

HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价不同生长期刺山柑果质量

周雯雯¹, 史银基^{2*}, 何江², 杨伟俊^{2*}

1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830004

2. 新疆维吾尔自治区药物研究所 新疆维吾尔药重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830004

摘要: 目的 建立不同生长期刺山柑 *Capparis spinosa* 果实的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定, 结合化学模式识别法评价不同生长期刺山柑果的质量, 为其进一步研究和开发提供依据。方法 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱, 以 0.1% 磷酸溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 310 nm, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》建立 18 批次不同生长期刺山柑果的 HPLC 指纹图谱并分析相似度。使用 SPSS 25.0 和 SIMCA-P 14.1 软件进行聚类分析、主成分分析和偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)。通过对照品比对指认化学成分并进行定量测定。结果 18 批次刺山柑果 HPLC 指纹图谱共匹配出 14 个共有峰, 分别指认出 2 号峰为原儿茶酸、13 号峰为芦丁、14 号峰为山柰酚-3-O-芸香糖苷, 指纹图谱相似度范围为 0.924~0.991。聚类分析将 18 批次刺山柑果分为 3 类; 主成分分析得刺山柑成熟果质量较好; 经 PLS-DA 分析筛选出了芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷等 4 个差异成分。样品中原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷含量分别为 0.032 3~0.059 4、0.115 7~0.464 0、0.062 9~0.330 7 mg/g。结论 建立的刺山柑果 HPLC 指纹图谱操作简便、结果可靠, 原儿茶酸、芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷可以作为刺山柑果质量评价的指标性成分。

关键词: 刺山柑; 指纹图谱; 原儿茶酸; 芦丁; 山柰酚-3-O-芸香糖苷; 化学模式识别; 主成分分析

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)07-2235-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.024

HPLC fingerprint and multi-components determination combined with chemical pattern recognition to evaluate quality of fruits of *Capparis spinosa* at different growth stages

ZHOU Wen-wen¹, SHI Yin-ji², HE Jiang², YANG Wei-jun²

1. School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830004, China

2. Key Laboratory of Xinjiang Uygur Medicine, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints and multi-component content determination for fruits of *Capparis spinosa* in different growth stages, and to evaluate the quality for fruits of *C. spinosa* in different growth stages in combination with chemical pattern recognition, so as to provide a basis for further research and development. **Methods** Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column was used for gradient elution with 0.1% phosphoric acid solution (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, a detection wavelength of 310 nm, a column temperature of 25 °C, and an injection volume of 10 μL. *The Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System (2012 Edition)* was used to establish the HPLC fingerprints of 18 batches for fruits of *C. spinosa* with different growth stages and analyze the similarity. Clustering, principal component analysis, and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were performed using SPSS 25.0 and SIMCA-P 14.1 software. Chemical composition was identified by comparison of controls and the content in the sample was determined. **Results** A total of 14 common peaks were matched by the HPLC fingerprint of 18 batches for fruits of *C. spinosa*, and peak 2 was identified as protocatechuic acid, peak 13 as rutin, and

收稿日期: 2022-08-09

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目 (2021D01A164); 国家中医局青年岐黄学者项目 (2021 年)

作者简介: 周雯雯 (1997—), 女, 硕士研究生 3, 研究方向为中药天然药物新工艺和新剂型研究。E-mail: 1713359580@qq.com

*通信作者: 杨伟俊 (1973—), 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向为新疆地产中药民族药研究。E-mail: wilfred3106@163.com

史银基 (1981—), 女, 硕士, 高级实验师, 研究方向为中药民族药新药研发与利用。E-mail: 57920863@qq.com

peak 14 as kaempferol-3-*O*-rutinoside, and the fingerprint similarity range was 0.924 to 0.991. Cluster analysis divided 18 batches for fruits of *C. spinosa* into three categories; Principal component analysis showed that the quality of ripe for fruits of *C. spinosa* was better; Four differentiated components, including rutin and kaempferol-3-*O*-rutinoside, were screened by PLS-DA analysis. The contents of protocatechuic acid, rutin and kaempferol-3-*O*-rutinoside were 0.032 3—0.059 4, 0.115 7—0.464 0, 0.062 9—0.330 7 mg/g. **Conclusion** The established HPLC fingerprint for fruits of *C. spinosa* is easy to operate and the results are reliable, and protocatechuic acid, rutin and kaempferol-3-*O*-rutinoside can be used as an indicator component for the quality evaluation for fruits of *C. spinosa*.

Key words: *Capparis spinosa* L.; fingerprint; protocatechuic acid; rutin; kaempferol-3-*O*-rutinoside; chemical pattern recognition; principal component analysis

刺山柑果为山柑科 (Capparaceae) 山柑属 *Capparis* L. 植物刺山柑 *Capparis spinosa* L. 的果实, 又被称为野西瓜、老鼠瓜、槌果藤。在我国主要分布于新疆、甘肃、西藏等地区, 国外主要分布于中东地区和地中海国家^[1]。《全国中草药汇编》(第二版下册) 记载刺山柑果可入药, 具有祛风、散寒、除湿功能, 外用可治急、慢性风湿性关节炎^[2]。刺山柑果在民间的人用历史最早可追述至距今 2800 年的吐鲁番洋海人, 在海洋墓地出土了世界上最早药用刺山柑果的实物证据^[3], 在新疆维吾尔自治区各中医和民族医医院, 刺山柑果在治疗风湿、关节炎等疾病方面也有着数十年的临床应用历史^[4-5]。课题组前期对新疆刺山柑果主要分布区的资源进行了系统分析与调研^[6], 并开展了生物多样性研究^[7], 发现吐鲁番地区的刺山柑果在各地维吾尔医及行业内被广泛认可, 通过综合分析确定新疆吐鲁番为我国刺山柑果分布最集中的产地, 是刺山柑果的道地产区, 并收集了吐鲁番 3 个产区不同生长期的 18 批次刺山柑果样品信息。本研究采用 HPLC 法建立不同生长期刺山柑果的指纹图谱, 并测定其中 3 个主要共有成分原儿茶酸、芦丁和山柰酚-3-*O*-芸香糖苷的含量, 并结合化学模式识别法对刺山柑果的质量进行综合评价, 为其质量控制与进一步研究开发提供参考依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1260 Infinity 型 HPLC 仪 (美国安捷伦公司); MS105DU 型电子天平 (梅特勒-托利多公司); UPC-I-10T 型超纯水器 (四川优普超纯科技有限公司); DZTW 型调温电热套 (北京市永光明医疗仪器有限公司); DZKW-S-4 型电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器有限公司); FW-80 型高速万能粉碎机 (北京市永光明医疗仪器有限公司); KQ-5200B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料

对照品原儿茶酸 (批号 110809-201205, 质量分数 ≥ 99.9%)、芦丁 (批号 100080-201409, 质量分数 ≥ 91.9%)、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 (批号 112007-202103) 均购自中国食品药品检定研究院。乙腈、磷酸为色谱纯; 甲醇为分析纯; 水为超纯水; 18 批次刺山柑果分别采于 2016 年 5~7 月, 经新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定为山柑科植物刺山柑 *C. spinosa* L. 的果实。所有样品采收后放置于阴凉通风处自然晾干, 并剔除生虫果实避免降低样品的品质从而影响实验效果, 样品充分阴干后密封保存。使用前粉碎, 过 80 目筛后置于干燥器中备用。样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取刺山柑果细粉约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 称定质量, 加热回流 1 h, 放冷, 用 80% 甲醇补足减失的质量, 滤过后滤液蒸干, 置 5 mL 量瓶中, 用 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别精密称取原儿茶酸、芦丁、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷 3 种对照品, 加入 80% 甲醇溶液, 配制质量浓度分别为 0.501、0.524、0.520 mg/mL 的对照品储备液, 分别精密量取各对照品储备液 0.5、2.0、1.5 mL 于同一 10 mL 量瓶中, 加入 80% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得混合对照品溶液。

2.2 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~40 min, 3%~8% B; 40~60 min, 8%~12% B; 60~90 min, 12%~22% B); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 310 nm; 柱温 25 °C; 进样量 10 μL。

表 1 刺山柑果的样品信息

Table 1 Sample information for fruits of *Capparis spinosa* L.

编号	产地	生长期	批次号
S1	新疆吐鲁番市沙漠植物园	幼果	2016052506
S2	新疆吐鲁番艾丁湖乡	幼果	2016052501
S3	新疆吐鲁番托克逊镇	幼果	2016052502
S4	新疆吐鲁番托克逊镇	幼果	2016052503
S5	新疆吐鲁番艾丁湖乡	幼果	2016052504
S6	新疆吐鲁番艾丁湖乡	幼果	2016052505
S7	新疆吐鲁番艾丁湖乡	近成熟果	2016070101
S8	新疆吐鲁番艾丁湖乡	近成熟果	2016070102
S9	新疆吐鲁番托克逊镇	近成熟果	2016063002
S10	新疆吐鲁番托克逊镇	近成熟果	2016063003
S11	新疆吐鲁番托克逊镇	近成熟果	2016063003-2
S12	新疆吐鲁番托克逊镇	近成熟果	2016063004
S13	新疆吐鲁番托克逊镇	近成熟果	2016063005
S14	新疆吐鲁番艾丁湖乡	近成熟果	2016063007
S15	新疆吐鲁番市沙漠植物园	近成熟果	2016070103
S16	新疆吐鲁番托克逊镇	成熟果	2016063001
S17	新疆吐鲁番托克逊镇	成熟果	2016063008
S18	新疆吐鲁番艾丁湖乡	成熟果	2016030306

2.3 指纹图谱方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密称取刺山柑果粉末 1 份 (S15), 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件重复进样 6 次, 以峰形对称且响应值较大的 14 号色谱峰山柰酚-3-O-芸香糖苷为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.14%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 3.61%, 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 精密称取刺山柑果粉末 1 份 (S15), 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后的 0、4、8、12、16、20、24 h 按照“2.2”项下色谱条件进样分析, 以 14 号色谱峰山柰酚-3-O-芸香糖苷为参照峰, 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.33%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 2.65%, 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 重复性试验 精密称取刺山柑果粉末 6 份 (S15), 按照“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件进样分析, 以 14 号色谱峰山柰酚-3-O-芸香糖苷为参照峰 (S), 测得各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.27%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 2.96%, 表明该方法重复性良好。

2.4 指纹图谱的建立和相似度分析

2.4.1 指纹图谱的建立及共有峰的指认 18 批次刺山柑果样品按“2.1.1”项下方法制备成供试品溶液, 按照“2.2”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。将得到的 18 批次刺山柑果指纹图谱 (图 1) 以 AIA 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》, 以 S15 样品为参照指纹图谱, 时间窗宽度设置为 0.3 min, 采用多点校正法自动匹配分析法建立指纹图谱, 中位数法生成对照指纹图谱。通过与混合对照品溶液图谱比对, 对共有峰进行指认。结果显示, 18 批次刺山柑果的色谱图中共匹配出 14 个共有峰。通过与混合对照品溶液图谱比对, 指认出其中 3 个共有峰, 依次为原儿茶酸 (2 号峰)、芦丁 (13 号峰)、山柰酚-3-O-芸香糖苷 (14 号峰)。18 批次刺山柑果的 HPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱 (R) 见图 1, 混合对照品溶液的 HPLC 图见图 2。

2.4.2 相似度分析 以生成的对照指纹图谱为标准, 计算 18 批次不同生长期刺山柑果样品的相似度, 结果如表 2 所示, 样品相似度为 0.924~0.991, 表明各生长期刺山柑果之间成分组成差异小, 指纹图谱相对稳定, 可以用于综合评价刺山柑果的整体质量。

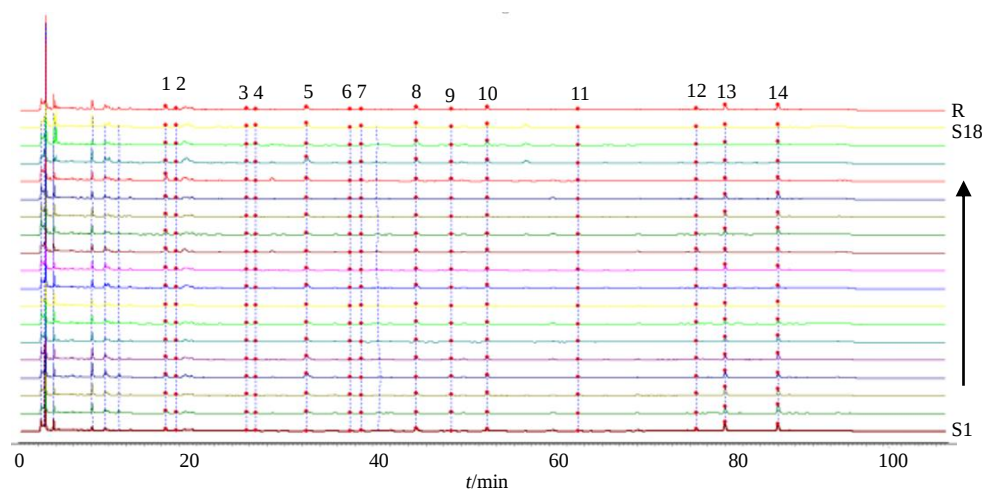


图 1 18 批次刺山柑果的 HPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

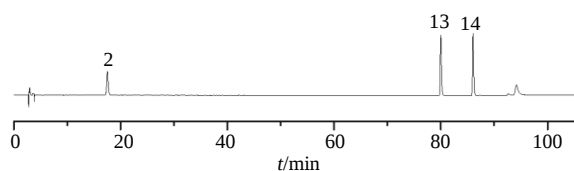
Fig. 1 HPLC superimposed fingerprint and control fingerprint (R) of 18 batches for fruits of *C. spinosa*2-原儿茶酸 13-芦丁 14-山柰酚-3-O-芸香糖苷
2-protocatechin acid 13-rutin 14-kaempferol-3-O-rutinoside

图 2 混合对照品溶液的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of mixed control solution

表 2 18 批次刺山柑果样品 HPLC 指纹图谱相似度评价结果

Table 2 HPLC fingerprint similarity evaluation results of 18 batches for fruits of *C. spinosa*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.950	S10	0.983
S2	0.966	S11	0.974
S3	0.961	S12	0.974
S4	0.925	S13	0.985
S5	0.981	S14	0.981
S6	0.985	S15	0.968
S7	0.991	S16	0.944
S8	0.986	S17	0.957
S9	0.980	S18	0.924

2.5 化学模式识别

2.5.1 聚类分析 以 18 批次样品中 14 个共有峰的峰面积为变量, 导入 SPSS 25.0 软件, 采用组间联接、平方欧式距离法进行系统聚类分析, 结果如图 3 所示, 当欧氏距离为 15 时, 刺山柑果样品可聚为 3 类, S2~S8、S10~S15 聚为第 1 类, 有幼果和近

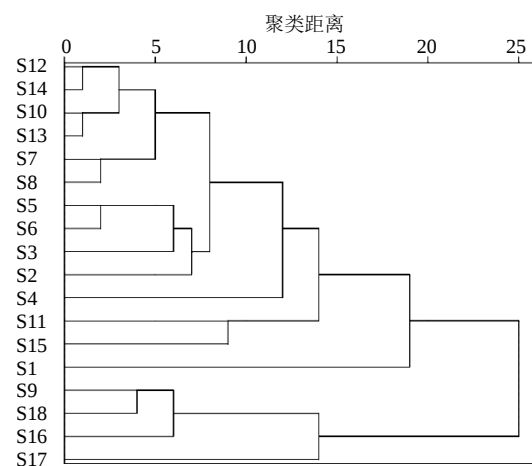


图 3 刺山柑果的系统聚类分析图

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis for fruits of *C. spinosa*

成熟果的样品, 表明大部分幼果与近成熟果质量上较为相似; S1 单独聚为第 2 类, 为吐鲁番市沙漠植物园幼果样品, 表明 S1 批次幼果与其余批次刺山柑果之间质量上存在一定的差异; S9、S16~S18 聚为第 3 类, 其中 S9 为近成熟果样品, 其余 3 批次均为成熟果样品, 表明 S9 批次近成熟果与成熟果质量上较为相似。

2.5.2 主成分分析 主成分分析是最常用的多指标线性降维和多变量分析方法。该法可将原有众多具有一定相关性的变量, 重新组合转换成一组新的、相互无关的变量来代替原变量, 转换后的本组变量叫主成分, 该分析方法已经广泛应用于中药材的品质综合评价与分类^[8]。以 18 批次刺山柑果指纹图谱中 14 个共有峰的峰面积为变量, 运用 SPSS 25.0 软

件进行主成分分析,以主成分特征值 >1 为提取标准并生成因子得分系数矩阵。结果 Bartlett 球形检验显著性 $P<0.0001$,说明拒绝变量相互独立的假设,即主成分分析成立,共提取得到 5 个主成分,其累积方差贡献率为 87.780%,说明这 5 个主成分可解释原有变量 87.780%的信息,即可以用 5 个主成分代替指纹图谱 14 个共有峰评价刺山柑样品。特征值及贡献率见表 3。

表 3 特征值及方差贡献率

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	5.489	39.204	39.204
2	2.625	18.749	57.953
3	1.829	13.067	71.019
4	1.321	9.436	80.456
5	1.025	7.324	87.780

因子载荷矩阵反映了各主成分与 14 个共有峰即原始变量之间的相关系数,结果见表 4,第 1 主成分主要反映了色谱峰 2、4、7、8、10 的信息,第 2 主成分主要反映了色谱峰 3、5、9 的信息,第 3 主成分主要反映了色谱峰 1、12 的信息,第 4 主成分主要反映了色谱峰 13、14 的信息,第 5 主成分主要反映了色谱峰 6、11 的信息。

表 4 因子载荷矩阵

共有峰编号	载荷				
	1	2	3	4	5
1	-0.372	0.574	0.669	-0.050	-0.198
2	0.507	-0.177	0.350	-0.589	0.411
3	0.302	0.727	-0.497	-0.051	-0.165
4	0.902	-0.145	0.045	-0.112	0.157
5	0.406	0.720	-0.366	0.179	0.172
6	-0.631	-0.139	-0.481	0.040	0.472
7	0.857	-0.272	0.002	0.270	-0.119
8	0.872	-0.128	-0.063	0.383	0.013
9	-0.328	0.815	0.274	0.182	-0.034
10	0.763	0.043	0.125	0.546	0.178
11	-0.489	0.321	0.203	0.187	0.635
12	-0.215	-0.301	0.652	0.425	0.027
13	-0.764	-0.289	-0.206	0.370	0.082
14	-0.758	-0.377	-0.207	0.141	-0.233

运用 SPSS 25.0 软件计算 18 批次刺山柑果样品的主成分得分,以各主成分对应的贡献率为权重系数计算综合得分,并进行排序,结果见表 5。由表 5 可知,3 批次刺山柑成熟果综合得分位居前 3,因此,以 14 个共有峰峰面积为综合评价指标,可得刺山柑果成熟期质量较好。

表 5 18 批次刺山柑果的主成分因子得分和排序

Table 5 Factor scores and sorting of principal components of 18 batches for fruits of *C. spinosa*

编号	得分					排序	
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5		综合
S1	-1.86	-3.06	0.14	1.67	-0.40	-1.16	17
S2	-2.31	-0.39	-1.66	-0.41	-1.20	-1.32	18
S3	-2.25	0.30	-0.92	2.21	1.07	-0.66	14
S4	-2.44	2.20	-0.22	0.26	1.17	-0.46	10
S5	-0.68	0.06	-0.90	1.33	-0.23	-0.26	9
S6	-1.29	-0.41	-1.22	0.14	1.17	-0.64	13
S7	0.44	-0.96	0.08	-0.59	-0.27	-0.07	8
S8	1.26	-1.66	0.34	-2.18	1.29	0.12	7
S9	2.02	0.96	-0.81	0.35	-0.33	0.87	4
S10	-1.79	0.40	0.02	-1.42	2.08	-0.61	12
S11	0.33	-0.68	4.01	0.48	0.14	0.58	6
S12	-1.26	-0.10	-0.58	-0.81	-1.51	-0.78	15
S13	-0.50	-0.31	-0.60	-1.72	-0.65	-0.54	11
S14	-1.77	-0.87	-0.05	-0.59	-1.46	-1.03	16
S15	-0.70	4.07	2.10	-0.22	-0.91	0.68	5
S16	3.56	2.04	-1.76	0.68	-0.22	1.59	2
S17	3.79	-1.76	1.34	0.89	0.08	1.42	3
S18	5.45	0.18	0.69	-0.07	0.18	2.27	1

以 18 批次刺山柑果 HPLC 指纹图谱的 14 个共有峰峰面积为变量,导入 SIMCA-P 14.1 分析软件,经分析生成得分矩阵图见图 4。由得分矩阵图可知,所有数据点均在 95%置信区间内,刺山柑成熟果与近成熟果和幼果之间区分明显。

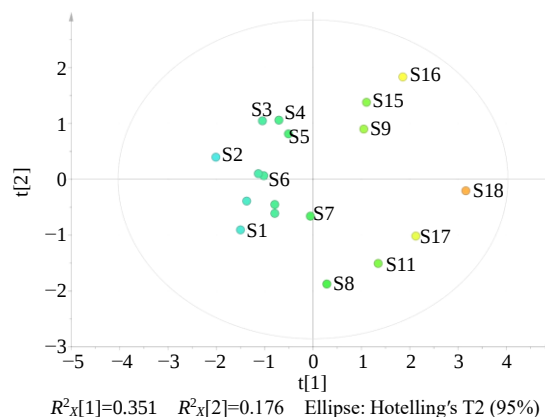


图 4 18 批次刺山柑果的主成分得分矩阵图

Fig. 4 Matrix of principal component scores of 18 batches for fruits of *C. spinosa*

2.5.3 PLS-DA 分析 为了更好地体现组间差异,进一步做了有监督模式的 PLS-DA 识别,并筛选出对组间差异贡献率较大的成分。将 18 批次刺山柑果 HPLC 指纹图谱中 14 个共有峰峰面积为变量导入 SIMCA-P 14.1 软件,进行 PLS-DA 建模分析,通过自动拟合建立模型。变量重要性投影 (variable importance in

projection, VIP) 值是筛选差异性化合物的重要指标, VIP 值越高, 对组间差异的影响越大^[9]。通过对 VIP 值进行分析, 得到差异性标记物的 VIP 得分图, 见图 5, 得分见表 6, 以 VIP 值 > 1 为阈值, 筛选出了 4 个变量, 按 VIP 值的大小依次排序为 6 号峰、芦丁 (13 号峰)、山柰酚-3-O-芸香糖苷 (14 号峰) 和 4 号峰, 这 4 个成分在不同生长期刺山柑果间起到重要的作用, 是其成分差异的主要标志物。

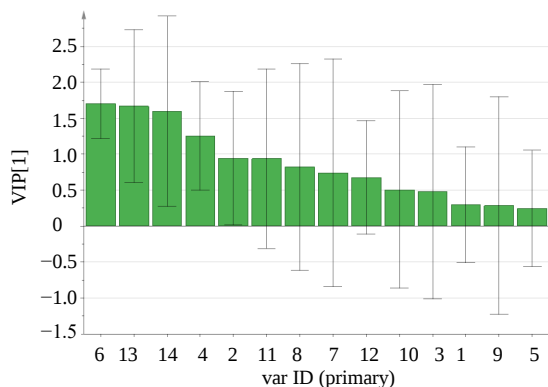


图 5 刺山柑果 14 个色谱峰的 VIP 得分图

Fig. 5 VIP score graph of 14 chromatographic peaks for fruits of *C. spinosa*

表 6 刺山柑果 14 个色谱峰的 VIP 得分

Table 6 VIP score table for 14 chromatographic peaks for fruits of *C. spinosa*

峰号	VIP 值	峰号	VIP 值
6	1.702 690	7	0.741 646
13	1.670 620	12	0.679 629
14	1.596 410	10	0.509 580
4	1.254 340	3	0.480 955
2	0.945 254	1	0.297 192
11	0.939 981	9	0.286 834
8	0.822 875	5	0.245 556

2.6 刺山柑果中 3 个化学成分的含量测定

2.6.1 线性关系考察 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇定容, 摇匀, 制成系列溶液。取该系列溶液和混合对照品溶液 (母液) 适量, 按“2.2”项下色谱条件进样分析。以各成分质量浓度为横坐标 (X)、峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得 3 个成分的回归方程与线性范围, 结果见表 7。

2.6.2 精密度试验 精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液, 在“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次,

表 7 刺山柑果中 3 个化学成分的线性关系考察结果

Table 7 Results of a linear relationship investigation of three chemical components in fruits of *C. spinosa*

成分	回归方程	r^2	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
原儿茶酸	$Y=18.115 X-0.731 7$	0.999 8	2.505~25.050
芦丁	$Y=8.445 X-1.076 7$	0.999 9	10.480~104.800
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$Y=11.728 X-2.348 3$	0.999 9	7.800~78.000

记录原儿茶酸、芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷的峰面积积分值, 计算 RSD 值分别为 0.97%、0.55%、0.64%, 表明该仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性试验 精密称取刺山柑果粉末 1 份 (S15), 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后的 0、4、8、12、16、20、24 h 按照“2.2”项下色谱条件进样分析, 记录原儿茶酸、芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷的峰面积积分值计算 RSD 值分别为 1.05%、0.76%、0.59%, 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.6.4 重复性试验 精密称取刺山柑果粉末 6 份 (S15), 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项下色谱条件平行进样分析, 计算原儿茶酸、芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷的平均质量分数分别为 0.044、0.158、0.136 mg/g。峰面积积分值的 RSD 值分别为 3.72%、1.84%、1.74%, 表明该实验重复性良好。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取刺山柑果粉末 0.5 g (S15), 置具塞锥形瓶中, 平行 6 份, 分别加入一定体积的对照品溶液, 精密加入 80% 甲醇 25 mL, 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项下色谱条件平行进样分析, 计算回收率和 RSD 值。结果原儿茶酸、芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷的平均回收率分别为 84.46%、95.34%、94.28%, RSD 值均小于 5%。

2.6.6 样品含量测定 18 批次刺山柑果样品粉末, 按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项下色谱条件进样分析, 测定 3 个成分的峰面积, 带入直线回归方程, 计算各成分在样品中的质量分数, 结果见表 8。

3 讨论

在供试品前处理方法考察时, 本实验考察了不同提取溶剂 (50%、60%、70%、80%、90% 乙醇、30%、50%、70%、80%、100% 甲醇和水)、提取方法 (超声提取法和加热回流提取法)、提取时间 (30、60、90、120 min)、提取次数 (1、2、3、4 次)、

表 8 18 批次刺山柑果中 3 个化学成分的含量 ($n=3$)
Table 8 Content determination of three chemical components in 18 batches for fruits of *C. spinosa* ($n=3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	原儿茶酸	芦丁	山柰酚-3-O-芸香糖苷
S1	0.032 8	0.464 0	0.271 2
S2	0.036 9	0.322 0	0.330 7
S3	0.032 3	0.436 3	0.220 4
S4	0.038 9	0.347 9	0.165 5
S5	0.033 5	0.266 7	0.220 1
S6	0.038 8	0.265 1	0.221 7
S7	0.045 6	0.221 1	0.159 1
S8	0.059 4	0.147 0	0.148 3
S9	0.039 4	0.118 1	0.078 6
S10	0.046 8	0.268 2	0.148 6
S11	0.048 8	0.166 2	0.122 5
S12	0.036 3	0.286 5	0.226 9
S13	0.045 1	0.263 3	0.139 4
S14	0.032 7	0.246 8	0.214 6
S15	0.039 7	0.149 0	0.131 2
S16	0.036 4	0.120 6	0.062 9
S17	0.045 6	0.167 1	0.124 5
S18	0.049 7	0.115 7	0.073 4

提取溶媒倍量 (1:5、1:10、1:25、1:50) 对刺山柑果指纹图谱提取效果的影响, 以指纹图谱色谱峰数量、峰型和分离度为指标, 最终确定 80% 甲醇为提取溶剂, 加热回流提取 60 min, 提取 1 次, 提取溶媒倍量 1:25, 作为供试品溶液处理方法。在检测波长筛选时, 对刺山柑果样品溶液进行 200~400 nm 全波长扫描, 波长为 310 nm 时, 指纹图谱色谱峰数量较多, 峰形及分离度较好, 可满足指纹图谱建立要求, 故选择 310 nm 波长作为检测波长。此外, 本实验考察了乙腈-水、乙腈-磷酸、乙腈-甲酸、甲醇-水、甲醇-磷酸作为流动相系统对指纹图谱的影响, 结果表明, 乙腈-0.1% 磷酸水溶液梯度洗脱刺山柑果指纹图谱色谱峰分离效果最为理想。在实验过程中发现刺山柑果样品中化学成分复杂, 单个成分含量较低, 查阅相关文献发现含量测定类文献较少, 且测得成分含量也较低, 如王响华等^[10]测得 5 批次刺山柑果中原儿茶酸的平均质量分数为 0.013 5 mg/g, 高丽等^[11]测得 14 批次不同产地刺山柑果中芦丁的平均含量为 0.230 5 mg/g, 山柰酚-3-O-芸香糖苷的平均含量为 0.184 5 mg/g, 考虑到此

情况在处理样品时将提取液过滤蒸干再定容, 一方面起到除杂的目的, 另一方面可以提高响应值。

本实验对 18 批次不同生长期刺山柑果指纹图谱进行研究, 结合化学模式识别法分析, 可以更加全面客观地评价药材质量^[12]。在指纹图谱相似度分析中, 18 批次样品相似度均高于 0.92, 表明不同生长期刺山柑果的化学成分组成较为相似, 但各批次样品之间化学成分含量存在一定差异。聚类分析将刺山柑果样品聚为 3 类, 大部分幼果和近成熟果聚为一类; 而 S1 幼果单独聚为一类, 其原因可能是 S1 幼果从外观上来看是 6 批次幼果中最小的, 果实小而瘪不如其余批次幼果饱满, 推测 S1 的果期可能比其余批次幼果短, 所以导致 S1 幼果与其余批次幼果之间质量上存在一定的差异, 单独聚为一类; S9 近成熟果和 3 批次成熟果聚为一类, 在样品粉碎前处理过程中笔者发现 S9 批次样品与 3 批次成熟果均出现粘壁现象, 推测这一现象可能与聚类分析结果有联系。主成分分析确定刺山柑果的成熟期质量较好, 且该生长阶段与近成熟果和幼果时期有区别。在研究中考虑到成熟果的果实会随着成熟程度崩裂开, 导致种子洒落, 果实采收不完整, 而幼果的果实未成熟, 结合实际采收情况、当地民间传统使用习惯以及刺山柑果药材市场主流情况, 本课题以近成熟果制定了刺山柑果质量标准^[13], 本次实验结果也可为后期研究提供参考价值。经过 PLS-DA 分析筛选出 6、13、14 号峰和 4 号峰为差异标志物, 经比对, 其中 13 号峰为芦丁, 14 号峰为山柰酚-3-O-芸香糖苷, 其余差异标志物还有待后续进一步研究指认。

从刺山柑果 HPLC 指纹图谱中指认出其中 3 个共有成分, 分别为原儿茶酸、芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷, 这 3 个成分均具有抗炎活性^[14-16], 与刺山柑果的抗关节炎活性吻合, 推测这 3 个成分可能与刺山柑果药理活性密切相关, 可为下一步的药效物质基础研究提供参考。此外本实验发现 3 个成分含量在不同生长期中各不相同, 原儿茶酸含量从幼果到成熟果整体呈上升趋势, 而芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量从幼果到成熟果整体呈下降趋势, 可能由于随着果实的生长发育, 果皮的叶绿素和碳水化合物含量产生变化, 导致果实光合作用和呼吸作用效率改变, 从而影响化学成分含量的变化, 推测随着刺山柑果的生长酚酸类物质逐步积累, 而黄酮类物质可能代谢转化为别的产物, 与其生物合成

有关。

本研究建立了不同生长期刺山柑果的 HPLC 指纹图谱, 确定了 14 个共有峰, 结合化学模式识别法确定刺山柑果的成熟期质量较好, 筛选出 4 个差异标志物, 并测定了其中原儿茶酸、芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷 3 个指标成分的含量, 所建方法准确度高、重复性好, 可用于刺山柑果的质量控制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志(第一卷)[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1993: 32.
- [2] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编彩色图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 223.
- [3] Jiang H E, Li X, Ferguson D K, *et al.* The discovery of *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) in the Yanghai Tombs (2800 years b.p.), NW China, and its medicinal implications [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113(3): 409-420.
- [4] 朱江丽. 苘麻、老鼠瓜治风湿 [J]. 中国民族民间医药杂志, 1996, 5(3): 24-25.
- [5] 罗俊, 谢阳. 维药刺山柑果治疗痛风风湿病 15 例 [J]. 中国民族医药杂志, 1999, 5(2): 3.
- [6] 杨伟俊, 谢彩香, 地力努尔, 等. 荒漠药用植物刺山柑产地适宜性数值分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 100-104.
- [7] Liu C, Xue G P, Cheng B, *et al.* Genetic diversity analysis of *Capparis spinosa* L. populations by using ISSR markers [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 16476-16483.
- [8] 聂鞞, 朱培林, 房海灵, 等. HPLC 指纹图谱结合化学计量学评价不同产地广东紫珠药材的质量 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 185-191.
- [9] 钟民勇, 乔日发, 罗涛, 等. 基于指纹图谱定性、多指标成分定量与化学计量学的枳壳质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(4): 138-145.
- [10] 王响华, 陈文, 郭小娜. 维药刺山柑果实中香草酸和原儿茶酸的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 71-73.
- [11] 高丽, 王旭, 卞华, 等. 一测多评法同时测定维药槲果藤中 2 个黄酮醇苷类成分的含量 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(5): 1071-1075.
- [12] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 231-237.
- [13] 杨伟俊, 阿不都沙拉木, 陈燕, 等. 刺山柑果质量标准研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 133-134.
- [14] Kakkar S, Bais S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential [J]. *ISRN Pharmacol*, 2014, 2014: 952943.
- [15] 冯爽, 马霄, 冯亚莉, 等. 天然化合物芦丁的治疗潜力 [J]. 化学通报, 2021, 84(12): 1338-1344.
- [16] Thi B, Luyen T, Bui H, *et al.* Anti-inflammatory components of *Euphorbia humifusa* Willd. [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(8): 1895-1900.

[责任编辑 时圣明]