

江西不同产区车前子药材的 HPLC 指纹图谱及其多成分 化学模式识别分析

李潮¹, 于欢^{1*}, 温柔¹, 严丽萍¹, 张寿文¹, 龚千锋^{1*}, 袁小平²

(1. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004;

2. 江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 江西樟树 336000)

[摘要] **目的:**建立车前子 HPLC 指纹图谱检测方法,结合化学模式识别方法对江西不同产区车前子样品进行分析,并测定其中 5 种有效成分的含量,为科学评价和有效控制该药材的质量提供参考。**方法:**利用 HPLC 检测 34 批车前子药材,采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)进行相似度评价,以其色谱峰信息为数据来源,利用化学模式识别方法综合分析江西地道药材车前子的质量,对筛选并指认出的 5 个有效成分京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷进行定量分析。**结果:**江西不同产区车前子样品的相似度均 >0.86,说明江西不同产区车前子相似度良好。利用正交偏最小二乘法-判别分析能较好地地区分不同产区车前子药材,且可判断与车前子质量相关性较强的化学成分。5 种有效成分的含量在不同产区车前子中仍存在一定差异,其中尤以大车前苷的含量差别较大。**结论:**建立的车前子 HPLC 指纹图谱特征性强,结合化学模式识别方法可有效的评价车前子质量并区分其不同产区,可为该药材的质量控制提供参考依据。

[关键词] 车前子; 指纹图谱; 化学模式识别; 有效成分; 大车前苷; 木犀草苷; 异毛蕊花糖苷

[中图分类号] R22;R931;R28;C37;O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0161-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191355

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190316.2205.008.html>

[网络出版时间] 2019-03-19 10:28

Analysis of HPLC Fingerprint and Multi-component Chemical Pattern Recognition of Plantaginis Semen from Different Producing Areas in Jiangxi Province

LI Chao¹, YU Huan^{1*}, WEN Rou¹, YAN Li-ping¹, ZHANG Shou-wen¹,
GONG Qian-feng^{1*}, YUAN Xiao-ping²

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;

2. Jiangxi Tianqitang TCM Decoction Pieces Co. Ltd., Zhangshu 336000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC fingerprint detection method of Plantaginis Semen, and analyze the samples from different producing areas in Jiangxi province by combining with chemical pattern recognition method, and the contents of five ingredients in Plantaginis Semen were determined. **Method:** A total of 34 batches of Plantaginis Semen medicinal materials were detected by HPLC. The similarity evaluation was carried out by the 2012 edition of similarity evaluation system of chromatographic fingerprint of traditional Chinese medicine. The chromatographic peak information was used as the data source, and three chemical pattern recognition methods were used to comprehensively analyze the quality of this medicinal herb. Quantitative analysis was performed on the 5 active components, including geniposidic acid, plantamajoside, acteoside, galuteolin and

[收稿日期] 20181129(004)

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-JX-27)

[第一作者] 李潮,在读硕士,从事中药炮制、饮片质量标准与炮制机制研究,E-mail:1668152829@qq.com

[通信作者] * 龚千锋,教授,从事中药炮制传承、饮片质量标准与炮制机制研究,Tel:0791-87118852,E-mail:gongqf2002@163.com;

* 于欢,讲师,从事中药饮片标准化与中药炮制机制研究,E-mail:416931863@qq.com

isoacteoside. **Result:** The similarities between Plantaginis Semen samples from different producing areas in Jiangxi province were > 0.86 . Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) could distinguish samples from different producing areas, and be used to determine the chemical components, which had strong correlation with the quality of Plantaginis Semen. The contents of 5 active components in samples from different producing areas were different to some degree, especially in the content of plantamajoside. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint of Plantaginis Semen has strong characteristics, combined with chemical pattern recognition method, it can effectively evaluate the quality of Plantaginis Semen and distinguish its producing areas.

[**Key words**] Plantaginis Semen; fingerprint; chemical pattern recognition; active ingredients; plantamajoside; galuteolin; isoacteoside

车前子味甘,性微寒,归肝、肾、肺、小肠经,功效清热利尿、渗湿通淋、明目、祛痰,用于治疗水肿胀满、热淋涩痛、暑湿泄泻、目赤肿痛、痰热咳嗽^[1]。车前子为利尿通淋药,始载于《神农本草经》,至今已有 1 000 多年的药用历史,主要化学成分为多糖类、苯乙醇苷类、环烯醚萜类、三萜类、黄酮类、甾醇类及生物碱类等^[2],具有利尿、消炎、降血糖、降血压、调血脂、抗氧化和调节免疫等药理作用^[3]。

车前子为江西省道地药材“三子一壳”之一,为临床常用中药,应用广泛。原药材作为“中药材-饮片-中成药”产业链的首要环节^[4],其质量的差异直接影响着炮制饮片的质量、产业和民生需求^[5],因此控制车前子药材的质量是控制和保障其饮片质量的有效手段之一。同时受地理因素、生长环境、栽培技术等综合影响,不同产区的栽培和野生车前子中化学组成不尽相同,质量存在一定差异。2015 年版《中国药典》仅以京尼平苷酸和毛蕊花糖苷的含量作为车前子质控标准,但这并不能全面反映药材的质量内涵。目前,关于车前子含量测定的研究多选择 1~2 个化学成分为指标成分,难以满足该药材质量控制及品种鉴定的需要。车前子中其他化学成分变化规律及其与饮片质量的相关性均有待于进一步探索,进而有助于更加全面地控制该药材的质量。

化学模式识别方法能更全面和系统地对药材进行评价,常用方法有主成分分析(PCA),聚类分析(HCA)和人工神经网络技术(ANNs)等^[6]。为了综合评价车前子质量,本实验共采集江西多个主要产区共 34 批车前子样品。在检测京尼平苷酸和毛蕊花糖苷含量均符合 2015 年版《中国药典》的要求之后,运用指纹图谱技术对获得的复杂中药化学数据进行特征提取,并对检测结果进行 PCA 和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),筛选并指出了其中 5 个重要指标成分;同时,采用 HPLC 同时测定样

品中京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷 5 个主要药效成分的含量,评价江西不同产区车前子药材的质量,为该药材的质量标准确定以及中药材生产质量管理规范(GAP)建设提供理论依据。

1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, Empower 色谱工作站),AE240 型 1/10 万电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],GZX-9076MBE 型电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),HK-02A 型 100 g 小型中药粉碎机(长沙旭朗粉碎机械有限公司)。京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷对照品(成都克洛玛生物科技有限公司,批号分别为 CHB171229, CHB170704, CHB171103, CHB171113, CHB170612,纯度均 $\geq 98\%$),水为自制双蒸馏水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。车前子药材分别购自江西吉安市新干县三湖镇(20 批样本),江西樟树市(5 批样本),江西九江修水县(9 批样本),共计 34 批样本。经江西中医药大学中药资源与民族药研究中心张寿文教授鉴定为车前科植物车前子 *Plantago asiatica* 的干燥成熟种子,在建立指纹图谱之前,测定 34 批车前子药材中毛蕊花糖苷和京尼平苷酸的含量,见表 1,均达到了 2015 年版《中国药典》的要求。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 取本品粉末(过三号筛,下同)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇 20 mL,称定质量,超声 30 min,放冷,再称定质量,用 60% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2 混合对照品溶液的制备 取京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加 60% 甲醇制成

表 1 车前子样品的指纹图谱相似度及指标成分质量分数

Table 1 Similarities of fingerprint and contents of index components of Plantaginis Semen samples

样品	来源	批号	相似度	京尼平苷酸 /%	大车前苷 /%	毛蕊花糖苷 /%	木犀草苷 /%	异毛蕊花糖苷 /%
S1	江西樟树	20180430	0.996	2.362 7	0.133 7	1.999 4	0.028 7	0.226 2
S2	江西樟树	20180430	0.973	2.422 5	0.171 7	1.985 8	0.027 9	0.222 9
S3	江西樟树	20180430	0.987	2.351 2	0.176 8	1.999 8	0.027 1	0.224 9
S4	江西樟树	20180430	0.984	2.363 0	0.172 4	2.007 4	0.027 2	0.225 1
S5	江西樟树	20180430	0.990	2.310 4	0.157 0	1.978 0	0.026 7	0.215 4
S6	江西修水县	20180429	0.971	1.978 0	0.277 2	1.419 5	0.018 9	0.100 5
S7	江西修水县	20180429	0.988	3.219 5	0.217 0	2.281 9	0.020 4	0.187 4
S8	江西修水县	20180429	0.965	2.623 0	0.386 8	2.261 2	0.027 7	0.154 4
S9	江西修水县	20180429	0.945	2.982 4	0.391 7	1.939 4	0.026 6	0.131 3
S10	江西修水县	20180429	0.918	2.942 8	0.522 0	1.822 9	0.030 1	0.107 2
S11	江西修水县	20180429	0.987	2.831 7	0.198 4	1.888 6	0.016 5	0.155 0
S12	江西修水县	20180429	0.990	2.798 4	0.150 3	1.944 4	0.017 8	0.151 0
S13	江西修水县	20180429	0.961	2.696 5	0.354 7	1.866 7	0.024 3	0.125 3
S14	江西修水县	20180429	0.902	2.627 1	0.423 8	1.668 5	0.033 5	0.109 8
S15	江西三湖镇	20180428	0.903	1.230 7	0.221 3	2.384 1	0.023 4	0.314 5
S16	江西三湖镇	20180428	0.966	1.141 9	0.109 3	2.128 1	0.009 1	0.023 8
S17	江西三湖镇	20180428	0.946	2.100 6	0.510 3	2.227 7	0.027 5	0.199 4
S18	江西三湖镇	20180428	0.981	1.449 4	0.094 8	1.381 7	0.013 6	0.065 3
S19	江西三湖镇	20180428	0.990	2.212 6	0.204 9	2.377 4	0.026 7	0.185 1
S20	江西三湖镇	20180428	0.963	1.870 9	0.235 8	1.956 2	0.019 8	0.170 7
S21	江西三湖镇	20180428	0.986	2.380 1	0.079 6	1.709 2	0.026 1	0.158 4
S22	江西三湖镇	20180428	0.989	1.601 5	0.088 1	1.740 2	0.008 0	0.153 9
S23	江西三湖镇	20180428	0.966	1.940 8	0.086 8	1.788 3	0.018 3	0.083 6
S24	江西三湖镇	20180428	0.995	1.990 2	0.213 2	2.256 1	0.019 9	0.113 9
S25	江西三湖镇	20180428	0.967	2.122 7	0.088 2	1.917 2	0.019 9	0.095 9
S26	江西三湖镇	20180427	0.926	0.996 9	0.199 2	2.066 1	0.021 4	0.228 1
S27	江西三湖镇	20180427	0.990	2.601 5	0.218 3	2.392 1	0.027 6	0.130 8
S28	江西三湖镇	20180427	0.959	1.116 2	0.207 2	1.373 8	0.011 7	0.095 7
S29	江西三湖镇	20180427	0.905	2.258 0	0.524 9	2.141 1	0.020 9	0.154 6
S30	江西三湖镇	20180427	0.907	1.556 1	0.470 4	1.599 8	0.037 9	0.210 8
S31	江西三湖镇	20180427	0.937	1.616 9	0.373 3	2.107 8	0.021 9	0.156 2
S32	江西三湖镇	20180427	0.894	1.419 3	0.224 9	2.357 2	0.024 3	0.301 0
S33	江西三湖镇	20180427	0.861	2.184 1	0.800 5	2.023 9	0.031 6	0.155 5
S34	江西三湖镇	20180427	0.937	1.597 5	0.550 1	2.138 5	0.027 0	0.138 2

混合溶液,即得。

2.3 色谱条件 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (A) - 0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 5% ~ 10% A; 5 ~ 15 min, 10% ~ 20% A; 15 ~ 35 min, 20% ~ 35%

A; 35 ~ 55 min, 35% ~ 50% A; 55 ~ 60 min, 50% A; 60 ~ 66 min, 50% ~ 5% A), 柱温 30 ℃, 流速 1 mL · min⁻¹, 进样量 20 μL, 检测波长 254 nm。

2.4 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验 取车前子样品 S1, 按 2.1 项

下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次,以 2 号峰(京尼平苷酸)为参照峰,考察各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取车前子样品 S1,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,分别在制备后 0,2,4,8,12,24 h 按 2.3 项下色谱条件测定,以 2 号峰(京尼平苷酸)为参照峰,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取车前子样品 S1,按 2.1 项下方法平行制备 6 份供试品溶液。按 2.3 项下色谱条件测定,以 2 号峰(京尼平苷酸)为参照峰,结果各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,表明该方法重复性良好。

2.5 化学模式识别分析^[7] 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)分析车前子 HPLC 指纹图谱数据,确定共有峰,生成对照指纹图谱并进行相似度计算。以共有峰相对峰面积为变量,将数据导入 SIMCA 14.1 软件进行 PCA, OPLS-DA 和变量重要性投影(VIP)值分析,研究江西不同产区车前子的差异性,筛选导致样品间差异的化学成分。

2.5.1 指纹图谱的构建及共有峰的确定 取 34 批江西不同产区的车前子,按 2.1 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,按“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)进行分析。以样品 S1 为参照图谱,通过多点校正进行匹配,计算相似度,见图 1,2。结果 34 批车前子样品共得到 20 个共有峰,经过对照品比对,确定色谱峰 2,10,11,14,15 分别为京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷。

2.5.2 江西不同产区车前子指纹图谱相似度分析 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)计算相似度,结果见表 1。结合图 1 可知,江西不同产区车前子具有较高的相似度(均 > 0.86),表明江西道地车前子不同产区整体化学组分类似,但化学成分含量可能存在一定差异。

2.5.3 PCA 将 34 个批次车前子的 20 个共有峰的峰面积数据导入 SIMCA 14.1 软件中进行 PCA,前 6 个主成分的特征值均 > 1,累计贡献率达 85.93%,说明前 6 个因子在反映江西车前子不同产区与 20 个共有成分的相互关系中起主导作用,能够

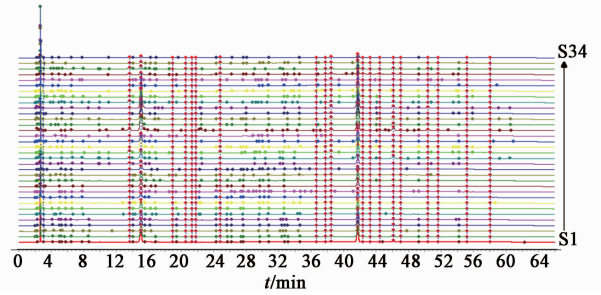
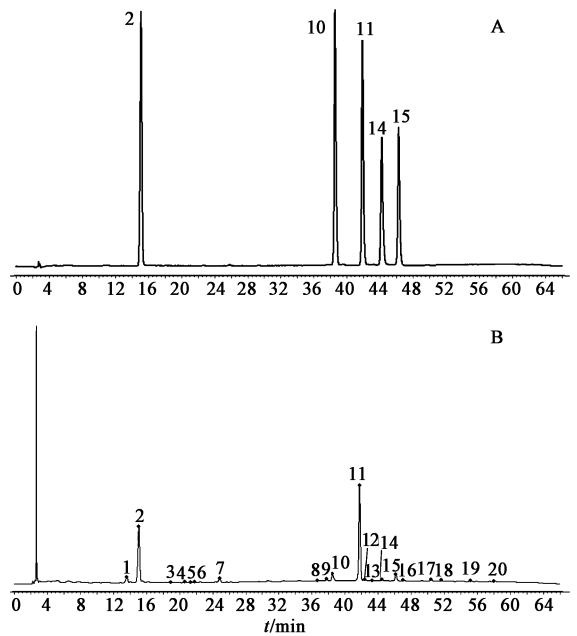


图 1 34 批车前子样品的 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 34 batches of Plantaginis Semen samples



2. 京尼平苷酸;10. 大车前苷;11. 毛蕊花糖苷;14. 木犀草苷;15. 异毛蕊花糖苷

图 2 混合对照品溶液(A)的 HPLC 指纹谱和 34 批车前子样品的对照指纹谱(B)

Fig. 2 HPLC fingerprint of mixed reference solution (A) and reference fingerprint (B) of 34 batches of Plantaginis Semen samples

揭示样品中大多数的差异信息,见表 2。根据 34 批车前子药材 20 个共有峰的 PCA 结果,提取前 2 个主成分得分图,见图 3。结果发现江西不同产区车前子在 PCA 处理下并没有得到很好的区分,故进一步采用 OPLS-DA 对样品进行分析。

2.5.4 OPLS-DA^[8] 结果表明 OPLS-DA 模型有效,能有效区分 3 组不同产区的车前子样品见图 4~6,计算模型的主成分回归系数(Q^2Y)分别为 0.993, 0.905, 0.799。

提取 OPLS-DA 模型中 20 个变量的 VIP 值,见图 7。结果发现 VIP 值 > 1 的共有峰包括峰 10 (VIP = 1.384), 峰 14 (VIP = 1.281), 峰 11 (VIP =

表 2 不同产区车前子中共有峰的主成分载荷分析

Table 2 Loadings of six principal components of common peaks in Plantaginis Semen samples

峰号	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
峰 1	0.171	0.741	-0.269	0.285	0.123	0.080
峰 2	0.955	-0.017	0.240	-0.031	0.044	0.023
峰 3	-0.175	-0.313	0.150	0.559	0.541	0.189
峰 4	-0.147	0.746	-0.438	0.026	0.326	-0.030
峰 5	-0.445	0.747	0.139	0.017	0.270	0.140
峰 6	0.803	0.251	-0.031	0.100	0.191	0.132
峰 7	-0.325	0.825	0.093	0.036	0.219	0.064
峰 8	-0.241	-0.579	0.396	0.037	0.377	0.261
峰 9	-0.478	0.629	0.480	-0.129	-0.268	-0.012
峰 10	0.860	0.345	0.012	-0.167	0.108	-0.007
峰 11	0.959	0.064	0.102	-0.183	0.081	0.002
峰 12	0.757	0.143	0.060	0.226	-0.316	0.293
峰 13	0.298	0.014	-0.796	0.312	-0.178	-0.199
峰 14	0.961	0.069	0.172	0.122	0.026	-0.028
峰 15	0.892	0.025	0.114	0.287	-0.033	-0.134
峰 16	0.279	0.065	-0.435	-0.465	0.108	0.053
峰 17	0.926	0.035	0.222	0.197	-0.101	-0.017
峰 18	-0.270	0.657	0.452	0.128	-0.386	0.000
峰 19	0.052	0.064	0.330	0.035	0.302	-0.859
峰 20	0.611	0.112	0.094	-0.604	0.247	0.100

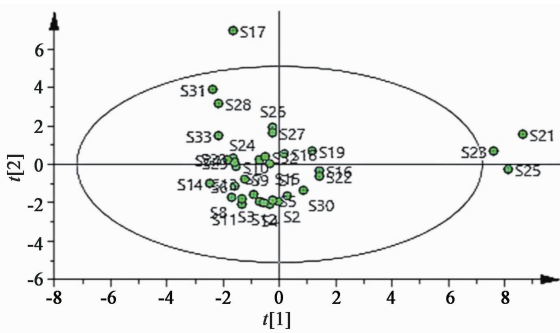


图 3 34 批车前子药材的 PCA 得分
Fig. 3 PCA score distribution of 34 batches of Plantaginis Semen samples

1. 280), 峰 15 (VIP = 1.207), 峰 2 (VIP = 1.204), 峰 6 (VIP = 1.202), 峰 17 (VIP = 1.201), 峰 8 (VIP = 1.176), 峰 1 (VIP = 1.085), 峰 4 (VIP = 1.011), 峰 12 (VIP = 1.003), 说明以上化学成分对江西不同产区车前子样品分类具有显著影响, 这些成分可能是引起不同产区车前子质量差异的主要标志性成分, 确定色谱峰 2, 10, 11, 14, 15 分别为京尼平昔酸、大

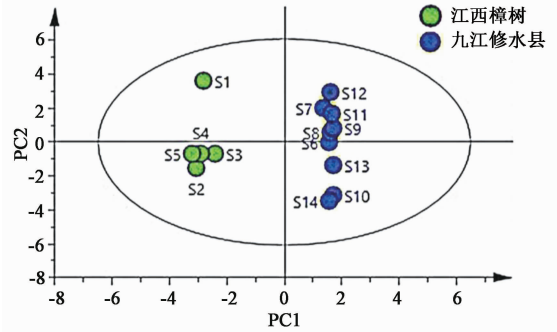


图 4 14 批车前子药材的 OPLS-DA 得分
Fig. 4 OPLS-DA score distribution of 14 batches of Plantaginis Semen samples

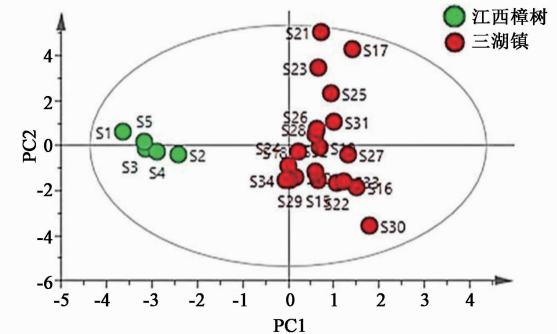


图 5 25 批车前子药材的 OPLS-DA 得分
Fig. 5 OPLS-DA score distribution of 25 batches of Plantaginis Semen samples

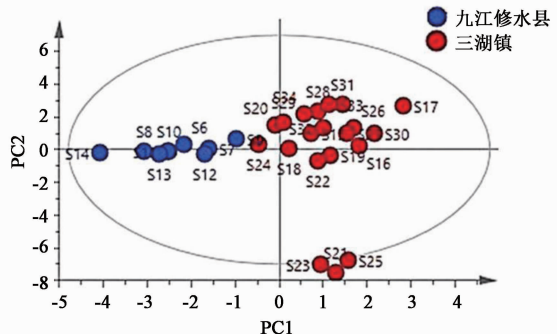


图 6 29 批车前子药材的 OPLS-DA 得分
Fig. 6 OPLS-DA score distribution of 29 batches of Plantaginis Semen samples

车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷。
2.6 车前子中 5 种指标性成分的定量分析
2.6.1 线性关系考察 将 2.2 项下混合对照品溶液稀释不同倍数, 按 2.3 项下色谱条件测定, 进样量 10 μL。以峰面积积分值为纵坐标, 对照品质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得京尼平昔酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷回归方程分别为 $Y = 3.0 \times 10^6 X + 19\ 506$ ($r = 0.999\ 8$), $Y = 6.0 \times$

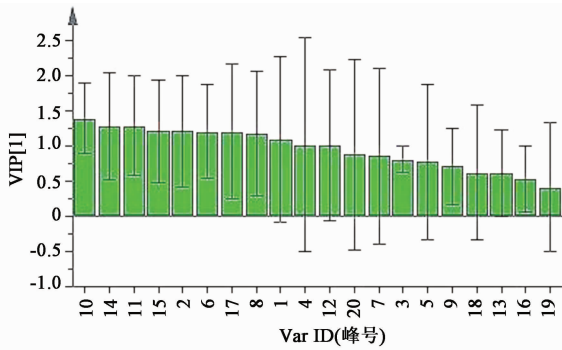


图 7 不同车前子样品共有峰的 VIP 值

Fig. 7 VIP values of common peaks of Plantaginis Semen samples by OPLS-DA

$10^6 X - 9\ 342.1$ ($r = 1.000\ 0$), $Y = 3.0 \times 10^6 X - 50\ 462$ ($r = 1.000\ 0$), $Y = 1.0 \times 10^7 X - 179\ 874$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 6.0 \times 10^6 X - 30\ 712$ ($r = 0.999\ 9$); 线性范围依次为 $0.008\ 2 \sim 6.29$, $0.009 \sim 6.45$, $0.008\ 8 \sim 6.74$, $0.003\ 8 \sim 4.00$, $0.005\ 28 \sim 4.66\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6.2 精密度试验 精密吸取 2.2 项下混合对照品溶液 $10\ \mu\text{L}$, 按 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 0.3%, 0.7%, 0.3%, 3.2%, 1.2%, 表明仪器精密度良好。

2.6.3 重复性试验 取车前子样品 S6 约 1.0 g, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液 6 份, 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷的平均质量分数分别为 1.978%, 0.277%, 1.420%, 0.019%, 0.101%, RSD 分别为 2.8%, 1.9%, 2.1%, 3.2%, 2.6%, 表明该方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 取车前子样品 S6 约 1.0 g, 精密称定, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷峰面积的 RSD 分别为 2.6%, 1.9%, 2.1%, 3.2%, 2.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.5 加样回收率试验 取 6 份车前子样品 S6, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分别按 1:1 比例加入混合对照品溶液适量, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定, 结果京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷的平均加样回收率分别为 102.60%, 98.64%, 101.25%, 96.20%, 101.24%, RSD 分别为 2.4%, 2.1%,

2.7%, 3.8%, 3.1%。

2.6.6 样品测定 取 34 批车前子样品, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液, 分别精密吸取 $10\ \mu\text{L}$ 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算各样品中 5 个指标成分的含量, 结果见表 1。

3 讨论

3.1 样品提取方法与色谱条件考察 预试验对比了 2015 年版《中国药典》收载的供试品溶液制备方法(加 50 倍量 60% 甲醇回流提取 2 h)和(加 50 倍量 60% 甲醇超声提取 30 min), 结果发现二者结果无明显差异, 且回流提取会破坏受热易分解成分; 同时, 还考察了超声时间、溶剂种类(甲醇、乙醇)和溶剂质量分数及其用量, 结果发现加 20 倍量 60% 甲醇超声提取 30 min 的效率较高。另外, 考察了不同流动相系统(甲醇-0.1% 甲酸水溶液、甲醇-0.2% 甲酸水溶液、甲醇-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液), 结果表明甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相时, 色谱峰的对称性、分离度最好。在上述实验条件下, 进一步对车前子 HPLC 指纹图谱开展全波长扫描, 比较了检测波长在不同波段的色谱图, 发现 254 nm 处的 HPLC 指纹图谱色谱峰丰富、峰形好、特征性强。

3.2 车前子质量评价的指标性成分选择 车前子虽为江西道地药材之一, 但不同产区样品中化学成分还是存在一定差异的, 这可能与人工栽培技术、土壤环境等因素有关。本实验在 2015 年版《中国药典》基础上增加了 3 个指标性成分。有研究表明, 车前子中苯乙醇苷类化合物是降低急性高尿酸血症小鼠血清尿酸水平的重要药效成分^[9-10], 主要成分为毛蕊花糖苷与异毛蕊花糖苷^[11]; 大车前苷也为苯乙醇苷类化合物, 三者均具有良好的抗菌^[12-13]、抗炎^[13]、抗氧化^[13-15]等生理活性。环烯醚萜及其苷类成分具有较强的抗氧化活性, 其中以京尼平苷酸活性最强^[16]。木犀草苷为黄酮类化合物, 具有很好的抗病毒作用^[17]。说明京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷对车前子的品质评价与质量控制具有重要意义。

3.3 化学模式识别结果的分析 中药指纹图谱具有整体性、全面性和系统性, 能够全面反映中药材和中成药的质量^[18-20]。而化学模式识别的应用有利于更好地控制中药质量。本实验在确认毛蕊花糖苷和京尼平苷酸符合 2015 年版《中国药典》规定之后, 对样品指纹图谱进行研究, 同时基于指纹图谱共有峰相对峰面积构建的 PCA, OPLS-DA 分类模型

直观、合理,能够区分不同来源车前子样品,同时测定了车前子中京尼平苷酸、大车前苷、毛蕊花糖苷、木犀草苷、异毛蕊花糖苷 5 个主要药效成分的含量,从多方面、多角度控制该药材质量,为其质量标准建立提供可靠数据。车前子作为江西道地药材之一,产区分布繁多,因此,优选江西道地产区也是提高中药材质量的有效途径,同时也可以加强与推广道地药材的中药材生产质量管理规范(GAP)基地建设。本实验只选取了江西产区车前子样本 34 个,且只抽样 3 个主要产区,未鉴定其他 VIP 值 > 1 的指标成分,后续将结合质谱技术加以确认,同时扩大江西车前子产区范围以及样本数量,以期更精确筛选出 GAP 产地,也为后期炮制工艺优选奠定基础。

[参考文献]

[1] 龚千锋. 中药炮制学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016:232-233.

[2] 李冲冲,龚苏晓,刘昌孝,等. 车前子化学成分与药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2018,49(6):1233-1246.

[3] 郑秀棉,杨莉,王峥涛. 车前子的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材,2013,36(7):1190-1196.

[4] 郝敏,陆兔林,毛春琴,等. 基于中药质量标志物的饮片质量控制研究[J]. 中草药,2017,48(9):1699-1708.

[5] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设[J]. 中草药,2017,48(18):3669-3676.

[6] 王露露,孙倩怡,杨慧海,等. 模式识别及其在中药质量评价中的应用[J]. 中草药,2016,47(23):4282-4288.

[7] 潘玄玄,宋粉云,林秀莲,等. 沉香化气丸的 UPLC 指纹图谱与化学模式识别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(19):105-110.

[8] 郭威,孙蓉,王亮,等. 基于指纹图谱和 OPLS-DA 的越南和国产土茯苓差异性化合物探索[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(14):62-67.

[9] 曾金祥,魏娟,毕莹,等. 车前子醇提物降低急性高尿酸血症小鼠血尿酸水平及机制研究[J]. 中国实验方

剂学杂志,2013,19(9):146-150.

[10] 曾金祥,毕莹,许兵兵,等. 车前子提取物部位群抗痛风的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(8):131-135.

[11] 万茵. 车前子多糖、黄酮和苯乙醇苷类的纯化、结构解析及其活性功能研究[D]. 南昌:南昌大学,2007.

[12] Deyama T, Kobayashi H, Nishibe S, et al. Isolation, structure elucidation and bioactivities of phenylethanoid glycosides from *Cistanche*, *Forsythia* and *Plantago* plants [J]. Stud Nat Prod Chem,2006,33(Part M):645-674.

[13] ZHOU Q, LU W, NIU Y, et al. Identification and quantification of phytochemical composition and anti-inflammatory, cellular antioxidant, and radical scavenging activities of 12 *Plantago* species [J]. J Agric Food Chem,2013,61(27):6693-6702.

[14] CHEN Y, CHEN W, LI D, et al. Preparative isolation and purification of five phenylethanoid glycosides from *Chirita eburnean*[J]. Chem Nat Compd⁺,2011,47(4):615-618.

[15] Amakura Y, Yoshimura A, Yoshimura M, et al. Isolation and characterization of phenolic antioxidants from *Plantago* herb[J]. Molecules,2012,17(5):5459-5466.

[16] Toda S, Miyase T, Arichi H, et al. Natural antioxidants: II. Antioxidative components isolated from seeds of *Plantago asiatica* Linne. [J]. Chem Pharm Bull,1985,33(3):1270-1273.

[17] Sansei N. The plant origins of herbal medicines and their quality evaluation[J]. Yakugaku Zasshi,2002,122(6):363-379.

[18] 薛非非,王勃,吕辰子,等. 款冬花不同炮制品的 HPLC 指纹图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018,24(14):7-14.

[19] 苏慧,岳琳,刘颖,等. 黄柏及黄柏炭饮片的 HPLC 特征图谱比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(24):41-45.

[20] 张霄潇,毛鹏,李正勇,等. 心速宁胶囊的 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(24):51-55.

[责任编辑 刘德文]