

藏药圆柏 HPLC 指纹图谱的建立及不同品种模式识别研究

赵紫薇¹, 赵程成², 徐鑫梅², 彭 芳², 古 锐¹, 邝婷婷^{1*}, 范 刚^{1*}

1. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘 要: 目的 建立圆柏药材 HPLC 化学指纹图谱, 并比较不同基原品种的差异。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 WondaSil® C₁₈-WR (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 270 nm。对 49 批圆柏药材进行指纹图谱构建, 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012 年 130723 版)进行相似度评价, 运用主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)和方差分析研究圆柏 5 个主流品种的化学成分差异。结果 建立了圆柏 HPLC 指纹图谱, 标定 15 个共有色谱峰, 相似度 0.648~0.975, 仅有 26 批相似度大于 0.9。鉴定 4 个峰为槲皮苷、穗花杉双黄酮、罗汉松双黄酮 A 和扁柏双黄酮。圆柏 5 个品种之间的化学成分存在差异, 并发现 7 个种间显著差异成分。结论 建立的化学指纹图谱稳定可靠, 可为其质量控制及评价提供参考。

关键词: 圆柏; HPLC; 指纹图谱; 品种差异; 模式识别; 槲皮苷; 穗花杉双黄酮; 罗汉松双黄酮 A; 扁柏双黄酮

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0663-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.034

Establishment of HPLC fingerprint of Tibetan medicine *Juniperri Caulis et Folium* and pattern recognition of its different species

ZHAO Zi-wei¹, ZHAO Cheng-cheng², XU Xin-mei², PENG Fang², GU Rui¹, KUANG Ting-ting¹, FAN Gang¹

1. College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints of Yuanbai (*Juniperri Caulis et Folium*) and compare the differences between different original species. **Methods** HPLC was performed on WondaSil® C₁₈-WR (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-0.2% phosphoric acid aqueous solution with the detection wavelength of 270 nm and volume flow rate of 1.0 mL/min for gradient elution. Similarity of fingerprints of 49 batches samples were evaluated by chromatographic fingerprint similarity evaluation software. The chemical composition differences of five species were studied by principal component analysis (PCA), partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and One-Way ANOVA. **Results** The HPLC fingerprint of *Juniperri Caulis et Folium* was established and 15 common peaks were calibrated. Among them, the similarity of fingerprints ranged from 0.648 to 0.975, only 26 batches were above 0.9. Four components were identified as quercetin, amentoflavone, podocarpusflavone A and hinokiflavone. There were differences in chemical components among five species, and seven inter-species differential components were found. **Conclusion** The established fingerprint is stable and reliable, which can provide the basis for its comprehensive evaluation and quality control.

Key words: *Juniperri Caulis et Folium*; HPLC; fingerprint; species difference; pattern recognition; quercetin; amentoflavone; podocarpusflavone A; hinokiflavone

圆柏(藏语:秀巴)为常用藏药材, 味苦性凉, 能清热、消炎、干黄水, 常用于治疗肾病、尿涩、膀胱病、关节炎、月经不调等^[1]。现代研究表明, 圆

柏主要含有黄酮类、木脂素类、萜类等化合物^[2], 在抗炎、抗氧化、抗菌和抗肿瘤^[3-6]等方面具有较好的生物活性。圆柏为典型的多基原药材, 同属多种

收稿日期: 2022-08-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1712302); 国家重点研发计划项目(2019YFC1712305)

作者简介: 赵紫薇(1997—), 女, 硕士研究生, 从事民族药质量控制及评价研究。E-mail: 617708706@qq.com

*通信作者: 范 刚(1983—), 男, 教授, 医学博士, 从事民族药质量控制及药效物质基础研究。E-mail: fangang1111@163.com

邝婷婷, 副教授, 从事民族药药效物质基础研究。E-mail: kuangtingting@cducm.edu.cn

植物均能入药。课题组前期对西藏、青海、四川、云南等藏区藏医院、藏药制药企业及药材市场的圆柏药材使用情况进行了调查,发现使用的品种包括滇藏方枝柏 *Juniperus indica* Bertoloni、香柏 *J. pingii* var. *wilsonii*、高山柏 *J. squamata* Buchanan-Hamilton ex D. Do、大果圆柏 *J. tibetica* Komarov、祁连圆柏 *J. przewalskii* Kom.等。圆柏药材的基原多样性和品种混淆使用不利于市场监管,也影响其质量稳定性和临床使用。因此,建立简便、可行的方法研究不同品种的化学成分差异对于其质量控制及不同基原品种能否等同使用具有重要的意义。

HPLC 指纹图谱分析可以实现多成分检测,是国际上公认的控制传统药材、天然药品质量的有效方法^[7-8]。然而,目前尚未见藏药圆柏常用品种的 HPLC 指纹图谱研究的文献报道。因此,本研究建立了圆柏药材的 HPLC 指纹图谱,并采用相似度评价、主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)和方差分析对圆柏的 5 个基原品种进行综合评价及差异分析,为其基原鉴定、质量控制及临床用药提供参考依据。

1 仪器与试药

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Sartorius BP121s 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);ULUP-I-10T 型优普超纯水机(成都超纯科技有限公司);CQ-250 型超声波清洗器(上海必能信有限公司)。

对照品槲皮苷(批号 111538-20504,质量分数>98%)购于中国药品生物制品检定研究院;对照品穗花杉双黄酮(批号 DTS201025-046)、扁柏双黄酮(批号 DST200619-009)和罗汉松双黄酮 A(批号 DST200919-053)均购于乐美天医药公司,质量分数均>98%;磷酸为色谱纯,甲醇为分析纯,水为超纯水。

本研究共收集 49 批圆柏药材,经重庆市中药研究院秦松云副研究员鉴定为柏科刺柏属滇藏方枝柏 *J. indica* Bertoloni、香柏 *J. pingii* var. *wilsonii* L.、高山柏 *J. squamata* Buchanan-Hamilton ex D. Do、大果圆柏 *J. tibetica* Komarov、祁连圆柏 *J. przewalskii* Kom.。样品信息详见表 1。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱色谱条件

WondaSil® C₁₈-WR 色谱柱(250 mm×4.6 mm,

表 1 圆柏样品信息

Table 1 Information of *Juniperri Caulis et Folium* samples

编号	基原植物	来源
QL-01	祁连圆柏	四川省阿坝州马尔康市梦笔山
QL-02	祁连圆柏	四川省阿坝州小金县达维乡
QL-03	祁连圆柏	青海省泽库县哈藏强山
QL-04	祁连圆柏	青海省泽库县雄让村
QL-05	祁连圆柏	青海省果洛州藏医院
QL-06	祁连圆柏	青海省玛沁县拉加镇
QL-07	祁连圆柏	青海省囊谦县香达镇
XB-01	香柏	四川省甘孜州甘孜县加多村
XB-02	香柏	四川省成都市国际贸易城中药材市场(6-1-1158)
XB-03	香柏	四川省成都市国际贸易城中药材市场(6-1-0725)
XB-04	香柏	西藏自治区拉萨农产品质量监督检验测试中心
XB-05	香柏	西藏自治区西藏藏医药大学附属医院
XB-06	香柏	西藏自治区国际藏中药材交易城
XB-07	香柏	青海省果洛州藏医院
XB-08	香柏	青海省称多县藏医院
XB-09	香柏	四川省甘孜藏族自治州康定机场
DZ-01	滇藏方枝柏	四川省德格县柯洛洞乡
DZ-02	滇藏方枝柏	四川省甘孜州理塘县兔儿山
DZ-03	滇藏方枝柏	西藏国际藏中药材交易城
DZ-04	滇藏方枝柏	西藏自治区北草地药材药材开发有限公司
DZ-05	滇藏方枝柏	西藏自治区林芝市藏医院
DZ-06	滇藏方枝柏	西藏自治区林芝县林芝镇
DZ-07	滇藏方枝柏	西藏自治区山南区
DZ-08	滇藏方枝柏	四川省甘孜藏族自治州道孚县色色乡
DZ-09	滇藏方枝柏	四川省甘孜藏族自治州得荣中藏医院
DZ-10	滇藏方枝柏	云南省德钦县白马雪山
DZ-11	滇藏方枝柏	云南省迪庆藏族自治州德钦县升平镇
DZ-12	滇藏方枝柏	西藏自治区睿俊芳生物科技发展有限公司
DZ-13	滇藏方枝柏	西藏自治区林芝县鲁朗镇
DZ-14	滇藏方枝柏	西藏自治区山南雍布拉克藏药厂
GS-01	高山柏	青海省海南藏族自治州贵南县
GS-02	高山柏	四川省甘孜州德格县藏医院
GS-03	高山柏	青海省海东市互助土族自治县
GS-04	高山柏	青海省藏医院
GS-05	高山柏	四川省成都国际贸易城中药材市场(6-1-1158)
GS-06	高山柏	青海省湟中区藏医院
GS-07	高山柏	青海省海南州藏医院
GS-08	高山柏	青海省泽库县藏医院
GS-09	高山柏	青海省三智商贸有限公司药材市场
GS-10	高山柏	四川省康定市折多山
GS-11	高山柏	云南省白马雪山纳帕海景区 G214 道旁
GS-12	高山柏	四川省康定市高尔寺山
GS-13	高山柏	四川省甘孜州理塘县
DG-01	大果圆柏	西藏自治区那曲地区藏药厂
DG-02	大果圆柏	西藏自治区山南市
DG-03	大果圆柏	成都国际贸易城中药材市场(6-1-0725)
DG-04	大果圆柏	青海省称多县藏医院
DG-05	大果圆柏	西藏自治区山南市雪源药材有限公司
DG-06	大果圆柏	西藏藏医学院藏药有限公司

5 μm),流动相为甲醇(A)-0.2%磷酸水溶液(B),梯度洗脱程序为 0~15 min, 28%~50% A; 15~25 min, 50%~65% A; 25~40 min, 65%~75% A; 40~50 min, 75%~85% A; 50~51 min, 85%~99.5% A; 51~56 min, 99.5%~100% A。柱温为 30 ℃;体积流量为 1.0 mL/min;进样量为 10 μL;检测波长为 270 nm。

2.2 对照品溶液的制备

取对照品槲皮苷、穗花杉双黄酮、罗汉松双黄酮 A 和扁柏双黄酮适量, 精密称定, 分别用甲醇制成 1.107、1.026、1.062、1.018 mg/mL 的对照品贮备液。精密量取上述贮备液各 0.5 mL 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 制成含槲皮苷 0.111 mg/mL、穗花杉双黄酮 0.103 mg/mL、罗汉松双黄酮 A 0.106 mg/mL、扁柏双黄酮 0.101 mg/mL 的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液的制备

取圆柏药材粉末(过 3 号筛)约 1 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定重量, 超声 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取圆柏样品(XB-02)约 1 g, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件连续进样 6 次, 记录其 HPLC 图谱。结果显示, 以穗花杉双黄酮为参照峰(S), 各共有峰的相对保留时间比 $RSD < 3.0\%$, 相对峰面积比 $RSD < 3.0\%$ 。将其色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012 年 130723 版)进行评价, 其相似度均大于 0.986。

2.4.2 稳定性试验 取圆柏样品(XB-02)约 1 g, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件分别于 0、1、2、3、4、6、12、24 h 进

样, 记录其 HPLC 图谱。结果显示, 以穗花杉双黄酮为参照峰, 各共有峰的相对保留时间比 $RSD < 3.0\%$, 相对峰面积比 $RSD < 3.0\%$ 。将其色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012 年 130723 版)进行评价, 其相似度均大于 0.990。

2.4.3 重复性试验 取圆柏样品(XB-02)6 份各 1 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进样, 记录其 HPLC 图谱。结果显示, 以穗花杉双黄酮为参照峰, 各共有峰的相对保留时间比 $RSD < 3.0\%$, 相对峰面积比 $RSD < 3.0\%$ 。将其色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012 年 130723 版)进行评价, 其相似度均大于 0.976。

2.5 HPLC 指纹图谱的建立及相似度评价

2.5.1 指纹图谱的建立 将 49 批圆柏药材按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件依次进样测定, 记录各批次色谱图。将 49 批样品的 HPLC 色谱图以 AIA 格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012 年 130723 版)。XB-02 号样品的图谱分离良好、特征峰面积较高为所有样品共有且峰面积比例均匀便于观测, 故确定选取作为参照图谱。采用中位数法, 时间窗宽度设为 0.5 min, 进行多点校正和色谱峰匹配, 最终确定了 15 个共有峰, 得到圆柏药材指纹图谱叠加图并生成对照指纹图谱(R), 见图 1。

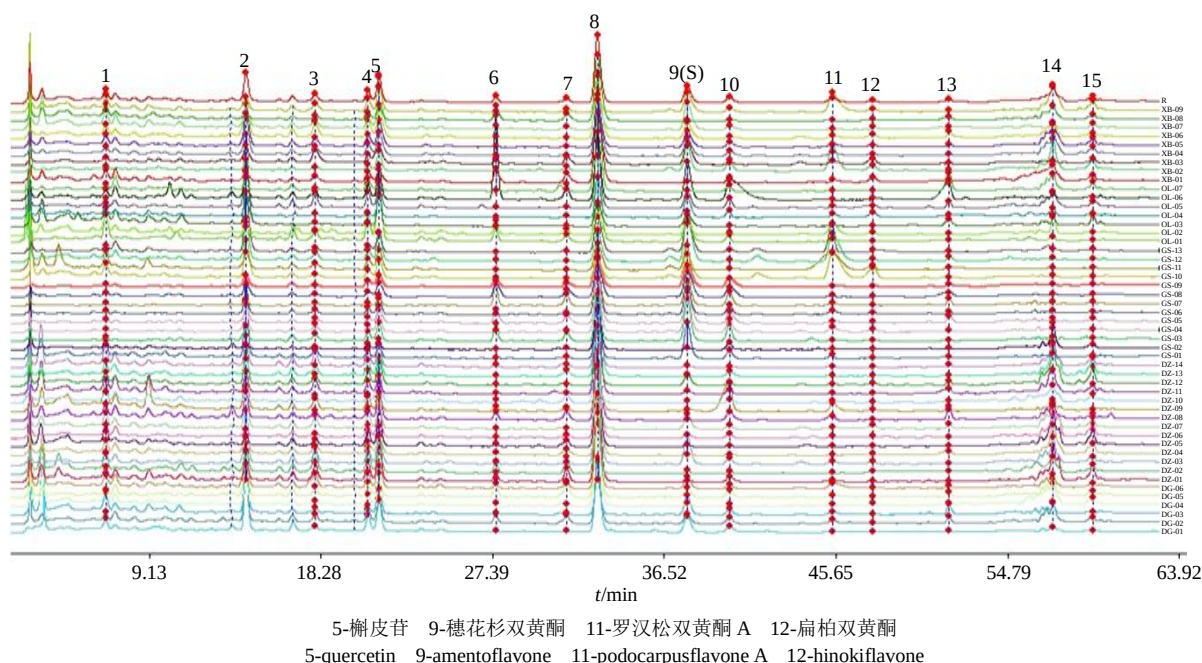


图 1 49 批圆柏药材的 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 1 HPLC fingerprints superposition of 49 batches of *Juniperri Caulis et Folium*

2.5.2 共有峰的确认 将对照品图谱与圆柏对照指纹图谱进行比对, 见图 2, 指认了其中 4 个共有峰, 分别为槲皮苷 (5 号峰)、穗花杉双黄酮 (9 号峰)、罗汉松双黄酮 A (11 号峰)、扁柏双黄酮 (12 号峰)。以穗花杉双黄酮作为参照物峰 (S), 指定其相对峰面积为 1.00, 计算指纹图谱中其他共有特征峰的相对峰面积比值, 见表 2, 各基原圆柏相对峰面积为 0.01~152.94, 不同基原圆柏间峰面积相差较大, 说明其化学成分含量存在差异。

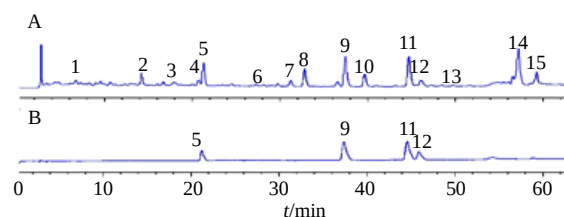


图 2 圆柏对照指纹图谱 (A) 和混合对照品溶液图谱 (B)
Fig. 2 Control fingerprint (A) and standard chromatogram (B) of *Juniperri Caulis et Folium*

表 2 圆柏药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks in fingerprints of *Juniperri Caulis et Folium*

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	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15
DZ-01	6.87	11.72	10.83	11.08	24.37	5.63	9.91	88.22	1.00	1.74	1.42	0.43	1.56	20.70	10.16
DZ-02	4.11	4.68	5.75	4.33	8.34	2.34	4.30	33.67	1.00	0.54	0.79	0.20	0.85	4.09	1.84
DZ-03	0.18	1.20	0.42	0.38	0.88	0.06	0.06	3.50	1.00	0.06	0.09	0.10	0.09	0.72	0.20
DZ-04	6.44	11.69	6.00	7.08	11.42	1.76	5.72	47.54	1.00	1.11	1.26	0.48	0.61	25.39	4.52
DZ-05	6.48	3.61	3.08	5.97	14.37	0.86	4.20	48.81	1.00	1.34	1.35	0.31	11.27	17.61	7.27
DZ-06	0.89	1.88	1.13	2.48	7.34	0.15	1.05	31.26	1.00	0.40	0.33	0.76	0.29	7.04	3.40
DZ-07	0.66	1.81	0.67	0.76	1.37	0.03	0.08	3.75	1.00	0.12	0.16	0.29	0.12	1.50	0.52
DZ-08	11.46	23.16	9.13	12.19	32.66	7.66	13.14	134.75	1.00	1.60	6.85	1.12	3.14	14.36	5.66
DZ-09	0.60	0.98	0.40	0.37	0.44	0.11	0.16	1.42	1.00	0.06	0.29	0.06	0.06	0.08	0.04
DZ-10	2.23	1.97	1.54	1.37	9.39	0.64	2.75	39.33	1.00	0.39	0.47	0.29	0.67	4.06	2.04
DZ-11	3.91	3.84	3.39	2.37	3.55	0.17	0.37	30.46	1.00	0.18	0.01	0.01	0.41	4.41	1.77
DZ-12	0.61	2.24	0.69	0.88	1.66	0.06	0.13	4.89	1.00	0.16	0.08	0.20	0.12	2.25	1.16
DZ-13	9.84	12.59	9.61	12.17	24.43	1.00	8.31	152.94	1.00	2.08	0.01	0.01	1.09	34.60	16.16
DZ-14	7.18	10.97	6.87	7.06	8.64	1.08	1.96	54.47	1.00	1.18	0.01	0.31	0.65	15.89	2.29
XB-01	5.63	3.15	4.52	5.98	7.50	7.86	7.09	75.31	1.00	1.03	2.16	3.03	1.18	13.91	4.15
XB-02	0.12	0.78	0.13	0.17	0.53	0.05	0.19	2.09	1.00	0.08	0.18	0.25	0.10	1.19	0.33
XB-03	0.14	0.55	0.47	0.19	0.62	0.04	0.31	2.01	1.00	0.08	0.15	0.25	0.07	0.05	0.10
XB-04	0.22	1.26	0.37	0.40	0.88	0.04	0.06	2.84	1.00	0.07	0.18	0.12	0.09	0.98	0.34
XB-05	0.35	1.72	0.36	0.47	1.12	0.03	0.06	2.65	1.00	0.08	0.17	0.11	0.09	1.30	0.33
XB-06	0.40	1.67	0.67	0.69	1.28	0.05	0.04	3.43	1.00	0.12	0.13	0.22	0.12	0.76	0.10
XB-07	0.33	0.59	0.25	0.26	1.24	0.08	0.11	1.11	1.00	0.06	0.02	0.01	0.07	0.07	0.13
XB-08	15.41	8.47	5.90	10.81	21.09	19.38	12.50	113.52	1.00	1.05	0.01	0.01	2.57	23.61	4.35
XB-09	0.38	0.53	0.33	0.41	0.80	0.03	0.15	0.51	1.00	0.07	1.00	0.16	0.05	1.47	0.23
GS-01	0.29	1.31	0.23	0.14	0.35	0.01	0.04	1.50	1.00	0.02	0.10	0.01	0.03	0.05	0.01
GS-02	1.34	1.77	0.98	1.80	2.25	0.26	0.75	24.81	1.00	0.37	0.55	0.51	0.54	10.24	2.11
GS-03	0.05	0.28	0.16	0.15	0.33	0.27	0.20	1.07	1.00	0.03	0.06	0.03	0.03	0.03	0.07
GS-04	0.04	0.47	0.17	0.11	0.37	0.04	0.06	1.43	1.00	0.02	0.11	0.07	0.04	0.02	0.01
GS-05	0.07	0.41	0.14	0.12	0.40	0.32	0.25	1.27	1.00	0.02	0.06	0.04	0.04	0.05	0.08
GS-06	0.07	0.57	0.15	0.14	0.41	0.02	0.04	1.73	1.00	0.03	0.12	0.06	0.05	0.04	0.03
GS-07	0.05	0.13	0.06	0.06	0.17	0.43	0.29	1.23	1.00	0.01	0.07	0.02	0.03	0.03	0.08
GS-08	0.09	0.35	0.10	0.14	0.39	0.41	0.27	1.10	1.00	0.02	0.07	0.01	0.03	0.03	0.05
GS-09	0.09	0.39	0.13	0.23	0.42	0.25	0.20	1.24	1.00	0.04	0.06	0.01	0.01	0.03	0.02
GS-10	0.26	0.98	0.16	0.23	0.55	0.02	0.04	0.73	1.00	0.05	1.08	0.44	0.08	0.04	0.05
GS-12	0.37	0.49	0.23	0.28	0.58	0.01	0.01	0.98	1.00	0.08	0.74	0.17	0.06	0.02	0.02
GS-13	0.13	0.58	0.15	0.15	0.41	0.02	0.01	0.62	1.00	0.02	0.62	0.04	0.05	0.01	0.02
QL-01	0.92	0.40	0.30	0.64	2.58	0.81	0.47	2.19	1.00	0.16	0.98	0.23	0.32	0.84	0.15
QL-02	0.83	3.28	0.20	0.12	2.03	0.01	0.03	1.77	1.00	0.08	0.01	0.14	0.06	0.28	0.42
QL-03	0.31	2.56	0.66	0.60	1.04	0.13	0.09	3.32	1.00	0.09	0.08	0.20	0.07	0.63	0.14
QL-04	0.15	0.52	0.19	0.27	0.63	1.49	0.38	1.63	1.00	0.04	0.01	0.01	0.05	0.07	0.05
QL-05	0.04	0.08	0.02	0.02	0.08	0.01	0.01	1.03	1.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.14	0.07
QL-06	0.47	1.41	0.28	0.22	1.44	0.02	0.04	2.46	1.00	0.03	0.06	0.04	0.10	0.19	0.12
QL-07	0.32	0.99	0.13	0.26	1.12	0.24	0.24	3.26	1.00	0.03	0.05	0.08	0.10	0.15	0.12
DG-01	0.37	2.37	0.29	0.63	1.26	0.03	0.09	3.78	1.00	0.09	0.01	0.08	0.09	0.31	0.04
DG-02	0.55	3.30	0.70	0.94	1.75	0.62	0.92	6.25	1.00	0.16	0.35	0.07	0.24	1.79	0.52
DG-03	0.68	2.37	0.28	0.28	1.68	0.04	0.08	1.67	1.00	0.05	0.17	0.05	0.10	0.29	0.03
DG-04	2.34	5.32	1.40	2.48	3.82	0.51	0.56	24.81	1.00	0.46	0.01	0.01	0.37	7.14	1.92
DG-05	0.44	3.21	0.84	1.07	1.78	1.33	1.57	8.85	1.00	0.19	0.18	0.11	0.16	1.43	0.44
DG-06	0.70	2.57	0.33	0.82	2.22	0.27	0.45	5.58	1.00	0.14	0.44	0.05	0.28	0.76	0.16

2.5.3 HPLC 指纹图谱的相似度评价 将 49 批圆柏药材的 HPLC 指纹图谱数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件(2012 年 130723 版)以指纹图谱共有模式(R)为对照,计算各批次样品相似度,结果显示,49 批圆柏相似度 0.648~0.975,不同品种样品相似度相差较大,说明圆柏不同基原之间的化学成分存在差异,见表 3。

表 3 49 批圆柏药材相似度

Table 3 Similarity of 49 batches of *Juniperri Caulis et Folium*

样品	相似度	样品	相似度
QL-01	0.860	XB-05	0.921
QL-02	0.898	XB-06	0.920
QL-03	0.777	XB-07	0.862
QL-04	0.893	XB-08	0.860
QL-05	0.904	XB-09	0.837
QL-06	0.654	GS-01	0.921
QL-07	0.919	GS-02	0.896
DZ-01	0.947	GS-03	0.942
DZ-02	0.944	GS-04	0.842
DZ-03	0.741	GS-05	0.849
DZ-04	0.922	GS-06	0.903
DZ-05	0.953	GS-07	0.648
DZ-06	0.931	GS-08	0.729
DZ-07	0.916	GS-09	0.719
DZ-08	0.929	GS-10	0.771
DZ-09	0.975	GS-11	0.950
DZ-10	0.896	GS-12	0.741
DZ-11	0.900	GS-13	0.688
DZ-12	0.925	DG-01	0.965
DZ-13	0.931	DG-02	0.914
DZ-14	0.921	DG-03	0.945
XB-01	0.690	DG-04	0.794
XB-02	0.916	DG-05	0.885
XB-03	0.910	DG-06	0.651
XB-04	0.912		

2.6 模式识别分析

2.6.1 PCA 分析 将 49 批圆柏样品的 15 个共有色谱峰的峰面积导入 SIMCA-P 软件进行模式识别分析。数据采用自动规格化(unit variance scaling, UV)处理,用 PCA 观察样品的自然聚集。所有样品的 PCA 得分图见图 3,结果表明高山柏、滇藏方枝柏的样品与其他 3 个品种有较好的分离,说明圆柏不同基原药材之间存在一定的化学成分差异,但存在离域值,故进一步采用有监督模式进行分析。

2.6.2 PLS-DA 分析 为了减少组内差异的干扰,

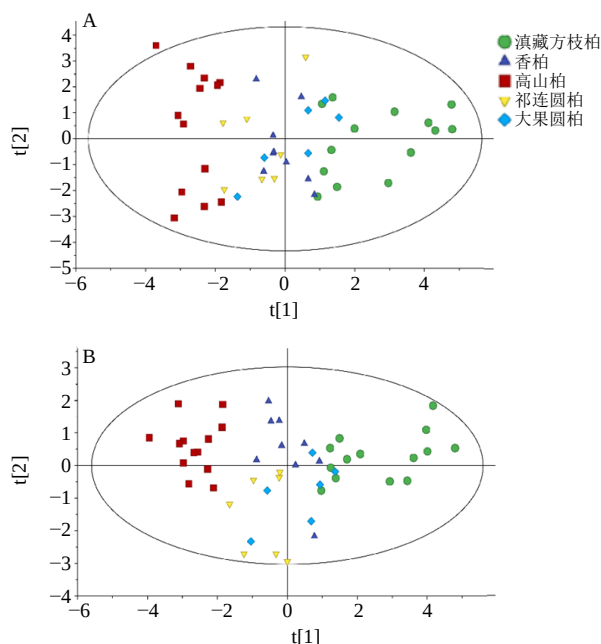


图 3 圆柏样品的 PCA (A) 和 PLS-DA (B) 得分图

Fig. 3 PCA (A) and PLS-DA (B) scores of *Juniperri Caulis et Folium*

更好的分析圆柏不同基原的差异性,本研究进一步采用有监督的模式识别方法 PLS-DA 对所有样品进行分析。PLS-DA 得分图见图 3, PLS-DA 模型的置换检验参数为 $R^2_X=93.8\%$ 、 $Q^2=93.2\%$,表明建立的模型较稳定且预测性良好。PLS-DA 分类结果比 PCA 更为显著,进一步说明高山柏、滇藏方枝柏的化学成分与其他 3 个品种(香柏、祁连圆柏、大果圆柏)存在一定的差异。

此外, VIP 为变量对模型的重要性, VIP 越大表明该成分对组间产生的差异性越大,由图 4 可知,筛选出 8 个共有峰的 VIP>1.0 即贡献度较大的成分作为潜在差异成分,按 VIP 值由大到小排列分别为 9 号峰(穗花衫双黄酮)>14 号峰>15 号峰>8 号峰>3 号峰>5 号峰(槲皮苷)>2 号峰>10 号峰,其中 9 号峰(穗花衫双黄酮)对组间差异贡献最大,且含量较高,故选用 9 号峰为本研究的参照峰。

2.7 方差分析

利用 PLS-DA 多变量分析方法,能够从多维数据中寻找出贡献于分类的主要差异成分,然而并不能判断观察到的差异是否具有统计学意义,因此有必要采用方差分析进一步确证差异的显著性。本研究采用 GraphPad Prism 6.0 软件对 PLS-DA 发现

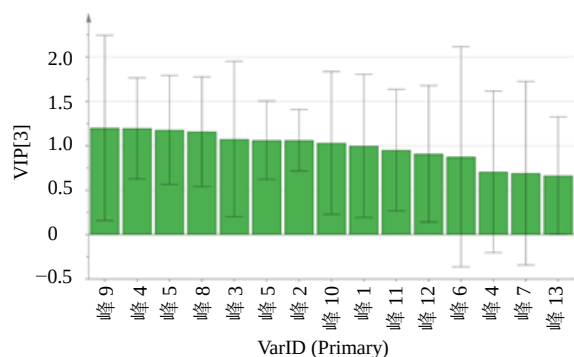
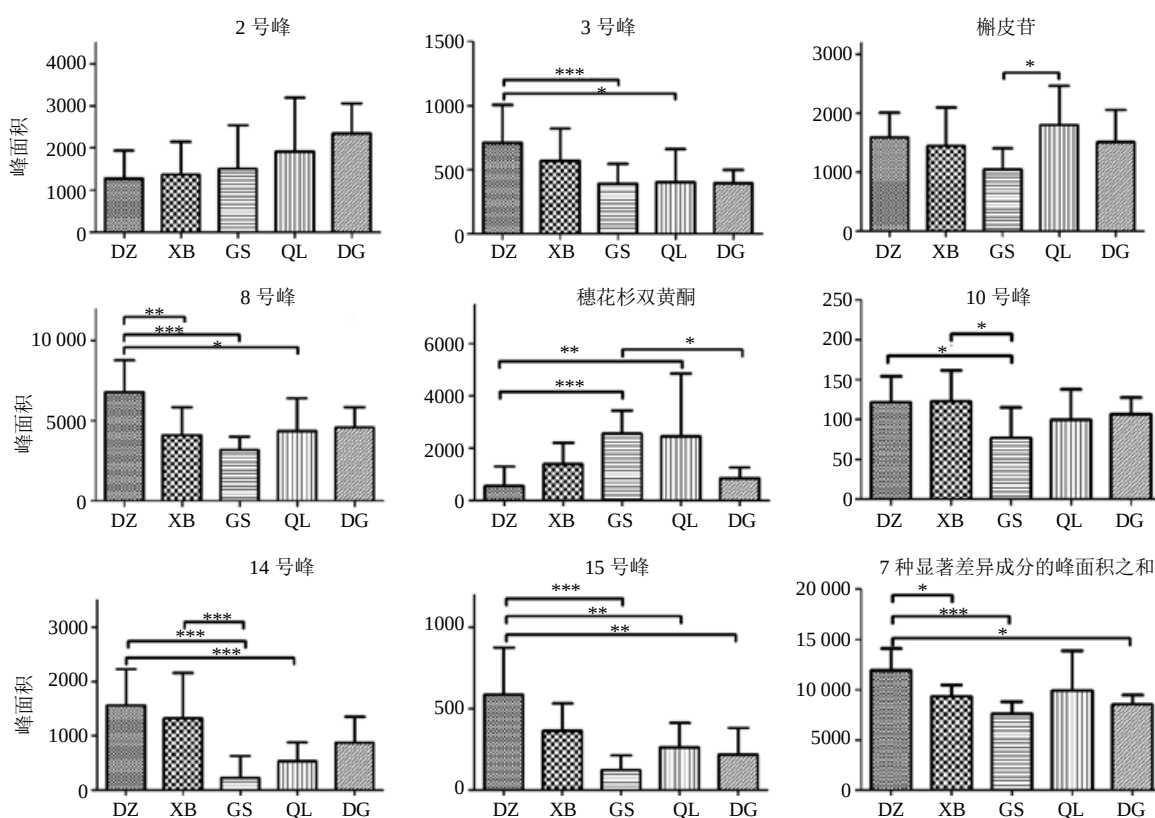


图 4 潜在种间差异成分的 VIP 值

Fig. 4 VIP values of potential interspecific differential components

的 8 个潜在种间差异成分的峰面积进行正态分布检验 ($P>0.1$, 符合正态性), 再进行单因素方差分析和 Tukey's 多重比较。由图 5 可知, 2 号峰在种间的差异不具有显著性 ($P>0.05$), 而其他 7 个成分 (穗花杉双黄酮、14、15、8、3 号峰、槲皮苷和 10 号峰) 在种间有显著差异 ($P<0.05$), 可作为圆柏种间差异标志物。此外, 为了进一步评价圆柏不同基原药材的质量差异, 以 7 个显著差异成分的峰面积之和为指标进行方差分析, 结果表明, 滇藏方枝柏药材可能具有更好的质量, 其次为香柏、大果圆柏和祁连圆柏, 而高山柏药材的质量相对较差, 见图 5。



DZ-滇藏方枝柏 XB-香柏 GS-高山柏 QL-祁连圆柏 DG-大果圆柏 * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

DZ-*J. indica* XB-*J. pingii* var. *wilsonii* GS-*J. squamata* QL-*J. przewalskii* DG-*J. tibetica* * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

图 5 潜在种间差异成分的方差分析结果 ($\bar{x} \pm s$)Fig. 5 One-Way ANOVA results of potential interspecific differential components ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本研究考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液 4 个流动相, 结果表明以甲醇-0.2%磷酸溶液 (B) 为流动相时, 主要色谱峰的分度明显提高, 且峰形

较好, 保留时间适中, 故最终确定流动相为甲醇-0.2%磷酸水溶液; 考察了 210、230、256、270、300 nm 等不同波长下的吸收图谱, 在 270 nm 波长下, 色谱峰峰信息多, 峰形良好, 吸收较强, 故选用 270 nm 作为检测波长。此外, 还考察了色谱柱、柱温等条件, 最终确定了最佳

的色谱条件。

3.2 提取条件的优化

本研究考察了冷浸、回流、超声、煎煮 4 种不同提取方法,结果表明超声提取效率高;考察了 30%、50%、70%、100%甲醇及 30%、50%、70%、100%乙醇的提取效率,结果发现甲醇提取效果较好,所以选定甲醇为最佳提取溶剂;考察了 15、30、60 min 提取时间,发现 30 min 提取率接近 60 min,高于 15 min,最终选择超声 30 min 提取。

3.3 HPLC 指纹图谱的建立及模式识别分析

本研究采用 HPLC 法首次建立了圆柏药材的化学指纹图谱,发现了 15 个共有色谱峰,指认了其中 4 个峰分别为槲皮苷、穗花杉双黄酮、罗汉松双黄酮 A 和扁柏双黄酮。本研究所建立的 HPLC 化学指纹图谱可为圆柏药材的质量控制及评价提供参考。然而,仍然有 11 个共有峰目前无法指认,今后将采用植物化学分离及 HPLC-MS 等分析技术进一步鉴定这些成分。

本研究结合 PCA、PLS-DA 和方差分析,发现圆柏 5 个基原品种之间的差异成分主要有 7 个:穗花杉双黄酮,3、8、14、15 号峰、槲皮苷和 10 号峰。其中,穗花杉双黄酮的 VIP 值最大,故穗花杉双黄酮为最重要的种间差异标志物。穗花杉双黄酮为双黄酮类成分,已被证明具有明显的抗炎、抗氧化等生物活性^[8-9],这与圆柏药材的功能主治基本一致。因此,穗花杉双黄酮可能是圆柏药材的活性成分之一,今后可作为圆柏药材的质量控制指标。

HPLC 指纹图谱结合模式识别方法,能够对不同来源药材进行快速聚类 and 判别分析^[10-13]。本实验通过模式识别分析,建立了圆柏 5 种基原植物的 PCA 和 PLS-DA 分类模型,2 种化学识别方法结果基本一致。高山柏和滇藏方枝柏 2 个品种与其余 3 个品种(香柏、祁连圆柏、大果圆柏)分离较好,表明这些品种之间的化学成分存在一定的差异,因此在临床使用时需要注意这些品种的疗效等同性。此外,本研究以 7 个种间差异成分为指标进行圆柏不同基原药材的质量评价,发现滇藏方枝柏药材可能具有更好的质量,而高山柏药材的质量相对较

差。为了进一步评价圆柏不同基原物种的质量优劣,再后续研究中应对这些品种进行与功效相关的药效评价研究,从而确定优质品种药材,为临床应用和开发新药时选择特定的品种提供参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 藏药卷 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 12.
- [2] 张姣, 德吉, 付爱玲, 等. 密枝圆柏的化学成分及其抗补体、抗氧化活性 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3008-3016.
- [3] 许芳. 新疆圆柏抗炎有效成分及其总黄酮抗大鼠佐剂性关节炎的研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2014.
- [4] 薛永新. 香柏总黄酮及其制备方法与医药用途: 中国, CN121002536 A [P]. 2009, 08-12.
- [5] 董艳芳, 叶睿超, 郭彩霞, 等. 垂枝香柏挥发油的化学成分与抑菌活性分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(3): 88-92.
- [6] 宗玉英, 党合群, 骆桂法, 等. 110 种藏药抗肿瘤体外筛选实验研究 [J]. 药学实践杂志, 2000, 18(5): 290-291.
- [7] 张钧. 指纹图谱研究现状的分析 [J]. 中国医药导报, 2007, 27(4): 150-151.
- [8] 卢焘韬, 王雪莲, 穆成林, 等. 一测多评法结合指纹图谱在枳壳质量评价中的应用 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 558-566.
- [9] 邱峰, 张琳, 郑介婷, 等. 穗花杉双黄酮激活 PPAR- α/γ 抑制 THP-1 源性巨噬细胞向 M1 型极化 [J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(3): 344-351.
- [10] Zhang Z, Sun T, Niu J G, et al. Amentoflavone protects hippocampal neurons: Anti-inflammatory, antioxidative, and antiapoptotic effects [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(7): 1125-1133.
- [11] 李晶峰, 杨海南, 郅慧, 等. 不同产地槐角 HPLC 指纹图谱建立及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6677-6682.
- [12] 李振雨, 陈万发, 王利伟, 等. 不同基原厚朴 UPLC 指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 244-249.
- [13] 曹娟, 王福刚, 刘克, 等. 蜜炙款冬花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药材, 2012, 35(1): 33-36.

[责任编辑 时圣明]