

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)19-0063-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.19.014



基于指纹图谱结合化学计量学评价栽培与野生五指毛桃质量*

杨小催¹, 郭凯欣², 李燕芳², 唐慧², 张庆业³, 潘海华¹, 郑丽思¹, 柯雪红^{3△}

(1. 广东省清远市中医院, 广东 清远 511500; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 建立五指毛桃的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,结合化学计量学方法确定野生、栽培五指毛桃的质量差异标志物。方法 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 320 nm,柱温为 30℃,进样量为 20 μL。对 10 批栽培五指毛桃与 21 批野生五指毛桃样品进行分析,建立 HPLC 指纹图谱,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)进行相似度评价,确认共有峰,通过与对照品比对指认共有峰,并结合化学计量学方法对野生、栽培五指毛桃的质量及其控制方法进行评价。结果 建立了 31 批五指毛桃样品的 HPLC 指纹图谱,共标定 19 个共有峰,以 10 批栽培五指毛桃指纹图谱的共有模式作为五指毛桃标准指纹图谱,经与对照品比对指认了其中 3 个差异性成分,分别为补骨脂素、芹菜素和 5-甲氧基补骨脂素;以栽培五指毛桃的共有模式为对照图谱,10 批栽培五指毛桃及 21 批野生五指毛桃的相似度分别为 0.847~0.947 和 0.503~0.594;层次聚类分析和主成分分析将 31 批五指毛桃基本分为栽培和野生五指毛桃;偏最小二乘法-判别分析筛选得到 6 个差异标志物,经与对照品比对指认了其中 3 个差异性成分,分别为芹菜素、补骨脂素、5-甲氧基补骨脂素。栽培五指毛桃的芹菜素含量为每 100 g 药材含 0.007 7 g,高于野生五指毛桃的 0.000 8 g。结论 所建立的指纹图谱合理、有效、准确,结合化学计量学方法表征信息更全面,可为五指毛桃的质量控制与品质评价提供参考。

关键词:五指毛桃;栽培;野生;高效液相色谱法;指纹图谱;化学计量学;质量评价

Evaluation of Cultivated *Fici Simplicissimae Radix* and Wild *Fici Simplicissimae Radix* by Fingerprints and Chemometrics

YANG Xiaocui¹, GUO Kaixin², LI Yanfang², TANG Hui², ZHANG Qingye³, PAN Haihua¹, ZHENG Lisi¹, KE Xuehong³

(1. Qingyuan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Qingyuan, Guangdong, China 511500; 2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510405; 3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510405)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints of *Fici Simplicissimae Radix*, and to determine the biomarkers for quality differences between wild *Fici Simplicissimae Radix* and cultivated *Fici Simplicissimae Radix* by fingerprint and chemometrics. **Methods** The chromatographic column was Hypersil ODS2 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 320 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 20 μL. The samples of 10 batches of cultivated *Fici Simplicissimae Radix* and 21 batches of wild *Fici Simplicissimae Radix* were analyzed to establish HPLC fingerprints. The Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (2004A) was used to evaluate the similarity and identify the common peak. The common peak was identified by comparison of reference substances, and the quality and control methods of wild *Fici Simplicissimae Radix* and cultivated *Fici Simplicissimae Radix* were analyzed and evaluated by fingerprints and chemometrics. **Results** The HPLC fingerprints of 31 batches of *Fici Simplicissimae Radix* samples were established, with a total of 19 common peaks calibrated. The common pattern of 10 batches of cultivated *Fici Simplicissimae Radix* was taken as the standard fingerprint of *Fici Simplicissimae Radix*, and three different components were identified by the reference substance, namely psoralen, apigenin and 5-methoxypsoralen. With the common pattern of cultivated *Fici Simplicissimae Radix* as the reference chromatograms, the similarities of 10 batches of cultivated *Fici Simplicissimae Radix* and 21 batches of wild *Fici Simplicissimae Radix* were 0.847-0.947 and 0.503-0.594, respectively. According to cluster analysis and principal component analysis (PCA), 31 batches of *Fici Simplicissimae Radix* were divided into cultivated *Fici Simplicissimae Radix* and wild *Fici Simplicissimae Radix*. Six differential markers were screened by partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA), and three different components were identified by the reference substance, including psoralen, apigenin and 5-methoxypsoralen. The content of apigenin in cultivated *Fici Simplicissimae Radix* was 0.007 7 g per 100 g of medicinal herbs, which was significantly higher than 0.000 8 g

*基金项目:广东省中医药局科研项目[20201404];广东省清远市科技计划项目[2021SJXM025]。

第一作者:杨小催,女,硕士研究生,研究方向为药物分析与药效物质,(电子信箱)386361799@qq.com。

△通信作者:柯雪红,女,研究员,研究方向为药物分析与药效物质,(电子信箱)kexuehong@126.com。

of wild *Fici Simplicissimae Radix*. **Conclusion** The established fingerprints are reasonable, effective and accurate. When the fingerprints are combined with chemometrics analysis methods, the characterization information of *Fici Simplicissimae Radix* is more comprehensive, which can provide a reference for the quality control and evaluation of *Fici Simplicissimae Radix*.

Key words: *Fici Simplicissimae Radix*; cultivation; wild; HPLC; fingerprints; chemometrics; quality evaluation

五指毛桃为桑科植物裂掌榕 *Ficus simplicissima* Lour. 的干燥根,有广东人参之美称,分布于广东、福建、广西等地。有五爪龙、土北芪、五指香等别名,为岭南地区少数民族特别是瑶族、壮族的常用药^[1],最早记载于《生草药性备要》,具有健脾补肺、行气利湿、舒筋活络之功效,主治脾虚浮肿、食少腹胀、肢倦无力、肺虚痰喘、带下、盗汗、水肿、风湿痹痛、产后无乳、跌打损伤等^[2-3]。五指毛桃以五爪龙之称收载于我国1977年版《中国药典(一部)》,是现行《中国药典》品种宫炎平片处方中包含的主要药材之一^[4],并收录于2013年版《广西壮族自治区瑶药材质量标准(第一卷)》^[5]。广东省清远市地处粤北山区,是我国瑶族一大聚居区。五指毛桃作为道地瑶药材被广泛研究与应用,其资源以野生为主,随着土地资源的减少和过度开采,导致五指毛桃的野生资源量下降,无法满足市场需求,故其栽培品逐渐增多^[6]。目前,尚未见野生与栽培五指毛桃药材指纹图谱结合化学模式识别的研究,限制了五指毛桃的质量标准制订及开发应用。本研究中收集广东省清远市不同地区(连山、连南、英德、清城)的21批野生五指毛桃药材及市售不同品牌的10批栽培五指毛桃药材,采用高效液相色谱(HPLC)法^[7-8]构建指纹图谱并测定其中补骨脂素、芹菜素、5-甲氧基补骨脂素的含量,同时采用层次聚类分析(HCA)^[9-10]、主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)进行化学计量学评价,为五指毛桃药材的质量标准及开发应用提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),包括Empower2色谱工作站、Waters2996二极管阵列检测器;XS105 DualRange型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为十万分之一);SK3310LHC型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,功率为180~350 W,频率为35/53 kHz);Thermo Legend Micro 17R型离心机(德国Thermo公司)。

1.2 试剂

补骨脂素对照品(批号为110739-201918,纯度为99.6%),芹菜素对照品(批号为111901-202004,纯度为99.4%),5-甲氧基补骨脂素对照品(批号为520036-201401,纯度为99.2%),均购于中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇(色谱纯,德国Merck公司);水为超纯

水;五指毛桃药材经广州中医药大学第一临床医学院袁小红教授鉴定均为正品,其药材样品信息见表1。

表1 栽培与野生五指毛桃药材样品信息

Tab. 1 Sample information of cultivated *Fici Simplicissimae Radix* and wild *Fici Simplicissimae Radix*

| 编号 | 批号 | 产地/生产厂家 | 种类 | 编号 | 批号 | 产地/生产厂家 | 种类 |
|-----|---------|---------|----|-----|----------|---------------------|----|
| S1 | 2020001 | 清远连山 | 野生 | S17 | 2020014 | 清远清城 | 野生 |
| S2 | 2020002 | 清远连山 | 野生 | S18 | 2020015 | 清远清城 | 野生 |
| S3 | 2020003 | 清远连山 | 野生 | S19 | 2020016 | 清远清城 | 野生 |
| S4 | 2020004 | 清远英德 | 野生 | S20 | 2020017 | 清远清城 | 野生 |
| S5 | 2020005 | 清远英德 | 野生 | S21 | 2020018 | 清远清城 | 野生 |
| S6 | 2020006 | 清远英德 | 野生 | S22 | 191102 | 河源市金源绿色生命有限公司金绿生中药厂 | 栽培 |
| S7 | 2020007 | 清远英德 | 野生 | S23 | 2202045 | 中山市仙逸堂中药饮片有限公司 | 栽培 |
| S8 | 2020008 | 清远英德 | 野生 | S24 | 2202044 | 中山市仙逸堂中药饮片有限公司 | 栽培 |
| S9 | 2020009 | 清远英德 | 野生 | S25 | 2104117 | 中山市仙逸堂中药饮片有限公司 | 栽培 |
| S10 | 2022001 | 清远英德 | 野生 | S26 | 2111011 | 中山市仙逸堂中药饮片有限公司 | 栽培 |
| S11 | 2022002 | 清远英德 | 野生 | S27 | 2101077 | 中山市仙逸堂中药饮片有限公司 | 栽培 |
| S12 | 2022003 | 清远英德 | 野生 | S28 | 2109084 | 中山市仙逸堂中药饮片有限公司 | 栽培 |
| S13 | 2020010 | 清远连南 | 野生 | S29 | W2422312 | 广东省药材公司中药饮片厂 | 栽培 |
| S14 | 2020011 | 清远连南 | 野生 | S30 | 170102-2 | 河源市金源绿色生命有限公司金绿生中药厂 | 栽培 |
| S15 | 2020012 | 清远连南 | 野生 | S31 | 161202-1 | 河源市金源绿色生命有限公司金绿生中药厂 | 栽培 |
| S16 | 2020013 | 清远连南 | 野生 | | | | |

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~10 min时5%A→10%A,10~50 min时10%A→30%A,50~65 min时30%A→45%A,65~85 min时45%A→90%A,85~87 min时90%A→5%A,87~92 min时5%A);流速:1.0 mL/min;运行时间:92 min;检测波长:320 nm;柱温:30℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

取补骨脂素、芹菜素、5-甲氧基补骨脂素对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解,配制成每1 mL含补骨脂素0.050 4 mg、芹菜素0.016 18 mg、5-甲氧基补骨脂素0.050 2 mg的混合对照品溶液。

取五指毛桃药材样品粉末0.2 g,精密称定,置5 mL容量瓶中,加3 mL 50%甲醇,静置4~5 h,超声(功率为350 W,频率为35 kHz)提取30 min,用50%甲醇定容至5 mL,离心(转速为13 000 r/min)10 min,取上清液,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

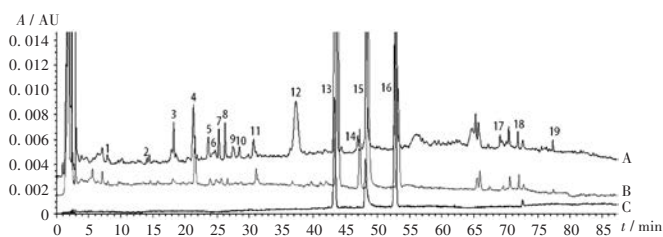
精密度试验:取样品(编号为S1)粉末适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。以13号峰(补骨脂素)为参照峰,计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别低于1%和2.6%($n=6$);采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)计算的相似度均大于0.99,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号为S1)粉末适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0,2,4,8,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以13号峰(补骨脂素)为参照峰,计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别低于2.4%和3.0%;采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)计算的相似度均大于0.99,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(编号为S1)粉末适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以13号峰(补骨脂素)为参照峰,计算得各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD分别低于1%和2.4%($n=6$),采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)计算的相似度均大于0.99,表明方法重复性良好。

2.4 五指毛桃指纹图谱建立

特征峰及主要色谱峰指认:通过对10批栽培五指毛桃HPLC色谱图的考察与比较,最终标定19个共有峰,其峰面积占总峰面积的比例超过90%。与对照品比对,可指认3个色谱峰,其中13号峰、15号峰、16号峰分别为补骨脂素、芹菜素和5-甲氧基补骨脂素,对应保留时间分别为43.16,48.25,52.84 min。详见图1。其中,13号峰(补骨脂素)未与其他峰重叠,即分离度较好,峰强度较其他峰高,故以此峰作为参照峰。



13. 补骨脂素 15. 芹菜素 16. 5-甲氧基补骨脂素

A. 栽培五指毛桃供试品溶液 B. 野生五指毛桃供试品溶液
C. 混合对照品溶液

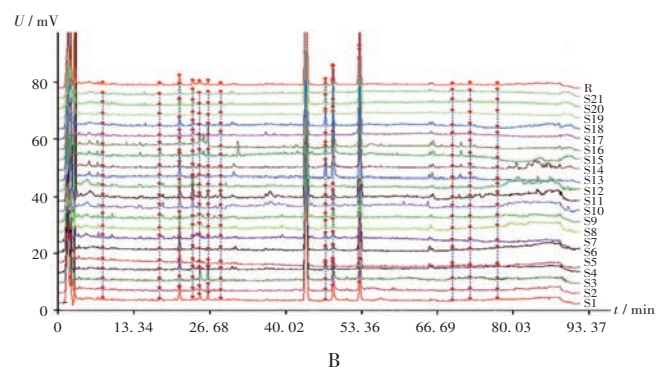
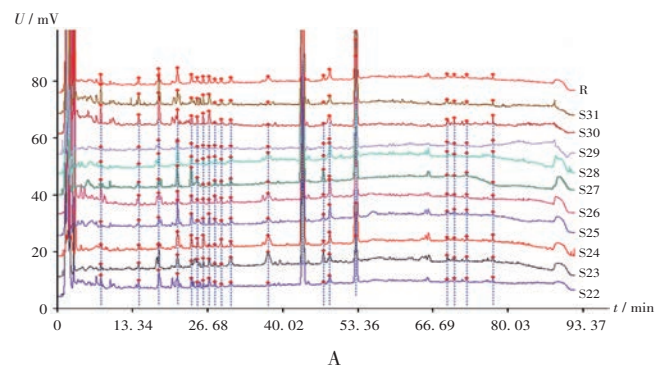
图1 五指毛桃供试品溶液与混合对照品溶液高效液相色谱图

13. Psoralen 15. Apigenin 16. 5-Methoxypsoralen

A. Test solution of Cultivate Fici simplicissimae Radix B. Test solution of Wild Fici simplicissimae Radix C. Mixed reference solution

Fig.1 HPLC chromatograms of the test solution and mixed reference solution of Fici simplicissimae Radix

HPLC 指纹图谱对比:采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版)计算的相似度均大于0.99,对10批栽培五指毛桃药材样品的数据进行分析。采用多点校正后进行自动匹配,以10批栽培五指毛桃药材样品均数为共有模式,建立10批栽培五指毛桃与21批五指毛桃对照图谱。对照图谱中有3个特征峰群,1~12号为特征峰群A,保留时间在0~37 min,其中,1~4号峰峰面积逐渐增大,5~12号峰峰面积较小且大小接近,12个峰占总色谱峰峰面积的12%;13~16号为特征峰群B,保留时间在43~54 min,13号峰较大,14~16号峰逐渐增大,4个峰占色谱峰峰面积的75%;17~19号为特征峰群C,保留时间在69~78 min,且3个峰的峰面积接近。将获得的10批栽培五指毛桃与21批野生五指毛桃共有模式进行比较,结果显示,野生五指毛桃无特征峰群A的2,10,11,12号峰,特征峰群B和C是两者共有的,但峰面积比例差异较大。详见图2至图3。



A. 栽培五指毛桃(编号为S22-S31) B. 野生五指毛桃(编号为S1-S21)

图2 栽培与野生五指毛桃高效液相色谱叠加指纹图谱

A. Cultivated Fici simplicissimae Radix (sample numbers S22-S31)

B. Wild Fici simplicissimae Radix (sample numbers S1-S21)

Fig.2 HPLC overlay fingerprints of cultivated Fici simplicissimae Radix and wild Fici simplicissimae Radix

共有峰面积比较:比较栽培五指毛桃与野生五指毛桃的共有峰面积,结果显示两者峰面积差异较明显,主要表现在野生五指毛桃特征峰群A的2,8,10,11,12号峰;特征峰群B和C为两者共有,特征峰群B峰面积所

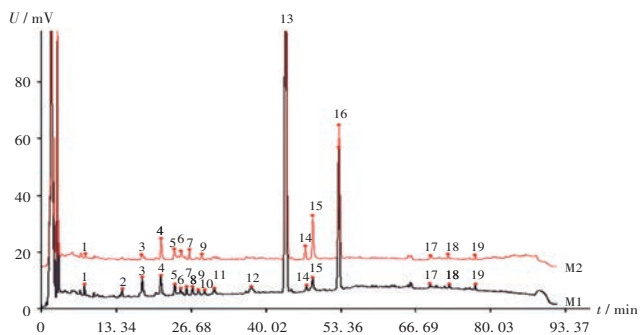


图3 野生(M1)与栽培(M2)五指毛桃对照图谱

Fig. 3 Reference chromatogram of wild *Fici Simplicissimae Radix* (sample number M1) and cultivated *Fici Simplicissimae Radix* (sample number M2)

占比差异较大,在特征峰群 B 中 13, 14, 15, 16 号峰野生五指毛桃与栽培五指毛桃的比例分别为 47:1:3:13 和 33:1:1:33。

相似度评价:根据 10 批栽培五指毛桃指纹图谱测定结果,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)计算不同批次栽培五指毛桃的相似度,结果为 0.847 ~ 0.947。对 21 批野生五指毛桃进行内部相似度分析,结果指纹图谱相似度为 0.982 ~ 0.998,表明内部相似度结果良好。以栽培五指毛桃的共有模式作为 21 批野生五指毛桃的对照图谱,计算得野生五指毛桃的相似度为 0.503 ~ 0.594,相似度结果较低。详见表 2。

表 2 野生与栽培五指毛桃指纹图谱相似度

Tab. 2 Similarity of HPLC fingerprints of cultivated *Fici Simplicissimae Radix* and wild *Fici Simplicissimae Radix*

| 编号 | 内部相似度 | 与栽培共有模式相似度 | 编号 | 内部相似度 | 与栽培共有模式相似度 | 编号 | 内部相似度 | 与栽培共有模式相似度 | 编号 | 内部相似度 | 与栽培共有模式相似度 |
|----|-------|------------|-----|-------|------------|-----|-------|------------|-----|-------|------------|
| S1 | 0.993 | 0.540 | S9 | 0.991 | 0.503 | S17 | 0.993 | 0.566 | S25 | 0.929 | 0.929 |
| S2 | 0.991 | 0.542 | S10 | 0.995 | 0.564 | S18 | 0.991 | 0.564 | S26 | 0.917 | 0.917 |
| S3 | 0.991 | 0.518 | S11 | 0.995 | 0.559 | S19 | 0.914 | 0.519 | S27 | 0.901 | 0.901 |
| S4 | 0.993 | 0.515 | S12 | 0.989 | 0.594 | S20 | 0.996 | 0.536 | S28 | 0.944 | 0.944 |
| S5 | 0.997 | 0.510 | S13 | 0.991 | 0.518 | S21 | 0.995 | 0.535 | S29 | 0.933 | 0.933 |
| S6 | 0.998 | 0.546 | S14 | 0.982 | 0.542 | S22 | 0.940 | 0.940 | S30 | 0.847 | 0.847 |
| S7 | 0.993 | 0.510 | S15 | 0.983 | 0.560 | S23 | 0.852 | 0.852 | S31 | 0.947 | 0.947 |
| S8 | 0.996 | 0.524 | S16 | 0.986 | 0.541 | S24 | 0.893 | 0.893 | | | |

2.5 化学计量学分析

HCA: 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)将 10 批栽培五指毛桃与 21 批野生五指毛桃的指纹图谱进行处理,获得 HPLC 色谱峰峰面积数据(量化指纹特征)。采用 IBM SPSS Statistics 26 统计学软件,将变量设为峰面积进行 HCA,在得到的 31 批五指毛桃样品指纹图谱中采用 13 号峰(补骨脂素)为对照的 19 个色谱峰相对峰面积,以欧氏距离平方为聚类统计量、横坐标为样品编号、纵坐标为临界值(不同类别之间的距离),获得 31 批五指毛桃样品 HCA 图(图 4)。临界值越小,谱图相似度越高。结果显示,当临界值为 25 时,31 批样品可聚为两大类,编号为 S1 - S21(均为野生五指毛桃)的样品聚为一类,编号为 S22 - S31(均为栽培五指毛桃)的样品聚为一类;当临界值为 1 时,编号为 S1 - S3(产地为清远连山)的样品聚为一类;编号为 S22、S30、S31(金绿生品牌)的样品聚为一类;当临界值为 2 时,编号为 S23、S26、S28(仙逸堂品牌)的样品聚为一类。聚类结果较理想,可有效地将栽培五指毛桃与野生五指毛桃 2 个品种区分,还能将不同野生产地及不同饮片加工品牌进行区分。

PCA: 采用 SIMCA - P14. 0 软件^[11],以 10 批栽培五指毛桃与 21 批野生五指毛桃样品的 19 个共有峰的峰面

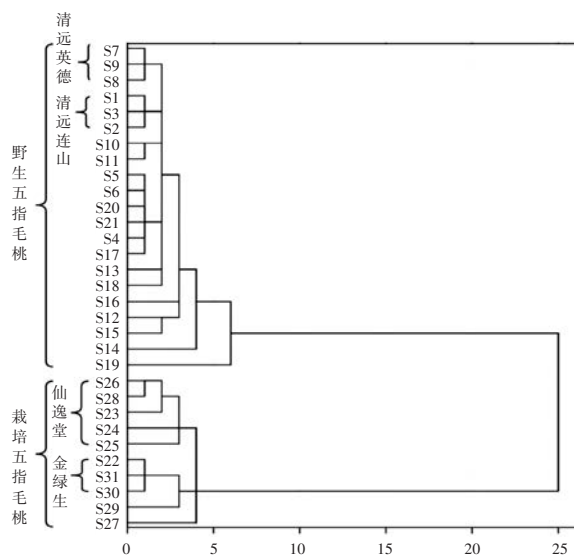


图 4 栽培与野生五指毛桃药材样品的层次聚类分析树状图
Fig. 4 Dendrogram of hierarchical cluster analysis of cultivated *Fici Simplicissimae Radix* and wild *Fici Simplicissimae Radix*

积为 X 变量、样品批次为 Y 变量进行无监督的 PCA。结果显示,PCA 图中大部分野生五指毛桃样本群与栽培五指毛桃样本群被分成不同的空间聚落,区分效果明显。栽培五指毛桃聚落分布较紧凑;野生五指毛桃聚落分布较分散,离散度大于栽培五指毛桃样本。详见图 5。

PLS - DA: 在 PCA 结果的基础上,进一步做有监督的

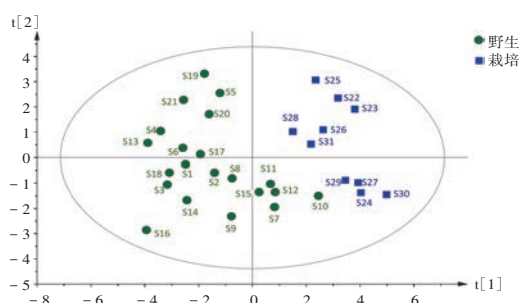


图5 栽培与野生五指毛桃药材样品主成分分析得分图
Fig. 5 Scattered plots of PCA of cultivated *Fici Simplicissimae Radix* and wild *Fici Simplicissimae Radix*

PLS-DA, 结果识别模型的解释度(R^2X)为0.66, 模型的预测度(Q^2)为0.794。对栽培五指毛桃与野生五指毛桃进行分组比较(图6), 区分效果明显, 此结果与PCA的结果相吻合。根据分组的贡献率(VIP)进行排序(图7)。其中, 峰15(芹菜素)、峰13(补骨脂素)、峰16(5-甲氧基补骨脂素)、峰3、峰12、峰8的VIP值均大于1.0, 表明这6个组分可能为栽培五指毛桃与野生五指毛桃的质量差异标志物, 即以上6个化学组分在栽培五指毛桃与野生五指毛桃中显示一定差异性。

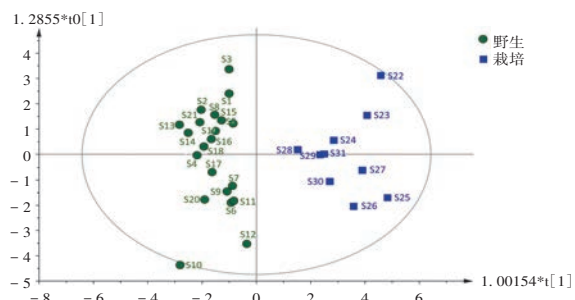


图6 栽培与野生五指毛桃药材样品PLS-DA得分图
Fig. 6 PLS-DA score plot of cultivated *Fici Simplicissimae Radix* and wild *Fici Simplicissimae Radix*

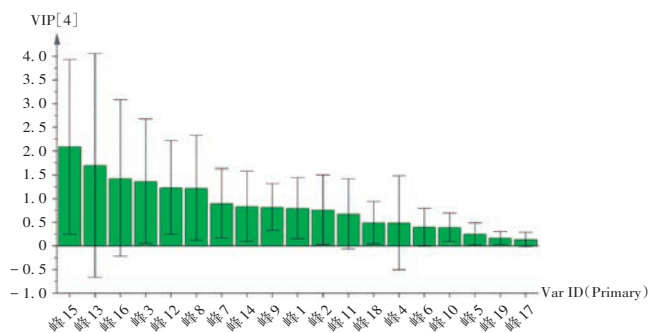


图7 19个共有峰对分组的贡献值(VIP值)
Fig. 7 Variable importance of projection (VIP) of the 19 common peaks for grouping

2.6 含量测定

2.6.1 方法学考察

线性关系考察: 精密吸取2.2项下混合对照品溶液2, 4, 8, 12, 16, 20 μL , 按2.1项下色谱条件进样测定, 以

含量($X, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表3。

表3 补骨脂素、芹菜素、5-甲氧基补骨脂素线性关系考察结果
Tab. 3 Results of the linear relation test of psoralen, apigenin and 5-methoxypsoralen

| 成分 | 回归方程 | r | 线性范围(μg) |
|-----------|---|---------|-----------------------|
| 补骨脂素 | $Y = 1.68 \times 10^3 X + 2.87 \times 10^4$ | 0.999 5 | 0.100 8~1.008 |
| 芹菜素 | $Y = 6.83 \times 10^2 X - 2.79 \times 10^2$ | 0.999 8 | 0.032 36~0.323 6 |
| 5-甲氧基补骨脂素 | $Y = 1.67 \times 10^3 X - 3.59 \times 10^4$ | 0.999 5 | 0.100 4~1.004 |

精密度试验: 精密量取2.2项下混合对照品溶液适量, 按2.1项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果补骨脂素、芹菜素、5-甲氧基补骨脂素峰面积的RSD分别为0.56%, 0.58%, 0.56% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取样品(编号为S1)粉末0.2 g, 精密称定, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 分别于0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果补骨脂素、芹菜素、5-甲氧基补骨脂素峰面积的RSD分别为0.87%, 1.12%, 0.96% ($n=7$), 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验: 取样品(编号为S1)粉末0.2 g, 精密称定, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 平行6份, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果补骨脂素、芹菜素、5-甲氧基补骨脂素的平均含量分别为每100 g药材含0.065 7, 0.007 5, 0.022 5 g, RSD分别为1.24%, 1.32%, 1.27% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取样品(编号为S1)粉末0.1 g, 精密称定, 置5 mL容量瓶中, 分别加入一定量的补骨脂素、芹菜素、5-甲氧基补骨脂素, 平行6份, 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, 记录峰面积, 并计算回收率。结果见表4。

2.6.2 样品含量测定

取栽培五指毛桃与野生五指毛桃药材样品, 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, 记录峰面积, 并计算各成分的含量, 比较野生五指毛桃与栽培五指毛桃两者的差异^[12-13]。结果见表5。

3 讨论

3.1 指纹图谱共有模式选择

相似度评价采用中药指纹图谱相似度评价系统(2004A版), 共有模式按平均值法生成。本研究中将10批栽培五指毛桃和21批野生五指毛桃数据同时导入软件建立共有模式, 因两者虽有部分共有峰, 但峰面积及峰面积比例差异明显, 生成的共有模式融合了两者的特征。以10批栽培五指毛桃的色谱图生成的对照图谱作为共有模式, 结果显示, 10批栽培五指毛桃相似度均高

表4 加样回收试验结果(n=6)

Tab. 4 Results of the recovery test(n=6)

| 取样量 (g) | 样品含量(μg) | | | 加入量(μg) | | | 测得量(μg) | | | 回收率(%) | | | \bar{X} (%) | | | RSD(%) | | |
|------------|----------|--------|---------|---------|--------|---------|----------|---------|---------|--------|--------|--------|---------------|--------|-------|--------|------|------|
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| 0.1045 | 76.6321 | 5.8090 | 15.1040 | 76.6400 | 5.8100 | 15.1200 | 153.1391 | 11.5682 | 30.2548 | 99.83 | 99.13 | 100.20 | | | | | | |
| 0.1005 | 73.2682 | 5.5192 | 15.7013 | 76.6300 | 5.8400 | 15.1400 | 149.1732 | 11.4973 | 30.7342 | 99.05 | 102.36 | 99.29 | | | | | | |
| 0.0956 | 77.5243 | 5.3474 | 16.4482 | 76.6200 | 5.8200 | 15.1100 | 153.1234 | 11.2921 | 31.5381 | 98.67 | 102.14 | 99.87 | 99.51 | 100.18 | 98.80 | 0.80 | 2.35 | 1.27 |
| 0.1030 | 71.2021 | 5.6063 | 16.3403 | 76.6400 | 5.8300 | 15.1300 | 148.5353 | 11.2873 | 30.9836 | 100.90 | 97.44 | 96.78 | | | | | | |
| 0.0974 | 68.4183 | 5.4101 | 14.9084 | 76.6300 | 5.8000 | 15.1200 | 144.3211 | 11.0764 | 29.7976 | 99.05 | 97.69 | 98.47 | | | | | | |
| 0.1040 | 71.6992 | 5.6411 | 16.5961 | 76.6200 | 5.8100 | 15.1400 | 147.9770 | 11.5835 | 31.4598 | 99.55 | 102.28 | 98.18 | | | | | | |

注:A为补骨脂素,B为芹菜素,C为5-甲氧基补骨脂素。

Note:A,B and C refer to psoralen,apigenin and 5-methoxypsoralen, respectively.

表5 栽培与野生五指毛桃中3种成分含量测定结果(g/100g,n=3)

Tab. 5 Results of the content determination of the three components in cultivated Fici Simplicissimae Radix and wild Fici Simplicissimae Radix (g/100g,n=3)

| 编号 | 野生品 | | | 编号 | 野生品 | | | 编号 | 栽培品 | | |
|-----|--------|--------|-----------|-----------|--------|--------|-----------|-----------|--------|--------|-----------|
| | 补骨脂素 | 芹菜素 | 5-甲氧基补骨脂素 | | 补骨脂素 | 芹菜素 | 5-甲氧基补骨脂素 | | 补骨脂素 | 芹菜素 | 5-甲氧基补骨脂素 |
| S1 | 0.0766 | 0.0058 | 0.0151 | S12 | 0.1122 | 0.0005 | 0.0001 | S22 | 0.0521 | 0.0008 | 0.0135 |
| S2 | 0.0629 | 0.0159 | 0.0096 | S13 | 0.0721 | 0.0471 | 0.0004 | S23 | 0.0354 | 0.0007 | 0.0068 |
| S3 | 0.0672 | 0.0130 | 0.0093 | S14 | 0.1168 | 0.0180 | 0.0201 | S24 | 0.1438 | 0.0003 | 0.0530 |
| S4 | 0.0497 | 0.0035 | 0.0256 | S15 | 0.1492 | 0.0033 | 0.0196 | S25 | 0.1048 | 0.0001 | 0.0378 |
| S5 | 0.0416 | 0.0047 | 0.0255 | S16 | 0.1339 | 0.0001 | 0.0288 | S26 | 0.0667 | 0.0004 | 0.0172 |
| S6 | 0.0464 | 0.0027 | 0.0349 | S17 | 0.1241 | 0.0003 | 0.0002 | S27 | 0.2519 | 0.0004 | 0.0002 |
| S7 | 0.0284 | 0.0040 | 0.0175 | S18 | 0.1232 | 0.0078 | 0.0225 | S28 | 0.0563 | 0.0009 | 0.0001 |
| S8 | 0.0677 | 0.0100 | 0.0084 | S19 | 0.0437 | 0.0031 | 0.0331 | S29 | 0.0453 | 0.0008 | 0.0234 |
| S9 | 0.0292 | 0.0057 | 0.0135 | S20 | 0.0935 | 0.0013 | 0.0257 | S30 | 0.0478 | 0.0021 | 0.0221 |
| S10 | 0.1223 | 0.0040 | 0.0573 | S21 | 0.0987 | 0.0072 | 0.0222 | S31 | 0.1173 | 0.0016 | 0.0463 |
| S11 | 0.2365 | 0.0040 | 0.0923 | \bar{X} | 0.0903 | 0.0077 | 0.0229 | \bar{X} | 0.0921 | 0.0008 | 0.0220 |

于0.84,表明各批栽培五指毛桃的化学成分种类及性质相似。21批野生五指毛桃相似度均低于0.6,表明以栽培五指毛桃指纹图谱为共有模式能有效区分栽培五指毛桃与野生五指毛桃。

3.2 色谱条件选择

预试验中,分别考察甲醇-水、乙腈-水溶液流动相体系进行等度洗脱的效果,结果在以乙腈-水得到的指纹图谱中能较完整地将主要色谱峰分离,并得到较平稳的基线,有利于采集指纹图谱的数据,进一步保障了数据的可重复性;选择230,250,270,320 nm作为检测波长,结果于不同波长处各色谱峰有较大差异,综合考虑,选定于320 nm波长处测定,色谱峰数量较多,各峰之间分离度较好,基线较平稳。

3.3 含量测定指标成分选择

由图7可知,VIP值排序居前3的成分分别为芹菜素(峰15)、补骨脂素(峰13)、5-甲氧基补骨脂素(峰16),五指毛桃主要有效成分为补骨脂素、芹菜素等香豆素及黄酮类成分^[14-16]。本研究结果显示,10批栽培五指毛桃3种化学成分的平均含量分别为每100g药材含

0.0903,0.0077,0.0229g,而21批野生五指毛桃的平均含量分别为每100g药材含0.0921,0.0008,0.0220g。栽培五指毛桃的芹菜素含量明显高于野生五指毛桃,与药材品种、产地、采收季节等有关。故选用上述最具代表性的3个成分进行含量测定。

3.4 方法评价

本研究中采用指纹图谱结合化学计量学方法构建质控模式^[17-20],可将栽培五指毛桃与野生五指毛桃有效区分,体现出品种之间的量化差异。HCA和PCA结果基本一致,且与实际相符,说明本研究中建立的识别模式直观、合理、可行,可作为五指毛桃质量评价主要依据。但因药材取样的局限性,本研究结果不能完全代表各产地栽培五指毛桃与野生五指毛桃的质量差异,应进一步扩大药材样品收集范围或进行其他方面的深入分析,以提高其研究的科学性。

参考文献

- [1] 马 骥,张宏伟. 岭南本草[M]. 北京:科学出版社, 2010:66.
- [2] 何凌云,陈燕燕. 五指毛桃高效液相色谱指纹图谱研究[J].