

· 化学与分析 ·

吴茱萸 UPLC 指纹图谱的建立及质量评价

梁彩霞, 杨岚, 张东, 冯伟红, 陈两绵, 张启伟, 闫利华*, 王智民*

(中国中医科学院 中药研究所 中药质量控制技术国家工程实验室, 国家中医药管理局
中药过程控制技术重点实验室, 北京 100700)

[摘要] **目的:**建立吴茱萸超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱分析方法,对不同品种、不同产地吴茱萸药材的质量进行较全面的评价。**方法:**采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),以乙腈-0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱,检测波长 300, 215 nm,流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 35 °C。采用相似度评价、聚类分析及偏最小二乘法判别分析对 37 批样品的指纹图谱进行分析。**结果:**建立了吴茱萸药材的 UPLC 指纹图谱及共有模式,标定了 34 个共有峰,采用对照品比对,指出 17 个共有峰。37 批样品的相似度在 0.703~0.973。不同来源的吴茱萸药材指纹图谱轮廓基本一致,化学成分的相对含量在较大范围内波动。聚类分析和偏最小二乘判别分析结果表明,化学成分的相对含量与药材品种、产地没有明显的相关性,而与药材的千粒重在一定程度上相关;吴茱萸次碱、吴茱萸碱、新绿原酸、绿原酸、吴茱萸卡品碱、柠檬苦素是差异较大的 6 个成分。**结论:**该方法简便、快速,可有效、全面地用于吴茱萸药材的质量评价;控制吴茱萸药材质量的关键是把握“近成熟”这一采收时间环节。

[关键词] 吴茱萸; 超高效液相色谱指纹图谱; 多基原; 千粒重

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0038-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140038

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.0927.006.html>

[网络出版时间] 2017-04-20 9:27

Quality Evaluation of Evodiae Fructus by UPLC Fingerprint

LIANG Cai-xia, YANG Lan, ZHANG Dong, FENG Wei-hong,

CHEN Liang-mian, ZHANG Qi-wei, YAN Li-hua*, WANG Zhi-min*

(*Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,*

National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines,

Key Laboratory of SATCM for Process Analysis Technology

of Chinese Herbal Medicines, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the ultra performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of Evodiae Fructus, and provide a comprehensive evaluation for their quality from different species and regions. **Method:** The UPLC method was performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), with acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution as mobile phase for gradient elution at a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 300 and 215 nm, the column temperature was set at 35 °C. Similarity evaluation, hierarchical clustering analysis and partial least squares-discriminate analysis were applied to evaluate

[收稿日期] 20170307(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31200244);中医药行业科研专项(201507002-3)

[第一作者] 梁彩霞,在读硕士,从事中药质量评价研究,E-mail:LCXIA1991@126.com

[通讯作者] *闫利华,博士,副研究员,从事中药化学和质量评价研究,E-mail:yanlihua2829@163.com;

*王智民,博士,研究员,从事中药化学和质量评价研究,Tel/Fax:010-84014128,E-mail:zhmw123@263.net

the fingerprints of 37 batches of Evodiae Fructus. **Result:** The UPLC fingerprint and common mode were established with 34 common peaks, and 17 of them were identified based on the reference substances. The similarities of 37 samples were 0.703-0.973. And fingerprint profiles of various samples from different regions were basically similar, but the relative contents of components varied greatly. Based on the results of hierarchical clustering analysis and partial least squares-discriminate analysis, the relative contents of components were almost unrelated to the species and regions, but related to 1 000 grain-weight of the fruits to a certain extent. Rutaecarpine, evodiamine, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, evocarpine and limonin turned out to be the top 6 differential compounds. **Conclusion:** This simple and rapid method could be effectively used for the comprehensive quality evaluation of Evodiae Fructus. It is the most important to confirm that near mature collection time is the key to guarantee the quality of crude drug of Evodiae Fructus.

[**Key words**] Evodiae Fructus; UPLC fingerprint; multiple botanical origins; 1 000 grain-weight

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^[1],主要含生物碱(吲哚类、喹诺酮类),柠檬苦素,黄酮,酚酸和挥发油等多种化学成分^[2-3]。《本草纲目》记载吴茱萸:“茱萸枝柔而肥,叶长而皱,其实结于梢头,累累成簇而无核,与椒不同;一种粒大,一种粒小,小者入药为胜”^[4],即传统应用上有大、小粒之分^[5];而药材市场上,其商品规格一直以“大花、中花和小花”来区分^[6];《中国药典》(1997—2015年版)均以3种基原作吴茱萸用,即芸香科植物吴茱萸,石虎或疏毛吴茱萸的干燥近成熟果实^[7];新版《Flora of China》(2008年)在对吴茱萸基原修订时,将三者归并为吴茱萸 *Tetradium ruticarpum*^[8]。那么,吴茱萸果实大小是否与品种或生长期有关,果实大小是否与其质量直接相关,吴茱萸品种归并是否科学等,解决这些问题对于吴茱萸的质量评价至关重要。

指纹图谱是目前国内外广泛接受的一种中药质量评价模式。目前文献中吴茱萸指纹图谱研究主要采用 HPLC^[9-16]及 LC-MS^[17-19]法,但存在耗时长或分离度较差、色谱峰不明确或未经对照品确证、未能全面表征吴茱萸的化学成分类型等不足。UPLC 具有高效、快速等特点,已广泛应用于中药指纹图谱研究^[20],但采用 UPLC-PDA 法建立吴茱萸指纹图谱的报道很少^[21]。

关于吴茱萸3种基原质量差异的比较已有多篇报道^[9,21-23],但研究结论不一致。曾金祥等^[9]、张红梅等^[21]研究认为吴茱萸3品种间成分上存在差异性,所建立的方法可进行品种鉴别^[9];而吴燕等^[22]、Chuang 等^[23]认为吴茱萸中有效成分的含量与品种基原无相关性。究其原因,上述文献有的只采集2个省份的样本进行比较^[21],或者某一省份的样本超过总样本数的70%^[9];有的为收集市售样本^[23];有

的只关注了3~6个化学成分^[9,21-22]。可见,限于产地、样本或化学成分的代表性不足,上述研究并未取得满意效果。而关于吴茱萸果实大小与质量的相关性研究尚无报道。

本研究在连续4年对吴茱萸主产区调研^[24]的基础上,以采自全国10个省份的37批吴茱萸药材为研究对象,建立了能够反映该药材特征的 UPLC 指纹图谱。以前期分离得到的化学成分^[25-26]为对照,对17个色谱峰进行指认,包括酚酸、黄酮、柠檬苦素、生物碱4种结构类型,较为全面地表征了该药材的化学信息。结合相似度评价和化学计量学方法,探讨品种、产地、商品规格与药材质量的关系,以期回答吴茱萸质量评价中存在的 key 问题,为吴茱萸质量标准提高和临床使用提供更多科学依据。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相色谱系统[美国 Waters 公司,包括四元超高压溶剂系统、自动进样器、柱温箱、二极管阵列(PDA)检测器,Empower 3 色谱工作站],Milli-Q 型超纯水制备仪(美国 Millipore 公司),KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司),BSA124S-CW 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),FW100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。

乙腈、甲醇为色谱纯,甲酸为质谱纯(美国 Fisher 公司),其余试剂均为分析纯,水为超纯水。对照品绿原酸(批号 110753-200413),金丝桃苷(批号 111521-201004,纯度 93.9%),柠檬苦素(批号 110800-200404)均购自中国食品药品检定研究院;新绿原酸(批号 X-014-140801,纯度 94.7%),隐绿原酸(批号 Y-067-141219,纯度 94.7%)均购自成都

瑞芬思生物科技有限公司; quercetin-3-*O*- β -sambubioside(纯度 94.3%), 异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷(纯度 99.5%), 去氢吴茱萸碱(纯度 97.6%), 7 β -羟基吴茱萸次碱(纯度 98.1%), ¹⁴N-甲酰二氢吴茱萸次碱(纯度 98.7%), 吴茱萸碱(纯度 99.6%), 吴茱萸次碱(纯度 99.4%), goshuyamide-I(纯度 97.9%), 1-甲基-2-正壬基-4-(1H)-喹诺酮(纯度 98.7%), 1-甲基-2-[(*Z*)-6-十一烯基]-4(1H)喹诺酮(纯度 97.8%), 1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮(纯度 98.7%), 吴茱萸卡品碱(纯度 95.5%), 二氢吴茱萸卡品碱(纯度 99.3%) 对照品均为实验室自制, 并经 MS, NMR 鉴定结构, UPLC 检测, 面积归一化法计算纯度。

吴茱萸药材采自湖南、江西、广西、贵州等 31 个产地的近成熟果实, 经中国中医科学院中药研究所闫利华副研究员鉴定分别为吴茱萸 *Evodia rutaecarpa*, 石虎 *E. rutaecarpa* var. *officinalis*, 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* var. *bodinieri* 的干燥近成熟果实。标本保存于中国中医科学院中药研究所质量标准研究中心。样品来源信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B) 梯度洗脱(0 ~ 3 min, 6% A; 3 ~ 4 min, 6 ~ 10% A; 4 ~ 7 min, 10% ~ 12% A; 7 ~ 8 min, 12% ~ 14% A; 8 ~ 13 min, 14% ~ 15% A; 13 ~ 15 min, 15% ~ 20% A; 15 ~ 18 min, 20% ~ 30% A; 18 ~ 21 min, 30% ~ 49% A; 21 ~ 25 min, 49% ~ 51% A; 25 ~ 27 min, 51% ~ 73% A; 27 ~ 30 min, 73% ~ 80% A; 30 ~ 31 min, 80% ~ 100% A; 31 ~ 32 min, 100% A), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 检测波长 300, 215 nm, 进样量 1 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别取各对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 分别含新绿原酸 15 μg, 绿原酸 25 μg, 隐绿原酸 6 μg, quercetin-3-*O*- β -sambubioside 4 μg, 金丝桃苷 10 μg, 异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷 101 μg, 去氢吴茱萸碱 32 μg, 7 β -羟基吴茱萸次碱 6 μg, 柠檬苦素 55 μg, ¹⁴N-甲酰二氢吴茱萸次碱 19 μg, 吴茱萸碱 50 μg, 吴茱萸次碱 30 μg, goshuyamide-I 7 μg, 1-甲基-2-正壬基-4-(1H)-喹诺酮 4 μg, 1-甲基-2-[(*Z*)-6-十一烯基]-4(1H)喹诺酮 10 μg, 1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮 9 μg, 吴茱萸卡品碱 54 μg, 二氢吴茱萸卡品碱 17 μg 的混合对照品溶液。

表 1 吴茱萸药材来源信息

Table 1 Information of Evodiae Fructus samples

No.	产地	采集时间	千粒重/g
A1	湖南桂阳县浩塘镇史家桥村	2016-08	6.14
A2	湖南新晃县黄雷乡转水村	2014-08	10.02
A3	湖南桂阳县浩塘镇史家桥村	2016-08	22.33
A4	湖南临湘县五里牌乡	2013-07	13.78
A5	江西樟树市吴城乡	2014-08	11.73
A6	广西柳城县龙头镇	2013-09	32.65
A7	广西大化县七百弄乡	2012-09	19.73
A8	广西灵川县灵川县马岭村	2016-08	37.07
A9	广西柳城县寨隆镇	2016-09	46.58
A10	广西柳城县龙头镇	2014-08	24.31
A11	广西灵川县三街镇	2014-07	27.64
B1	重庆黔江正阳街道	2014-09	9.10
B2	重庆秀山县清溪场镇	2014-09	7.62
B3	贵州余庆县龙溪镇	2013-09	13.88
B4	贵州松桃县正大乡	2015-09	8.63
B5	贵州松桃县正大乡	2015-09	9.32
B6	贵州凤冈县天桥乡	2015-09	17.80
B7	贵州纳雍县	2015-10	16.00
B8	甘肃康县大南峪镇	2016-08	5.69
B9	甘肃康县大南峪镇	2016-08	10.96
B10	浙江磐安县新渥镇	2015-08	27.43
B11	浙江缙云县壶镇潜陈村	2016-07	5.25
B12	浙江缙云县东方镇马石桥村	2015-07	5.34
B13	浙江平阳县	2016-07	17.03
B14	陕西略阳县破口驿镇大院子村	2016-08	6.10
B15	湖南新晃县黄雷乡转水村	2014-08	10.24
B16	湖南吉首雅溪科技园	2015-09	23.21
B17	湖南武冈市湾头桥镇	2015-08	16.21
B18	广西灵川县三街镇	2015-08	34.95
C1	湖北蕲春县漕河镇清水河村	2016-07	22.38
C2	湖北阳新县坳上村	2015-07	21.11
C3	湖北阳新县木港镇	2016-06	14.43
C4	江西瑞昌市横立山乡秦岭村	2013-07	9.39
C5	广西都安县高岭镇塘仑村	2016-08	51.16
C6	安徽郎溪县建平镇	2012-10	21.25
C7	安徽歙县深渡镇漳岭山村	2015-09	23.88
C8	重庆荣昌安富镇通安村	2015-09	23.48

注: A1 ~ A11. 石虎; B1 ~ B18. 疏毛吴茱萸; C1 ~ C8. 吴茱萸。

2.3 供试品溶液的制备 取吴茱萸药材粉末(过 60 目筛)约 0.3 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声 30 min, 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,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 空白试验 精密吸取提取溶剂 70% 甲醇 1 μL ,作为空白溶液,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进行测定,结果表明空白溶液对测定的样品无干扰。

2.4.2 精密度试验 取吴茱萸粉末 0.3 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续测定 6 次,记录色谱图,以吴茱萸次碱为参照峰,计算各主要特征峰(可指认的色谱峰)的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别 < 0.3% 和 1.4%,表明仪器的精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 取吴茱萸(No. 10)粉末 0.3 g,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件,分别于供试品溶液制备后的第 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 h 进样,记录色谱图。以吴茱萸次碱为参照峰,计算各主要特征峰(可指认的色谱峰)相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别 < 1.0% 和 2.5%,表明在 48 h 内供试品溶液的稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取吴茱萸(A10)粉末 0.3 g,共 6 份,精密称定,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件依次进样,记录色谱图。以吴茱萸次碱为参照峰,计算各主要特征峰(可指认的色谱峰)相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别 < 0.4% 和 2.6%,表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立与色谱峰指认 取 37 批吴茱萸样品,分别按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样,每份样品重复操作 2 次,记录色谱图。对 37 批吴茱萸 UPLC 色谱图统一积分后,将所有数据导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”软件进行处理。基于中位数法,时间窗设置为 0.1 min,以 A10 号样品的色谱图作为参照图谱,建立了吴茱萸药材 UPLC 指纹图谱(图 1)。*quercetin-3-O- β -sambubioside* 成分部分药材含有,但不是共有峰。

从 37 批吴茱萸药材的指纹图谱中共标定出 34 个共有峰,通过与对照品比对,对其中 17 个共有峰进行了指认(图 2)。在 34 个共有峰中,峰 26(吴茱萸次碱)在药材中的相对含量较高、保留时间居中、分离度好,因此将其作为参照峰(S),其余各共有峰的保留时间和峰面积与 S 峰的比值定义为其余各峰的相对保留时间和相对峰面积。

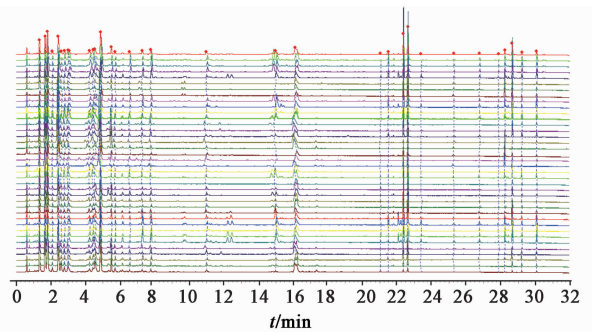
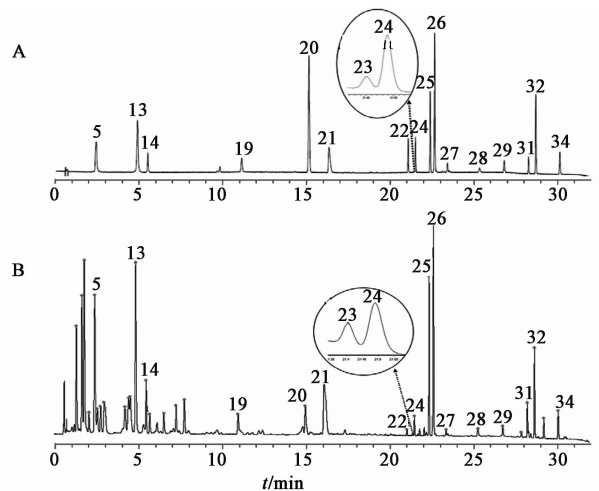


图 1 37 批吴茱萸药材的 UPLC 指纹谱

Fig. 1 UPLC fingerprints of 37 batches of Evodiae Fructus



A. 混合对照品; B. 共有模式; 5. 新绿原酸; 13. 绿原酸; 14. 隐绿原酸; 19. 金丝桃苷; 20. 异鼠李素-3-O-芸香糖苷; 21. 去氢吴茱萸碱; 22. 7 β -羟基吴茱萸次碱; 23. 柠檬苦素; 24. ¹⁴N-甲酰二氢吴茱萸次碱; 25. 吴茱萸碱; 26. 吴茱萸次碱; 27. goshuyuamide-I; 28. 1-甲基-2-正壬基-4-(1H)-喹诺酮; 29. 1-甲基-2-[(Z)-6-十一烯基]-4(1H)喹诺酮; 31. 1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮; 32. 吴茱萸卡品碱; 34. 二氢吴茱萸卡品碱

图 2 对照品(A)及吴茱萸药材 UPLC 指纹谱共有模式(B)(215 nm)

Fig. 2 UPLC of reference substances (A) and fingerprint common model of Evodiae Fructus (B) (215 nm)

2.6 指纹图谱的分析

2.6.1 相似度评价 采用国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”软件对 37 批吴茱萸药材进行相似度评价,结果见表 2。

37 批吴茱萸药材与对照指纹图谱的相似度范围为 0.703 ~ 0.973,相似度 > 0.900 的样本共 16 批,相似度 < 0.800 的共 8 批。不同来源的吴茱萸药材指纹图谱轮廓基本一致,化学成分的相对含量存在一定差异。石虎相似度范围为 0.703 ~ 0.973;疏毛吴茱萸相似度范围为 0.717 ~ 0.970;吴茱萸相似度范围为 0.782 ~ 0.967。可见,3 个品种在各自种内的相似度范围均较大,即种内差异比较大。

表 2 37 批吴茱萸 UPLC 指纹谱的相似度评价

Table 2 UPLC fingerprint similarities of 37 batches Evodiae Fructus

Fructus					
No.	相似度	No.	相似度	No.	相似度
A1	0.844	B3	0.881	B16	0.939
A2	0.937	B4	0.898	B17	0.835
A3	0.973	B5	0.875	B18	0.717
A4	0.911	B6	0.938	C1	0.884
A5	0.880	B7	0.912	C2	0.891
A6	0.799	B8	0.873	C3	0.967
A7	0.703	B9	0.789	C4	0.946
A8	0.770	B10	0.953	C5	0.782
A9	0.788	B11	0.796	C6	0.945
A10	0.844	B12	0.848	C7	0.961
A11	0.965	B13	0.970	C8	0.959
B1	0.945	B14	0.856		
B2	0.888	B15	0.908		

湖南省同一产区的 7 份样本相似度范围在 0.835 ~ 0.973; 广西省同一产区的 8 份样本相似度范围在 0.703 ~ 0.965; 贵州省同一产区的 5 份样本相似度范围在 0.875 ~ 0.938; 可见, 同一产区内的差异也比较大。

2.6.2 聚类分析 将 37 批样品指纹图谱中的 34 个共有峰的峰面积作为变量, 形成 34 × 37 阶数据矩阵, 导入在线 MetaboAnalyst 3.0 软件, 采用 Spearman-Ward 法进行聚类分析, 结果见图 3。当判别条件距离等于 5 时, 37 批吴茱萸药材可分为 3 组, 即组 1, 2, 3。

从药材品种分布来看, 组 1 共 10 批样品, 包括吴茱萸 4 批, 疏毛吴茱萸 4 批, 石虎 2 批; 组 2 共 6 批样品, 包括吴茱萸 1 批, 疏毛吴茱萸 1 批, 石虎 4 批; 组 3 共 21 批样品, 吴茱萸 3 批、疏毛吴茱萸 13 批, 石虎 5 批。可见, 不同品种吴茱萸在 3 组中交叉分布。由此得出, 吴茱萸指纹图谱的轮廓及化学成分相对含量与品种的相关性不显著, 因此品种不能作为区分吴茱萸药材差异的依据。

从药材产地分布来看, 组 1 中 10 批样品来源于湖北、湖南、广西、重庆、安徽、贵州、浙江 7 个省市; 组 2 中 6 批样品均来源于广西; 组 3 中 21 批样品来源于湖北、贵州、江西、浙江、甘肃、重庆、湖南、陕西 8 个省市。可见, 不同产地的药材可分布在同一组, 而同一产地的药材可分布在不同组。由此得出, 吴茱萸指纹图谱的轮廓及化学成分的相对含量与产地

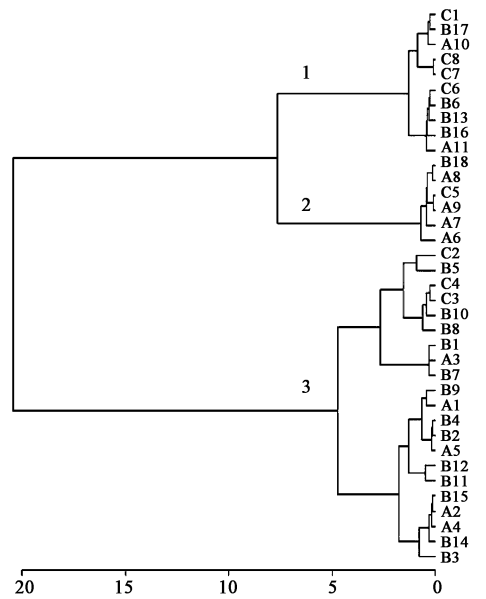


图 3 37 批吴茱萸 UPLC 指纹谱聚类分析

Fig. 3 HCA of UPLC fingerprint of 37 batches Evodiae Fructus

的相关性不显著, 因此产地也不能作为区分吴茱萸药材差异的依据。

从药材的千粒重分布来看, 组 1 的千粒重范围为 16.21 ~ 27.64 g, 平均值 21.72 g, 组 2 的千粒重范围为 19.73 ~ 51.16 g, 平均值 37.02 g, 组 3 的千粒重范围为 5.25 ~ 27.43 g, 平均值 11.64 g。采用 GraphPad Prism 5 软件, 将千粒重数据按照组别绘制散点图, 见图 4。由图 4 可以直观地看出, 组 2 的样本千粒重相对最大, 组 1 次之, 组 3 最小。由此得出, 吴茱萸药材质量的差异可以通过千粒重大小直观地体现出来。

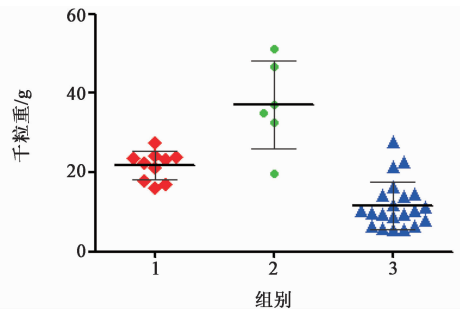


图 4 3 个组别吴茱萸千粒重分布的比较

Fig. 4 Comparison of distribution of 1000 grain-weights in three groups of Evodiae Fructus

2.6.3 偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 为了更好地观察 1, 2, 3 个组别样品的组间差异, 将 3 个组别样品中的 34 个共有峰的峰面积作为变量, 形成 34 × 37 阶数据矩阵, 导入在线 MetaboAnalyst 3.0 软件, 对 3 个组别样品进行监督模式识别方法 PLS-DA

建模分析, PLS-DA 得分矩阵见图 5。PLS-DA 模型质量评价的 2 个关键指标 ($R^2 Y$ 反映模型的准确性; $Q^2 Y$ 反映模型的预测性; $R^2 Y$ 和 $Q^2 Y$ 均 > 0.5 说明模型预测力较强) 说明 3 组样品聚类良好, 显著分离 ($R^2 Y = 0.710$, $Q^2 Y = 0.505$)。本文标定的 34 个共有峰可全面覆盖存在量变差异的化学成分, 结合变量重要性投影 (Variable Importance of Projection, VIP) 法筛选差异性较大的成分, 以 $VIP > 1.0$ 作为标准筛选出对聚类结果分类贡献较大的 8 个变量 (图 6)。图 6 纵坐标表示化合物的峰号, 横坐标表示 VIP 值, 随着 VIP 值逐渐增大, 该化合物的贡献也越大。图中红、黄、绿色表示该化合物的相对含量在 3 组中的高、中、低分布情况。对 34 个共有峰筛选后, 表明贡献大小依次为峰 26 (吴茱萸次碱), 峰 25 (吴茱萸碱), 峰 5 (新绿原酸), 峰 13 (绿原酸), 峰 32 (吴茱萸卡品碱), 峰 23 (柠檬苦素), 峰 3 和峰 2。

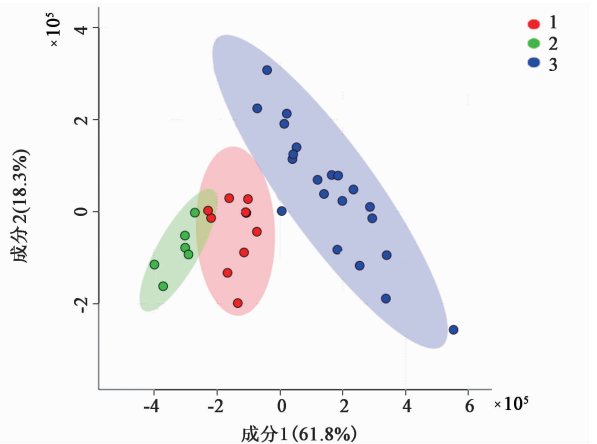
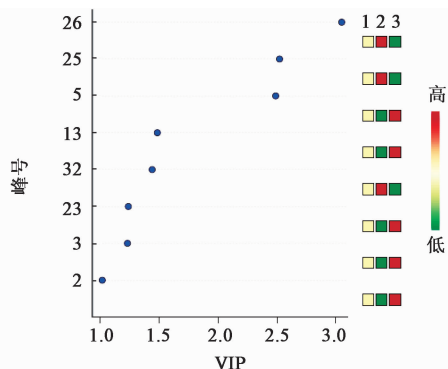


图 5 3 个组别吴茱萸共有峰面积 PLS-DA 得分
Fig. 5 PLS-DA scores plot of three groups Evodiae Fuctus common areas

综合聚类分析及偏最小二乘判别分析的结果, 组 2 样本的千粒重较大 (对应大花吴茱萸), 吴茱萸次碱 (峰 26), 吴茱萸碱 (峰 25) 及吴茱萸卡品碱 (峰 32) 的相对含量较高; 组 3 样本的千粒重较小 (对应小花吴茱萸), 新绿原酸 (峰 5), 绿原酸 (峰 13), 峰 3, 峰 2 等大极性成分及柠檬苦素 (峰 23) 的相对含量较高。组 1 中样本的千粒重中等 (对应中花吴茱萸), 8 个成分的相对含量介于以上二组之间, 相对适中。可见, 吴茱萸化学成分的相对含量与药材千粒重在一定程度上相关。

3 讨论

比较甲醇, 70% 甲醇, 50% 甲醇, 95% 乙醇, 70% 乙醇, 50% 乙醇 6 种提取溶剂, 采用 70% 甲醇或



26. 吴茱萸次碱; 25. 吴茱萸碱; 5. 新绿原酸; 13. 绿原酸; 32. 吴茱萸卡品碱; 23. 柠檬苦素; 3. 未知; 2. 未知

图 6 吴茱萸 3 个品种样品 PLS-DA 得分重要性投影
Fig. 6 VIP plot of PLS-DA of three groups Evodiae Fuctus

70% 乙醇提取, 可以同时兼顾酚酸类大极性成分和喹诺酮生物碱类小极性成分的提取率。70% 甲醇较 70% 乙醇提取, 检测到各成分的峰面积略高, 故选择 70% 甲醇为提取溶剂; 比较超声、回流 2 种提取方法, 检测到各成分的峰面积没有明显差异, 且超声提取操作简便, 故选择超声提取; 比较 15, 25, 50 和 75 mL 4 种溶剂用量, 50 mL 溶剂既可将药材中所有成分提取充分, 又可使各成分在色谱图上具有适合的响应值, 故选择 50 mL 溶剂提取; 比较 30, 45 和 60 min 3 种提取时间, 结果表明, 检测到各成分的峰面积没有明显差异, 故选择提取 30 min。

比较甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水及乙腈-0.1% 甲酸水 4 个流动相系统, 结果发现, 乙腈-0.1% 甲酸水系统对整体成分分离效果较好, 故选择乙腈-0.1% 甲酸水作为流动相系统。采用 PDA 检测器, 在 200 ~ 400 nm 扫描紫外吸收光谱, 发现在 300 nm 下, 色谱图基线平稳, 色谱峰响应值较高; 柠檬苦素仅在 215 nm 附近有最大吸收, 因此需单独检测。色谱柱、柱温及流速经考察分别确定为 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 35 °C 和 0.4 mL·min⁻¹。

本实验建立的吴茱萸 UPLC 指纹图谱在 32 min 内完成对吴茱萸全成分的指纹图谱分析, 与文献 [9-16, 21-22] 报道的吴茱萸指纹图谱相比, 具有高效、分离度好、信息丰富、特征性强等特点。该指纹图谱共标定了 34 个共有峰, 指认了 17 个成分, 这些成分包括 3 个酚酸, 2 个黄酮, 1 个柠檬苦素, 11 个生物碱 (6 个吲哚类及 5 个喹诺酮类), 共 4 种化学结构类型, 能够综合全面反映吴茱萸药材的质量。

本实验采用相似度评价、聚类分析、偏最小二乘判别分析对 37 批不同来源的吴茱萸药材进行分析,

结果表明,不同来源吴茱萸指纹图谱轮廓,即化学成分的种类基本一致,成分的相对含量在一定范围内波动。成分相对含量的差异与药材品种、产地的相关性不显著,而与千粒重有相关性。吴茱萸次碱、吴茱萸碱、新绿原酸、绿原酸、吴茱萸卡品碱、柠檬苦素是导致差异较大的前6个成分。2015年版《中国药典》规定,吴茱萸的药用部位为近成熟果实。在一定程度上,千粒重的大小可以表征果实的成熟度。即,果实的成熟度对吴茱萸品质的影响远比品种、产地的影响要突出。从化学成分的角度来看,没必要将3个品种区分对待,赞同将目前《中国药典》记载的3种吴茱萸归并,控制吴茱萸药材质量的关键是把握“近成熟”这一采收时间环节。

[参考文献]

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:1118-1120.

[2] HE Y, LI J, WU H H, et al. A new caffeoylgluconic acid derivative from the nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. Nat Prod Res, 2015, 29(13):1243-1248.

[3] XIA X, LUO J G, LIU R H, et al. New alkaloids from the leaves of *Evodia rutaecarpa* [J]. Nat Prod Res, 2016, 30(19):2154-2159.

[4] 李时珍. 本草纲目[M]. 金陵版. 北京:中医古籍出版社,1994:791.

[5] 张红梅, 赵志礼, 王长虹, 等. 吴茱萸的本草考证[J]. 中药材, 2011, 34(2):307-309.

[6] 周建理. 安徽省中药饮片规格等级手册[M]. 合肥:安徽大学出版社, 2016:109-110.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:171.

[8] WU Z Y, RAVEN P H, HONG D Y. Flora of China; Vol. 11[M]. Beijing: Science Press, 2008:69.

[9] 曾金祥, 魏娟, 毕莹, 等. 吴茱萸指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24):143-147.

[10] 赵平, 许海玉, 许浚, 等. 吴茱萸药材的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(23):3178-3183.

[11] 陈华国, 马青青, 周欣, 等. 指纹图谱技术优选甘草炙吴茱萸的炮制工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17):31-35.

[12] 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.

[13] 童巧珍, 蔡嘉洛, 郭婷, 等. 湘产吴茱萸脂溶性成分的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2014, 12

(10):950-952.

[14] 罗秀琼, 张丽艳, 罗君, 等. 贵州余庆规范化种植吴茱萸药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(17):1958-1966.

[15] ZENG J X, LIU Y, HUANG B T, et al. Establishment of HPLC fingerprint of Fructus Evodiae and determination of three components[J]. Med Plant, 2011, 2(3):33-36.

[16] HUANG D, LI S X, CAI G X, et al. Molecular authentication and quality control using a high performance liquid chromatography technique of Fructus Evodiae[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(2):312-315.

[17] ZHOU X, ZHAO Y, LEI P H, et al. Chromatographic fingerprint study on *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth by HPLC/DAD/ESI-MSⁿ technique[J]. J Sep Sci, 2010, 33(15):2258-2265.

[18] LI W, SUN X, LIU B, et al. Screening and identification of hepatotoxic component in *Evodia rutaecarpa* based on spectrum-effect relationship and UPLC-Q-TOFMS[J]. Biomed Chromatogr, 2016, 30(12):1975-1983.

[19] ZHAO Y, ZHOU X, ZHAO Y L, et al. A study of the geo-herbalism of *Evodiae Fructus* based on a flow-injection mass spectrometric fingerprinting method combined with chemometrics[J]. Molecules, 2015, 20(2):2658-2667.

[20] 黄再强, 陈玲, 张燕飞, 等. 川产几种葛根类药材资源品种的 UPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7):41-45.

[21] 张红梅, 李国, 宋龙贵, 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.

[22] 吴燕, 黄志芳, 舒光明, 等. 吴茱萸指纹图谱研究和3种成分的含量测定[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24):3329-3331.

[23] Chuang W C, CHENG C M, CHANG H C, et al. Contents of constituents in mature and immature fruits of *evodia species*[J]. Planta Med, 1999, 65(6):567-571.

[24] 刘珊珊, 尹元元, 闫利华, 等. 吴茱萸药用植物资源调查[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(9):5-9.

[25] 刘珊珊, 周兴清, 梁彩霞, 等. 吴茱萸水提取物化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8):58-64.

[26] 尹元元, 刘珊珊, 韩利文, 等. 吴茱萸生物碱类化学成分及其抗血管生成活性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5):45-53.

[责任编辑 顾雪竹]