

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)23-0041-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.23.010



高效液相色谱指纹图谱结合化学模式识别评价龙葵质量*

HOANG Trunghieu^{1,2,3}, 刘仁炎^{1,2}, 李汉洪¹, 张书亚¹, 辛灵怡^{1,2}, 杨 洋², 梅全喜^{1△}

(1. 广州中医药大学第七临床医学院, 广东 深圳 518000; 2. 广东省深圳市宝安纯中医治疗医院, 广东 深圳 518101; 3. National Hospital of Acupuncture, Vietnam, Hanoi 10000)

摘要:目的 建立评价龙葵质量的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱和化学模式识别方法。方法 色谱柱为 Waters C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.3% 磷酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 205 nm, 柱温为 26 °C, 进样量为 10 μL。建立 13 批样品的 HPLC 叠加指纹图谱, 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, 确定并指认共有峰, 同时测定指认成分的含量。通过层次聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对不同批次样品进行聚类。结果 13 批样品共标定了 9 个共有峰, 相似度为 0.701~0.984; 指认出 2 个成分, 分别为澳洲茄碱(6 号峰)和澳洲茄边碱(7 号峰), 其质量浓度均在 3.9~500.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 \geq 0.9950$, $n=5$)。越南产少花龙葵中澳洲茄碱含量(895.57 mg/kg)远高于国内含量最高的广西南宁产少花龙葵(68.05 mg/kg), 但越南产少花龙葵中澳洲茄边碱含量(68.05 mg/kg)仅为广西南宁产少花龙葵(867.42 mg/kg)的 7.85%。HCA, PCA, OPLS-DA 结果显示, 13 批龙葵药材按基原被分为 2 类, 1 类为龙葵, 另 1 类为少花龙葵。结论 该方法操作简单、结果准确, 能快速、科学、准确地评价龙葵的质量。

关键词: 龙葵; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量评价

Quality Evaluation of *Solanum Nigrum* Based on HPLC Fingerprint and Chemical Pattern Recognition

HOANG Trunghieu^{1,2,3}, LIU Renyan^{1,2}, LI Hanhong¹, ZHANG Shuya¹, XIN Lingyi^{1,2}, YANG Yang², MEI Quanxi¹

(1. The Seventh Clinical Medicine College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong, China 518000; 2. Shenzhen Bao'an Pure Traditional Chinese Medicine Treatment Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518101; 3. National Hospital of Acupuncture, Hanoi, Vietnam 10000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint and chemical pattern recognition method for evaluating the quality of *Solanum nigrum*. **Methods** The chromatographic column was Waters C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.3% phosphoric acid solution (gradient elution), and the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 205 nm, the column temperature was 26 °C, and the injection volume was 10 μL. HPLC overlay fingerprints of 13 batches of samples were established, and the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2004A) was used for similarity evaluation to determine and identify common peaks, and the content of identified components was determined. The different batches of samples were clustered by the hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). **Results** Nine common peaks were calibrated for 13 batches of samples, with similarity ranging from 0.701 to 0.984. Two components were identified, namely solanenin (peak 6) and solamargine (peak 7), with the linear range of 3.9-500 μg/mL ($R^2 \geq 0.9950$, $n=5$). The content of solanenin in Vietnamese-produced *Solanum photeinocarpum* (895.57 mg/kg) was significantly higher than that in Guangxi Nanning-produced *Solanum photeinocarpum* (68.05 mg/kg, it was the highest content in China). However, the content of solamargine in Vietnamese-produced *Solanum photeinocarpum* (68.05 mg/kg) was only 7.85% of that in Guangxi Nanning-produced *Solanum photeinocarpum* (867.42 mg/kg). The HCA, PCA, OPLS-DA results showed that the 13 batches of *Solanum nigrum* samples were divided into two categories based on their origins, one group was *Solanum nigrum*, and the other group was *Solanum photeinocarpum*. **Conclusion** The method is simple, accurate, which can quickly, scientifically, and accurately evaluate the quality of *Solanum nigrum*.

Key words: *Solanum nigrum*; HPLC; fingerprints; chemical pattern recognition; quality evaluation

龙葵为茄科植物龙葵 *Solanum nigrum* Linn. 或少花龙葵 *Solanum photeinocarpum* Nakamura et Odashima 的干燥全草, 主要分布于我国南北各省, 越南也有分布, 主要用于疮疖肿痛、肿瘤等的治疗^[1]。研究表明, 龙

* 基金项目: 广东省深圳市科技计划项目[JCYJ20210324125210028]; 广东省深圳市医疗卫生三名工程项目[SZZYSM202106004, SZZYSM202206005]; 上海吴孟超医学科技基金会-广东省药学会外科药理学曼陀罗研究专项项目[2022WKYX10]; 广东省深圳市药学会医院药学研究基金项目[SZ2022A13]。

第一作者: Hoang Trung Hieu, 男, 硕士, 副主任中医师, 研究方向为麻醉针科学, (电子信箱)trunghieu3179@qq.com。

△通信作者: 梅全喜, 男, 大学本科, 教授, 主任中医师, 研究方向为药理学及广东地产药材的研发, (电子信箱)meiquanxi@163.com。

葵的抗肿瘤活性与其所含生物碱(即澳洲茄碱和澳洲茄边碱)相关^[2],目前,虽对龙葵的活性成分已有研究^[3],但对龙葵不同产地和基原中含有澳洲茄碱、澳洲茄边碱含量的分析尚未见报道。因此,本研究选取了不同产地和基原的龙葵作为原料药材,建立了不同产地和基原龙葵的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱^[4],比较其中澳洲茄碱、澳洲茄边碱的含量^[5],并结合相似度分析、层次聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)对不同产地和基原的龙葵药材进行质量分析,以更全面、更深入地评估龙葵药材质量^[6-7]。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ME204E 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为十万分之一);ARIUM CQMFOR T I 型纯水机(赛多利斯<上海>贸易有限公司);Waters e2695-UV 型 HPLC 仪(沃特世科技<上海>有限公司);DA 型数控超声波清洗器(东莞市科桥超声波设备有限公司,功率为 100 W,频率为 40 kHz);DP-01 型无油真空泵(上海安达尔实业有限公司);注射泵(保定雷弗流体科技有限公司)。

1.2 试药

澳洲茄碱对照品(批号为 MUST-22121710,纯度为 99.13%),澳洲茄边碱对照品(批号为 MUST-22103022,纯度为 99.83%),均购于成都曼思特公司;13 批龙葵样品产地与采收时间见表 1,经广州中医药大学陈琴华教授鉴定均为正品;乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);甲醇、磷酸(分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);水为超纯水。

表 1 龙葵样品产地与采收时间

Tab.1 Origin and harvesting time of Solanum nigrum samples			
编号	品种	产地	采收时间
S1	少花龙葵	江西省赣州市上犹县	2023 年 8 月
S2	少花龙葵	广西壮族自治区南宁市	2023 年 7 月
S3	少花龙葵	广西壮族自治区来宾市	2023 年 7 月
S4	少花龙葵	云南省昭通市	2023 年 8 月
S5	少花龙葵	云南省昆明市	2023 年 8 月
S6	少花龙葵	云南省楚雄市	2023 年 8 月
S7	少花龙葵	云南省武定县	2023 年 8 月
S8	少花龙葵	云南省禄劝县	2023 年 8 月
S9	龙葵	广西康盛医药有限公司	2023 年 7 月
S10	龙葵	吉林省四平市	2023 年 8 月
S11	龙葵	吉林省梨树县	2023 年 8 月
S12	龙葵	江苏省宿迁市大兴镇	2023 年 8 月
S13	少花龙葵	越南太平省	2023 年 8 月

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.3% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~27 min 时 5%A→33%A,27~35 min 时 33%A→65%A,35~65 min 时 65%A→100%A,65~70 min 时 100%A→5%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:205 nm;柱温:26℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下,供试品溶液中各色谱峰的分离度良好,理论板数按澳洲茄碱和澳洲茄边碱峰计应不低于 5 000。

2.2 溶液制备

分别取澳洲茄碱、澳洲茄边碱对照品各 1 mg,精密称定,分别置 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,即得每 1 mL 含澳洲茄碱、澳洲茄边碱各 0.1 mg/mL 的对照品贮备液。取龙葵样品粗粉 2.0 g,精密称定,置 50 mL 带塞锥形瓶中,精密加入 20 mL 80% 甲醇,称定质量,超声(200 W,40 kHz)40 min,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,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察与定量限和检测限确定:精密吸取 2.2 项下对照品贮备液适量,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释成质量浓度分别为 3.90,7.81,31.25,125.00,500.0 μg/mL 的系列对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以对照品溶液质量浓度(X,μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 2,表明澳洲茄碱、澳洲茄边碱的质量浓度在 3.9~500.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。以响应信号为噪音信号 3 倍时的质量浓度为检测限,以响应信号为噪音信号 10 倍时的质量浓度为定量限。结果见表 2。

表 2 线性关系考察与检测限和定量限确定结果

Tab.2 Results of linear relation test and limits of detection and limits of quantification					
成分	线性范围 (μg/mL)	回归方程	R ²	检测限 (μg/mL)	定量限 (μg/mL)
澳洲茄碱	3.9~500	Y=2 044.7X-11 059	0.999 2	1.3	3.9
澳洲茄边碱	3.9~500	Y=3 292.7X-37 413	0.995 0	1.3	3.9

精密度试验:取龙葵样品(编号为 S2)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,记录峰面积,以澳洲茄碱峰(6 号峰)为参照峰。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.6%(n=6),相对峰面积的 RSD 均小于 2.6%(n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取龙葵样品(编号为 S2)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,以澳洲茄碱峰(6号峰)为参照峰。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 $1.0\%(n=6)$,相对峰面积的 RSD 均小于 $2.5\%(n=6)$,表明方法重复性较好。

稳定性试验:取龙葵样品(编号为S2)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,以澳洲茄碱峰(6号峰)为参照峰。结果各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 $1.1\%(n=6)$,相对峰面积的 RSD 均小于 $2.5\%(n=6)$,表明供试品溶液放置24 h内稳定性良好。

2.4 样品含量测定

取龙葵样品(编号为S1-S13)适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,按外标法计算样品中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量。结果见表3。

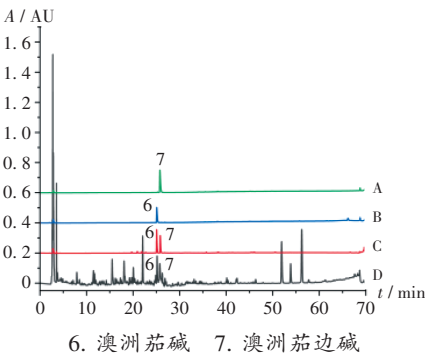
2.5 指纹图谱建立

指纹图谱建立:取13批龙葵供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,将色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A版),以样品S1为参照图谱,设置时间窗为0.5 min,采用平均数法经多点校正和自动匹配处理,生成共有模式指纹图谱^[8-9],共标识9个共有峰。详见图1。

相似度评价: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^[10],结果13批样品(编号为S1-S13)的相似度分别为0.973,0.973,0.984,0.915,0.94,0.922,0.701,0.706,0.928,0.835,0.946,0.747,0.863。

共有峰指认:将混合对照品溶液与供试品溶液的

HPLC图进行比较,确定峰6为澳洲茄碱(保留时间为24.90 min),峰7为澳洲茄边碱(保留时间为25.77 min)。详见图2。



A. 澳洲茄边碱对照品溶液 B. 澳洲茄碱对照品溶液 C. 混合对照品溶液 D. 供试品溶液

图2 高效液相色谱对照指纹图谱

6. Solanen 7. Solamargine

A. Reference solution of solamargine B. Reference solution of solanene
C. Mixed reference solution D. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

2.7 化学模式识别

HCA:采用SIMCA 14.1统计学软件处理9个共有峰的峰面积,并进行HCA。当间距为25时,13批样品可聚为2类,其中编号为S1-S2,S6的样品聚为1类,编号为S3-S5,S7-S13的样品聚为1类;当间距为5时,13批样品聚为3类,编号为S1-S2,S6的样品聚为1类,编号为S9-S12的样品聚为1类,编号为S3-S5,S7-S8,S13的样品聚为1类,即少花龙葵、龙葵各聚为1类。详见图3。可见,基原相同的龙葵样品最相似,而产

表3 13批龙葵样品中澳洲茄碱和澳洲茄边碱含量测定结果(mg/kg)

Tab. 3 Results of the content determination of solanen and solamargine in 13 batches of Solanum nigrum samples (mg/kg)													
成分	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13
澳洲茄碱	363.67	594.65	203.06	142.11	47.27	421.93	154.09	48.49	214.87	85.44	201.48	225.99	895.57
澳洲茄边碱	262.33	867.42	235.38	292.38	88.03	212.15	48.89	120.39	101.45	69.97	101.24	530.62	68.05

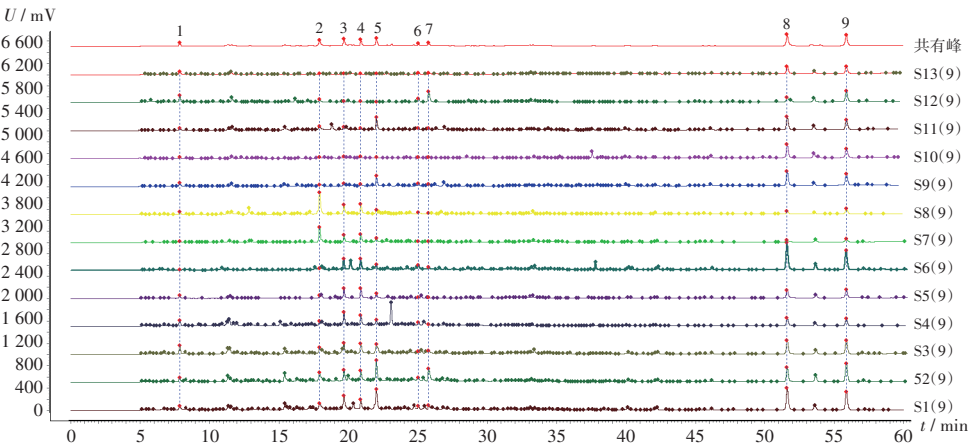


图1 13批龙葵样品高效液相色谱叠加指纹图谱

Fig. 1 HPLC overlay fingerprints of 13 batches of Solanum nigrum samples

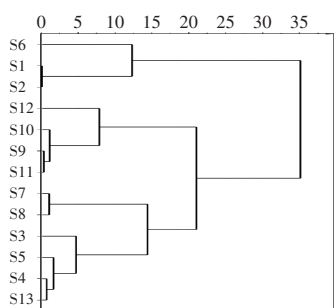


图 3 13 批龙葵样品聚类分析树状图

Fig. 3 HCA dendrogram of 13 batches of *Solanum nigrum* samples
地不同、基原不同的龙葵样品有一定差异,可能与其生长环境、气候条件等不同相关^[11]。

PCA:采用SIMCA 14.1 统计学软件分析,对 9 个共有峰进行 PCA^[12]。结果见图 4。可见,编号为 S9 – S12 的样品位于图的左下侧,编号为 S1 – S8, S13 的样品位于图的左上侧和右侧,与 HCA 结果基本一致,且广西来宾与云南昭通的龙葵在成分上与越南太平省的少花龙葵最接近。

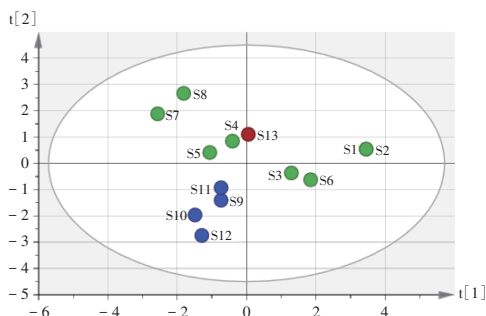


图 4 13 批龙葵样品主成分分析得分图

Fig. 4 Score plot of PCA for 13 batches of *Solanum nigrum* samples

OPLS – DA:采用 SIMCA 14.1 统计学软件对 13 批样品进行 OPLS – DA。结果见图 5。可见,龙葵样品被分为了两组,其中编号为 S1 – S8 的少花龙葵和编号为 S13 的越南少花龙葵样品聚为 1 类,编号为 S9 – S12 的龙葵聚为 1 类,与 PCA 结果一致。

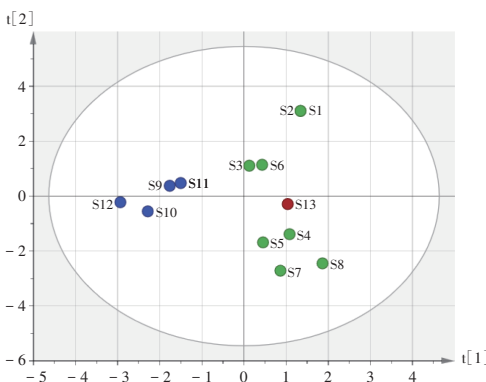


图 5 13 批龙葵样品正交偏最小二乘判别分析得分图

Fig. 5 Score plot of OPLS – DA for 13 batches of *Solanum nigrum* samples

3 讨论

3.1 样品提取方法选择

考察了不同体积分数甲醇超声提取龙葵样品的效

果,发现以 80% 甲醇超声提取法对龙葵中的澳洲茄碱和澳洲茄边碱进行提取,不同产地和基原的龙葵经 HPLC 仪测定的色谱峰峰面积较大,各色谱峰的分离度相对较好,且易滤过,滤液澄清。故样品提取方法选择 80% 甲醇超声提取法。

3.2 HPLC 指纹图谱与化学模式识别分析

本研究中建立了 13 批不同产地龙葵的 HPLC 指纹图谱,共发现 9 个共有峰,并对 2 个主要色谱峰(澳洲茄碱、澳洲茄边碱)进行了鉴定,为龙葵药材的质量控制提供了参考依据。13 批龙葵药材的相似度为 0.701 ~ 0.984,结合 HPLC 图进行分析,可能与龙葵的产地、生长环境、采收时间相关^[13]。由表 3 可知,同一化学成分在不同产地龙葵中的含量存在明显差异,龙葵质量相差较大;而越南龙葵的图谱与国内龙葵也有一定差异,表明不同产地、同一品种龙葵的化学成分在种类和含量上均存在一定差异,但从目前已鉴定的澳洲茄碱、澳洲茄边碱色谱峰来看,越南产少花龙葵中澳洲茄碱含量(895.57 mg / kg)远高于国内含量最高的广西南宁产少花龙葵(594.65 mg / kg);但越南产少花龙葵中澳洲茄边碱含量最少(68.05 mg / kg),仅为广西南宁产少花龙葵的 7.85%。在此基础上,本研究中结合 HCA, PCA, OPLS – DA 综合评估龙葵样品,结果显示,13 批不同产地龙葵样品大致被分为 2 类,1 类为少花龙葵,1 类为龙葵,其中越南太平省产少花龙葵与广西来宾与云南昭通产少花龙葵在成分上最接近。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简单、结果准确,能快速、科学、准确地评价龙葵的质量。

参考文献

- [1] 梅全喜,董鹏鹏,李红念,等. 鲜龙葵果治疗肿瘤的药理学基础与临床应用研究进展[J]. 时珍国医国药,2016,27(7): 1713 – 1716.
- [2] 武凤霞,赵 宁,梅全喜,等. 龙葵抗肿瘤机制及其研究进展[J]. 中药材,2017,40(5):1238 – 1241.
- [3] 王 强,徐 建,王宏伟. 反相高效液相色谱法测定龙葵果中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量[J]. 长春师范大学学报,2020,39(12):100 – 102.
- [4] 叶 彬,闫小巧,雷 婷,等. 葛根药材 HPLC 指纹图谱与 6 种成分含量测定研究[J]. 中草药,2023,54(24):8222 – 8227.
- [5] 李本淳,程 焱,王婧姝. HPLC 法测定龙葵果中澳洲茄碱和澳洲茄边碱的含量[J]. 中国药物评价,2017,34(5):355 – 357.
- [6] 张维方,梁献葵,纪 亮,等. 不同品种牛膝 3 个成分含量测定及 HPLC 指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2020,31(11): 2665 – 2669.
- [7] 郑依玲,陈小露,梅全喜,等. 中药鲜药的化学成分和药理