

芦荟的 HPLC 指纹图谱建立、化学模式识别分析及其含量测定

严雅慧^{1,2}, 李淑萍¹, 热依木古丽·阿布都拉¹, 阿吉艾克拜尔·艾萨^{1,2*}

¹中国科学院大学,北京 100049; ²中国科学院干旱区植物资源化学重点实验室
中国科学院新疆理化技术研究所,乌鲁木齐 830011

摘要:采用 Phenomenex C₁₈色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),以甲醇-乙腈-0.3% 磷酸水为流动相进行梯度洗脱,建立芦荟的指纹图谱。运用化学模式识别方法对不同产地芦荟药材质量控制方法进行评价。结果表明:12 批芦荟 HPLC 指纹图谱共标定 23 个共有峰,并通过对照品指认其中 6 个成分;除了广西的 3 批药材之外,其他药材相似度都在 0.93 以上;聚类分析和主成分分析将 12 批芦荟分为 3 类;利用正交偏最小二乘判别法筛选出芦荟药材差异的 5 个色谱峰,并以相同 HPLC 法对其进行含量测定。本文将 HPLC 指纹图谱与化学模式识别相结合的方法简便准确,为芦荟药材的质量控制和品质评价提供依据。

关键词:芦荟;高效液相色谱指纹图谱;主成分分析;聚类分析;正交偏最小二乘法判别分析;含量测定

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)3-0353-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.3.001

Establishment of HPLC fingerprint, chemical pattern recognition analysis and content determination of aloe

YAN Ya-hui^{1,2}, LI Shu-ping¹, ABDULA Rahima¹, AISA Hajiakber^{1,2*}

¹University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

²Key Laboratory of Plant Resources and Chemistry in Arid Regions Xinjiang

Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

Abstract: The fingerprint of aloe from different origins was established, and the chromatographic separation was performed on a Phenomenex C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and a mixture of methanol-acetonitrile-0.3 % phosphoric acid water solution was selected as the mobile phase for gradient elution. The high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint and chemical pattern recognition were studied to provide new method for quality control and evaluation of the different production areas of aloe. The results revealed that the HPLC fingerprint of aloe was calibrated with a total of 23 common peaks, and 6 common peaks could be identified using the references. The similarities of other medicinal materials was above 0.93 except for three batches of Guangxi medicinal materials and 12 batches of aloe could be divided into 3 groups by both cluster analysis and principal component analysis (PCA). Furthermore, the quality differences of aloe from different origins were mainly caused by 5 common peaks according to the results of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). Meanwhile, the contents of 6 components were determined by the same HPLC method. In brief, the establishment of HPLC fingerprint combined with the application of chemical pattern recognition could provide a simple and accurate method for the quality control and evaluation of aloe.

Key words: aloe; HPLC fingerprint; PCA; cluster analysis; OPLS-DA; content determination

芦荟为重要的可食用的药材,是百合科芦荟属

多年生常绿肉质草本植物,性寒味苦,古方中记载其具有清肝热、通便、散结、疗癰等作用。芦荟总共有 500 多个品种,其中库拉索芦荟 (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) 是最常用的药用品种,其制品也广泛应用

收稿日期:2020-09-27 接受日期:2021-02-18

基金项目:中国科学院西部之光计划(2018-XBQNXZ-B-002,2017-XBQNXZ-B-005);自治区天池博士计划(2019)

*通信作者 E-mail:haji@ms.xjb.ac.cn

于食品(包含保健食品)、药品、化妆品等多个领域^[1]。近年来,国内外芦荟的研究工作主要集中在品种的对比分析^[2,3]、分离纯化^[4,5]、质谱分析^[6,7]、含量测定^[8,9]和药理作用^[10,11]等方面。研究证明,芦荟的主要活性成分为蒽酮类、蒽醌类和色酮类化合物,此外还有多糖类及糖苷、氨基酸、有机酸等化学成分^[12,13],具有抑菌、消炎、抗肿瘤、抗病毒、抗过敏等活性^[14-16]。

目前,指纹图谱结合化学模式识别是评价中药材质量的有效手段。指纹图谱主要关注药材的整体性,建立共有模式,识别共有峰,能够客观、全面揭示药材中可能的活性成分种类和数量;而化学模式识别技术则强调的是药材之间差异性,通过对指纹图谱数据信息的整合和校正,进一步缩小药材活性成分的范围;两者结合可实现药材的整体描述到个体分析的过程,可更加准确、客观地反映中药的质量差异^[17,18]。芦荟药材主要药用成分以芦荟苷、芦荟大黄素等化合物为主^[19],但功效成分及其含量随药材产地、生长环境、土壤及采摘季节等因素而不同,给芦荟药材品质及安全性的评价带来了一定的困难。此外,《中国药典》(2020 版)^[20]中芦荟药材的含量测定项目以芦荟苷含量来制定,指标成分单一,难以控制药材质量。因此,在生产和开发芦荟药材相关制剂之前,对芦荟药材进行指纹图谱和结合化学模式识别研究是必不可少的。

本研究采用高效液相色谱(HPLC)法建立 12 批次不同产地的芦荟药材的指纹图谱,并结合相似度分析、聚类分析、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)研究其化学组分特征,筛选出能影响药材质量差异的标志物,并用相同的方法测定 12 批芦荟药材中 6 个标志物(芦荟新苷 D、芦荟苷 A、芦荟苷 B、7-O-甲基芦荟新苷 A、芦荟苦素和芦荟大黄素)的含量,旨在从生产源头确保药材品质,为芦荟药材质量控制和标准完善提供科学依据。

1 实验仪器与材料

1.1 仪器

美国 Water 2695 液相色谱仪(包括自动进样器,DAD 紫外检测器;Empower 色谱工作站,四元梯度泵,在线过滤器,柱温箱);BT25S 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);SQP 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);SK7210 HP 型超声波(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与材料

对照品:芦荟苦素(批号:19011601)、芦荟新苷 D(批号:19091701)、芦荟苷 B(批号:19030501)、芦荟苷 A(批号:19030204)、芦荟大黄素(批号:19010803)、7-O-甲基芦荟新苷 A(批号:19101301)均采购于上海纯优生物科技有限公司,以上对照品纯度均 $\geq 97.5\%$ 。

甲醇和乙腈均为色谱纯(Merck 公司, Darmstadt, 德国);磷酸和甲醇为分析纯(天津市光复精细化工研究所);娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);其他所有试剂均为分析纯。

12 批芦荟药材来源于广东、广西、海南和四川 4 个省份,其中 S1、S2、S7 来源于四川省,S10~S12 来源于广西省,S3~S5 来源于广东省,S6、S8、S9 来源于海南省。经中国科学院新疆理化技术研究所刘戈宇研究员鉴定为库拉索芦荟 *Aloe vera* (L.) Burm. f. 的浓缩物。

2 实验方法与结果

2.1 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 样品制备

参照中国药典方法^[25]略微改动,取芦荟药材粉末(过 5 号筛)50 mg,精密称定,精密加入 50% 甲醇 75 mL,称定重量,超声处理(40 kHz, 700 W, 25 °C) 20 min, 放冷, 再称定重量, 用 50% 甲醇水补足减失的重量,摇匀,分析前过 0.45 μm 微孔滤膜,备用。

2.1.2 对照品溶液制备

精密称取各对照品适量,精密称定,置于棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制对照溶液:芦荟苦素(316 μg/mL)、芦荟新苷 D(524 μg/mL)、7-O-甲基芦荟新苷 A(228 μg/mL)、芦荟苷 B(508 μg/mL)、芦荟苷 A(506 μg/mL)、芦荟大黄素(436 μg/mL),精密量取各对照溶液按一定比例混合配制成不同浓度的 6 份混合对照溶液,摇匀,过 0.45 μm 微孔滤膜备用,-20 °C 避光保存。

2.1.3 色谱条件

HPLC 色谱柱:Gemini C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Phenomenex Inc., CA, USA),流动相溶剂 A:0.3% (V/V) 磷酸水溶液,B:乙腈,C:甲醇,流速是 1 mL/min,进样 10 μL,柱温 35 °C,检测波长为 254 nm,最佳梯度洗脱如下:0~8 min, 88% A + 10% B + 2% C;8~10 min, 74% A + 10% B + 16% C;10~45 min, 58% A + 10% B + 32% C;45~80 min, 55% A + 10% B + 35% C。

2.2 指纹图谱的方法学考察

2.2.1 精密度

取编号 S1 的样品,按“2.1.1”项下处理,按“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次,记录液相色谱图。以 15 号色谱峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.19%, 相对峰面积的 RSD < 0.89% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.2 稳定性

取编号 S1 的样品,按“2.1.1”项下处理,按“2.1.3”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、18、24、48 h 进样,记录液相色谱图。以 15 号色谱峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.87%, 相对峰面积的 RSD < 2.67% ($n=8$), 表明样品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.3 重复性

取编号 S1 的样品,精密称取 6 份,按“2.1.1”项下处理,按“2.1.3”项下色谱条件进行测定,记录液相色谱图。以 15 号色谱峰为参照峰,计算各共有峰相对保留时间的 RSD < 0.42%, 相对峰面积的 RSD < 2.66% ($n=6$), 表明方法重现性良好。

2.3 指纹图谱的生成

12 批芦荟药材按“2.1.1”方法制备,再按“2.1.3”色谱条件进样测定,记录液相色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 A 版)》,以 S1 为参照图谱,采用中位数法、时间窗宽度设为 0.1 min 建立对照图谱,用多点校正 Mark 峰匹配,建立 12 批芦荟药材样品的指纹图谱。叠加指纹图谱、参照图以及共有峰标记均见图 1。

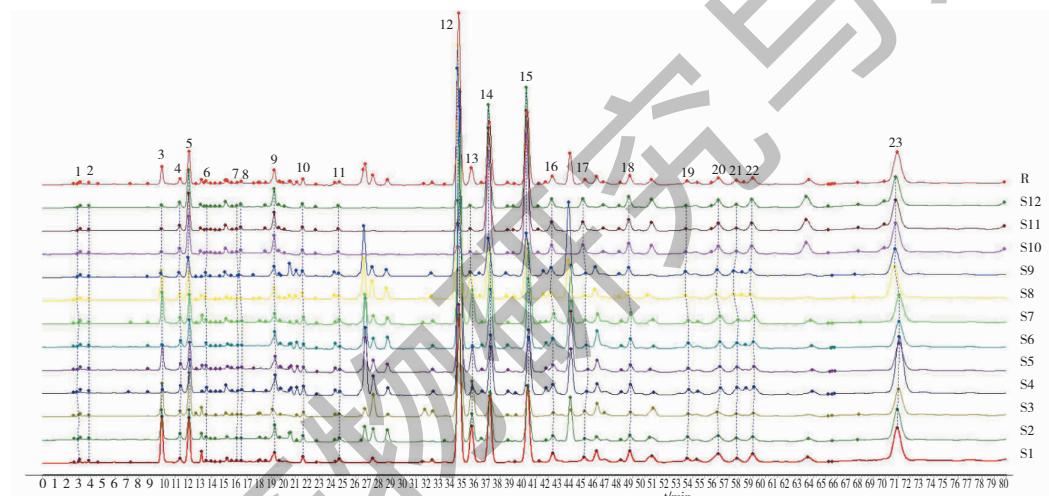


图 1 12 批芦荟药材的指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 12 batches of aloe

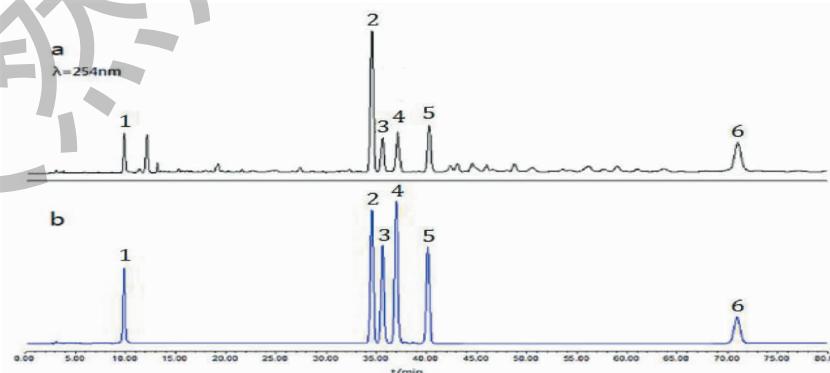


图 2 芦荟样品(a)和混合对照品溶液(b)HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of sample (a) of aloe and mixed reference substances (b)

注:1:芦荟苦素;2:芦荟新苷 D;3:7-O-甲基芦荟新苷 A;4:芦荟苷 B;5:芦荟苷 A;6:芦荟大黄素。Note:1:Aloesin;2:Aloeresin D;3:7-O-Methylaloeresin A;4:Aloin B;5:Aloin A;6:Aloe-emodin.

2.3.1 共有峰的指认

从12批芦荟药材中标定了23个共有峰,通过与对照品比对,指认出6个成分,分别是3号峰为芦荟苦素、12号峰为芦荟新苷D、13号峰为7-O-甲基芦荟新甙A、14号峰为芦荟甙B、15号峰为芦荟甙A、23号峰为芦荟大黄素。芦荟样品和混合对照品的HPLC图谱见图2。结果表明12批芦荟药材中23个共有峰的相对保留时间RSD为0%~0.55%,

相对峰面积RSD为16.54%~97.02%,表明方法稳定,但不同产地的芦荟药材中成分含量差异较大。

2.3.2 相似度分析

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 A版)》软件建立12批芦荟药材共有模式的指纹图谱,其相似度评价见表1。除产地是广西的S10~S12样品相似度小于0.5外,其余样品的相似度均>0.93。

表1 12批芦荟药材指纹图谱的相似度评价表

Table 1 Similarity evaluation of fingerprint of 12 batches of aloe

样品 Sample	相似度 Similarity											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
S1	1.000	0.960	0.874	0.901	0.885	0.877	0.976	0.829	0.776	0.370	0.388	0.385
S2	0.960	1.000	0.866	0.931	0.926	0.935	0.974	0.862	0.858	0.354	0.394	0.370
S3	0.874	0.866	1.000	0.948	0.969	0.918	0.908	0.943	0.898	0.167	0.305	0.175
S4	0.901	0.931	0.948	1.000	0.979	0.967	0.945	0.939	0.935	0.250	0.366	0.264
S5	0.885	0.926	0.969	0.979	1.000	0.982	0.943	0.952	0.950	0.200	0.318	0.210
S6	0.877	0.935	0.918	0.967	0.982	1.000	0.948	0.917	0.939	0.228	0.302	0.236
S7	0.976	0.974	0.908	0.945	0.943	0.948	1.000	0.882	0.854	0.321	0.351	0.332
S8	0.829	0.862	0.943	0.939	0.952	0.917	0.882	1.000	0.975	0.398	0.320	0.402
S9	0.776	0.858	0.898	0.935	0.950	0.939	0.854	0.975	1.000	0.360	0.305	0.367
S10	0.370	0.354	0.167	0.250	0.200	0.228	0.321	0.398	0.360	1.000	0.222	0.996
S11	0.388	0.394	0.305	0.366	0.318	0.302	0.351	0.320	0.305	0.222	1.000	0.246
S12	0.385	0.370	0.175	0.264	0.210	0.236	0.332	0.402	0.367	0.996	0.246	1.000
R	0.930	0.954	0.933	0.970	0.965	0.957	0.962	0.966	0.948	0.435	0.383	0.446

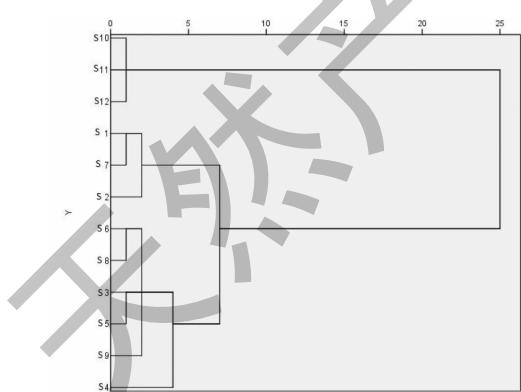


图3 12批芦荟药材的聚类分析树状图

Fig. 3 Hierarchical cluster analysis plot for 12 batches of aloe

2.4 化学模式识别分析

2.4.1 聚类分析

以12批芦荟药材中23个共有峰的峰面积为变量,运用SPSS 26.0统计软件,以组间联接平方欧式

距离测度的方式进行聚类分析,结果见图3。由图3可知,12批芦荟药材样品明显聚为三类,S1、S2、S7聚为第一类,S10~S12聚为第二类,S3~S6、S8、S9聚为第三类。

2.4.2 主成分分析(PCA)

采用SPSS 26.0统计学软件对12批芦荟药材中23个共有峰的峰面积进行标准化处理,计算相关矩阵的特征值即方差贡献率,以特征值>1为标准,得到了前4个主成分的累积方差贡献率为87.593%,能够较好的代表指纹图谱中的大部分信息。从成分载荷矩阵表可以看出,第一主成分的独立方差贡献率为39.529%,主要反映色谱峰7~9、11~15、17、18、22的信息;第二主成分的独立方差贡献率为26.749%,主要反映色谱峰1、2、4、6、10、16、19、21、23的信息;第三主成分的独立方差贡献率为14.833%,主要反映色谱峰3、20的信息;第四

主成分的独立方差贡献率为 6.482%, 主要反映色谱峰 5 的信息。利用 SIMCA 14.1 分析软件绘制主成分得分图, 见图 4。结果表明 12 批芦荟药材大致可被分为三类, S1、S2、S7 在主成分得分图的中间分为第一类; S10~S12 在主成分得分图的左侧分为第二类, S3~S6、S8、S9 在主成分得分图的右侧分为第三类, 其结果与聚类分析结果一致, 也验证了聚类分析的分类结果。

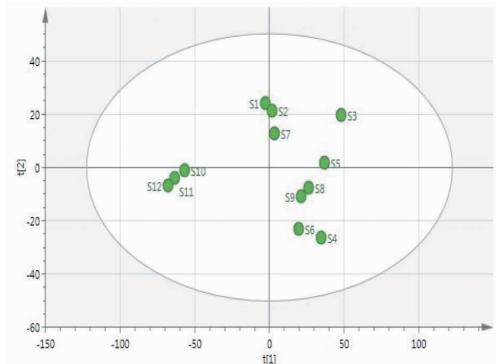


图 4 主成分分析得分图

Fig. 4 Score scatter plot of PCA

2.4.3 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)

正交偏最小二乘判别分析法(OPLS-DA)是常用来处理分类和判别问题的一种非常有效的监督分析方法。而 OPLS-DA 模型的拟合效果评价指标主要是累积解释能力参数(R^2X 、 R^2Y)和预测能力参数(Q^2), 如果 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 均大于 0.5, 且数值越接近于 1, 则表示模型拟合效果越好^[17]。采用 SIMCA 14.1 软件对 12 批芦荟药材共有峰进行 OPLS-DA 分析, 拟合的模型 $R^2X = 0.929$, $R^2Y = 0.939$, $Q^2 = 0.835$, 均大于 0.8, 表示拟合的预测模型稳定、可靠, 可用来评价芦荟药材指纹图谱的模式识别方法, 其得分散点图见图 5。由图 5 可知, 广西和四川产区的样品各自聚为一类; 广东和海南产区的样品聚为一类, 说明这两个产区药材的化学成分相似性很高。以变量投影重要性(VIP)值大于 1 为依据, 筛选对分组结果产生较大影响的色谱峰, 结果见图 6。由图 6 可知, VIP 值大于 1 的色谱峰从大到小分别为 12 号峰(芦荟新苷 D, VIP 值为 2.982 3)、15 号峰(芦荟苷 A, VIP 值为 1.971 5)、13 号峰(7-O-甲基芦荟新甙 A, VIP 值为 1.691 5)、14 号峰(芦荟苷 B, VIP 值为 1.540 1)、3 号峰(芦荟苦素, VIP 值为 1.523 5), 表明这 5 个化合物是影响芦荟药材质量差异的标志物。

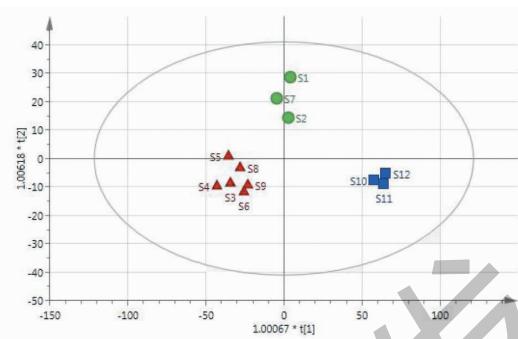


图 5 OPLS-DA 得分散点图

Fig. 5 Score scatter plot of OPLS-DA

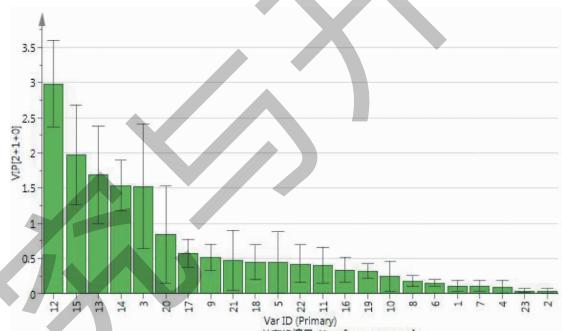


图 6 12 批芦荟药材 OPLS-DA 模型中共有峰的 VIP 值

Fig. 6 VIP values of common peaks in OPLS-DA model of 12 batches of aloe

2.5 含量测定

2.5.1 色谱条件、样品溶液制备和混合对照品溶液制备

同“2.1”一致, 样品和混合对照品见图 2。

2.5.2 线性关系、检测限和定量限

分别精密吸取“2.1.2”项下 6 个对照品贮备液适量, 混合, 加甲醇定容、稀释, 制成一系列不同浓度的混合对照品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。以各待测成分质量浓度(x , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行回归分析, 结果见表 2。分别精密吸取对照品溶液适量, 加甲醇稀释, 按“2.1.3”项下色谱条件进样测定, 以信噪比 10:1、3:1 分别计算定量限、检测限。结果表明, 芦荟苦素、芦荟新苷 D、7-O-甲基芦荟新甙 A、芦荟苷 B、芦荟苷 A 和芦荟大黄素的标准曲线在其各自的线性范围内均具有良好的线性关系, 相关系数 R^2 均 ≥ 0.9995 , 检测限范围在 0.017 4~0.314 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 定量限范围在 0.034 9~0.559 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 结果见表 2。

2.5.3 精密度、稳定性、重复性和回收率

精密度试验:取样品(S1),按“2.1.1”方法制备样品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,芦荟苦素、芦荟新苷D、

7-O-甲基芦荟新甙A、芦荟甙B、芦荟甙A和芦荟大黄素峰面积的RSD分别为0.69%、0.75%、0.64%、1.22%、0.99%、1.13%($n=6$),表明仪器精密度良好。

表2 6个指标成分的线性方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Table 2 The regression equations, correlation coefficient, linear ranges, LOQ and LOD of six markers

编号 No.	化合物 Compound	回归方程 Regression equation	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数 Correlation coefficient R^2	检测限 LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	芦荟苦素 Aloesin	$Y = 70.835x - 65.539$	0.22~22.25	0.9995	0.0189	0.0474
2	芦荟新苷 D Aloeresin D	$Y = 433.364x + 18.164$	2.86~524	0.9995	0.2200	0.5500
3	7-O-甲基芦荟新甙 A 7-O-Methylaloeresin A	$Y = 134.814x - 1.9664$	0.79~47.81	0.9999	0.1640	0.3280
4	芦荟甙 B Aloin B	$Y = 528.980x - 1.0208$	5.64~508	0.9999	0.2230	0.5590
5	芦荟甙 A Aloin A	$Y = 508.639x + 3.6522$	7.76~506	0.9999	0.3140	0.5230
6	芦荟大黄素 Aloe-emodin	$Y = 260.250x - 48.472$	0.78~55.66	0.9999	0.0174	0.0349

稳定性试验:取样品(S1),按“2.1.1”方法制备样品溶液,置于室温储存,按“2.1.3”色谱条件,分别在0、2、4、8、12、18、24、48 h进样测定,记录峰面积。结果显示,芦荟苦素、芦荟新苷D、7-O-甲基芦荟新甙A、芦荟甙B、芦荟甙A和芦荟大黄素峰面积的RSD分别为1.92%、2.59%、2.73%、2.93%、2.46%、2.15%($n=8$),表明芦荟样品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(S1),精密称取6份,按“2.1.1”方法制备样品溶液,按“2.1.3”色谱条件进样测定,记录峰面积计算样品含量。结果显示,芦荟苦素、芦荟新苷D、7-O-甲基芦荟新甙A、芦荟甙B、芦荟甙A和芦荟大黄素平均含量分别为8.42、167.28、18.62、109.60、191.91、24.02 mg/g,含量的

RSD分别为0.88%、0.72%、2.13%、1.30%、1.48%、1.95%($n=6$),表明方法重现性良好。

加样回收率试验:取样品(S1)药材粉末(过5号筛)25 mg,按照样品中芦荟苦素、芦荟新苷D、7-O-甲基芦荟新甙A、芦荟甙B、芦荟甙A和芦荟大黄素的含有量与混合对照品比例1:1精密加入,后续处理同“2.1.1”项。按“2.1.3”色谱条件进行测定,计算回收率。芦荟苦素、芦荟新苷D、7-O-甲基芦荟新甙A、芦荟甙B、芦荟甙A和芦荟大黄素的平均加样回收率分别为99.00%、91.45%、97.93%、94.70%、96.41%、95.34%,其RSD值分别为1.16%、0.86%、0.98%、1.13%、1.22%、1.94%($n=6$)品的回收率良好,结果见表3。

表3 加样回收率结果($n=6$)

Table 3 Results of recovery test ($n=6$)

成分 Component	样品量 Sample weight (mg)	原有量 Original amount (μg)	加入量 Added amount (μg)	测得量 Found amount (μg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
芦荟苦素 Aloesin	25.45	214.2	284.4	497.6	99.7	99.00	1.16
	25.20	212.1	284.4	488.6	97.2		
	25.05	210.8	284.4	490.2	98.2		
	25.00	210.4	284.4	496.3	100.5		
	25.10	211.3	284.4	493.1	99.1		
	25.15	211.7	284.4	494.0	99.3		
	25.45	4257.3	3710.0	7673.6	92.1	91.45	0.86
芦荟新苷 D Aloeresin D	25.20	4215.5	3710.0	7560.9	90.2		

续表 3

成分 Component	样品量 Sample weight (mg)	原有量 Original amount (μg)	加入量 Added amount (μg)	测得量 Found amount (μg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery (%)	RSD (%)
7-O-甲基芦荟新甙 A 7-O-Methylaloeresin A	25.05	4 190.4	3 710.0	7 559.1	90.8		
	25.00	4 182.0	3 710.0	7 598.3	92.1		
	25.10	4 198.7	3 710.0	7 603.4	91.8		
	25.15	4 207.1	3 710.0	7 612.1	91.8		
	25.45	473.8	513.0	980.3	98.7	97.93	0.98
	25.20	469.2	513.0	964.9	96.6		
	25.05	466.4	513.0	965.7	97.3		
	25.00	465.4	513.0	971.3	98.6		
	25.10	467.3	513.0	975.2	99.0		
	25.15	468.2	513.0	967.4	97.3		
芦荟苷 B Aloin B	25.45	2 789.3	2 403.7	5 095.8	95.9	94.70	1.13
	25.20	2 761.9	2 403.7	5 008.7	93.5		
	25.05	2 745.5	2 403.7	4 995.0	93.6		
	25.00	2 740.0	2 403.7	5 039.0	95.6		
	25.10	2 750.9	2 403.7	5 040.2	95.2		
	25.15	2 756.4	2 403.7	5 022.7	94.3		
芦荟苷 A Aloin A	25.45	4 883.8	3 328.0	8 071.4	95.8	96.41	1.22
	25.20	4 835.9	3 328.0	8 077.6	97.4		
	25.05	4 807.1	3 328.0	8 043.7	97.2		
	25.00	4 797.5	3 328.0	8 049.2	97.7		
	25.10	4 816.7	3 328.0	7 987.9	95.3		
	25.15	4 826.3	3 328.0	7 988.6	97.3		
芦荟大黄素 Aloe-emodin	25.45	614.9	719.4	1 322.2	98.3	95.34	1.94
	25.20	608.8	719.4	1 303.6	96.6		
	25.05	605.2	719.4	1 290.4	95.2		
	25.00	604.0	719.4	1 274.0	93.1		
	25.10	606.4	719.4	1 284.4	94.2		
	25.15	607.6	719.4	1 287.6	94.5		

2.5.4 样品含量测定

采用“2.1.3”项下的色谱方法,测定了12批芦荟药材中芦荟苦素、芦荟新苷D、7-O-甲基芦荟新甙A、芦荟苷B、芦荟苷A和芦荟大黄素的含量,每个样品做3个平行,结果见表4。

由表4可知,广东、海南和四川产区的6个指标成分总含量达到519.87~688.87 mg/g以上,而广西产区仅达到371.31~442.73 mg/g。12批药材中6个指标成分含量对比,芦荟苦素、芦荟新苷D、7-O-甲基芦荟新甙A的相对含量差异较大,分别为0.55~13.47、7.98~369.88、1.36~25.44 mg/g;芦荟苷

B、A和芦荟大黄素的含量差异相对较小,含量分别为65.14~150.08、109.51~263.16、18.30~40.32 mg/g。其中广西产区的样品,芦荟新苷D的平均含量(9.70 mg/g)远低于广东产区(293.97 mg/g)、海南产区(293.57 mg/g)和四川产区(257.81 mg/g)的平均值,但芦荟苷B(142.58 mg/g)和A(237.08 mg/g)的平均含量均高于广东产区(110.21、195.79 mg/g)、海南产区(102.80、179.87 mg/g)和四川产区(97.17、170.48 mg/g)的平均值。

3 讨论

本研究比较了热回流法和超声法对特征色谱峰

表 4 12 批芦荟样品 6 个指标成分的含量

Table 4 Contents of 6 indicative compounds in 12 batches of aloe

编号 No.	产地 Origin	芦荟苦素 Aloesin	芦荟新苷 D Aloeresin D	含量 Contents(mg/g)				总和 Total
				7-O-甲基芦荟新苷 A 7-O-Methylaloeresin A	芦荟苷 B Aloin B	芦荟苷 A Aloin A	芦荟大黄素 Aloe-emodin	
S1	四川	8.44	167.28	18.62	109.60	191.91	24.02	519.87
S2	四川	10.14	369.88	25.39	65.14	109.51	19.03	599.09
S3	广东	0.55	354.24	3.96	105.87	183.93	40.32	688.87
S4	广东	7.15	330.90	16.29	95.17	166.95	20.63	637.09
S5	广东	13.47	196.77	25.44	129.59	236.50	23.63	625.40
S6	海南	0.63	317.65	2.13	113.06	201.13	18.73	653.33
S7	四川	8.91	236.26	23.67	116.77	210.03	19.67	615.31
S8	海南	8.73	309.76	15.74	103.60	180.32	21.74	639.89
S9	海南	1.32	253.31	2.80	91.74	158.17	18.30	525.64
S10	广西	0.60	7.98	1.36	150.08	263.16	19.55	442.73
S11	广西	1.15	12.24	2.41	129.60	199.42	26.49	371.31
S12	广西	0.74	8.87	2.05	148.05	248.65	22.07	430.43

提取率的影响。结果发现,超声处理提取效率高、时间短、损失少,易操作。同时分别考察了提取溶剂(甲醇、乙醇)及浓度、提取时间和液料比对芦荟药材中 6 个指标成分提取率的影响,结果显示,50% 甲醇水溶液 75 mL 超声提取 20 min 为最佳。考察了乙腈-甲酸水溶液、乙腈-磷酸水溶液和甲醇-磷酸水等流动相体系。结果表明,当以甲醇-乙腈-0.3% 磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱时,各指标成分峰型对称、分离度较好,运行时间短,效果最佳。比较了不同检测波长(254、280、310、330、360 nm)下各色谱峰的峰形和分离度,结果显示,254 nm 处 6 个指标成分吸收强度高,基线平稳、分离度良好,故选择 254 nm 为检测波长。

12 批芦荟药材的指纹图谱共识别 23 个共有峰,从相似度结果可知,除广西产区的相似度低于 0.5 外,其他均大于 0.93,说明市售的芦荟药材因产地不同,其化学成分种类和含量有很大差异。从聚类分析结果可知,12 批芦荟药材聚为 3 类,与主成分分析结果一致。利用正交偏最小二乘判别法筛选出影响芦荟药材质量差异的 5 个色谱峰,并以相同 HPLC 法对其进行含量测定。因芦荟大黄素也是芦荟药材中主要的生物活性化合物之一^[21],固也列入含量测定的指标性成分,其分析结果可知 6 个指标成分含量存在较大差异。这种差异可能是由于地理

环境、气候条件、采收期、土壤及田间管理、种植模式等诸多因素,对药材次生代谢产物的积累产生影响,从而导致药材相似度以及含量的差异性^[22];其次芦荟药材是以浓缩物的性状呈现,其浓缩方式、烘干工艺、取材部位等也会使药材的化学成分有很大差异。

本研究采用定量指纹图谱结合化学模式多元判别方法对不同产地的芦荟药材成分差异进行分析,并对 6 个指标成分进行了含量测定,可直观评价各产地芦荟药材品质的一致性,还同时体现化学成分的差异性,为芦荟药材的质量控制和后续相关产品开发提供科学参考。

参考文献

- Eshun K, He Q. *Aloe vera*: a valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries-a review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2004, 44(2): 91-96.
- Zhao Y, Sun YN, Lee MJ, et al. Identification and discrimination of three common aloe species by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with multivariate analysis [J]. J Chromatogr B, 2016, 1031: 163-171.
- Fan JJ, Li CH, Hu YJ, et al. Comparative assessment of *in vitro* thrombolytic and fibrinolysis activity of four *Aloe* species and analysis of their phenolic compounds by LC-MS [J]. S Afr J Bot, 2018, 119: 325-334.
- Park JH, Kwon SW. Chemical components of aloe and its a-

- nalysis: an epitome of chemical components and low molecular compounds [J]. New York: Springer US-New Perspectives on Aloe, 2006: 19-34.
- 5 Wu XF, Wan JZ, Zhong JS, et al. Research progress on the chemical constituents of aloe [J]. Chin J Trop Crops(热带作物学报), 2015, 36: 1542-1550.
- 6 Li TT, Liao ZQ, Chen MY, et al. Simultaneous qualitative and quantitative determination of compounds in *Aloe arborescens* Mill using liquid chromatography with ion trap time-of-flight mass spectrometry and diode array detectors [J]. Sep Sci Plus, 2018, 1: 640-649.
- 7 Sonmezdag AS, Kelebek H, Selli S, et al. Characterization of aroma-active compounds, phenolics, and antioxidant properties in fresh and fermented capers (*Capparis spinosa*) by GC-MS olfactometry and LC-DAD-ESI-MS/MS [J]. J Food Sci, 2019, 84: 2449-2457.
- 8 Rao NN, Zhang Q, Gu H, et al. Determination of 8 anthraquinones in aloe by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab(分析试验室), 2018, 37: 720-725.
- 9 Park MK, Park JH, Kim NY, et al. Analysis of 13 phenolic compounds in aloe species by high performance liquid chromatography [J]. Phytochem Anal, 1998, 9: 186-191.
- 10 Cai JF, Tang JH. Research progress of pharmacological mechanism of active components in aloe [J]. World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘), 2018, 18(102): 122-125.
- 11 Chois S and Chung MH. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects [J]. Semi Integr Med, 2003, 1(1): 53-62.
- 12 He J, Fang ZJ. Research progress of polysaccharide of aloe [J]. Acta Med Sin(华夏医学), 2017, 30: 188-191.
- 13 Gao XR. Determination of free amino acids in aloe [J]. J Yanan Univ: Nat Sci(延安大学学报: 自科版), 2015, 34(3): 46-48.
- 14 Pan MM, Liu XH, Tong SJ, et al. Effects of *Aloe vera* and compound extract of *Aloe vera* on inflammatory factors in RAW264.7 cells [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 18(7): 166-169.
- 15 Cai HR, Wang ZQ, Jiang YQ. Effects of aloin on proliferation, apoptosis and invasion of esophageal cancer KESY70 cell line [J]. Cancer Res Prev Treat(肿瘤防治研究), 2018, 45: 453-457.
- 16 Saoo K, Miki H, Ohmori M, et al. Antiviral activity of aloe extracts against cytomegalovirus [J]. Phytotherapy Res, 1996, 10: 348-350.
- 17 Liu XX, Pei D, Liu JF, et al. The study of HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of *Lycii Fructus* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1675-1681.
- 18 Yang BY, Hu BX, Zhang L, et al. HPLC fingerprint analysis and chemistry pattern recognition of wild and cultivated *Notholirion bulbuliferum* from different regions [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25(5): 187-191.
- 19 Nazeema JA, Gadb HA, El-Hefnawy HM, et al. Chrommatographic separation and detection methods of *Aloe arborescens* Miller constituents: a systematic review [J]. J Chromatogr B, 2017, 1058: 57-67.
- 20 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 175.
- 21 Tian L, Pan SY, Li WH. Apoptosis and mechanism of endometrial cancer cells HEC-1-B on induced aloe-emodin [J]. World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘), 2019, 19(21): 98.
- 22 Wang YX, Zang P, Ma L, et al. Research progress on influencing factors of secondary metabolism in medicinal plants [J]. Chin Med Biotechnol(中国医药生物技术), 2011, 6: 291-294.