

基于 UPLC 指纹图谱和含量测定的六月雪质量评价研究

杜兰哲^{1,2}, 范倩^{1,2}, 蔡盛康^{1,2}, 殷洪林^{1,2,3},
吴晓纯^{1,2}, 陶晨璐^{1,2}, 孙冬梅^{1,2}, 丁青^{1,2}, 朱德全^{1,2*}

¹广东一方制药有限公司; ²广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244; ³广州中医药大学, 广州 510405

摘要:建立六月雪的 UPLC 指纹图谱和多成分含量测定方法, 对不同产地六月雪药材的质量进行较全面的评价。通过对照品化学指认, 并结合相似度评价、主成分分析、和正交偏最小二乘判别分析对 16 批六月雪样品的总体质量进行分析评价。16 批六月雪样品指纹图谱具有 14 个共有峰, 通过与对照品比对以及 UPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS 定性分析指认了其中 6 个成分, 分别为去乙酰车叶草苷酸、京尼平苷酸、车叶草苷酸、维采宁 II、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖基(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷-7-O- α -L-鼠李糖苷和新绿原酸, 各批样品与对照图谱的相似度均 > 0.900; 多元统计分析结果表明 16 批六月雪样品可分成 4 类, 确定了 8 个差异性标志物。16 批次六月雪药材中去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸和维采宁 II 的含量范围分别为 2.035 ~ 4.422、1.210 ~ 3.279 和 0.087 ~ 0.288 mg/g, 其中河南产区的六月雪样品中去乙酰车叶草苷酸和车叶草苷酸含量最高, 而维采宁 II 含量偏低。该研究建立的方法简便、准确, 可为不同产地六月雪药材的质量控制及其评价研究提供参考。

关键词:六月雪; UPLC 指纹图谱; 多元统计分析; 质量差异标志物; 含量测定

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023) Suppl-0063-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.S.008

Study on the quality evaluation of Herba Serissae based on UPLC fingerprint and determination

DU Lan-zhe^{1,2}, FAN Qian^{1,2}, CAI Sheng-kang^{1,2}, YIN Hong-lin^{1,2,3},
WU Xiao-chun^{1,2}, TAO Chen-lu^{1,2}, SUN Dong-mei^{1,2}, DING Qing^{1,2}, ZHU De-quan^{1,2*}

¹Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd.; ²Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China;

³School of the Fifth Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: In this study, the ultra performance liquid chromatography (UPLC) was used to establish fingerprint and multi-component determination method of Herba Serissae, and provide a comprehensive evaluation of the drug from different habitats. The further quality assessment of the drug were carried out by chemical identification of reference substance combined with similarity evaluation, principal component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The UPLC fingerprint of Herba Serissae was established and fourteen common peaks were designated. Six common peaks were identified, namely deacetyl asperulosidic acid, neochlorogenic acid, geniposide, asperulosidic acid, vicenin II and quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- β -D-glucopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside by comparing with the reference substances and UPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS technical analysis. Multivariate statistical analysis showed that 16 batches of Herba Serissae were divided into four categories, and eight quality differential markers were determined. The content of deacetyl asperulosidic acid, asperulosidic acid and vicenin II in 16 batches of Herba Serissae standard were decoction ranged from 2.035 to 4.422 mg/g, 1.210 to 3.279 mg/g and 0.087 to 0.288 mg/g, respectively. The contents of deacetyl asperulosidic acid and asperulosidic acid ether in Herba Serissae of Henan province were the highest, while the content of vicenin II was low.

The method established in this study is simple and accurate, which can provide an quality control and evaluation for the Herba Serissae from different producing areas and provide reference.

Key words: Herba Serissae; UPLC fingerprint; multivariate statistical analysis method; quality differential markers; content determination

六月雪为茜草科植物六月雪 *Serissa japonica* (Thunb.) Thunb 或白马骨 *S. serissoides* (DC.) Druce 的干燥全草,最早记载于唐代《本草拾遗》一书中,因其枝粗壮、多节、灰白色,形似马骨,故又名白马骨,主产于华东、中南、华南及云南、贵州等地^[1]。六月雪味淡、微辛性凉,归肺、肝、胃、大肠经,具有祛风利湿,清热解毒的功效,用于治疗感冒,黄疸型肝炎,肾炎水肿,咳嗽,喉痛,角膜炎,肠炎,痢疾,腰腿疼痛等^[1,2]。六月雪含有挥发油类、萜类、木脂素类、甾体类及糖类等成分^[1-4],六月雪常见有两种不同的基原,六月雪和白马骨形态学上最明显的区别在于花萼的形状不同,六月雪的花萼为三角形,无刺芒而白马骨的花萼为披针状,先端有刺芒。此外,各省市中药材标准或炮制规范收载的六月雪品种药材的基原和药用部位也有所差别,目前市场上六月雪药材的基原多以白马骨为主。目前关于六月雪的质量相关研究文献罕见报道,缺少六月雪药材的质量评价方法。本研究旨在通过建立六月雪 UPLC 指纹图谱,并测定其差异活性成分即车叶草苷酸的含量,结合指纹图谱的相似度评价、聚类分析及主成分分析等分析方法,综合评价来源于不同产

地的六月雪的质量,为六月雪质量控制提供研究基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters H-Class 超高效液相色谱仪(沃特世科技有限公司);UHPLC-ESI-QE-Orbitrap 液质联用高分辨质谱(美国赛默飞公司)。

1.2 材料

车叶草苷酸对照品(批号:DST200920-068,含量:98.0%,成都德思特生物技术有限公司);京尼平苷酸对照品(批号:111828-201805,含量:98.10%,中国食品药品检定研究院);维采宁 II 对照品(批号:DST210901-023,含量:99.4%,乐美天医药);去乙酰车叶草苷酸对照品(批号:wkq20083107,含量:98.0%,四川省维克奇生物技术有限公司);乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯;甲酸为质谱纯、其余试剂均为分析纯;水为超纯水。16 批六月雪样品产地具体信息见表 1(编号:S1~S16),经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定为茜草科植物白马骨 *Serissa serissoides* 的干燥全草。

表 1 六月雪药材信息表

Table 1 Origin information of Herba Serissae samples

编号 No.	产地 Origin	采收时间 Collecting time	编号 No.	产地 Origin	采收时间 Collecting time
S1	河南省驻马店市确山县新安店镇	2021.03	S9	广西壮族自治区桂林市全州县石塘镇	2021.03
S2	河南省驻马店市确山县竹沟镇	2021.03	S10	广西壮族自治区玉林市玉州区南江街道金港路	2021.03
S3	河南省安阳市殷都区水冶镇	2021.03	S11	广西壮族自治区玉林市玉州区南江街道金港路	2021.03
S4	河南省驻马店市确山县竹沟镇	2021.04	S12	广西壮族自治区桂林市全州县石塘镇	2021.03
S5	河南省驻马店市确山县任店镇	2021.04	S13	湖南省衡阳市祁东县家桥镇	2021.02
S6	河南省驻马店市确山县石滚河镇	2021.04	S14	湖南省衡阳市祁东县黄土铺镇	2021.02
S7	江苏省徐州市铜山区大许镇	2021.04	S15	湖南省邵阳市邵东县团山镇	2021.02
S8	江苏省徐州市铜山区徐庄镇	2021.04	S16	湖南省邵阳市流光岭镇	2021.02

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件

采用 Waters HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8

μm) 色谱柱,以甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~3 min,3% A;3~8 min,3% → 12% A;8~12 min,12% → 25% A;12~25 min,25% → 38% A;25~30 min,38% → 90% A);流速为 0.28

mL/min;柱温为 30 ℃;检测波长:254 nm;进样量为 1 μ L。

2.1.2 溶液配制

对照品溶液的配制:分别精密称取去乙酰车叶草苷酸、京尼平苷酸、车叶草苷酸、维采宁 II 对照品适量,加 30% 甲醇溶解,制成浓度依次为 50.216、30.313、50.145、50.163 μ g/mL 的对照品溶液。

供试品溶液的配制:取六月雪样品粉末(过三号筛)约 1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 30% 甲醇 25 mL,称定重量,超声处理(300 W,40 kHz)30 min,放冷,再称定重量称重,用 30% 甲醇补足减失的重量,摇匀,过 0.22 μ m 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.1.3 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),正离子扫描模式(HESI⁺),喷雾电压为 3.8 kV,扫描范围:100~1500 m/z ;毛细管温度为 320 ℃;辅助气加热温度为 350 ℃;鞘气流速为 35 arb;辅助气流速为 10 arb;Full MS 分辨率为 70 000,dd-MS²分辨率为 17 500;二级碰撞能量为 40 eV;S-lens 电压为 50 V。

2.1.4 方法学考察

精密度考察:取六月雪供试品溶液,按“2.1.1”项下确定的色谱条件连续进样测定 6 次,检测其指纹图谱。以 8 号车叶草苷酸色谱峰为参照峰(S),计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD 值为

0.07%~1.69%,相对峰面积 RSD 值为 0.92%~4.95%,表明仪器精密度良好。

稳定性考察:取六月雪供试品溶液,于室温状态下放置并分别在制备后的 0、2、4、8、10、12、24 h,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,检测其指纹图谱,以 8 号车叶草苷酸色谱峰为参照峰(S),计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.05%~2.22%,相对峰面积 RSD 为 0.41%~5.17%,表明六月雪供试品溶液在 24 h 内稳定性良好;

重复性考察:取同一批六月雪药材 6 份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,检测其指纹图谱,以 8 号车叶草苷酸色谱峰为参照峰(S),计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.03%~1.82%,相对峰面积 RSD 为 0.28%~3.33%,表明该方法重复性良好。

2.1.5 指纹图谱的建立及相似度评价

取 16 批六月雪样品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录 UPLC 色谱图,并利用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”对 16 批六月雪样品色谱图进行峰匹配,以编号 S1 的六月雪样品溶液色谱图为参照图谱,采用平均数法生成共有模式,共标定 14 个共有峰(见图 1)。16 批六月雪样品相似度均在 0.900 以上,说明不同产地的六月雪药材相似度较高,结果见表 2。

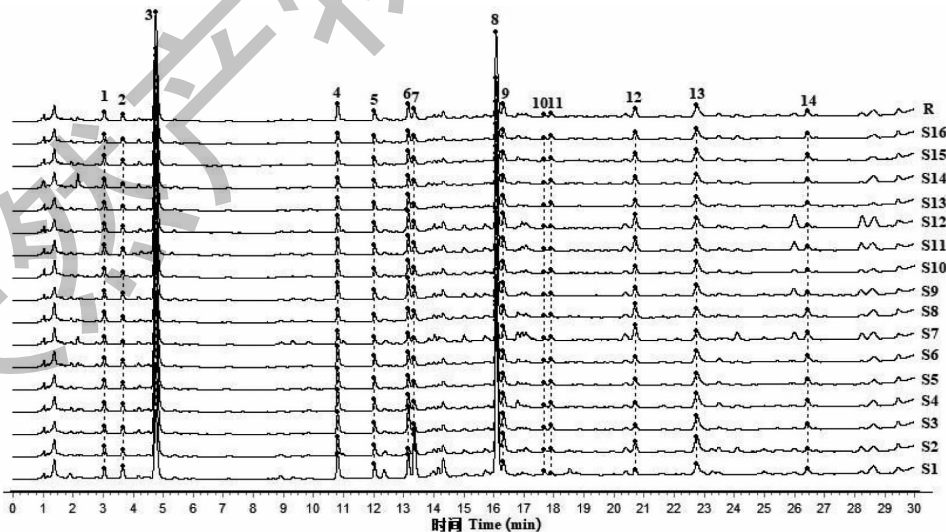


图 1 16 批六月雪样品 UPLC 叠加图谱及对照图谱(R)

Fig. 1 HPLC fingerprints and common control fingerprints of 16 batches of Herba Serissae

注:3:去乙酰车叶草苷酸;5:新绿原酸;6:京尼平苷酸;8:车叶草苷酸;12:维采宁 II;14:槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖基(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷-7-O- α -L-鼠李糖苷。Note:3:Deacetyl asperulosidic acid;5:Neochlorogenic acid;6:Geniposide;8:Asperulosidic acid;12:Vicenin II;

14:Quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1-2)- β -D-glucopyranoside-7-O- α -L-rhamnopyranoside.

表 2 16 批次六月雪指纹图谱相似度评价

Table 2 Fingerprint similarity evaluation of 16 batches of Herba Serissae

编号 No.	相似度 Similarity	编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.988	S9	0.958
S2	0.985	S10	0.964
S3	0.983	S11	0.976
S4	0.995	S12	0.958
S5	0.984	S13	0.962
S6	0.994	S14	0.956
S7	0.932	S15	0.951
S8	0.945	S16	0.966

2.1.6 共有峰指认

取六月雪药材(编号:S1)供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件和“2.1.3”项下质谱条件进样分析,与六月雪的相关化学成分研究文献^[5,6]对比,并结合色谱峰的二级质谱碎片离子,初步指认出 14 个指

纹峰中的 4 个化学成分,分别为峰 3:去乙酰车叶草苷酸,峰 6:京尼平苷酸,峰 8:车叶草苷酸,峰 12:维采宁 II。六月雪供试品和对照品溶液的总离子流图(ESI 模式)见图 2,共有峰的质谱信息见表 3。

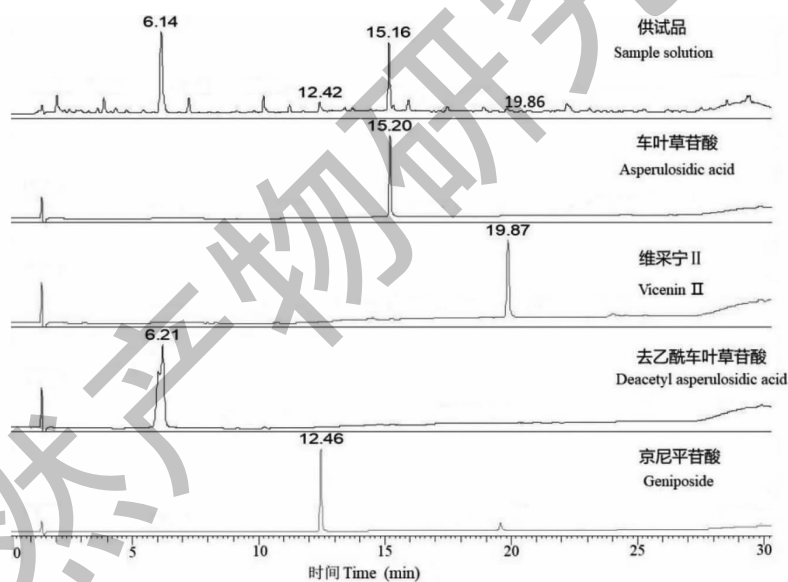


图 2 对照品与六月雪供试品溶液总离子流图

Fig. 2 TIC of Herba Serissae sample solution and reference substance

表 3 六月雪药材中化合物质谱指认结果

Table 3 Mass spectrum information of common peak of Herba Serissae

峰号 Peak No.	化合物 Compound	t_R (min)	分子式 Molecular formula	m/z	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 Fragment ion	参考文献 Ref.
3	去乙酰车叶草苷酸 Deacetyl asperulosidic acid	6.20	$C_{16}H_{22}O_{11}$	389.109 5	4.27	358.906 7, 227.056 1, 209.045 1, 183.065 7, 165.054 9, 137.059 8	5
4	未知成分 1	10.23	$C_{23}H_{18}O_{11}$	469.073 5	-3.84	427.549 2, 371.062 2, 209.029 9, 191.018 9	

续表 3 (Continued Tab. 3)

峰号 Peak No.	化合物 Compound	t_R (min)	分子式 Molecular formula	m/z	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 Fragment ion	参考文献 Ref.
5	新绿原酸 Neochlorogenic acid	11.42	$C_{16}H_{18}O_9$	353.088 2	4.33	353.088 2, 191.055 4, 179.034 1, 135.044 1	6
6	京尼平苷酸 Geniposide	12.46	$C_{16}H_{22}O_{10}$	373.114 4	3.95	345.277 4, 211.060 8, 193.050 0, 167.070 4, 149.059 8, 123.044 0	5
8	车叶草苷酸 Asperulosidic acid	15.19	$C_{18}H_{24}O_{12}$	431.119 6	2.78	379.626 5, 269.066 7, 251.056 4, 225.077 3, 165.054 8, 119.033 8	5, 7
10	未知成分 2	17.48	$C_{26}H_{34}O_{12}$	561.193 7	-0.88	399.141 1, 335.097 1, 303.881 6, 159.041 8	
11	未知成分 3	17.98	$C_{22}H_{24}O_9$	433.149 8	1.13	403.138 6, 373.128 9, 249.075 5, 221.080 7, 181.049 3	
12	维采宁 II Vicenin II	19.83	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.152 6	-1.69	473.109 1, 395.076 9, 383.077 7, 353.067 1, 325.071 9, 297.077 1	8
14	槲皮素-3-O- α -L- 鼠李糖基(1 \rightarrow 2)- β -D- 吡喃葡萄糖苷-7-O- α - L-鼠李糖苷	25.20	$C_{33}H_{40}O_{20}$	755.206 1	4.23	609.147 3, 447.093 4, 383. 500 9, 360.770 7, 301.034 8	9

2.2 多元统计学分析

2.2.1 聚类分析

以 14 个共有峰的峰面积为变量,运用“SPSS 20.0”软件,采用组间平均数连接法,以余弦对 16 批六月雪样品进行聚类分析,结果见图 3。当类间距离为 5 时,六月雪样品聚被分为 4 类, S1、S2 号样品

聚为第 1 类, S3 ~ S6 号样品聚为第 2 类, S7、S8 号样品聚为第 3 类, S9 ~ S16 号样品聚为第 4 类,可以初步确定 16 批六月雪样品成分组成具有一定差异性,河南相同产地的六月雪药材不一定能聚为一类,而广西和湖南产样品能归为一类。

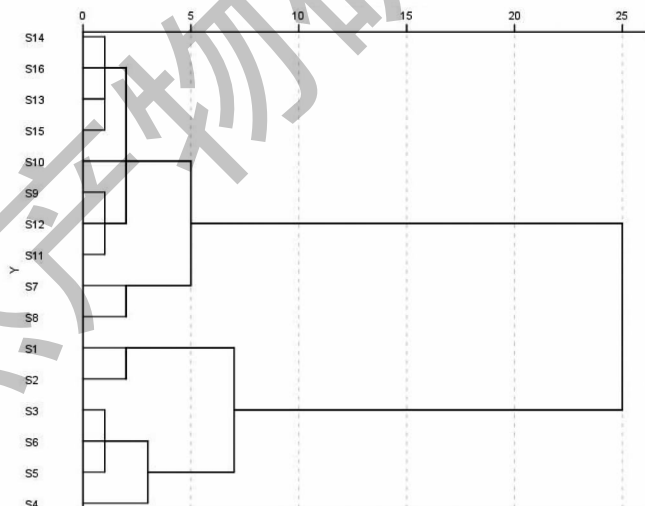


图 3 六月雪聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis of Herba Serissae

2.2.2 主成分分析(PCA)

采用 SIMCA-P 14.1 软件对 16 批六月雪样品的指纹图谱 16 个共有峰的峰面积进行 PCA 分析,得分图见图 4, 16 批六月雪样品基本可以分为 4 类,湖南产区的 S13 ~ S16 号样品聚为一类,江苏和云南产

区的 S7 ~ S12 号样品被聚为一类,而剩下 6 批河南产区的样品被聚为 2 类,其中河南产区的 S1 号样品距离群体分散较远,自分为一类,这可能与该批次产区的样品生长环境,以及采收加工方式等因素相关。PCA 分类结果与药材产地息息相关。

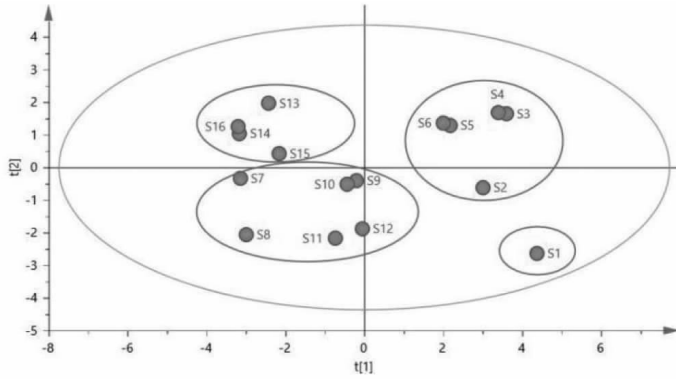


图4 六月雪样品 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score plot of Herba Serissae

2.2.3 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)

为了进一步寻找各产地批次产生差异的主要标志物,以 16 批六月雪样品中各共有峰的峰面积为变量,采用 SIMCA-P 14.0 软件对其进行 OPLS-DA 分析,分析结果见图 5 和图 6。不同产地六月雪样品明显分为 4 类,与主成分分析结果基本保持一致。

其 $R^2X = 0.973, R^2Y = 0.899, Q^2 = 0.688$ (均 > 0.5),表明该模型可靠且稳定。以 $VIP > 1$ 为标准,得到 8 个质量差异标志物,分别为色谱峰 14、12 (维采宁 II)、10、3 (去乙酰车叶草苷酸)、11、4、5、8 号 (车叶草苷酸),可作为六月雪药材质量控制的差异标志物,提示该质量差异标志物对区分不同产地六

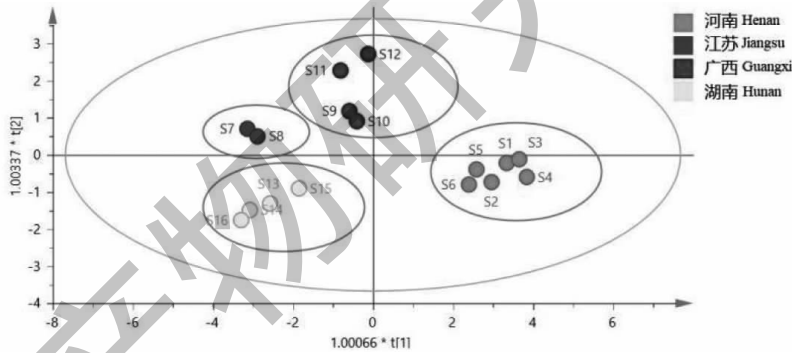


图5 六月雪样品 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 OPLS-DA score plot of Herba Serissae

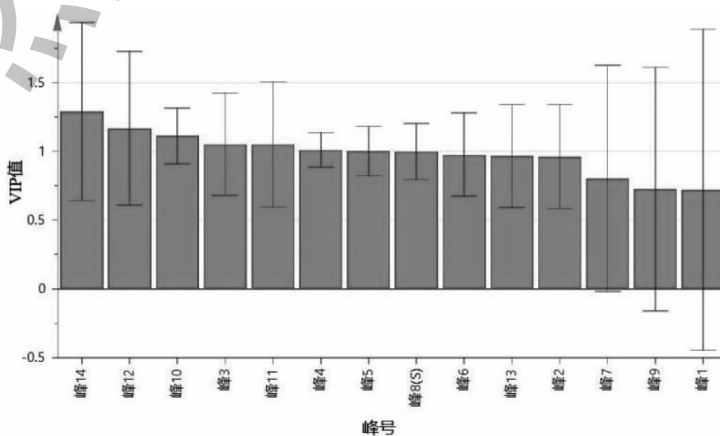


图6 六月雪样品 OPLS-DA VIP 值

Fig. 6 VIP value of Herba Serissae

月雪样品的贡献较大。

2.3 含量测定

为进一步分析、评价不同产地六月雪药材质量的差异性,建立了蝴蝶果多成分含量测定的方法,对去乙酰车叶草苷酸(峰3)、车叶草苷酸(峰8)、维采宁 II(峰12)、这3个差异性标志物进行含量测定。

2.3.1 色谱条件

同“2.1.1”项色谱条件。

2.3.2 溶液配制

同“2.1.2”项溶液配制。

2.3.3 方法学考察

线性考察:分别精密称取去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸、维采宁 II 对照品适量,加 30% 甲醇溶解,制成每 1 mL 分别含 100.376、250.777 和 289.608 μg 的混合对照品储备液。精密量取上述对照品母液 10、5、1、0.5、0.4、0.1 mL 置 10 mL 容量瓶中,加 30% 甲醇定容,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以对照品溶液的浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,3 种成分的线性回归方程和线性范围见表 4。

精密密度试验:取“2.1.2”项下混合对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,计算

得到去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸、维采宁 II 的峰面积 RSD 分别为 0.27%、1.48%、1.02%,表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取六月雪供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件,分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,计算得到去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸、维采宁 II 的峰面积 RSD 为 0.58%、2.06%、1.39%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:取同一批六月雪供试品适量,按“2.3.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,进样测定,计算得到去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸、维采宁 II 的峰面积 RSD 为 0.94%、2.88%、1.23%,表明该方法重复性良好。

加样回收率试验:取六月雪供试品 0.50 g,平行 9 份,精密称定,按样品中待测成分含量的 50%、100%、150% 比例加入对照品,按“2.3.2”项下方法制备 9 份供试品溶液,进样测定,计算车叶草苷酸、去乙酰车叶草苷酸、维采宁 II 的平均加样回收率分别为 94.49%、97.21%、91.71%,RSD 分别为 1.51%、2.49%、2.30%,均小于 3%,表明方法准确度良好,平均加样回收率见表 5。

表 4 各成分线性关系

Table 4 Linear relationship of various constituents

指标成分 Index component	标准曲线 Standard curve	相关系数 Correlation coefficient(r)	线性范围 Linear range($\mu\text{g}/\text{mL}$)
去乙酰车叶草苷酸 Deacetyl asperulosidic acid	$Y = 1\ 050.823X - 7\ 891.856$	1.000 0	2.896 ~ 289.608
车叶草苷酸 Asperulosidic acid	$Y = 4\ 120.332X - 909.001$	0.999 6	2.508 ~ 250.777
维采宁 II Vicenin II	$Y = 1\ 203.117X + 4\ 052.904$	0.999 8	1.004 ~ 100.376

表 5 六月雪药材中 3 个成分加样回收率试验结果

Table 5 Results of recovery tests of three components of Herba Serissae

指标成分 Index component	回收率 Recovery rate (%)	均值 Average (%)	RSD (%)
车叶草苷酸 Asperulosidic acid	95.06	94.49	1.51
	96.25		
	95.91		
	93.25		
	94.27		
	95.04		
	95.57		

续表 5 (Continued Tab. 5)

指标成分 Index component	回收率 Recovery rate (%)	均值 Average (%)	RSD (%)
车叶草苷酸 Asperulosidic acid	92.76		
去乙酰车叶草苷酸 Deacetyl asperulosidic acid	92.31		
	99.40	97.21	2.49
	91.35		
	96.77		
	98.16		
	99.40		
	97.26		
	98.52		
	96.82		
	97.22		
维采宁 II Vicenin II	89.39	91.71	2.30
	90.91		
	92.42		
	95.52		
	91.79		
	89.55		
	93.43		
	89.39		
	92.93		

2.3.4 样品含量测定

取 16 批六月雪样品,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3.1”项下已确定的色谱条件进样测定,测定去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸、维采宁 II 成分,计算样品去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸和维采宁 II 的含量,结果见表 6。16 批六月雪去乙酰车叶草苷酸质量分数在 2.035 ~ 4.422 mg/g、

车叶草苷酸质量分数在 1.210 ~ 3.279 mg/g、维采宁 II 质量分数在 0.087 ~ 0.288 mg/g。其中河南产区的六月雪样品中去乙酰车叶草苷酸和车叶草苷酸含量是江苏产区的 2 ~ 3 倍,而江苏产区六月雪样品中维采宁 II 含量是河南产区的 2 ~ 3 倍。湖南和广西产区的六月雪样品中去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸和维采宁 II 差异较小,表明该产区质量较稳定。

表 6 16 批六月雪药材含量测定结果

Table 6 Content determination results of 16 batches of Herba Serissae

编号 No.	含量 Content (mg/g)		
	去乙酰车叶草苷酸 Deacetyl asperulosidic acid	车叶草苷酸 Asperulosidic acid	维采宁 II Vicenin II
S1	3.804	3.279	0.098
S2	3.725	3.008	0.120
S3	4.047	2.392	0.087
S4	4.422	2.875	0.095
S5	4.219	2.563	0.116
S6	3.896	2.736	0.116
S7	2.035	1.210	0.288
S8	2.006	1.409	0.246
S9	2.731	2.014	0.166

续表 6(Continued Tab. 6)

编号 No.	含量 Content (mg/g)		
	去乙酰车叶草苷酸 Deacetyl asperulosidic acid	车叶草苷酸 Asperulosidic acid	维采宁 II Vicenin II
S10	3.087	2.120	0.156
S11	2.500	2.043	0.238
S12	2.832	1.932	0.240
S13	3.038	1.769	0.189
S14	2.662	1.665	0.131
S15	3.017	1.548	0.146
S16	2.735	1.602	0.137

3 讨论与结论

3.1 指纹图谱分析

本研究 PDA 全波长扫描结果显示,检测波长为 254 nm 时,六月雪 UPLC 指纹图谱整体色谱峰数较多、吸收强、能够反映该品种组分的全貌。本研究分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸溶液、和乙腈-0.1% 磷酸溶液的 4 种流动相系统,最终确定了甲醇-0.1% 磷酸溶液洗脱作为流动相体系,此体系各色谱峰峰形对称、分离度较好、基线平稳、响应更高。此外还考察了 3 种不同的色谱柱(Agilent Eclipse Plus C₁₈、YMC Trait C₁₈、Waters HSS T3 C₁₈)的分离效果,综合各色谱峰分离效果,最后选择使用 Waters HSS T3 C18 色谱柱。本研究还分别考察了不同提取溶剂(甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇)、不同提取方式(超声、回流)、不同提取时间(15、30、45 min)对六月雪样品制备的影响,以共有峰总峰面积/称样量为评价指标,最后确定六月雪指纹图谱最优供试品制备方法为 30% 甲醇超声提取 30 min。本研究建立的六月雪 UPLC 指纹图谱共确定 14 个共有峰,通过对照品的质谱指认,确定了其中 4 个成分。通过聚类分析和 PCA 分析将 16 批六月雪按照不同产地分成 4 类,并结合 OPLS-DA 对影响分类的差异性成分进行分析,对 VIP 值大于 1 为临界点,共筛选出 8 个差异标志物,指认了其中 5 个化合物,分别为去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸、维采宁 II、槲皮素-3-O- α -L-鼠李糖基(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷-7-O- α -L-鼠李糖苷和新绿原酸,用于六月雪的质量评价。

3.2 含量测定分析

去乙酰车叶草苷酸和车叶草苷酸是环烯醚萜类化学成分,主要存在于白花蛇舌草、巴戟天、鸡矢藤

等茜草科植物中,具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、抗氧化、抗畸变、降血脂等药理^[10,11],维采宁-II 为炒酸枣仁发挥镇静催眠作用的主要化学物质基础^[12]。本研究在指纹图谱的基础上,选取了峰纯度和活性均较高的 3 个质量差异标志物分别为去乙酰车叶草苷酸、车叶草苷酸和维采宁 II 的含量测定,从多角度研究不同产地六月雪药材质量的差异性。结果表明,来自河南省驻马店和安阳的药材去乙酰车叶草苷酸和车叶草苷酸含量最高,而维采宁 II 含量偏低;来自江苏徐州的药材去乙酰车叶草苷酸和车叶草苷酸含量最低,反之维采宁 II 含量相对于其他产地较高;来自广西桂林、广西玉林、湖南衡阳和湖南邵阳的药材去乙酰车叶草苷酸和车叶草苷酸含量均较高,提示六月雪药材的产地、环境气候、采收加工、生长年限等多种因素会造成药材中成分的含量变化。

综上,本研究建立了 UPLC 指纹图谱对不同产地的六月雪进行分析结合 UPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS 技术对各色谱峰进行定性指认,并对其进行化学计量学分析,筛选出了 8 个差异标志物,并同时对其其中 3 个差异标志物进行含量测定。该方法精密度、稳定性和重复性良好,从 UPLC 指纹图谱定性和活性成分定量等多个方面,对不同产地六月雪药材整体质量进行评价,为六月雪药材及其相关制剂的质量控制提供了科学依据。

参考文献

- Xu YH, Zheng DD, Zheng HS. The Research progress of *Serissa serissoides* (DC.) Druce (SSD) [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药), 2016, 25: 24-26.
- Guo P, Liu H, Zhu HJ, et al. Lignans from *Serissa japonica* [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2016, 38: 2192-2197.