

基于 HPLC 指纹图谱及多指标定量结合熵权 TOPSIS 法评价不同产地白屈菜药材质量

张红娟¹, 史银基², 罗玉琴³, 何江², 王浩杰¹, 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

3. 中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要: 目的 建立不同产地白屈菜 *Chelidonium majus* 的 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定方法, 综合评价不同产地白屈菜药材质量, 为其进一步研究和开发提供依据。方法 采用 Agilent Extend 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, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 284 nm, 柱温 25 ℃, 进样量 10 μL。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》建立 4 个主产地 19 批次白屈菜药材的 HPLC 指纹图谱并分析相似度。使用 Origin2022 软件进行聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、SIMCA-14.1 软件进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 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指标成分并定量测定, 结果采用化学模式识别、箱线图以及熵权 TOPSIS 法进行综合评价。结果 19 批次白屈菜 HPLC 指纹图谱共匹配出 16 个共有峰, 指认出白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱和白屈菜红碱。指纹图谱相似度范围为 0.745~0.983。HCA 将 19 批白屈菜分为 4 类; PCA 得到 5 个主成分的累积方差贡献率为 84.758%; PLS-DA 表明盐酸血根碱和白屈菜红碱等 5 个成分不同产地白屈菜药材质量差异的标志性成分。白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱、白屈菜红碱质量分数分别为 0.658~1.547、0.718~2.577、0.029~0.108、0.095~0.527、0.069~0.253 mg/g。箱线图与熵权 TOPSIS 法评价均表明辽宁和陕西产地的白屈菜药材综合质量较优。结论 所建立的白屈菜药材 HPLC 指纹图谱方法分离度好, 操作简单; 含量测定方法具有较好的稳定性和重复性, 可为白屈菜药材质量控制与进一步研究提供参考依据。

关键词: 白屈菜; 指纹图谱; 白屈菜碱; 盐酸黄连碱; 紫堇碱; 盐酸血根碱; 白屈菜红碱; 化学模式识别; 主成分分析; 熵权 TOPSIS 法

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)12-4194-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.026

Quality evaluation of *Chelidonium majus* herbs from different regions based on HPLC fingerprint and multi-index content determination combined with entropy weighted TOPSIS method

ZHANG Hongjuan¹, SHI Yinji², LUO Yuqin³, HE Jiang², WANG Haojie¹, YANG Weijun²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830004, China

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

3. Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint spectra and multi-index content determination method of *Chelidonium majus* from different regions. The quality of *C. majus* herbs from different regions was evaluated comprehensively to provide a basis for its further research and development. **Methods** Agilent Extend C₁₈ chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used and

收稿日期: 2023-11-02

基金项目: 新疆维吾尔自治区公益性科研院所项目 (KY2023094); 新疆自治区“十四五”重大科技专项 (2022A03003-3)

作者简介: 张红娟 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为新疆地产中药民族药新药研发与利用。

Tel: 13099283335 E-mail: 1280750594@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新药研发与利用。

Tel: 13999875994 E-mail: wilfred3106@163.com

0.1% phosphoric acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) were as the mobile phase for gradient elution, volume flow rate was 1.0 mL/min, detection wavelength was 284 nm, column temperature was 25 °C, and injection volume was 10 µL. Using the “Similarity Evaluation System for Traditional Chinese Medicine Chromatographic Fingerprints (2012 Edition)” to establish HPLC fingerprints of 19 batches of *C. majus* herbs from four main producing areas and analyze the similarity. Using Origin2022 software for hierarchical cluster analysis (HCA) and SIMCA-14.1 software for principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). By comparing the identified indicator components with reference materials and quantitatively measuring them, a comprehensive evaluation was conducted using chemical pattern recognition and entropy weighted TOPSIS method. **Results** A total of 16 common peaks were identified in the HPLC fingerprint of 19 batches of *C. majus*, identifying chelidone, coptisine hydrochloride, corydiline, sanguinarine hydrochloride and chelerythrine. The similarity range of the fingerprint spectrum was 0.745—0.983. HCA divided 19 batches of *C. majus* into four categories; The cumulative variance contribution rate of the five principal components obtained from PCA was 84.758%; The PLS-DA showed that five components, including sanguinarine hydrochloride and chelidone, were the symbolic components of the quality difference of *C. majus* herbs from different regions. The mass fractions of chelidone, coptisine hydrochloride, corydiline, sanguinarine hydrochloride and chelerythrine were 0.658—1.547, 0.718—2.577, 0.029—0.108, 0.095—0.527 and 0.069—0.253 mg/g, respectively. The box plot and entropy weighted TOPSIS method evaluation both indicated that the comprehensive quality of *C. majus* herbs from Liaoning and Shaanxi regions was superior. **Conclusion** The established HPLC fingerprint method for *C. majus* herbs has good separation and simple operation; The content determination method has good stability and repeatability, which can provide a reference basis for the quality control and further research of *C. majus* herbs. **Key words:** *Chelidonium majus* L.; fingerprint; chelidone; coptisine hydrochloride; corydiline; sanguinarine hydrochloride; chelerythrine; chemical pattern recognition; principal component analysis; entropy weight TOPSIS method

白屈菜为罂粟科白屈菜属白屈菜 *Chelidonium majus* L. 的干燥全草, 收载于《中国药典》2020 年版, 为多年生草本植物, 具有解痉止痛、止咳平喘等功效^[1]。白屈菜别名山黄连、土黄连、牛金花、八步紧、断肠草等。国内主要分布于东北、华北、西北地区^[2], 喜生于山谷的湿润地带, 林缘水沟边, 是北方山区常见的药用植物。国外主要分布于朝鲜、日本、俄罗斯及欧洲等地^[3]。作为吉林省道地药材^[4], 首载于明代《救荒本草》^[5]。研究表明, 白屈菜富含异喹啉类生物碱, 主要包括白屈菜碱、盐酸黄连碱、白屈菜红碱、盐酸血根碱、小檗碱等, 具有抗肿瘤^[6-10]、抑菌杀虫^[11-13]、镇痛抗炎^[14-16]、祛痰止咳平喘^[17-18]等功效。临床用于治疗胃脘疼痛、解痉止痛、止咳平喘、百日咳等疾病^[1]。

《中国药典》描述白屈菜有毒, 但文献对其毒性报道较少, 现有文献大多集中在对白屈菜红碱毒性的研究, 少数文献涉及其他生物碱。如林飞等^[19]通过白屈菜红碱的急性毒性试验, 发现白屈菜红碱对小鼠、大鼠和 Beagle 犬都呈现不同的毒性; 罗飞亚等^[20]研究表明白屈菜红碱 ≥ 5.6 mg/kg 剂量下, 可引起大鼠局部刺激和药物毒性所引起的全身性异常反应, 以致部分大鼠死亡。刘建明等^[21]在罗飞亚实验基础上研究了白屈菜赤碱对大鼠肺组织的毒性并探讨其引起肺组织损伤的相关机制, 结果表明白屈菜赤碱以剂量相关性 (≥ 5.6 mg/kg) 的方式对大鼠

肺组织产生长期毒性作用, 该结果与罗飞亚的研究结果一致, 研究其机制发现白屈菜赤碱可能通过转录因子蛋白家族 (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 活化和产生炎性细胞因子加重中毒性肺损伤。

《中国药典》2020 年版白屈菜项下仅以白屈菜红碱的含量作为白屈菜药材的质量评价标准, 并不能满足对不同产地白屈菜药材质量客观评价的要求。因此, 本研究对采集的安徽、辽宁、河南、陕西 4 个不同产地 19 批次白屈菜药材进行了 HPLC 指纹图谱研究, 同时测定了 5 种生物碱成分的含量; 并运用聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 等化学模式识别, 结合含量箱线图和熵权 TOPSIS 法综合评价白屈菜药材质量, 为其质量控制与综合评价提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1260 型 HPLC 液相色谱仪 (美国安捷伦公司); FW-80 型高速万能粉碎机 (北京市永光明医疗仪器有限公司); JM0.1 型电子天平 (余姚纪铭称重设备有限公司); MS105DU 型电子天平 (梅特勒-托利多公司); DZTW 型调温电热套 (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)；UPC-I-10T 型超纯水器（四川优普超纯科技有限公司）；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）。

1.2 材料

对照品白屈菜碱（批号 PS020719，质量分数≥98%）、盐酸黄连碱（批号 PS012353，质量分数≥99.9%）、紫堇碱（批号 PS020651，质量分数≥98%）、盐酸血根碱（批号 PS011032，质量分数≥98%）均购自成都普斯生物科技股份有限公司；白屈菜红碱（批号 111718-202203，质量分数≥80.5%）购自中国食品药品检定研究院；乙腈、磷酸为色谱纯；盐酸、甲醇为分析纯；水为超纯水。

采集安徽（S1~S5）、辽宁（S6~S10）、河南（S11~S15）、陕西（S16~S19）4 个产地的 19 批次白屈菜药材，经新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定为罂粟科植物白屈菜 *C. majus* L. 的干燥全草。样品产地信息见表 1。

表 1 白屈菜药材来源信息
Table 1 Sources information of medicinal materials of *C. majus*

编号	产地	编号	产地
S1	安徽	S11	河南
S2	安徽	S12	河南
S3	安徽	S13	河南
S4	安徽	S14	河南
S5	安徽	S15	河南
S6	辽宁葫芦岛	S16	陕西西安
S7	辽宁葫芦岛	S17	陕西商洛
S8	辽宁	S18	陕西
S9	辽宁	S19	陕西
S10	辽宁		

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

取白屈菜粉末（过三号筛）约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 95%乙醇-1%盐酸水溶液（1：1）20 mL，称定质量，加热回流 2 h，放冷，再称定质量，用 95%乙醇-1%盐酸水溶液（1：1）补足减失的质量，摇匀，滤过后滤液蒸干，残渣加甲醇使溶解转移至 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、

盐酸血根碱、白屈菜红碱对照品适量，精密加入甲醇溶液配制成质量浓度分别为 0.200、1.832、1.032、1.020、1.002 mg/mL 的对照品储备液。分别精密量取各对照品储备液 12.50、4.00、0.50、2.50、0.25 mL 于 25 mL 量瓶中，加入甲醇稀释至刻度，摇匀，制成含白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱、白屈菜红碱的混合对照品溶液，质量浓度分别为 0.100、0.293、0.021、0.102、0.010 mg/mL。

2.3 色谱条件

Agilent Extend 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（0~5 min，5% B；5~30 min，5%~20% B；30~32 min，20%~5% B；32~70 min，5%~30% B；70~85 min，30%~5% B）；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 284 nm；柱温 25 ℃；进样 10 μL。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取白屈菜粉末 1 份（S3），精密称定，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件重复进样 6 次，以分离度高、峰形较好的 16 号色谱峰白屈菜红碱为参照峰，计算各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.49%，相对峰面积的 RSD 值均小于 5%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取白屈菜粉末 1 份（S3），精密称定，按“2.1”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“2.3”项下色谱条件进样分析，16 号色谱峰白屈菜红碱为参照峰，计算各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 0.29%，相对峰面积的 RSD 值均小于 5%，表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取白屈菜粉末 6 份（S3），精密称定，按“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样分析，以 16 号色谱峰白屈菜红碱为参照峰，计算各共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 1.33%，相对峰面积的 RSD 值均小于 5%，表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立和化学模式识别

2.5.1 指纹图谱共有峰指认 19 批次白屈菜样品按“2.1”项下方法制备成供试品溶液，按“2.3”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，将 AIA 数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 版）》

软件中,以 S9 样品色谱图为参照指纹图谱,时间窗宽度设置为 0.5 min,以中位数法生成对照图谱,采用多点校正后 Mark 峰自动匹配建立指纹图谱。结果显示,19 批次白屈菜的色谱图中共匹配出 16 个共有峰,通过与混合对照品进行比对,指出其中的 10、11、12、13、16 号峰分别为白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱和白屈菜红碱。19 批次白屈菜样品的 HPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱 (R) 见图 1,混合对照品和供试品溶液 HPLC 色谱图见图 2。

2.5.2 指纹图谱的相似度计算 设定对照指纹图谱 (R) 为参照图谱,计算 19 批次白屈菜样品的相似度,结果见表 2。19 批次白屈菜药材相似度结果为 0.745~0.983。19 批次药材中除辽宁葫芦岛 (S7)

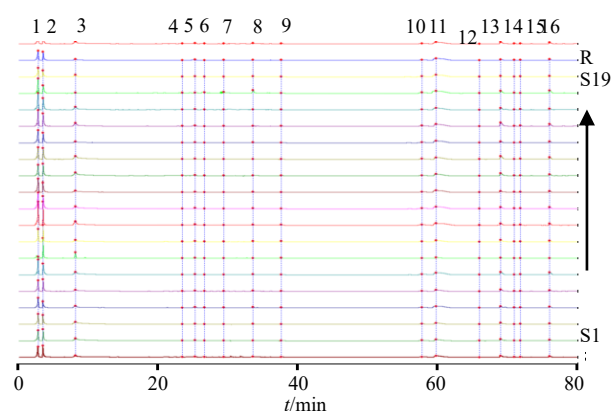
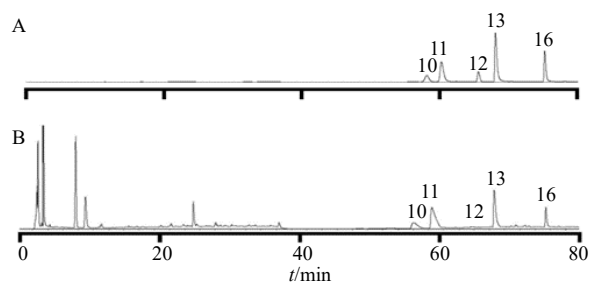


图 1 19 批白屈菜的 HPLC 叠加指纹图谱和对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC superimposed fingerprints and control fingerprint (R) of 19 batches of *C. majus*



10-白屈菜碱; 11-盐酸黄连碱; 12-紫堇碱; 13-盐酸血根碱; 16-白屈菜红碱。
10-chelidonium; 11-coptisine hydrochloride; 12-corydalline; 13-sanguinarine hydrochloride; 16-chelerythrine.

图 2 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 溶液的 HPLC 图
Fig. 2 HPLC of mixed reference substance solution (A) and test solution (B)

表 2 19 批次白屈菜样品 HPLC 指纹图谱相似度评价结果

Table 2 HPLC fingerprint similarity evaluation results of 19 batches of *C. majus*

编号	相似度	编号	相似度
S1	0.968	S11	0.981
S2	0.953	S12	0.950
S3	0.904	S13	0.960
S4	0.972	S14	0.941
S5	0.964	S15	0.981
S6	0.983	S16	0.977
S7	0.745	S17	0.854
S8	0.975	S18	0.936
S9	0.983	S19	0.900
S10	0.972		

和陕西商洛 (S17) 外,其余 17 批次药材指纹图谱相似度均在 0.90 及以上,表明这 17 批次白屈菜药材的一致性较好,质量较为稳定;而 S17 批次药材相似度为 0.854, S7 批次药材的相似度为 0.745,在所有批次药材中相似度最低,表明这 2 批次药材与其余 17 批次间的差异显著。

2.5.3 HCA 运用 Origin2022 软件,以 19 批次白屈菜样品指纹图谱的 16 个共有峰峰面积为变量,采用组间连接法,平方欧式距离作为样品的测度,进行系统聚类分析^[22],结果见图 3。当距离为 0.1 时,样品聚为 4 类: S1、S4~S6、S8~S11、S14~S16、S18、S19 为第 1 类; S2、S3、S12、S13 为第 2 类; S7 单独聚为第 3 类; S17 单独聚为第 4 类,聚类 1 中包含 4 个不同产地的 13 批次的药材;聚类 2 中包含 2 个不同产地的 4 批次的药材,表明不同产地白屈菜药材质量上既具有相似性,又具有差异性,同一产地药材质量上也存在一定的差异性。

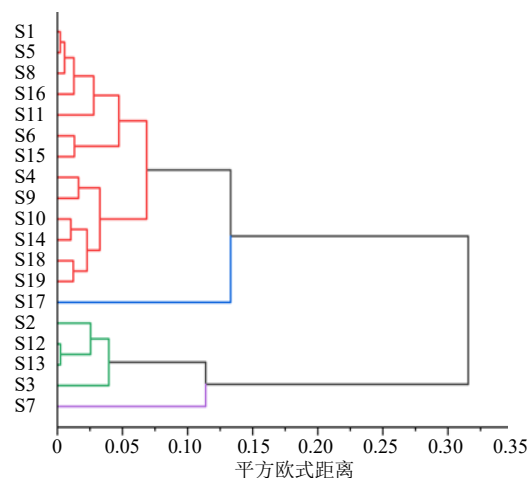


图 3 白屈菜的系统聚类分析图

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis diagram of *C. majus*

2.5.4 PCA 运用 SPSS25.0 软件, 以 19 批次白屈菜样品指纹图谱的 16 个共有峰峰面积为变量, 对其进行 Z-Score 标准化处理, 进行 PCA, 以主成分特征值 >1 为标准^[23], 得到 5 个主成分的特征值和方差贡献率, 见表 3 和各成分碎石图, 见图 4。由表 3 可知, 5 个主成分累积方差贡献率达到 84.758%, 表明这 5 个主成分可涵盖白屈菜药材的基本特征和大部分信息, 由图 4 可知, 前 5 个主成分变化曲线较陡峭, 也说明这 5 个主成分能够揭示不同产地白屈菜药材指纹图谱的大部分信息。

表 3 主成分特征值及贡献率

Table 3 Principal component eigenvalues and variance contribution rates

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.957	30.983	30.983
2	3.343	20.894	51.877
3	2.125	13.284	65.160
4	1.886	11.785	76.946
5	1.250	7.812	84.758

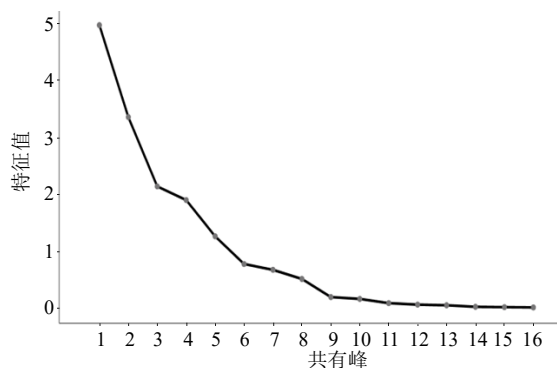


图 4 白屈菜 PCA 碎石图

Fig. 4 PCA crushed stone map of *C. majus*

以 19 批次白屈菜样品指纹图谱的 16 个共有峰峰面积为变量, 导入 SIMCA-14.1 数据统计软件, 进行无监督模式的 PCA, 结果见图 5。结果显示, PCA 模型解释率参数模型拟合参数 R^2_X 为 0.998, 预测参数 Q^2 为 0.624, 以上参数均大于 0.5, 表示所建立的模型稳定^[24-25]。观察样品之间的离散和聚集趋势, 发现 19 批次药材分布为 A、B、C 和 D 区域, 有 17 批次的药材属于 A 区域和 B 区域, 这 2 个区域的药材分布相对集中, 表明这 17 批次药材在质量上的相似度较高; C 区域的 S7 批次药材与 D 区域的 S17 批次药材分布比较离散, 说明这 2 批次药材与其余批次药材在质量上差异较大。PCA 结果

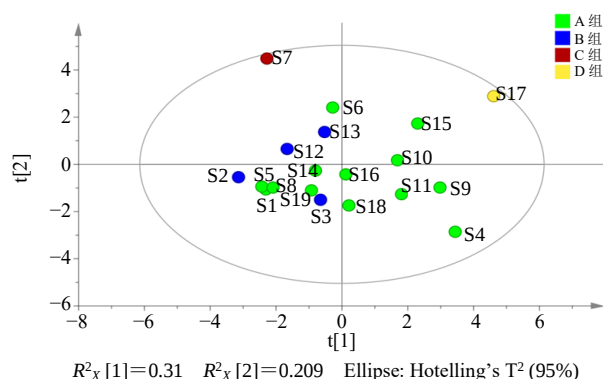


图 5 19 批次白屈菜的 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plot of 19 batches of *C. majus*

与 HCA 结果一致, 进一步验证了 HCA 的结果。PCA 结果一方面表明大部分不同产地白屈菜药材一致性较好, 另一方面也表明白屈菜指纹图谱差异的因素与主成分具有一定的关联性。

利用 SPSS25.0 软件以降维方式对 PCA 结果进行因子提取, 采用凯撒正态化最大方差法正交旋转, 迭代 11 次后得到主成分载荷矩阵模型, 得到 1~16 号峰对 5 个主成分的贡献系数, 见表 4。

表 4 白屈菜 PCA 因子载荷矩阵

Table 4 PCA factor load matrix of *C. majus*

峰号	载荷				
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4	主成分 5
1	0.703	-0.174	0.382	-0.254	0.430
2	0.391	0.269	0.537	-0.285	0.541
3	-0.275	0.541	0.415	0.503	0.233
4	0.719	0.039	-0.141	-0.154	0.007
5	0.188	-0.546	0.621	0.287	-0.215
6	0.791	-0.242	-0.296	0.299	-0.026
7	0.228	-0.445	-0.025	0.685	0.455
8	0.557	-0.243	-0.435	0.584	0.149
9	0.179	-0.417	0.380	0.288	-0.525
10	0.661	0.643	-0.100	0.015	-0.284
11	0.805	0.189	-0.080	-0.385	-0.039
12	0.650	0.319	-0.079	0.161	-0.068
13	0.022	0.793	0.384	0.375	-0.134
14	0.903	-0.163	-0.171	-0.106	-0.100
15	0.495	-0.378	0.699	-0.142	-0.209
16	0.306	0.899	0.053	0.229	-0.086

第 1 主成分对色谱峰 1、4、6、10 (白屈菜碱)、11 (盐酸黄连碱)、12 (紫堇碱)、14 的贡献较大; 第 2 主成分对色谱峰 3、13 (盐酸血根碱)、16 (白屈菜红碱) 的贡献较大; 第 3 主成分对色谱峰 5、9、15 的贡献较大, 第 4 主成分对色谱峰 7、8 的贡献较大, 第 5 主成分对色谱峰 2 的贡献较大。

2.5.5 PLS-DA 为更好地体现组间差异，在 PCA 的基础上进一步做了有监督模式的 PLS-DA 识别分析，以 19 批次白屈菜样品 16 个共有峰峰面积为变量，进行 PLS-DA，通过筛选 PLS-DA 模型中变量重要性投影(variable importance in projection, VIP)，得到差异性标志物的 VIP 得分图，见图 6，得分见表 5。以 VIP>1 为筛选标准^[26]，得到 5 个差异成分(以红色标示)，分别为 3 号峰、4 号峰、13 号峰(盐酸血根碱)、15 号峰和 16 号峰(白屈菜红碱)，这 5 个成分对不同产地白屈菜药材具有重要的作用，可作为区分和鉴别不同产地白屈菜药材质量的差异标志物。

2.6 5 个指标成分的测定

2.6.1 标准曲线的绘制 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL 分别置于 5 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度，摇匀，得系列混

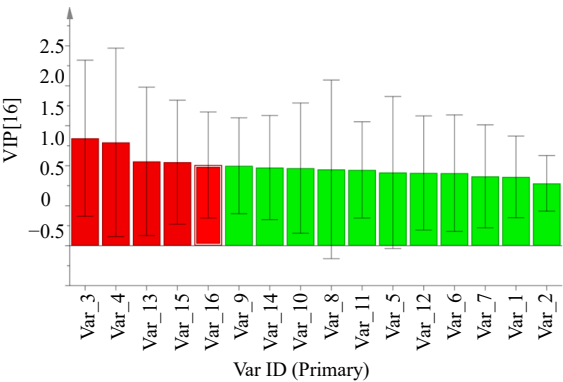


图 6 白屈菜 16 个色谱峰的 VIP 得分图
Fig. 6 VIP score graph of 16 chromatographic peaks of C. majus

表 5 白屈菜 16 个色谱峰 VIP 得分
Table 5 VIP score for 16 chromatographic peaks of C. majus

峰号	VIP 值	峰号	VIP 值
3	1.344 150	8	0.954 488
4	1.292 420	11	0.948 322
13	1.054 510	5	0.915 573
15	1.044 840	12	0.909 801
16	1.009 650	6	0.907 781
9	0.999 840	7	0.867 556
14	0.977 319	1	0.861 084
10	0.970 352	2	0.780 310

合对照品溶液。精密吸取该系列混合对照品溶液适量，按“2.3”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)，绘制标准曲线，得 5 个指标成分的回归方程与线性范围，结果见表 6。结果表明白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱、白屈菜红碱 5 个成分具有良好的线性关系。

2.6.2 精密度试验 精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液，按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次，记录白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱、白屈菜红碱的峰面积积分值，计算 RSD 值均小于 5%，表明该仪器精密度良好。

2.6.3 稳定性试验 精密称取白屈菜粉末 1 份(S3)，按“2.1”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“2.3”项下色谱条件进样分析，记录白屈菜碱、盐酸黄连碱、

表 6 白屈菜中 5 个指标成分的线性关系考察结果
Table 6 Results of linear relationship investigation of five chemical components of C. majus

指标成分	回归方程	r ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
白屈菜碱	Y=11.249 X-13.042	0.999 7	10.000~100.000
盐酸黄连碱	Y=31.171 X-131.37	0.999 8	29.300~293.000
紫堇碱	Y=11.224 X-4.45	0.999 6	2.050~20.500
盐酸血根碱	Y=56.242 X-74.766	0.999 1	10.200~102.000
白屈菜红碱	Y=66.246 X-5.820 5	0.999 1	1.002~10.020

紫堇碱、盐酸血根碱、白屈菜红碱的峰面积积分值，计算 RSD 值均小于 5%，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 精密称取白屈菜粉末 6 份(S3)，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，按“2.3”

项下色谱条件进样分析。峰面积积分值的 RSD 值均小于 5%，表明该实验重复性良好。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取白屈菜粉末 0.5g(S3)，置具塞锥形瓶中，平行 6 份，分别加入一定体积的混合对照品溶液，精密加入 95%乙醇-1.0%盐

酸水溶液 (1:1) 20 mL, 按“2.1”项下方法制备供试品, 按“2.3”项下色谱条件平行进样分析, 计算回收率和 RSD 值。结果白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱、白屈菜红碱的平均回收率分别为 111.28%、83.89%、98.42%、108.84%、103.16%, RSD 值均小于 5%。

2.6.6 样品含量测定 取 19 批次的白屈菜药材粉末, 按“2.1”项下方法进行供试品溶液的制备, 按“2.3”项下色谱条件进样分析, 测定 5 个指标成分的峰面积, 采用标准曲线法计算样品中各指标的含量, 结果见表 7。

2.7 白屈菜药材综合评价

2.7.1 不同产地白屈菜药材质量评价 由含量测定结果可知, 19 批次白屈菜样品指标成分含量存在显著差异, 白屈菜碱和紫堇碱在陕西产地的 S17 批次样品含量最高, 分别是 1.547 mg/g 和 0.108 mg/g; 盐酸黄连碱在辽宁产地 S9 批次样品含量最高, 达到 2.557 mg/g; 盐酸血根碱和白屈菜红碱在辽宁产地的 S7 批次样品含量最高, 分别是 0.527 mg/g 和 0.253 mg/g。为客观分析产地对白屈菜样品指标成分含量的影响, 以 19 批次白屈菜药材中 5 种生物碱含量为变量, 导入 GraphPad Prism8.0 软件, 采用箱线图对 19 批次样品含量测定结果进行进一步分析, 结果见图 7。通过箱线图可以直观的看到, 白屈菜碱和紫堇碱二者含量在陕西产地有相对优势, 整体含量

表 7 19 批次白屈菜药材中 5 个指标成分的含量测定结果

Table 7 Content determination results of five index components in 19 batches of *C. majus*

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
	白屈菜碱	盐酸黄连碱	紫堇碱	盐酸血根碱	白屈菜红碱
S1	0.678	0.875	0.048	0.177	0.069
S2	0.723	0.718	0.048	0.205	0.074
S3	0.658	0.851	0.052	0.175	0.068
S4	0.897	1.589	0.044	0.150	0.088
S5	0.740	0.842	0.051	0.195	0.085
S6	1.062	1.989	0.072	0.309	0.183
S7	1.011	1.163	0.075	0.527	0.253
S8	0.703	0.944	0.055	0.204	0.076
S9	1.163	2.557	0.041	0.222	0.127
S10	0.996	2.038	0.090	0.189	0.109
S11	0.690	1.636	0.061	0.129	0.075
S12	0.775	1.188	0.031	0.303	0.107
S13	0.909	1.397	0.047	0.392	0.146
S14	0.752	1.700	0.059	0.141	0.079
S15	1.120	1.762	0.101	0.451	0.167
S16	0.695	1.497	0.044	0.181	0.070
S17	1.547	2.435	0.108	0.267	0.224
S18	0.715	1.873	0.029	0.095	0.068
S19	0.714	1.848	0.038	0.104	0.070

较高; 盐酸黄连碱、盐酸血根碱和白屈菜红碱含量以辽宁产地整体含量较高; 安徽白屈菜药材中以上 5 种成分整体偏低, 由此可以看出产地对白屈菜的含量有较大影响, 该差异与指纹图谱色谱峰的变化有一定的联系。

2.7.2 不同批次白屈菜药材质量评价 熵权 TOPSIS 是近年来在中药、农业、经济和环境工程等领域迅

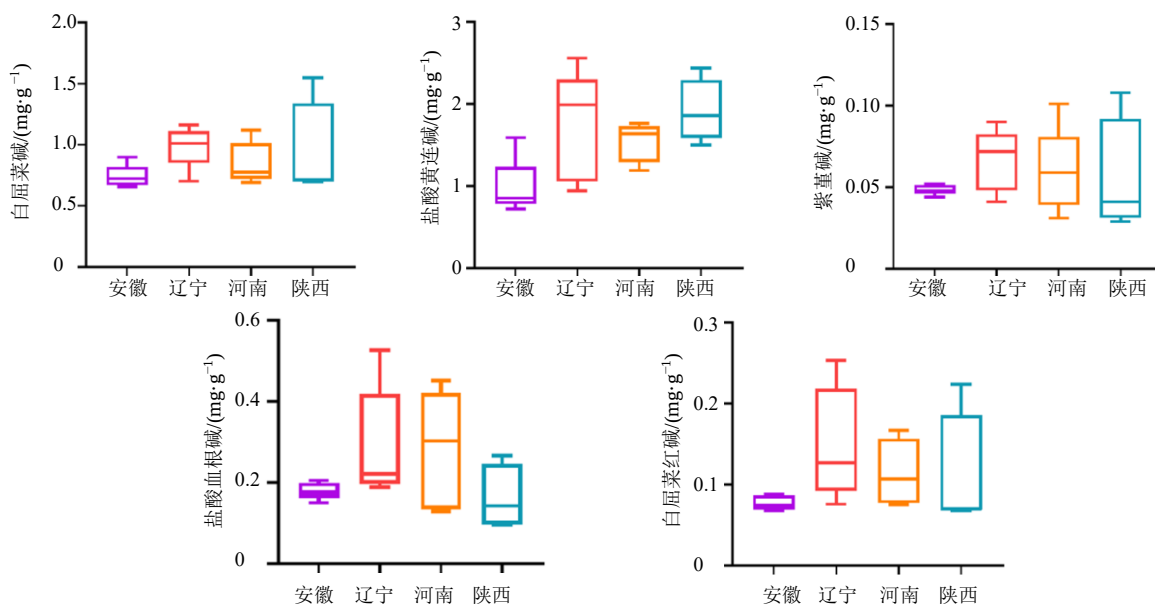


图 7 不同产地白屈菜中 5 种指标成分含量箱线图

Fig. 7 Box plots of content of five indexes in *C. majus* from different origins

速发展的多目标决策算法,旨在综合不同维度指标,对不同对象的多个指标进行统一评价,针对不相容的问题和方法对象具有可量化、操作性强的特点^[27-28]。主要包括建立初始化决策矩阵、归一化处理决策矩

阵、计算熵权的权重、构建加权决策矩阵,计算各指标与最优(D_i^+)、最劣值(D_i^-)的欧式距离,以接近程度(C_i)进行排序,评价白屈菜药材质量的优劣,结果见表 8。

表 8 白屈菜药材质量评分排序

Table 8 Scoring ranking of quality of *C. majus* herbs

编号	D_i^+	D_i^-	C_i	排序	编号	D_i^+	D_i^-	C_i	排序
S1	3.750	3.787	0.502	14	S11	2.272	4.168	0.647	5
S2	4.042	3.644	0.474	17	S12	3.440	3.253	0.486	15
S3	3.758	3.838	0.505	13	S13	3.138	2.822	0.473	18
S4	2.655	3.659	0.580	8	S14	2.203	4.096	0.650	4
S5	3.796	3.491	0.479	16	S15	2.583	3.315	0.562	9
S6	2.617	3.266	0.555	10	S16	2.704	4.048	0.599	7
S7	4.342	2.061	0.322	19	S17	3.438	4.017	0.539	11
S8	3.556	3.699	0.510	12	S18	2.454	4.385	0.641	6
S9	2.320	4.400	0.655	2	S19	2.316	4.342	0.652	3
S10	1.650	4.122	0.714	1					

19 批白屈菜药材与理想值 C_i 排序如下: S10>S9>S19>S14>S11>S18>S16>S4>S15>S6>S17>S8>S3>S1>S12>S5>S2>S13>S7, 排名前三的是 S10>S9>S19, 对应的产地是辽宁(S10、S9)和陕西(S19), 进一步验证了箱线图的结果。

3 讨论

3.1 提取方式的选取与优化

前期比较了超声提取和回流提取两种方式, 回流提取的供试品生物碱色谱峰更全面, 故采用加热回流提取方式。同时还考察了不同提取溶剂(20%、40%、60%、80%、100%甲醇及 50%、70%、95%、100%乙醇)、盐酸加入量(0%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%)、提取时间(30、60、90、120、150 min)、提取溶媒倍量(1:10、1:20、1:30、1:40、1:50)对白屈菜药材提取效果的影响, 以图谱色谱峰数量、峰型和分离度为指标, 最终确定 95%乙醇-1.0%盐酸水溶液(1:1)为提取溶剂, 加热回流提取 2 h, 提取溶媒倍量 1:20, 作为供试品溶液前处理方法。

3.2 检测波长的选取

本实验考察了 269、274、284 nm 3 个检测波长, 在 284 nm 检测波长下, 白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱和白屈菜红碱均能有较好吸收, 且能检测到样品中更多的成分峰, 且此波长下基线平直, 峰形及分离度较好, 故选择 284 nm 波长作为检测波长。

3.3 HPLC 条件优化

针对白屈菜中的生物碱类成分, 在色谱柱选择

上前期使用了型号为 Gemini C₁₈110A(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、极性较强的氨基柱 X Bridge® BEH Amide(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和 Agilent Extend C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱进行预实验。经过多次实验发现, Agilent Extend C₁₈ 色谱柱对本次实验样品中的色谱峰达到较好的分离效果, 能够改善色谱峰拖尾现象, 且测得的色谱峰更多, 故本实验采用 Agilent Extend C₁₈ 色谱柱。本实验前期分别对甲醇-水、甲醇-磷酸、乙腈-水、乙腈-磷酸、乙腈-(0.1%、0.5%)三乙胺(磷酸调节 pH=3.0)流动相体系和体积流量 0.8、0.9、1.0 mL/min 进行不同梯度多次调整洗脱, 结果表明, 采用乙腈-0.1%磷酸水溶液条件进行梯度洗脱(0~5 min, 5% B; 5~30 min, 5%~20% B; 30~32 min, 20%~5% B; 32~70 min, 5%~30% B; 70~85 min, 30%~5% B), 体积流量 1.0 mL/min, 梯度洗脱, 白屈菜药材图谱色谱峰分离效果最为理想, 且峰形较好。

3.4 指纹图谱及含量测定

中药指纹图谱是评价中药的有效方式之一, 指纹图谱能全面整体地反映药材的内在质量^[29]。多指标含量测定可以准确测定白屈菜药材中指标成分的含量, 因此将两者结合能更好地评价白屈菜药材的整体质量。本实验对 19 批次白屈菜药材建立了指纹图谱, 共匹配出 16 个共有峰。通过与混合对照品色谱图进行比对, 共指认了 5 个指标成分, 分别为白屈菜碱(10 号峰)、盐酸黄连碱(11 号峰)、紫堇碱(12 号峰)、盐酸血根碱(13 号峰)和白屈

菜红碱(16 号峰); 指纹图谱相似度软件分析发现 19 批次药材中除辽宁葫芦岛和陕西商洛外, 其他批次药材指纹图谱相似度均在 0.90 及以上, 表明多批次不同产地的白屈菜药材一致性较好, 质量较为稳定。PCA 结果与 HCA 结果表明, S7 与 S17 批次样品与其余批次差异明显, 仅从外观属性上来看 S7 批次药材本身有少量偏绿, 而 S17 批次药材整体偏绿, 推测 S7 和 S17 的生长期比其余批次短, 采收较早, 所以导致了这两批次与其余批次药材质量上存在一定的差异。PLS-DA 结果表明 3 号峰、4 号峰、13 号峰(盐酸血根碱)、15 号峰和 16 号峰(白屈菜红碱)作为不同产地白屈菜药材的差异标志物, 本课题组后续将通过质谱分析等手段, 确定其余质量差异标志物的结构。

文献报道白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱和白屈菜红碱具有抗肿瘤、抗炎镇痛、抑菌杀虫、止咳平喘等药理活性^[30-34]。本实验含量测定结果显示不同产地白屈菜药材指标成分含量存在显著差异, S7 批次样品中测得的盐酸血根碱、白屈菜红碱含量明显高于其余批次的含量, S17 批次样品的白屈菜碱、紫堇碱的含量明显高于其余批次的含量, 盐酸黄连碱含量也仅次于含量最高的辽宁产地的白屈菜药材。造成以上差异产生的主要原因可能与实验所购买的药材基原、种植技术、种植区域的地理环境、气候环境、生长期长短、微生物作用、采收与加工方式和储存条件等诸多因素有关。箱线图与熵权 TOPSIS 法评价均表明辽宁和陕西产地的白屈菜药材综合质量较优。正因为中药有着“性随地异”的特性, 故元代汤显祖的《牡丹亭》首次出现“道地药材”^[35]。药材的产地对药材的质量优劣有很大影响, 《神农本草经》在序录中载: “土地所出, 真伪陈新, 并各由法。”^[36], 《新修本草》载: “离其本土, 则质同而效异。”^[37]均可以说明产地与药材质量的密切关系。此外, 根据白屈菜有毒的报道, 本实验也为完善白屈菜药材的质量标准, 提供了理论依据。

本实验测定的盐酸黄连碱的含量明显高于其余生物碱的含量, 如赵胜男等^[38]测得 21 批次白屈菜中盐酸黄连碱平均质量分数为 4.401 mg/g, 其获得性较高, 但查阅文献发现目前对盐酸黄连碱测定以及药理作用的相关研究的报道的较少; 另外, 本研究所测定的紫堇碱文献鲜有报道, 但在实验中发现该生物碱的色谱响应值很低, 通过优化实验方案发

现并不能使其含量明显上升, 可能是由于药材本身的含量比较低导致。本课题组后续将对盐酸黄连碱、紫堇碱进一步研究。

本研究建立了不同产地白屈菜药材的 HPLC 指纹图谱, 确定了 16 个共有峰, 结合 HCA 和 PCA 将白屈菜区分为 4 类, PCA 分析中 5 个主成分累积方差贡献率为 84.758%, PLS-DA 筛选出 3 号峰、4 号峰、13 号峰(盐酸血根碱)、15 号峰和 16 号峰(白屈菜红碱)这 5 个成分在不同产地白屈菜药材中起到重要的作用, 是其成分差异的主要标志物, 并测定了其中白屈菜碱、盐酸黄连碱、紫堇碱、盐酸血根碱和白屈菜红碱 5 个指标成分的含量。本实验所建方法准确性、重复性好、结果可靠, 可用于构建基于产地差异的白屈菜药材的品质评价方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 112.
- [2] 咎立峰, 李丹花, 葛水莲, 等. 大孔吸附树脂分离纯化白屈菜总生物碱的研究 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(8): 2082-2085.
- [3] 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, 1999: 74.
- [4] 于秀杰, 苏焱, 唐丽萍, 等. 白屈菜的栽培方法 [J]. 人参研究, 2008, 20(3): 40.
- [5] 明·朱橚原著. 王家葵, 张瑞贤, 李敏校注. 救荒本草校释与研究 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2007: 72.
- [6] 董艳艳, 张娜, 何文倩, 等. 白屈菜提取物的抗肿瘤作用与免疫调节作用的机制研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2021, 55(1): 1-6.
- [7] 陶然婷, 冉令涛. 白屈菜碱对 KB 细胞株的抗肿瘤作用机制探讨 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(10): 1498-1502.
- [8] 章亮, 陈泽慧, 陈韩英, 等. 基于网络药理学的白屈菜抗肿瘤分子机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 646-657.
- [9] Capistrano I R, Wouters A, Lardon F, et al. *In vitro* and *in vivo* investigations on the antitumour activity of *Chelidonium majus* [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(14): 1279-1287.
- [10] Xiao X Z, Chen Z H, Wu Z R, et al. Insights into the antineoplastic mechanism of *Chelidonium majus* via systems pharmacology approach [J]. *Quant Biol*, 2019, 7(1): 42-53.
- [11] Wei Q H, Zhao M, Li X Y. Extraction of chelerythrine and its effects on pathogenic fungus spore germination [J]. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13(52): 600-606.
- [12] Qian W D, Zhang J N, Wang W J, et al. Efficacy of chelerythrine against mono- and dual-species biofilms of

- Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* and its properties of inducing hypha-to-yeast transition of *C. albicans* [J]. *J Fungi*, 2020, 6(2): 45.
- [13] Meng F Y, Zuo G Y, Hao X Y, *et al.* Antifungal activity of the benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125(3): 494-496.
- [14] 李静, 田芳, 李美艳, 等. 白屈菜提取物中生物碱的镇痛抗炎作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 262-265.
- [15] 刘南彤, 李瑞海, 贾天柱. 醋制白屈菜的镇痛作用研究 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18(5): 35-38.
- [16] 才玉婷, 鞠传余, 闫海润, 等. 白屈菜总生物碱镇痛作用的实验研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2011, 32(6): 29-30.
- [17] 周佳, 许佳明, 杨明慧, 等. 吉林省不同产地白屈菜药效学的比较 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(11): 1206-1211.
- [18] 李梅芳, 胡思源, 李新民, 等. 小儿白贝止咳糖浆治疗小儿急性支气管炎痰火壅肺证的临床研究 [J]. 中成药, 2014, 36(1): 44-48.
- [19] 林飞, 马新群, 吕廉, 等. 抗肿瘤药物白屈菜红碱的急性毒性试验研究 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2010, 24(5): 415-417.
- [20] 罗飞亚, 马新群, 林飞. 白屈菜红碱对大鼠的长期毒性试验研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2014, 26(6): 459-462.
- [21] 刘建明, 刘宸辰, 刘新民, 等. 白屈菜赤碱对大鼠肺组织的长期毒性作用及其对肺组织中 NF- κ B 表达的影响 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2019, 45(3): 518-523.
- [22] 周雯雯, 史银基, 何江, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2235-2242.
- [23] 任慧, 胡静, 崔小敏, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多酚类成分含量测定的大盘龙七质量评价 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6452-6460.
- [24] 郝佳旭, 杨丽娟, 范晓, 等. 复方蜘蛛香挥发油 GC-MS 指纹图谱的建立及多组分定量分析 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7048-7057.
- [25] 范雪花, 王艳丽, 侯富国, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的白及与黄花白及辨识研究 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 3990-3998.
- [26] 何文媛, 李妍, 王康宇, 等. 正交偏最小二乘判别分析法研究赤芍标准汤剂指纹图谱 [J]. 中药材, 2022, 45(3): 664-667.
- [27] 石依姗, 万青, 汪秋兰, 等. 基于熵权 TOPSIS 法和灰色关联度分析的藤茶药材等级研究 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5504-5512.
- [28] 贾银芝, 吴琦, 杨绪芳, 等. 基于灰色关联-TOPSIS 法评价不同产地山楂质量 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7317-7322.
- [29] 何丹, 张舒涵, 王佳凤, 等. 千年健 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1165-1168.
- [30] 郭正红, 陈山, 何琪, 等. HPLC 指纹图谱和多成分定量结合化学模式识别法评价黔钩藤质量 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(3): 583-591.
- [31] 都姝麟, 李丽荣, 顾硕, 等. 白屈菜药理作用综合研究进展 [J]. 吉林中医药, 2022, 42(1): 84-87.
- [32] 洪波, 孟琦, 江健梅, 等. 白屈菜生物碱研究进展 [J]. 人参研究, 2022, 34(2): 58-62.
- [33] 林惠莹, 赵永兵, 李荣强, 等. 白屈菜药理作用及质量标志物预测分析 [J]. 中兽医医药杂志, 2022, 41(2): 41-45.
- [34] 韦祖巧, 邹翔, 曲中原, 等. 白屈菜化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(S1): 38-40.
- [35] 汤显祖. 牡丹亭 [M]. 北京: 人民文学出版社, 1978: 169.
- [36] 魏·吴普等述. 曹瑛校注. 神农本草经 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 495.
- [37] 苏敬等撰. 尚志钧辑校. 新修本草 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1987: 2.
- [38] 赵胜男, 李瑞海, 贾天柱. 21 个批次白屈菜 6 种成分含量测定研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(11): 207-209.

[责任编辑 时圣明]