diosgenin) and 16 were the main markers of the quality differences between the two groups. **Conclusion** the method is simple, repeatable and reliable, and can be used to evaluate the quality of fruits of *S. nigrum*.

Key words: fruits of *Solanum nigrum* L.; fingerprint; solanone; solamargine; diosgenin; chemometrics; quality evaluation

龙葵果为茄科植物龙葵 *Solanum nigrum* L. 的未成熟果实, 药用历史悠久, 始载于《药性论》^[1], 并被 1999 版《中华人民共和国卫生部药品标准 维吾尔药分册》^[2]和 2013 年发布的《广东省中药材标准》^[3]所刊载。龙葵果能调血解毒、清热止渴、收敛消肿、治疗肿瘤^[4]。在临床上主要用于肝癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌等多种肿瘤的防治, 疗效显著^[4]。近年来, 随着对化学成分和药理作用的深入研究, 人们发现^[5-6]龙葵果抗肿瘤药效物质基础为总甾体皂苷, 包括生物碱型和非生物碱型 2 种, 它们存在于 70% 甲醇或 60% 乙醇提取部位。抗肿瘤活性较强的单体成分主要是澳洲茄碱^[7]和澳洲茄边碱^[8], 此外还有澳洲茄胺、龙葵酸^[9]等部分新分离得到的甾体成分。但现有标准仅对龙葵果的性状、显微鉴别、浸出物、灰分、薄层鉴别项进行了较为详尽的说明, 缺少针对其药效部位和指标性成分的定性、定量检查方法。目前因产地、采收时期、炮制方法不同所导致的龙葵果药材质量不稳定及伪劣混杂等问题已严重影响到龙葵果药材市场和临床疗效, 因此有必要从整体上对龙葵果药材质量进行综合评价, 为建立其更为完善的质量评价方法奠定基础。

药用龙葵果主要为人工栽培品, 主产吉林、安徽等地, 不同产地对龙葵果加工处理方法有所不同, 吉林产龙葵果以保鲜处理为特点, 其他地区则为干燥品。本研究以吉林产区 25 批不同产地、不同采收期鲜龙葵果作为研究对象, 以澳洲茄碱、澳洲茄边碱作为主要质控成分建立定量分析方法, 以 60% 乙醇提取部位作为质控部位建立特征指纹图谱, 并对浸出物进行测定, 从而构建起基于抗肿瘤活性的龙葵果质量评价体系。以期今后龙葵果药材产地、采收、加工及质量控制和资源开发利用提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

赛默飞 Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司); 101-3AB 型电热鼓风干燥机(天津市泰斯特仪器有限公司); DK-98-II 型水

浴锅(天津泰斯特仪器有限公司); FW-100 型高速多功能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司)。

1.2 试剂

澳洲茄碱(批号 B20019)、澳洲茄胺(批号 B20017)、澳洲茄边碱(批号 B20018)、薯蓣皂昔元(批号 B21177)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$; 甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher 公司); 娃哈哈饮用纯净水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 试药

25 批龙葵果药材由吉林创歧生态农业技术开发有限公司提供。经北京中医药大学中药学院鉴定教研室鉴定为茄科植物龙葵 *Solanum nigrum* L. 的未成熟果实, 经乙醇保鲜处理。于鼓风干燥箱中 55 °C 烘干, 粉碎后过二号筛, 置于干燥器内保存备用。样品产地和采收时间信息见表 1。

2 方法

2.1 HPLC 法测定澳洲茄碱、澳洲茄边碱含量

2.1.1 供试品溶液的制备 取龙葵果药材粉末约 2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL、氨水 2 mL, 称定质量, 加热回流 2 h, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取澳洲茄碱、澳洲茄边碱对照品适量, 加 70% 甲醇溶解制成质量浓度分别为 0.88 和 0.95 mg/mL 的混合对照品储备液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Welch Ultimate[®]XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。以乙腈(A)-2 mmol/L 磷酸氢二钠(B)梯度洗脱: 0~5 min: 5% A; 5~10 min: 5%~39% A; 10~20 min: 39% A; 20~35 min: 39%~65% A; 35~40 min: 65%~35% A; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。在此条件下澳洲茄碱、澳洲茄边碱色谱峰分离良好, 无杂质峰干扰, 见图 1。

2.1.4 标准曲线方程的绘制 取“2.1.2”项下混合对照品储备溶液, 用 70% 甲醇分别稀释至 5 个不

表 1 不同产地、不同采收期龙葵果样品信息

Table 1 Information of *S. nigrum* fruit samples from different producing areas and harvest dates

批次	产地	采收日期	批次	产地	采收日期
S1	吉林省铁东区叶赫镇	2020-08-06	S14	吉林省梨树县榆树台镇	2020-08-18
S2	吉林省铁东区叶赫镇	2020-08-13	S15	吉林省梨树县榆树台镇	2020-08-27
S3	吉林省铁东区叶赫镇	2020-08-24	S16	吉林省梨树县杏山村	2020-08-02
S4	吉林省铁东区下三台村	2020-08-10	S17	吉林省梨树县杏山村	2020-08-11
S5	吉林省铁东区下三台村	2020-08-17	S18	吉林省梨树县杏山村	2020-08-21
S6	吉林省铁东区下三台村	2020-08-26	S19	吉林省梨树县北夏家村	2020-08-22
S7	吉林省铁东区山门镇	2020-08-07	S20	吉林省梨树县北夏家村	2020-08-25
S8	吉林省铁东区山门镇	2020-08-13	S21	吉林省梨树县獾子洞村	2020-08-02
S9	吉林省铁东区石岭镇	2020-08-09	S22	吉林省梨树县獾子洞村	2020-08-14
S10	吉林省铁东区石岭镇	2020-08-18	S23	吉林省梨树县泉眼沟村	2020-08-03
S11	吉林省梨树县孤家子镇	2020-08-09	S24	吉林省梨树县泉眼沟村	2020-08-15
S12	吉林省梨树县孤家子镇	2020-08-16	S25	吉林省梨树县泉眼沟村	2020-08-24
S13	吉林省梨树县孤家子镇	2020-08-27			

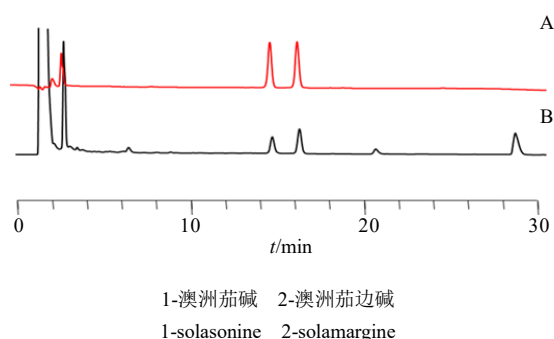


图 1 混合对照品 (A) 与供试品 (B) 溶液 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of mixed reference (A) and test solution (B) solution

同的质量浓度，得系列混合对照品溶液。按“2.1.3”项条件下分别进样测定，以峰面积为纵坐标 (Y)，质量为横坐标 (X) 建立标准曲线。得到澳洲茄碱标准曲线 $Y=6.0787X-2.2598$, $r^2=0.9999$, 线性范围为 $3.53\sim 17.65\ \mu\text{g}$; 澳洲茄边碱标准曲线 $Y=5.5803X-0.9983$, $r^2=0.9999$, 线性范围为 $3.83\sim 19.15\ \mu\text{g}$ 。

2.1.5 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液，在“2.1.3”项条件下连续进样 6 次，计算澳洲茄碱、澳洲茄边碱百分含量的 RSD 值为 0.01%、0.02%，表明该仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 精密称取龙葵果样品 (S5) 约 2 g，置锥形瓶中，按“2.1.1”项方法制备供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、8、10、12、24 h 按“2.1.3”项条件进样测定，计算澳洲茄碱、澳洲茄边碱质量分数的 RSD 值为 1.45%、1.11%，表明供

试液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 分别精密称取同一批次样品 (S5) 6 份，按“2.1.1”项方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项条件分别进样测定，并计算各样品中澳洲茄碱、澳洲茄边碱百分含量及 RSD 值。测得澳洲茄碱、澳洲茄边碱的平均质量分数分别为 1.55%、2.30%。RSD 值分别为 1.95%、2.27%，表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的龙葵果药材 6 份 (S5)，约 1 g，置锥形瓶中，精密加入一定体积的混合对照品溶液，按“2.1.1”项方法制备供试品溶液，按“2.1.3”项条件分别进样测定，计算回收率和 RSD 值。结果澳洲茄碱、澳洲茄边碱的平均回收率分别为 99.30%、98.14%，RSD 值分别为 2.30%、2.26%。

2.2 龙葵果药材特征指纹图谱的建立及相似度评价

2.2.1 供试品溶液的制备 取本品粉末约 2 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 60%乙醇 50 mL，称定质量，加热回流 1 h，放冷，再称定质量，用 60%乙醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取澳洲茄碱、澳洲茄边碱、澳洲茄胺、薯蓣皂苷元对照品适量，加 60%乙醇溶解，制备质量浓度分别为 0.49、0.50、0.56、0.58 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Welch Ultimate® XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。以乙腈(A)-1%磷酸(B)梯度洗脱: 0~5 min: 10%~20% A; 5~20 min: 20%~33% A; 20~25 min: 33~84% A; 25~40 min: 84%~100% A; 40~50 min: 100% A; 50~60 min: 100%~10% A; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 203 nm; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 各色谱峰可以得到很好的分离, 见图 2。由于 4 号澳洲茄边碱色谱峰的保留时间适中, 分离度良好, 峰面积较大, 以此作为参照峰进行方法学考察。

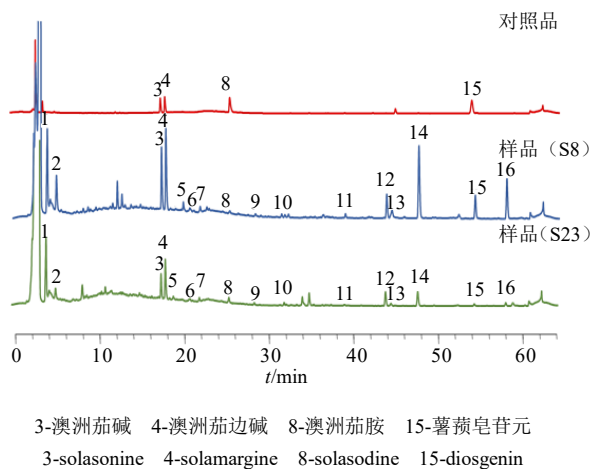


图 2 龙葵果药材 HPLC 指纹图

Fig. 2 HPLC fingerprint of fruits of *S. nigrum*

2.2.4 方法学考察 方法学考察内容同“2.1”项。

2.2.5 指纹图谱相似度评价 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 A)”对 25 批龙葵果药材 HPLC 图谱进行处理。以 S1 号样品色谱图作为参照图谱, 时间窗宽度设为 0.1 min, 进行多点校正和自动谱峰匹配, 中位数法生成对照图谱。以此作为龙葵果药材的对照指纹图谱, 进行相似度评价。

2.3 龙葵果药材醇(水)溶性浸出物测定

根据《中国药典》采用冷浸法^[10]测定浸出物含量。取供试品约 4 g, 精密称定, 置 250 mL 锥形瓶中, 精密加水(稀乙醇) 100 mL, 密塞, 冷浸, 前 6 h 内时时振摇, 再静置 18 h, 用干燥滤器迅速滤过, 精密量取续滤液 20 mL 置已干燥至恒定质量的蒸发皿中, 在水浴上蒸干后, 于 105 °C 干燥 3 h, 置干燥器中冷却 3 min, 迅速精密称定质量。以干燥品计算供试品中水(醇)溶性浸出物的含量。

2.4 数据分析

采用 GraphPad Prism 6.0 进行回归分析, 采用

SAS 14.0、SIMCA14.1 软件进行系统聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)及偏最小二乘判别分析(partial least squares analysis, PLS-DA)。

3 结果与分析

3.1 澳洲茄碱、澳洲茄边碱含量测定结果

所建立的澳洲茄碱、澳洲茄边碱 HPLC 含量测定方法, 线性、精密度、重复性、和回收率试验结果均符合含量测定要求。25 批龙葵果药材中澳洲茄碱、澳洲茄边碱含量差异较大, 澳洲茄碱质量分数在 0.61%~1.70%, 澳洲茄边碱质量分数在 1.27%~2.59%, 结果见表 2。

表 2 25 批药材醇(水)溶性浸出物、澳洲茄碱、澳洲茄边碱含量及指纹图谱相似度测定结果

Table 2 Determination results of alcohol (water) soluble extract, content of solasonine and solamargine and fingerprint similarity of 25 batches of medicinal materials

批次	质量分数/%		质量分数/%		指纹图谱相似度
	水溶性浸出物	醇溶性浸出物	澳洲茄碱	澳洲茄边碱	
S1	35.94	26.78	1.38	2.05	0.968 0
S2	34.43	26.48	1.37	2.10	0.983 0
S3	35.32	26.52	1.70	2.58	0.989 0
S4	34.18	26.37	1.54	2.36	0.995 0
S5	33.51	27.41	1.55	2.30	0.991 0
S6	35.34	26.75	1.16	1.83	0.990 0
S7	39.18	26.21	1.36	2.12	0.992 0
S8	34.03	26.19	1.07	1.68	0.992 0
S9	43.07	27.64	1.34	2.09	0.989 0
S10	42.69	27.28	1.04	1.61	0.995 0
S11	41.23	26.14	1.32	1.95	0.978 0
S12	43.58	27.40	1.45	2.11	0.981 0
S13	44.32	27.21	1.69	2.59	0.934 0
S14	41.45	28.48	1.34	2.05	0.960 0
S15	43.05	25.85	1.29	2.02	0.944 0
S16	44.22	34.25	0.63	1.27	0.928 0
S17	45.55	32.82	0.61	1.29	0.958 0
S18	43.05	35.98	0.65	1.39	0.949 0
S19	41.61	35.39	0.81	1.71	0.946 0
S20	40.71	35.01	0.79	1.63	0.941 0
S21	33.91	36.57	0.84	1.79	0.928 0
S22	34.51	35.38	0.79	1.61	0.943 0
S23	35.84	30.02	0.88	1.83	0.944 0
S24	34.77	32.06	0.61	1.31	0.937 0
S25	39.28	33.05	0.83	1.63	0.964 0

3.2 龙葵果药材特征指纹图谱的建立及相似度评价结果

所建立的 HPLC 指纹图谱测定方法符合方法学考察要求。25 批样品共标定 16 个共有峰, 且 16 个共有峰的峰面积占总峰面积的 85%以上。经与对照品色谱图比对后, 确认样品图谱中 3 号峰为澳洲茄碱, 4 号峰为澳洲茄边碱, 8 号峰为澳洲茄胺, 15 号峰为薯

磺皂苷元，后续经质谱鉴定 5 号峰为 Khasianine^[11]。25 批样品的相似度计算结果在 0.928~0.995，说明各产地的药材有较好的一致性，可以用于综合评价龙葵果药材的整体质量。结果见图 3 和表 2。

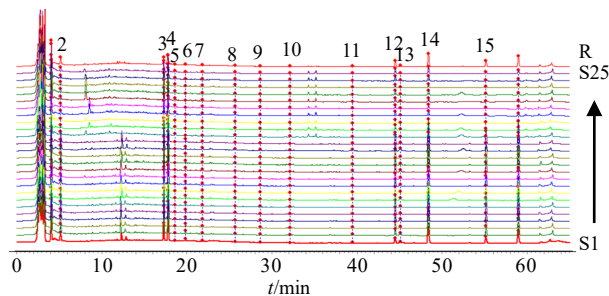


图 3 25 批样品 HPLC 指纹叠加图谱

Fig. 3 HPLC fingerprinting of 25 batches of fruits of *S. nigrum*

3.3 浸出物测定结果

25 批龙葵果药材水溶性浸出物含量在 33.51%~45.55%，醇溶性浸出物含量在 25.85%~36.57%，不同批次之间差异较大，结果见表 2。

3.4 HCA 分析

采用 SAS 14.0 统计软件对 25 批龙葵果水溶性浸出物含量、醇溶性浸出物含量、澳洲茄碱含量、澳洲茄边碱含量、指纹图谱相似度 5 个数据进行 HCA 分析。将数据进行标准化处理后采用 Ward 离差平方和聚类分析，结果见图 4。从中可以看出，25 批龙葵果样品聚为 2 大类，其中，S1~S15 聚为

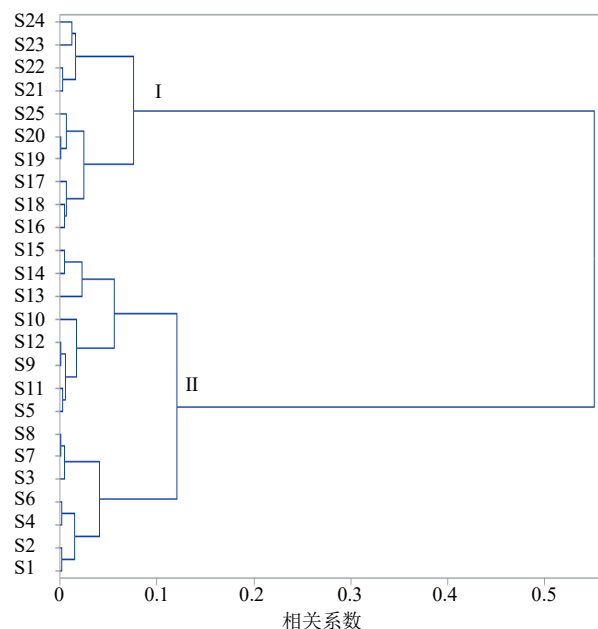


图 4 25 批样品聚类分析结果图

Fig. 4 Cluster analysis results of 25 batches of samples

第 I 类；S16~S25 聚为第 II 类。在第 I 类药材中，S1~S10 均为铁东区产地，S11~S13 为梨树县孤家子镇产区，S14、S15 为梨树县榆树台镇产区；第 II 类均为梨树县产区，分类主要与产地有关。

3.5 PCA 分析

采用 SAS14.0 统计软件对 25 批龙葵果水溶性浸出物含量、醇溶性浸出物含量、澳洲茄碱含量、澳洲茄边碱含量、指纹图谱相似度 5 个数据进行 PCA 分析。对数据进行 Z 标准化处理后，计算相关系数矩阵，主成分特征值、累积贡献率及主成分综合得分等。结果见表 3。

由 PCA 结果可知，前 3 个主成分的累积贡献率为 95.95%，其中主成分 1 的占比为 63.41%，由特征向量值可知主要反映 X2（醇溶性浸出物含量）、X3（指纹图谱相似性）、X4（澳洲茄碱含量）、X5（澳洲茄边碱含量）信息，为综合评价指标；主成分 2 主要反映 X1（水溶性浸出物含量）信息，为极性成分评价指标；主成分 3 主要反映 X4（澳洲茄边碱含量）信息，为抗肿瘤药效成分评价指标。前 3 个主成分代表了龙葵果药材中 95.95% 的信息量，具有很好的代表性，足以评价龙葵果药材的品质。

用 3 个主成分对龙葵果药材进行综合评价，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 25 批龙葵果药材的主成分得分、综合得分及排名，见表 3，综合得分越高，表明质量越好。由分析结果可知，I 类药材（S1~S15）质量较为稳定，且质量较优；II 类药材（S16~S25）综合得分较低。

3.6 PLS-DA 分析

为了进一步比较 2 类龙葵果质量，寻找类间差异性指标，在进行了无监督的主成分分析基础上进一步采用有监督的 PLS-DA 分析，结果如图 5、6 所示。建立的 PLS-DA 分析模型中累计解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.975、0.912，预测能力参数 Q^2 为 0.879，提示所建立的模型稳定性及预测能力较好。根据模型中各变量权重重要性排序（variable importance in projection, VIP）预测值来筛选类间差异性指标。一般认为在 95% 的置信区间内 $VIP > 1.0$ 的指标在分类中发挥着重要作用，小于 0.5 表示不重要变量，1~0.5 的间隔是一个灰色区域，其重要性级别取决于数据集的大小。由图 6 可知，醇溶性

表 3 各主成分得分、综合得分及排名

Table 3 Principal component score, comprehensive score and ranking

批次	主成分1得分	主成分2得分	主成分3得分	综合得分	排名
S1	1.186 32	-0.459 37	0.289 53	3.505 65	10
S2	1.603 67	-0.873 09	-0.067 28	4.193 01	8
S3	2.811 66	-0.410 52	0.664 28	8.952 14	1
S4	1.071 71	-0.910 57	-1.013 57	1.848 40	13
S5	1.616 07	0.197 04	-0.509 66	4.979 70	6
S6	0.769 20	-1.253 65	-1.127 79	0.481 50	14
S7	2.392 98	-0.823 89	0.166 05	6.896 43	3
S8	2.215 76	-1.026 12	0.183 54	6.149 92	4
S9	1.174 43	1.047 13	-0.575 63	4.360 82	7
S10	0.250 62	0.662 11	-1.696 85	0.321 84	10
S11	1.027 80	0.680 32	-0.473 55	3.607 24	9
S12	1.236 54	1.274 55	-0.249 03	4.992 96	5
S13	1.392 23	1.957 46	2.042 32	7.654 58	2
S14	0.549 92	0.790 22	0.386 54	2.763 97	12
S15	0.434 79	1.304 46	0.560 51	3.012 08	11
S16	-3.006 67	0.866 25	-0.046 61	-8.722 46	25
S17	-2.332 14	1.054 74	-1.110 75	-7.100 37	22
S18	-2.624 35	0.465 56	-0.346 36	-8.096 04	23
S19	-1.877 60	0.331 81	0.354 89	-5.397 55	18
S20	-2.020 12	0.130 61	0.391 47	-6.020 50	19
S21	-1.915 76	-1.361 79	1.448 67	-6.442 65	20
S22	-1.826 76	-1.339 21	0.583 47	-6.707 10	21
S23	-0.720 11	-0.754 64	0.534 93	-2.663 49	16
S24	-2.176 99	-1.305 29	-0.032 36	-8.189 18	24
S25	-1.233 20	-0.244 13	-0.356 75	-4.380 88	17

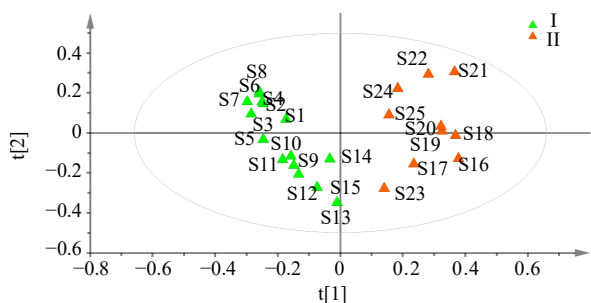


图 5 25 批样品基于 5 个测定指标的 PCA 分析得分图
Fig. 5 PCA analysis score diagram of 25 batches of samples based on five measurement indexes

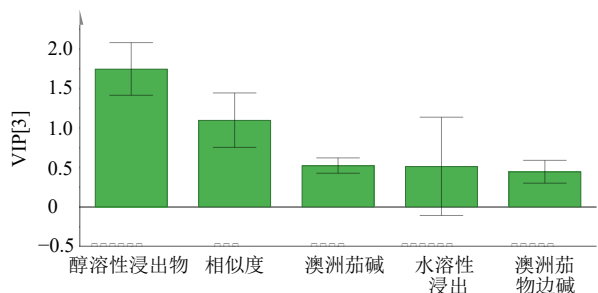


图 6 5 个测定指标的 PLS-DA 分析 VIP 图
Fig. 6 VIP value diagram of PLS-DA analysis of five measured indexes

浸出物含量、指纹图谱相似度为 2 组分类的主要差异性指标。

3.7 龙葵果质量差异成分的筛选

为了分析龙葵果质量的差异性规律，筛选引起两组分类龙葵果质量差异的潜在化学成分，利用 SIMCA14.1 软件对 25 批不同产地、不同采收期龙葵果药材指纹图谱共有峰峰面积的原始数据进行 PCA 分析及 PLS-DA 分析，结果见图 7、8。建立的 PLS-DA 分析模型中，累计解释能力参数 R^2_X 和 R^2_Y 分别为 0.874、0.936，预测能力参数 Q^2 为 0.914，提示所建立的模型稳定性及预测能力较好。提取 PLS-DA 模型中 16 个共有峰的 VIP 值，色谱峰 2、3、4、14、15、16 的 VIP 值均大于 1，说明这些峰所代表的成分是造成 2 组分类质量差异的主要标志性物质，色谱峰 5、6、7、12、13 的 VIP 值在 0.5~1.0，说明这些成分对分类结果也有一定影响，其中 3 号峰为澳洲茄碱、4 号峰为澳洲茄边碱、5 号峰为 Khasianine，15 号峰为薯蓣皂苷元，而澳洲茄胺（8 号峰）在各产地间分布较为均匀，其他色谱峰还有待进一步鉴别。

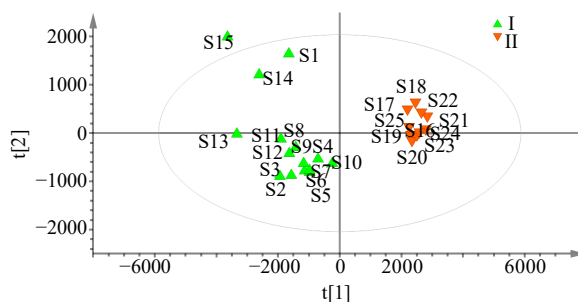


图 7 25 批样品基于 16 个共有色谱峰的 PCA 分析得分图
Fig. 7 PCA analysis score diagram of 25 batches of samples based on 16 common chromatographic peaks

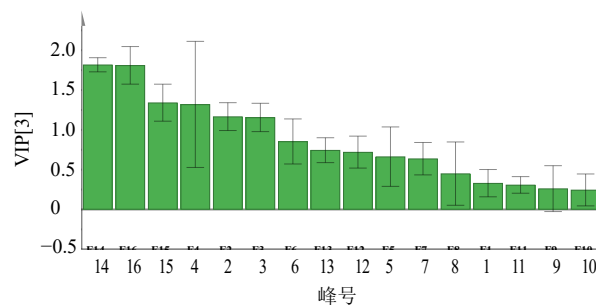


图 8 16 个共有色谱峰的 PLS-DA 分析 VIP 得分图
Fig. 8 VIP score of PLS-DA analysis of 16 common chromatographic peaks

4 讨论

HPLC 含量测定中为最大限度提取出 2 个生物碱, 本研究采用单因素实验法对提取方法、提取时间、甲醇百分比、料液比、氨水用量等提取条件进行了考察。结果表明回流提取法提取率高于超声提取法, 加入氨水使提取溶剂呈碱性可更多的提取出 2 个生物碱。浸出物测定是指用水或其他适宜的溶剂对药材和饮片中可溶性物质进行测定, 以药材浸出物的含量作为其质量控制指标的测定方法^[9]。由于中药成分复杂, 有效成分难以完全阐明, 故以浸出物作为质量评价的指标之一, 对于中药质量评价具有重要意义。龙葵果药材中含有的酚酸类、多糖类等极性较大成分可被水浸出; 含有的黄酮苷、花色苷等成分可被稀乙醇浸出。因此, 本研究选择澳洲茄碱、澳洲茄边碱含量、浸出物含量、指纹图谱相似度作为质量控制指标, 可较为全面的反映龙葵果质量信息, 从而实现整体上的质量评价。

采用化学计量学的方法对 5 个指标进行综合分析, 25 批龙葵果样品聚为 2 大类, S1~S15 为 I 类; S16~S25 聚为 II 类。分类主要与产地有关, 在 I 类药材中, S1~S10 均为铁东区产地, S11~S13 为梨树县孤家子镇产区, S14、S15 为梨树县榆树台镇产区; 第 II 类均为梨树县产区。主成分分析用 3 个主成分对龙葵果药材进行综合评价, 由分析结果可知, I 类药材综合得分及排名较高, 整体质量较为稳定, 且质量较优; II 类药材综合得分较低。根据偏最小二乘判别分析, 造成 2 类药材质量差异的指标为醇溶性浸出物含量及指纹图谱相似度。色谱峰 2、3、4、14、15、16 所代表的成分是造成 2 组分类龙葵果质量差异的主要标志性物质。而色谱峰 5、6、7、12、13 成分对分类结果也有一定影响, 其中 3 号峰为澳洲茄碱、4 号峰为澳洲茄边碱、5 号峰为 Khasianine, 15 号峰为薯蓣皂苷元, 而澳洲茄胺(8 号峰)在各产地间分布较为均匀。研究表明, 澳洲茄碱、澳洲茄边碱、Khasianine、澳洲茄胺、薯蓣皂

苷元均与抗肿瘤作用密切相关。综上所述, 建立的澳洲茄碱、澳洲茄边碱含量测定、浸出物含量测定、指纹图谱相似度结合化学计量学的方法可以在整体上的对龙葵果进行质量评价。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梅全喜, 张锦超. 鲜龙葵果抗肿瘤作用研究与应用 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 26.
- [2] 中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册 [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 27.
- [3] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准(第二册) [M]. 广州: 广东科技出版社, 2011: 53.
- [4] 梅全喜, 董鹏鹏, 李红念, 等. 鲜龙葵果治疗肿瘤的药理学基础与临床应用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(7): 1713-1716.
- [5] Xiang L M, Wang Y H, Yi X M, et al. Steroidal alkaloid glycosides and phenolics from the immature fruits of *Solanum nigrum* [J]. *Fitoterapia*, 2019, 137: 104268.
- [6] Xiang L M, Wang Y H, Yi X M, et al. Anti-inflammatory steroidal glycosides from the berries of *Solanum nigrum* L. (European black nightshade) [J]. *Phytochemistry*, 2018, 148: 87-96.
- [7] Gu X Y, Shen X F, Wang L, et al. Bioactive steroidal alkaloids from the fruits of *Solanum nigrum* [J]. *Phytochemistry*, 2018, 147: 125-131.
- [8] 王立业. 龙葵 (*Solanum nigrum* L.) 细胞毒活性成分的继续研究和药材的质量控制研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [9] Shi F Q, Wang C F, Wang L X, et al. Preparative isolation and purification of steroidal glycoalkaloid from the ripe berries of *Solanum nigrum* L. by preparative HPLC-MS and UHPLC-TOF-MS/MS and its anti-non-small cell lung tumors effects *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(15): 2471-2481.
- [10] 中国药典 [S]. 四部. 2015: 202.
- [11] 袁海建, 陈宜刚, 蔡宝昌, 等. 反相高效液相色谱法同时分析龙葵中 3 种甾体生物碱 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(12): 1630-1632.

[责任编辑 时圣明]