

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.13.018

山苦荬高效液相色谱指纹图谱研究*

孙丽君¹, 王玉华¹, 李瑞娟¹, 王秋桐^{2,△}

(1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古医科大学附属医院药物临床试验机构, 内蒙古 呼和浩特 010110)

摘要:目的 建立鉴别山苦荬质量的高效液相色谱指纹图谱法。方法 色谱柱为 Apollo C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.04% 磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 220 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μL。采用相似度软件、SPSS 26.0 统计学软件和 SIMCA-P 软件对 12 批山苦荬的色谱数据进行化学计量学分析。结果 共标定 17 个共有峰, 相似度介于 0.914 ~ 0.992 ($r=1.000$); 主成分分析和聚类分析均将样品分为 4 类; 结合偏最小二乘回归分析得到可能鉴别山苦荬最关键的 9 个色谱峰, 其中 10 号峰为木犀草苷峰。结论 所建立的高效液相色谱指纹图谱法结果准确、稳定, 可为山苦荬药材的质量控制提供参考。

关键词: 山苦荬; 指纹图谱法; 高效液相色谱法; 化学计量学分析; 质量控制

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)13-0064-04

HPLC Fingerprint of *Ixeris chinensis*

SUN Lijun¹, WANG Yuhua¹, LI Ruijuan¹, WANG Qiutong²

(1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China 010110; 2. Drug Clinical Trial Institution, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia, China 010110)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint for the identification of *Ixeris chinensis*.

Methods The chromatographic column was Apollo C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.04% phosphoric acid-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. The chromatographic data of 12 batches of samples were analyzed by the similarity software, SPSS 26.0 statistical software and SIMCA-P software. **Results** A total of 17 common peaks were calibrated, and the similarity 12 batches of *Ixeris chinensis* was between 0.914 and 0.992 ($r=1.000$). The samples were divided into four groups by principal component analysis and cluster analysis. It showed that nine chromatographic peaks may be the most critical peaks to identify the *Ixeris chinensis* by partial least squares discriminant analysis method, among which the peak 10 was luteoloside. **Conclusion** The established HPLC fingerprint method is accurate and stable, which can provide a reference for the quality control of *Ixeris chinensis*.

Key words: *Ixeris chinensis*; fingerprint; HPLC; chemometric analysis; quality control

山苦荬 *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai 为菊科 *Compositae* 苦荬菜属 *Ixeris* 植物, 蒙药材名为苏素-乌布斯, 在内蒙古自治区分布广泛, 收载于《内蒙古蒙药材标准》^[1], 具有抑协日、清热作用, 蒙医临床多用于治疗肝胆热、肝炎等疾病^[2-4]。现代药理学研究表明, 山苦荬具有抗肿瘤活性、镇痛、保肝、免疫调节、抗氧化等作用^[5-6]。其所含成分复杂, 主要包括黄酮类、倍半萜内酯类、三萜皂苷类等化合物^[6-7]。本研究中检测了 12 批山苦荬药材的指纹图谱, 并采用化学计量学分析法分析隐藏信息, 寻找并区分不同品质山苦荬的标志性成分, 为该药材的质量评价提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo Fisher UltiMate 3000 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司); AL204 型分析天平(美国 Mettler Toledo 公司, 精度为十万分之一); KQ-250DA

型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为 350 W, 频率为 36 ~ 44 kHz)。

1.2 试剂

木犀草苷(中国食品药品检定研究院, 批号为 111720-200905); 乙腈、甲醇(Fisher 公司)为色谱纯, 其他试剂为分析纯, 水为超纯水; 12 批不同产地的山苦荬采自山西、内蒙古自治区不同盟市, 经内蒙古医科大学药学院庞秀生教授鉴定为菊科苦荬菜属植物山苦荬 *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai。药材均密封保存于阴凉干燥处, 药材来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 溶液制备^[8-9]

取木犀草苷适量, 精密称定, 加甲醇制成每 1 mL 含 0.102 mg 的溶液, 即得对照品溶液。取山苦荬药材粉末(过 4 号筛)1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加 60% 甲

*基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金[2009MS1206]。

第一作者: 孙丽君, 女, 硕士, 讲师, 研究方向为中蒙药的质量控制, (电子信箱)iamsunlijun1984@126.com。

△通信作者: 王秋桐, 男, 蒙古族, 硕士, 主管药师, 研究方向为中蒙药药效物质基础, (电子信箱)wangqiutong365@126.com。

表1 山苦荬药材来源
Tab. 1 Source of *Ixeris chinensis*

编号	产地	采集日期	编号	产地	采集日期
S1	内蒙古自治区集宁市郊区	2016年6月	S7	内蒙古自治区丰镇市	2016年5月
S2	内蒙古自治区医科大学校园	2016年5月	S8	内蒙古自治区小井沟	2017年6月
S3	内蒙古自治区土默特右旗	2016年5月	S9	内蒙古自治区凉城县	2016年5月
S4	内蒙古自治区赤峰市	2016年6月	S10	内蒙古自治区集宁市郊区	2017年6月
S5	内蒙古自治区赤峰市	2017年6月	S11	山西省大同市	2016年6月
S6	内蒙古自治区土默特右旗	2017年6月	S12	内蒙古医科大学校园	2017年5月

醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 40 min, 放至室温, 再称定质量, 用 60% 甲醇补足减失的质量, 加入 0.5 mL 磷酸, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2 山苦荬指纹图谱建立

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Apollo C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.04% 磷酸溶液 (A) – 乙腈 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min 时 100% A → 90% A, 5 ~ 8 min 时 90% A → 85% A, 8 ~ 28 min 时 85% A → 75% A, 28 ~ 41 min 时 75% A → 70% A, 41 ~ 43 min 时 70% A → 69% A, 43 ~ 60 min 时 69% A → 50% A); 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μL。

2.2.2 指纹图谱建立及相似度评价^[10-13]

取 12 批山苦荬药材, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A 版) 软件分析 12 批山苦荬药材的色谱数据, 以 S12 号样品的色谱图作为参照图谱, 时间窗宽度为 0.10, 采用多点校正的方式, 得到 12 批山苦荬药材的叠加图谱 (见图 1); 以 12 批药材的共有模式为对照色谱图, 共标定 17 个共有峰 (见图 2); 通过对照, 指认出 10 号峰为木犀草苷峰, 峰面积适中, 且不同批次样品中稳定存在, 故选其作为参比峰 (见图 3)。将 12 批山苦荬药材与对照图谱进行相似度比较, 结果 17 个共有峰的相似度介于 0.914 ~ 0.992 ($r = 1.000$), 表明不同批次山苦荬药材的化学成分均较稳定。

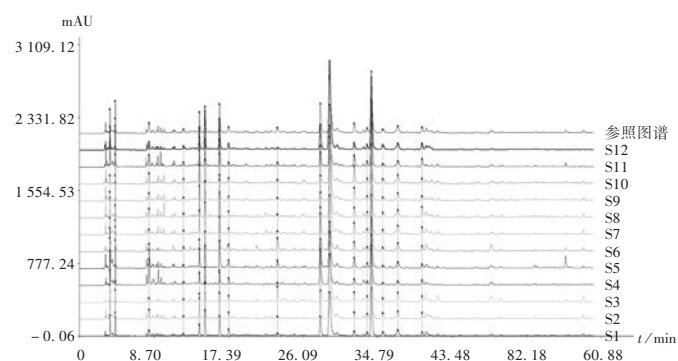


图1 12批山苦荬药材的高效液相色谱叠加指纹图谱
Fig. 1 HPLC superimposed fingerprint of 12 batches of *Ixeris chinensis*

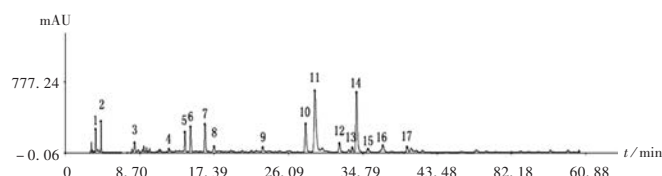


图2 山苦荬药材的共有模式图谱
Fig. 2 Common pattern of *Ixeris chinensis*

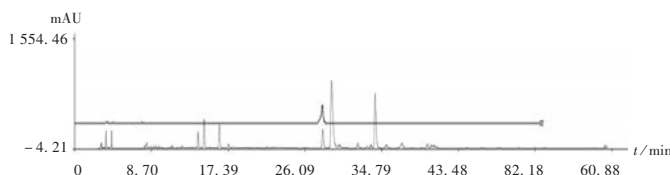


图3 山苦荬药材与木犀草苷对照品的对比色谱图
Fig. 3 Contrast chromatogram of *Ixeris chinensis* and luteoloside

2.2.3 方法学考察

精密度试验: 取 S12 号山苦荬药材适量, 精密称定, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次。结果以 10 号峰为参比峰, 各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均小于 2.00% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取 S12 号山苦荬药材适量, 精密称定, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 3.5, 7.0, 10.5, 14.0 h 时进样测定。结果以 10 号峰为参比峰, 各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均小于 3.00% ($n = 5$), 表明供试品溶液在 14 h 内稳定。

重复性试验: 取 S12 号山苦荬药材适量, 精密称定, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 分别按 2.2.1 项下色谱条件进样测定。结果以 10 号峰为参比峰, 测得各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均小于 3.00% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

2.3 化学计量学分析^[14-15]

聚类分析: 将 12 批山苦荬药材共有峰峰面积的色谱数据导入 SPSS 26.0 统计学软件, 使用沃德联接谱系图重新标度的距离聚类组合, 采用平方欧氏距离对药材进行系统聚类分析 (见图 4)。结果显示, 12 批山苦荬药材大致分为 4 类, I 类包括 S1, S2, S7, S8, S9, S10, S12; II 类包括 S3, S6; III 类包括 S5, S11; IV 类包括 S4。结合表 1 可知, S4 和 S5 均采自内蒙古自治区赤峰市, 但 S4 单独聚为了一类。可见, 即便是同一产地, 也有个别批次的药材质量存在较大差异。

主成分分析: 以 12 批山苦荬药材中 17 个共有峰的峰面积为变量, 采用 SIMCA-P 软件进行主成分分析, 以主成分的特征根和贡献率作为选择主成分的依据, 模型自动拟合选择 4 个主成分, 其特征根分别为 6.79, 2.21, 1.20, 1.02, 方差贡献率分别为 56.60%,

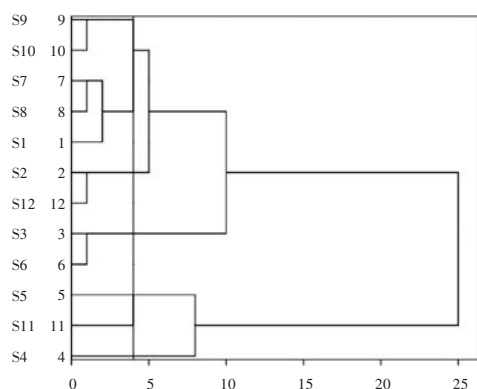


图4 12批山苦荬药材的聚类分析结果

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis of 12 batches of *Ixeris chinensis*

18.40%, 10.00%, 8.52%, 累积方差贡献率大于93.50%, 提示模型预测良好。详见图5。可见, 12批山苦荬药材被分为4类, 与聚类分析结果一致。

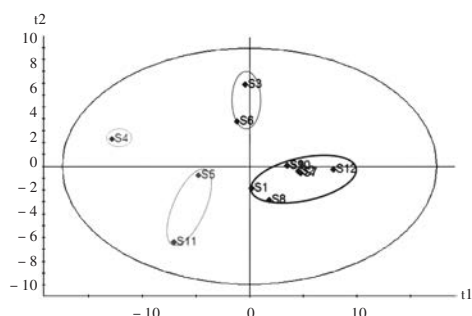


图5 12批山苦荬药材的主成分分析得分图

Fig. 5 PCA score chart of 12 batches of *Ixeris chinensis*

偏最小二乘回归分析(PLS-DA): 采用SIMCA-P软件建立PLS-DA模型, 采用监督模式识别法进行两组间的PLS-DA。结果见图6和图7。PLS-DA模型得分图显示, 样品可很好地区分为4类, 与聚类分析、主成分分析结果一致。以模型变量投影(VIP)值为指标, 对引起组间差异的成分进行分析, VIP图可反映出每个峰的贡献程度。以VIP>1为原则, 得出1, 2, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 15号峰可能是区分样品最关键的色谱峰, 对样品分类作用较大。

3 讨论

3.1 提取方法考察

本试验中分别对提取溶剂(20%甲醇、40%甲醇、60%甲醇、80%甲醇、100%甲醇)、提取方式(超声提取和加热回流提取), 以及提取时间(30, 40, 50 min)进行了考察, 以色谱峰信息的最大化、提取效率高为指标, 最终确定山苦荬的最佳提取方式为以60%甲醇为提取溶剂, 超声提取40 min。

3.2 色谱条件考察^[16]

本试验中分别对色谱条件中的流动相体系(乙腈-0.04%磷酸溶液、甲醇-水、甲醇-0.02%磷酸溶液、甲醇-0.04%磷酸溶液、甲醇-0.06%磷酸溶液、甲醇-0.08%磷酸溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液)、检测波长(全

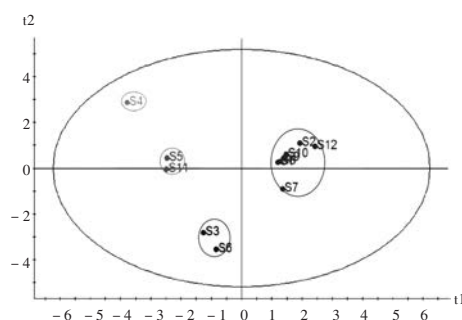


图6 12批山苦荬药材的PLS-DA模型得分图

Fig. 6 PLS-DA score chart of 12 batches of *Ixeris chinensis*

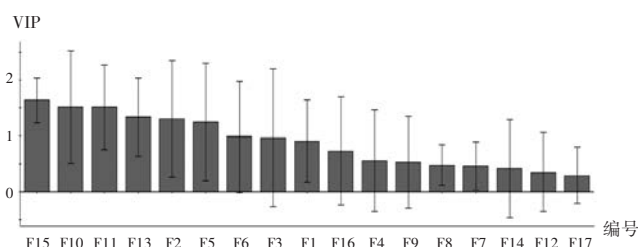


图7 12批山苦荬药材的PLS-DA结果

Fig. 7 PLS-DA results of 12 batches of *Ixeris chinensis*

波长扫描), 以及柱温(20, 25, 30, 35 ℃)和流速(1.0, 0.8 mL/min)进行了考察, 以色谱峰数、峰面积和分离效果为指标, 最终确定了2.2.1项下的色谱条件。

3.3 方法评价

本研究中建立了山苦荬药材的高效液相色谱指纹图谱, 并结合化学计量学分析法进行分析, 结果显示, 该药材中1, 2, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 15号色谱峰对应的9个成分受生长环境的影响较大, 可能为山苦荬中起决定性作用的化学成分, 可全面反映内蒙古自治区范围内不同盟市山苦荬药材的质量差异, 进而为完善山苦荬的地方质量标准提供参考。

参考文献

- [1] 内蒙古自治区卫生厅: 内蒙古蒙药材标准[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1987: 361.
- [2] 崔光志, 李峰, 刘杨. 中药苦菜的文献考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 360-362.
- [3] 内蒙古自治区革命委员会卫生局. 内蒙古中草药[M]. 呼和浩特: 内蒙古自治区人民出版社, 1972: 108.
- [4] 王放, 张加余, 刘颖, 等. 苦碟子化学成分及质量控制方法研究进展[J]. 中南药学, 2013, 11(4): 275-278.
- [5] 希古日干, 哈力嘎, 白淑珍, 等. 山苦荬化学成分及药理研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(7): 1259-1267.
- [6] 刘海霞. 中华苦荬菜与苣荬菜主要化学成分及保肝抗炎药理作用的比较研究[D]. 太原: 山西中医学院, 2016.
- [7] LI HY, XIE WC, QIAO X, et al. Structural Characterization of Arabinogalactan Extracted From *Ixeris Chinensis*(Thunb.) Nakai and Its Immunomodulatory Effect on RAW264. 7 Macrophages[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 143: 977-983.
- [8] 太文杰, 陈生科, 甘秀海. 山苦荬中总黄酮的提取及抗氧化