

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.06.010

酒萸肉超高效液相色谱指纹图谱的建立及化学计量分析*

李永鹏,卜晨琛,宋霞,刘亚蓉

(青海省药品检验检测院·青海省中藏药现代化研究重点实验室,青海 西宁 810000)

摘要:目的 建立酒萸肉的超高效液相色谱指纹图谱,并进行聚类分析和主成分分析。方法 色谱柱为 ACE3 C₁₈-AR 柱(100 mm × 2.1 mm, 3 μm),流动相为乙腈-0.3% 磷酸溶液(梯度洗脱),流速为 0.2 mL/min,检测波长为 254 nm,柱温为 25 °C,进样量为 1 μL。以马钱苷为参照峰绘制 76 批酒萸肉药材样品的指纹图谱,并与 10 批山萸肉药材样品的指纹图谱进行比较。采用 Chempattern 化学计量学软件进行相似度评价,并进行聚类分析和主成分分析。结果 76 批酒萸肉药材指纹图谱共确定 7 个共有峰、6 种成分,分别为没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、獐牙菜苷、山茱萸新苷;76 批酒萸肉药材样品中有 60 批次的相似度大于 0.8;76 批酒萸肉药材样品和 10 批山萸肉药材样品聚为两大类,两大类的 5-羟甲基糠醛含量差异明显;经主成分分析,峰 6 和峰 2 均是导致药材样品质量差异的重要因素。结论 所建立的超高效液相色谱指纹图谱可用于酒萸肉的质量评价。

关键词:酒萸肉;山萸肉;超高效液相色谱法;指纹图谱;没食子酸;5-羟甲基糠醛;莫诺苷;马钱苷;獐牙菜苷;山茱萸新苷

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)06-0035-06

Establishment of UPLC Fingerprint of Wine-Prepared *Fructus Corni* and Its Stoichiometric Analysis

LI Yongpeng, BU Chenchen, SONG Xia, LIU Yarong

(Qinghai Provincial Institutes for Drug Control · Qinghai Key Lab for Modernization Research of Traditional Chinese and Tibetan Medicine, Xining, Qinghai, China 810000)

Abstract: Objective To establish the ultra-performance liquid chromatography (UPLC) fingerprint of wine-prepared *Fructus Corni*, and to conduct cluster analysis and principal component analysis (PCA). **Methods** The chromatographic column was ACE3 C₁₈-AR column (100 mm × 2.1 mm, 3 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.3% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow

*基金项目:青海省科技计划项目[2017-ZJ-Y40;2018-ZJ-T06]。

第一作者:李永鹏,男,大学本科,主管药师,研究方向为中药药品检验,(电子信箱)453460131@qq.com。

苷的提取率为指标,采用正交试验法优化,筛选最佳提取条件,优选工艺提取的成品质量稳定,且质量标准可控。

3.2 质控药材选择

质量标准部分主要包括定性鉴别和含量测定。定性鉴别中,由于处方药味较少,以水作为提取溶剂,故其中几味药材的鉴别试验未发现特征性斑点或分离效果较差,最终只完成了连翘、知母的定性鉴别。含量测定以连翘苷为指标,预试验结果表明,以乙腈-水(23:77, V/V)为流动相、检测波长为 277 nm 时样品各成分分离效果较好,可有效分离连翘苷与其他成分。方法学考察结果表明,仪器精密度高,供试品溶液室温放置 24 h 内稳定,方法重复性良好。

3.3 含量限度

工艺确定后,制备 3 批供试品,按质量标准检测方法进样测定,结果 3 批样品中连翘苷的含量分别为 0.338, 0.346, 0.342 mg/mL。样品连翘苷含量的差异主要与药材中相关成分含量高低有关,因此可根据样品含量测定结果设定复方连翘滴鼻液中连翘苷含量限度。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:

中国医药科技出版社,2015:170-171.

- [2] 魏晋安,杨光义,陈欢,等. 连翘苷的提取方法、药理毒理及药动学研究进展[J]. 中国药师,2015,18(12):2144-2147.
- [3] 夏伟,董诚明,杨朝帆,等. 连翘化学成分及其药理学研究进展[J]. 中国现代中药,2016,18(12):1670-1674.
- [4] 卢雪盈,彭怡文,姜新根,等. 正交试验设计优选肝纤颗粒水提工艺[J]. 中国药业,2019,28(20):9-11.
- [5] 周旭,朱红,陈红鸽,等. 正交试验法优选连翘药材中连翘苷的提取工艺[J]. 解放军药学学报,2013,29(3):230-232.
- [6] 古惠权. 抗感解毒颗粒中连翘苷的含量测定[J]. 抗感染药学,2017,14(8):1470-1472.
- [7] 宋岚,卞明,陈菊. 连麦通淋颗粒中连翘苷的含量测定[J]. 中国药业,2014,23(6):34-35.
- [8] 覃晓媚,陆红萍,黄妹春,等. HPLC 法测定小儿肺热咳喘口服液中含连翘苷的含量[J]. 广西科学,2011,18(4):359-360.
- [9] 温德平,施夏蓉. HPLC 法测定健儿清解液中含连翘苷的含量[J]. 海峡药学,2016,28(10):75-76.
- [10] 潘喆,张辉,宋文静. HPLC 法测定清热胶囊中含连翘苷的含量[J]. 天津药学,2016,28(2):16-17.
- [11] 孙晓佳,纪宏宇,兰恭赞,等. HPLC 法测定乳癖消颗粒中含连翘苷的含量[J]. 中国药师,2016,19(1):184-185.

(收稿日期:2020-06-26;修回日期:2020-09-03)

rate was 0.2 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 1 µL. The UPLC fingerprints of 76 batches of wine-prepared *Fructus Corni* were drawn with loganin as reference peak and compared with those of 10 batches of *Fructus Corni*. The similarity evaluation was carried out by Chempattern chemometrics software, and the cluster analysis and PCA were conducted. **Results** Seven common peaks and six main effective components were identified in the fingerprints of 76 batches of wine-prepared *Fructus Corni*, which were gallic acid, 5-hydroxymethylfurfural, morroniside, loganin, swertioside and cornuside. The similarity of 60 batches of 76 batches of wine-prepared *Fructus Corni* was more than 0.8. Totally 76 batches of wine-prepared *Fructus Corni* samples and 10 batches of *Fructus Corni* samples were grouped into two groups, and the content of 5-hydroxymethylfurfural in the two groups was significantly different. The results of PCA showed that peak 6 and peak 2 were the important reasons for the quality difference of samples. **Conclusion** The established HPLC fingerprint can be used to evaluate the quality of wine-prepared *Fructus Corni*.

Key words: wine-prepared *Fructus Corni*; *Fructus Corni*; UPLC; fingerprint; gallic acid; 5-hydroxymethylfurfural; morroniside; loganin; swertioside; cornuside

山茱萸有补益肝肾、收涩固脱功效,临床用于治疗眩晕耳鸣、腰膝酸软、阳痿遗精、遗尿尿频、崩漏带下、大汗虚脱、内热消渴等症^[1]。山茱萸经酒炮制后补益功能增强,六味地黄丸、知柏地黄丸等经典名方均以酒萸肉为原料^[2-3],但 2015 年版《中国药典(一部)》尚未区分山萸肉和酒萸肉的质控指标。为了全面评价酒萸肉的质量和现行标准的可行性,本研究中采用超高效液相色谱(UPLC)法测定酒萸肉多指标成分的含量,并建立指纹图谱,为酒萸肉的临床应用、炮制和资源开发提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);BSA224SCW 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司,精度为十万分之一);N-1001 型旋转蒸发器(东京理化机械株式会社);Milli-QA10 型超纯水器(德国 Merck Millipore 公司);KQ-500DE 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司);Chempattern 化学计量学软件(北京科迈恩科技有限公司)。

1.2 试剂

没食子酸对照品(批号为 110831-201605),5-羟甲基糠醛对照品(批号为 111626-201610),莫诺苷对照品(批号为 111637-201609),马钱苷对照品(批号为 111640-201707),獐牙菜苷对照品(批号为 111742-200501),含量均大于 98%,均购自中国食品药品检定研究院;山茱萸新苷对照品(上海科哲生物科技有限公司,批号为 Y14M10H88277,含量 > 98%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。山茱萸药材均来自 2019 年国家药品评价性抽验计划抽验样品,经青海药品检验检测院鉴定为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉,其中 10 批为山萸肉,76 批为酒萸肉(黄酒炮制品)。酒萸肉药材信息见表 1。

2 方法与结果^[4-14]

2.1 色谱条件

色谱柱:ACE3 C₁₈-AR 柱(100 mm × 2.1 mm, 3 µm);流动相:乙腈(A)-0.3% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表 2);流速:0.2 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:25 °C;进样量:1 µL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、獐牙菜苷、山茱萸新苷对照品各 10 mg,精密称定,分别置 50 mL 容量瓶中,用 80% 甲醇溶解并定容,得各单一对照品贮备液;分别取 1.0 mL,置同一 10 mL 容量瓶中,用 80% 甲醇定容,即得上述 6 种成分质量浓度分别为 24.62, 35.79, 59.16, 9.28, 43.05, 18.09 µg/mL 的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品(编号为 005)粉末(过 3 号筛)约 0.2 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,再称定质量,用 80% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

精密度试验:取样品(编号为 005)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定 6 次,以马钱苷峰为参照峰计算。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 小于 1% (n=6),单峰面积占总峰面积大于 2% 的特征峰相对峰面积的 RSD 小于 2% (n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以马钱苷峰为参照峰计算。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 小于 1% (n=7),单峰面积占总峰面积的比例大于 2% 的特征峰相对峰面积的 RSD 小于 2% (n=7),表明供试品溶液室温下放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(编号为 005)适量,精密称定,共 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项

表 1 76 批酒萸肉药材样品来源和指纹图谱相似度评价

Tab. 1 Information about the origin of 76 batches of wine – prepared *Fructus Corni* and their fingerprint similarity

编号	批号	生产单位	相似度	编号	批号	生产单位	相似度	编号	批号	生产单位	相似度
004	180228	亳州市永刚饮片厂有限公司	0.75	159	20181201	湖南省金翼堂药业有限公司	0.89	302	181217001	北京康源祥瑞医药科技有限公司	0.96
005	181221	南通三越中药饮片有限公司	0.99	160	180160711	北京康美制药有限公司	0.98	303	315180801	北京宏济药业有限公司	0.98
006	18101901	江苏百草中药有限公司	0.95	164	L0P181260701	北京康美制药有限公司	0.99	304	18062701	北京泰仁康药业发展有限公司	1.00
008	190103	江苏东方慧医华康中药饮片有限公司	0.81	169	180801	湖南省南国药都中药饮片有限公司	0.70	305	17022102	北京明辉恒通药业有限公司	0.83
010	181001	安徽黄太中药饮片科技有限公司	1.00	174	180907	安徽魏武中药饮片科技有限公司	0.99	306	H81201	北京均大制药有限公司	0.99
011	190101	江苏同济中药饮片有限公司	1.00	176	YP181201	民生药业集团珍医堂制药有限公司	0.68	314	20181201	北京同仁堂健康药业(福州)有限公司	0.99
012	31811040	江苏福源中药饮片有限公司	0.89	181	180701	青岛善大天源中药饮片有限公司	0.87	315	20181201	海王百草堂药业有限公司	0.53
015	YP170802	民生药业集团珍医堂制药有限公司	0.81	183	180601	北京本草方源(亳州)药业科技有限公司	0.99	324	1901001	宁夏康泰隆中药饮片有限公司	0.96
018	2018082001	盐城市中药饮片厂	0.82	190	181201	安徽药知源中药饮片有限公司	0.86	325	181260701	北京康美制药有限公司	0.99
019	20180802001	盐城市中药饮片厂	0.78	198	181221	亳州市永刚饮片厂有限公司	0.82	326	XE2231	北京华邈药业有限公司	0.94
021	20180824	江苏东莲药业有限公司	0.88	199	190118	嘉兴东方国药饮片有限公司	0.86	333	170601	四川省卓宇制药有限公司	0.51
023	181201	甘肃陇脉药材有限公司	0.86	205	180701	天津市兴达药业有限公司	1.00	334	19021112	江西彭氏国药堂饮片有限公司	0.57
026	181128	苏州市天灵中药饮片有限公司	1.00	213	171101	安徽济顺中药饮片有限公司	0.99	338	190401	浙江国新中药饮片有限公司	0.99
029	190121	江苏华洪药业有限公司	0.99	214	18030029	天津市同曦中药饮片科技发展有限公司	0.69	343	1902120162	亳州市沪淮药业有限公司	0.95
031	180701	酒泉市培丰中药材生态种植加工有限公司	0.88	215	18050004	天津市同曦中药饮片科技发展有限公司	0.64	365	20180402	陕西康盛堂药业有限公司	0.95
033	20180401	宝鸡向源中药饮片有限责任公司	0.96	216	18070901	盛安百草药业有限公司	0.96	366	20180403	陕西康盛堂药业有限公司	0.95
036	0805059	甘肃天士力中天药业有限责任公司	0.82	231	807040	新疆本草堂药业有限公司	0.94	378	201811022	山西科兴药业有限公司	0.76
043	181101	湖北强康中药饮片有限公司	0.71	237	171101	安徽济顺中药饮片有限公司	0.95	380	190401	洛阳康鑫中药饮片有限公司	1.00
044	171019	亳州市蜀中药业有限公司	0.97	241	1804056-01	天津市中药饮片厂有限公司	0.97	392	18109023	北京昊园药业有限公司	0.86
052	20180801	陕西兴盛德耀药业有限责任公司	0.96	243	1812001	安国市聚药堂药业有限公司	0.99	402	180531	嘉兴东方国药饮片有限公司	0.99
077	C18110305	安国润德药业有限公司	0.59	248	181101	湖南福泰中药饮片有限公司	0.82	403	20190301	安徽新兴中药材饮片有限公司	0.94
141	180101	吉首湘泉中药饮片有限公司	0.77	249	18031201	湖南聚仁中药饮片有限公司	0.58	404	20171101	浙江佐力百草中药饮片有限公司	0.99
142	1809004	张家界锦华中药饮片有限责任公司	0.56	260	190311002	青海九康中药饮片有限公司	1.00	xx1	190405	河南西峡	0.93
151	1706522	湖北誉丰药业有限公司	0.69	261	180701	安徽人民中药饮片有限公司	0.95	xx2	190408	河南西峡	0.90
155	201809178	樟树市庆仁中药饮片有限公司	0.99	266	1810032	安徽毫药千草园药股份有限公司	0.97				
156	20190101	湖南淳之宝药业有限责任公司	0.91	285	180802	天马(安徽)国药科技股份有限公司	0.94				

表 2 流动相梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution programs of the mobile phase

时间 (min)	A (%)	B (%)	时间 (min)	A (%)	B (%)
0 ~ 6	2	98	22 ~ 26	18 → 22	82 → 78
6 ~ 8	2 → 7	98 → 93	26 ~ 34	22 → 90	78 → 10
8 ~ 20	7 → 16	93 → 84	34 ~ 36	90 → 2	10 → 98
20 ~ 22	16 → 18	84 → 82			

下色谱条件进样测定,以马钱苷峰为参照峰计算。结果各特征峰相对保留时间的 RSD 小于 1% ($n=6$),单峰面积占总峰面积的比例大于 2% 的特征峰相对峰面积的 RSD 小于 2% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.4 指纹图谱研究

指纹图谱建立:取酒萸肉药材样品 76 批,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,指纹图谱见图 1。根据结果,采用 Chempattern 化学计量学软件分析数据,设编号 005 样品的色谱图作为参照图谱,其他样品的色谱峰与参照图谱进行自动匹配,即得酒萸肉共有模式的对照指纹图谱,见图 2。将 76 批酒

萸肉药材样品的指纹图谱均导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版),计算相似度,结果 76 批酒萸肉药材样品中有 60 批的相似度大于 0.8,10 批的相似度小于 0.7,详见表 1。结果表明,不同来源酒萸肉存在差异。

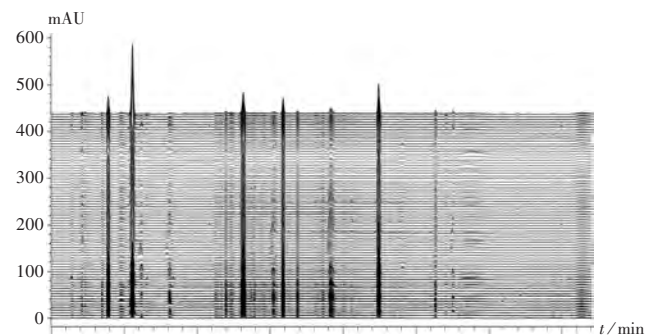
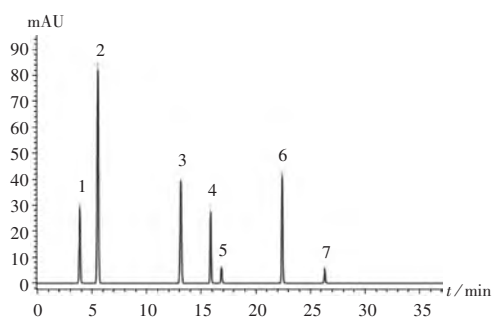


图 1 76 批酒萸肉药材样品超高效液相色谱叠加指纹图谱
Fig.1 UPLC fingerprints of 76 batches of wine – prepared *Fructus Corni*

特征峰标定:根据 76 批酒萸肉的特征图谱测定结果,共标定 7 个特征峰。与对照品比对并结合图谱可知,



1. 没食子酸 2. 5-羟甲基糠醛 3. 莫诺苷 4. 马钱苷
5. 獐牙菜苷 7. 山茱萸新苷

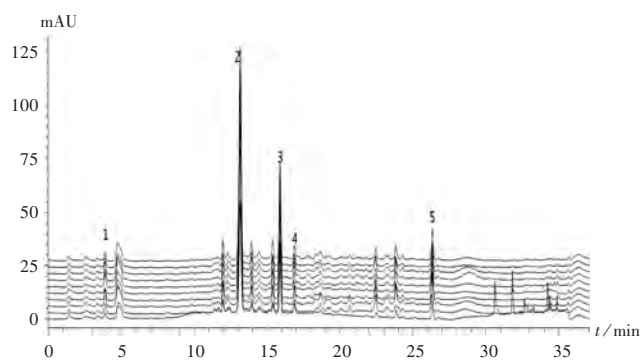
图 2 酒萸肉药材超高效液相色谱对照指纹图谱

1. gallic acid 2. 5-hydroxymethylfurfural 3. morroniside 4. loganin
5. sweroside 7. cornuside

Fig. 2 UPLC reference fingerprints of wine-prepared *Fructus Corni*

1 号峰为没食子酸, 2 号峰为 5-羟甲基糠醛, 3 号峰为莫诺苷, 4 号峰为马钱苷, 5 号峰为獐牙菜苷, 7 号峰为山茱萸新苷; 6 号峰成分未定。

酒萸肉和山萸肉指纹图谱比较: 取 10 批山萸肉药材样品粉末, 精密称定, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 色谱图见图 3, 根据结果, 采用 Chempattern 化学计量学软件分析数据, 并计算酒萸肉和山萸肉指纹图谱的相似度, 结果 10 批山萸肉样品相似度分别为 0.38, 0.54, 0.60, 0.53, 0.54,



1. 没食子酸 2. 莫诺苷 3. 马钱苷 4. 獐牙菜苷
5. 山茱萸新苷

图 3 10 批山萸肉药材样品超高效液相色谱叠加指纹图谱

1. gallic acid 2. morroniside 3. loganin
4. sweroside 5. cornuside

Fig. 3 UPLC fingerprints of 10 batches of *Fructus Corni*

0.56, 0.53, 0.56, 0.54, 0.53, 详见图 4。结果表明, 山茱萸炮制前后的指纹图谱差异较大。

2.5 化学计量学分析

聚类分析: 以各参照峰面积相对峰面积为变量, 以 Chempattern 化学计量学软件进行聚类分析, 采用误差平方和法, 以欧氏距离为样品测度, 聚类分析结果见图 5。结果 76 批酒萸肉药材和 10 批山萸肉药材聚为两大类, 两大类的 5-羟甲基糠醛含量差异明显。其中有

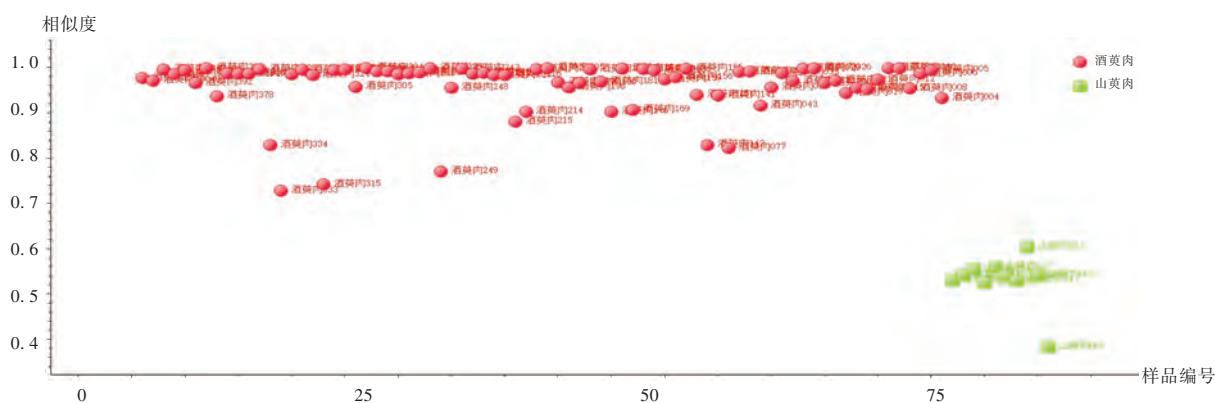


图 4 酒萸肉与山萸肉药材样品相似度评价

Fig. 4 Similarity of wine-prepared *Fructus Corni* and *Fructus Corni*

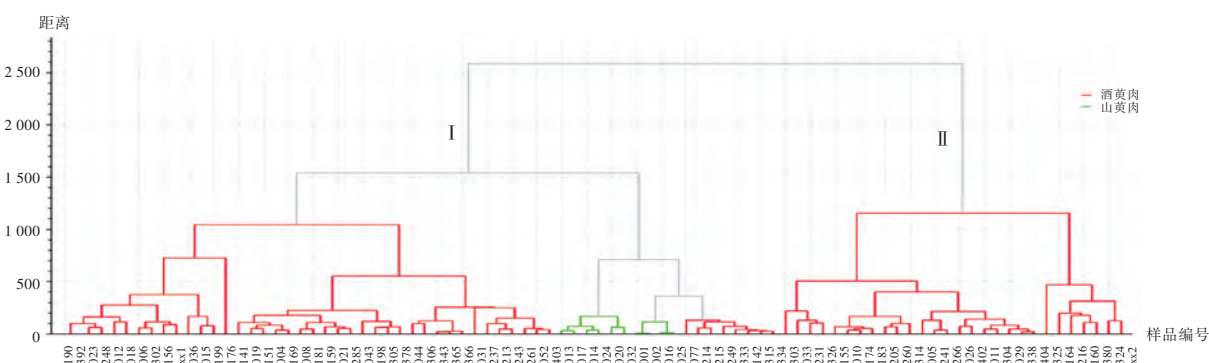


图 5 酒萸肉与山萸肉药材样品聚类分析

Fig. 5 Cluster analysis of wine-prepared *Fructus Corni* and *Fructus Corni*

