

HPLC-CAD 结合化学计量学的川楝子饮片指纹图谱研究

张春泥¹, 王英姿^{1*}, 孙欣光², 赵阳², 郑伟³, 李文华¹, 龙珍⁴, 马百平^{2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850;
3. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193; 4. 赛默飞科技有限公司, 北京 100080)

摘要: 建立川楝子饮片的高效液相串联电雾式检测器 (HPLC-CAD) 指纹图谱。采用 Agilent ZOBAX SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱温 30 °C, 进样量 5 μL, 流速为 1 mL·min⁻¹; CAD 雾化气为氮气, 雾化气压力为 35 psi, 雾化室温度 35 °C。采用相似度评价、聚类分析及主成分分析等方法, 对不同来源、不同产地的 20 批次饮片进行系统比较与归类。结果确定了 28 个共有峰, 并对其中的 6 个色谱峰进行了指认和鉴定, 将不同产地的样品分为 3 类。方法学考察结果表明, 该方法精密性、重复性以及稳定性良好, 为市售川楝子饮片的质量评价和控制提供了更加全面科学的依据。

关键词: 川楝子; HPLC-CAD; 指纹图谱; 相似度分析; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0456-06

Chromatographic fingerprint analysis of Toosendan Fructus by HPLC-CAD coupled with chemometrics methods

ZHANG Chun-ni¹, WANG Ying-zi^{1*}, SUN Xin-guang², ZHAO Yang², ZHENG Wei³,
LI Wen-hua¹, LONG Zhen⁴, MA Bai-ping^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 3. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 4. ThermoFisher Scientific Corporation, Beijing 100080, China)

Abstract: A new method was developed for the chromatographic fingerprint analysis of Toosendan Fructus by HPLC coupled with the charged aerosol detector (CAD) in the present study. Samples were well separated on an Agilent ZOBAX SB C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution using acetonitrile and water containing 0.1 % formic acid (v/v) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 °C and the injection volume was 5 μL. The nitrogen inlet pressure of the charged aerosol detector (CAD) was 35 psi, and the nebulizer chamber temperature was 35 °C. In addition, the method of the chromatographic fingerprints combined with multivariate statistical analysis was effective and reasonable lead to an accurate classification of 20 batches of samples from different locations. The results showed that 28 common peaks were observed in the fingerprint and the samples were classified into three clusters. The established method was well validated, and showed high precision, good repeatability, and satisfactory stability. It may serve in the quality control and evaluation of Toosendan Fructus.

收稿日期: 2016-09-30; 修回日期: 2016-11-23.

基金项目: 国家科技基础性工作专项资助项目 (2014FY111100-3); 北京中医药大学 2016 年度基本科研业务费项目 (在读研究生项目: 2016-JYB-XS118).

*通讯作者 Tel: 86-10-84738615, E-mail: wangzyi@sina.com;

Tel: 86-10-66930265, E-mail: mabaiping@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0965

Key words: Toosendan Fructus; HPLC-CAD; fingerprint; similarity evaluation; hierarchical cluster analysis; principle components analysis

川楝子为楝科植物川楝 (*Melia toosendan* Sieb.et Zucc.) 的干燥成熟果实, 是传统的理气、驱虫药, 始载于《神农本草经》, 迄今已有 2 000 余年的用药历史, 临床上具有广泛的应用。现代药理学研究表明川楝子具有驱虫、镇痛、抗肿瘤、抗病毒、抑制破骨细胞等作用。川楝子中含有多种化学成分, 主要包括萜类、挥发油、黄酮、酚酸等^[1, 2]。2015 版《中国药典》中收录了川楝子和炒川楝子两个饮片品种, 并规定以三萜类成分川楝素的含量作为质量评价指标^[3]。然而仅仅采用单一成分进行检测, 往往难以全面系统反映川楝子饮片的内在质量。指纹图谱针对中药多组分、多靶点的特点, 从“全成分”的角度出发进行中药的质量控制, 具有系统性、特征性等特点, 能较全面的反映中药中所含化学成分的种类, 目前已在中药质量评价和控制研究中得到了较好的应用。

截至目前, 关于川楝子的指纹图谱研究已有部分报道, 但其检测方法大多为高效液相串联紫外检测器 (HPLC-UV)^[4-6], 少数采用高效液相串联蒸发光散射检测器^[7] (HPLC-ELSD)。川楝子中川楝素等三萜类化合物如采用 HPLC-UV 分析很难达到理想的基线分离; 蒸发光散射检测器虽然对如川楝素等化合物的检测灵敏度高于 UV 的末端波长检测, 但由于其对含量较低成分的检测不够灵敏, 限制了其进一步的应用。电雾式检测器 (CAD) 已在液相色谱分析中得到了较好的应用。由于其不依赖于化合物的分子结构, 尤其适用于紫外吸收较弱的化合物, 且该检测器较 ELSD 具有更高的灵敏度^[8-10]。因此, 本实验将 HPLC-CAD 方法用于川楝子饮片指纹图谱的研究, 并通过 3 种检测器 (UV、ELSD 和 CAD) 的对比, 进一步证实了 CAD 检测器用于川楝子指纹图谱研究的优势。同时, 本研究采用多种化学计量学数据处理方法, 对 20 批次不同来源、不同产地的川楝子饮片进行分析评价, 以期为川楝子饮片的质量控制提供依据。

材料与amp;方法

仪器 Waters 2695 型高效液相色谱仪 (Waters Corporation, Milford, MA, USA), 包含四元溶剂洗脱系统, 自动进样器, 柱温箱; Corona Ultra 型电雾式检测器 (Corona Ultra, ThermoFisher, USA); 2000 ES 型蒸

发光散射检测器 (2000 ES, Alltech Associates, USA); 2487 型紫外检测器 (2487, Waters, USA); 色谱柱: Agilent ZOBAX SB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)、TGL-16A 台式高速冷冻离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司); 超高效液相: Waters ACQUITY™ 超高效液相色谱系统 (Waters Corporation, Milford, MA, USA); 质谱: SYNAPT G1 质谱系统 (Waters Corporation, Manchester, UK); 色谱柱: Acquity HSS T3 C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Waters, Ireland); Sartorius BP211D 十万分之一电子天平; 天鹏 TP600 超声波清洗器; 0.22 μm 微孔滤膜 (上海兴亚净化材料厂)。

试剂与样品 甲醇 (色谱纯, ThermoFisher, USA); 乙腈 (色谱纯, ThermoFisher, USA); 甲酸 (色谱纯, Acros Co., Ltd., NJ, USA); 蒸馏水 (广州屈臣氏蒸馏水有限公司); 19 批次市售川楝子饮片购自全国不同地区, 经北京中医药大学中药鉴定系刘春生教授鉴定为楝科植物川楝 (*Melia toosendan* Sieb.et Zucc.) 的干燥成熟果实, 1 批次川楝子标准药材购自于中国食品药品检定研究院 (批号: 121464-201102), 详见表 1; 川楝素对照品购自于北京四面体生物科技有限公司 (批号: 150408); 其他试剂均为市售分析纯。

高效液相色谱条件 色谱柱: Agilent ZOBAX SB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃; 进样量 5 μL, 流速 1 mL·min⁻¹; 紫外检测波长 270 nm; 蒸发光散射检测器: 漂移管温度 110.0 ℃, 载气流量 2.4 L·min⁻¹; Corona Ultra 电雾式检测器雾化气为氮气, 雾化气压力为 35 psi (1 psi≈6.9 kPa), 雾化室温度 35 ℃; 流动相为: A (乙腈)、B (0.1%甲酸-水), 梯度洗脱条件如下: 0~3 min, 5% A; 3~20 min, 5%~20% A; 20~35 min, 20%~32% A; 35~45 min, 32%~38% A; 45~60 min, 38%~50% A; 60~75 min, 50% A; 75~83 min, 50%~75% A; 83~98 min, 75%~90% A; 98~109 min, 90%~95% A。

UHPLC-Q-TOF/MS^E 色谱及质谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 柱温: 45 ℃; 进样量: 2 μL, 流速 0.5 mL·min⁻¹; 流动相: A (乙腈)、B (0.1%甲酸-水), 梯度洗脱条件如下: 0~1.0 min, 5% A; 1.0~8.0 min, 5%~22% A; 8.0~12.0 min, 22%~38% A; 12.0~15.0 min, 38%~43% A; 15.0~17.0 min, 43%~45% A; 17.0~

Table 1 The details of 20 batches of Toosendan Fructus samples

Sample No.	Geographical origin	Supplier
S1	Sichuan	Beijing Tong Ren Tang Co., Ltd., Beijing
S2	Sichuan	Herb Pharmacies of Chinese PLA general hospital, Beijing
S3	Sichuan	Chengdu Hehuachi Chinese Herbal Medicine Market, Sichuan
S4	Sichuan	Local herb market in Guigang, Guangxi
S5	Sichuan	Beijing Tong Ren Tang Co., Ltd.(Jixi shop), Heilongjiang
S6	Sichuan	Local herb market in Dingzhou, Hebei
S7	Sichuan	Chengdu Hehuachi Chinese Herbal Medicine Market, Sichuan
S8	Sichuan	Chengdu Hehuachi Chinese Herbal Medicine Market, Sichuan
S9	Sichuan	Chengdu Hehuachi Chinese Herbal Medicine Market, Sichuan
S10	Sichuan	Local herb market in Chengdu, Sichuan
S11	Yunnan	Chengdu Hehuachi Chinese Herbal Medicine Market, Sichuan
S12	Yunnan	Chengdu Hehuachi Chinese Herbal Medicine Market, Sichuan
S13	Yunnan	Anguo Chinese Herbal Medicine Market, Hebei
S14	Yunnan	Anguo Chinese Herbal Medicine Market, Hebei
S15	Yunnan	Chengdu Hehuachi Chinese Herbal Medicine Market, Sichuan
S16	Gansu	Anguo Chinese Herbal Medicine Market, Hebei
S17	Gansu	Lanzhou Huanghe Chinese Herbal Medicine Market, Gansu
S18	Gansu	Lanzhou Huanghe Chinese Herbal Medicine Market, Gansu
S19	Gansu	Lanzhou Huanghe Chinese Herbal Medicine Market, Gansu
S20	Unknown	National Institutes for Food and Drug Control

20.0 min, 45%~50% A; 20.0~23.0 min, 50%~60% A; 23.0~27.0 min, 60%~75% A; 27.0~28.0 min, 75%~77% A; 28.0~30.0 min, 77%~85% A; 30.0~32.0 min, 85% A; 32.0~32.1 min, 85%~95% A; 32.1~34.0 min, 95% A。

电喷雾电离离子源 (ESI), 离子化模式分为正、负离子, 离子源温度为 100.0 °C, 脱溶剂气体为氮气, 流速为 900 L·h⁻¹, 温度为 450 °C。毛细管电压为 3 kV, 锥孔电压为 30 V, 扫描范围为 *m/z* 100~1500。低能量扫描时 trap 电压为 6 eV, transfer 电压为 4 eV; 高能量扫描时, 负离子模式: trap 电压为 25~50 eV, transfer 电压为 20 eV, 正离子模式: trap 电压为 75~100 eV, transfer 电压为 20 eV。准确质量数用 leucineenkephalin 作校正液。

对照品储备液的制备 精密称取川楝素对照品适量, 甲醇溶解并定容, 摇匀, 配制成 1 mg·mL⁻¹ 的川楝素对照品溶液。

供试品溶液的制备 精密称取川楝子中粉粉末 2.0 g, 加入 70% 甲醇溶液 20 mL 超声提取 40 min, 离心机离心 10 min (转速 8000 r·min⁻¹), 将上清液减压浓缩至干, 加入 70% 甲醇溶液 1 mL 复溶, 过微孔滤膜 (0.22 μm), 即得供试品溶液。

不同检测器指纹图谱的对比 按“供试品溶液制备方法”制备川楝子饮片供试品溶液, 取同一供试品溶液, 按“高效液相色谱条件”, 进相同体积 5 μL,

分别采用 CAD、ELSD 及 UV 检测器建立川楝子饮片指纹图谱。

方法学考察

精密度 按“供试品溶液的制备”制备川楝子饮片供试品溶液, 取同一供试品溶液, 按“高效液相色谱条件”, 进样 5 μL, 连续进样 6 次。以各共有峰相对峰面积和相对保留时间进行考察。

重复性 按“供试品溶液的制备”平行制备 6 份川楝子饮片供试品溶液, 按“高效液相色谱条件”进样分析, 以各共有峰相对峰面积和相对保留时间进行考察。

稳定性 按“供试品溶液的制备”制备川楝子饮片供试品溶液, 按“高效液相色谱条件”, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 和 24 h 进样 5 μL, 以各共有峰相对峰面积和相对保留时间进行考察。

HPLC-CAD 指纹图谱的建立及相似度评价 取上述 20 批川楝子药材, 按“供试品溶液制备方法”制备供试品溶液, 分别精密吸取供试品溶液 5 μL, 注入到高效液相色谱仪测定, 按“高效液相色谱条件”进样分析, 记录色谱图。将上述 20 批川楝子药材所得各色谱图导入 2012 版《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》软件进行数据处理。以 S20 为参照图谱, 时间窗为 0.1, 中位数法, 经多点校正自动匹配生成川楝子饮片色谱指纹图谱共有模式。

聚类分析 以 20 批次川楝子药材共有峰的峰面

积作为变量,运用 SPSS 20.0 统计软件,采用组间平均数联结法,以“Pearson 相关性”作为样品相似度的距离计算公式,对川楝子样品进行聚类分析。

主成分分析 将 20 批川楝子饮片指纹图谱中共有峰峰面积导入统计软件 SPSS 20.0,所有数据经过标准化处理后,进行主成分分析,计算贡献率及累计贡献率。

结果

1 川楝子饮片 HPLC-CAD、HPLC-ELSD 及 HPLC-UV 指纹图谱对比

结果如图 1 所示。川楝子饮片 HPLC-CAD 指纹图谱较 HPLC-ELSD 及 HPLC-UV 指纹图谱有更高的灵敏度和更多的色谱峰,且指标性成分川楝素的色谱峰与其他色谱峰分离度良好,因此 CAD 检测器更适用于川楝子饮片的指纹图谱分析。

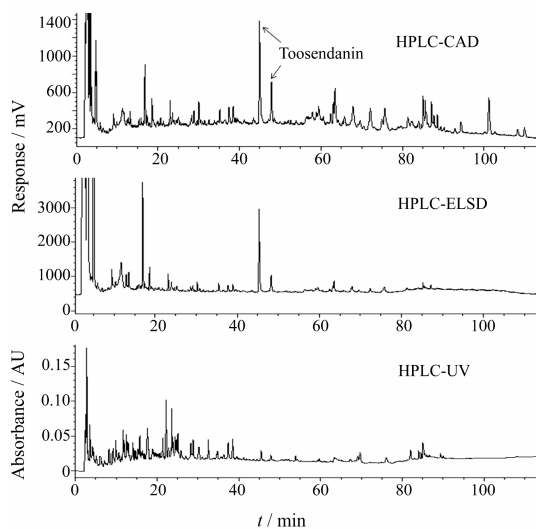


Figure 1 Comparison of the chromatographic fingerprints by HPLC-CAD, HPLC-ELSD and HPLC-UV with the same sample

2 HPLC-CAD 指纹图谱的方法学考察

2.1 精密度 结果显示,共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.03%~1.03%和 0.34%~2.03%,说明各主要色谱峰保留时间与峰面积基本一致,表明仪器精密度良好。

2.2 重复性 结果显示,共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.11%~1.75%和 1.03%~2.64%,表明该方法重复性良好。

2.3 稳定性 结果显示,共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 0.03%~1.01%和 0.56%~2.22%,表明该样品在 24 h 内稳定。

3 川楝子 HPLC-CAD 指纹图谱的建立及相似度评价

建立川楝子饮片色谱指纹图谱共有模式(图 2),确定 28 个峰为共有特征色谱峰,并对 20 批川楝子饮片的相似度进行了评价,结果见表 2。

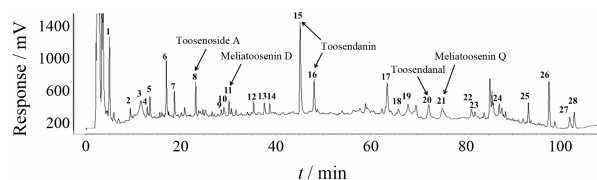


Figure 2 HPLC-CAD standard fingerprint marked with peak numbers of Toosendan Fructus. Peak number 1-28 are the common peaks which are marked by the similarity evaluation software

Table 2 The similarity evaluation results of 20 batches of Toosendan fructus

Sample No.	Similarity	Sample No.	Similarity
S1	0.967	S11	0.923
S2	0.947	S12	0.975
S3	0.964	S13	0.962
S4	0.974	S14	0.861
S5	0.968	S15	0.957
S6	0.978	S16	0.866
S7	0.966	S17	0.882
S8	0.935	S18	0.916
S9	0.986	S19	0.890
S10	0.963	S20	0.975

此外,通过液质联用分析以及与对照品和相关文献^[11-16]比对的方法,对 28 个共有峰中的 6 个色谱峰进行了指认和鉴定。峰 15、16 经标准品比对后鉴定为川楝素(toosendanin,两个峰为川楝素的互变异构体^[14])。峰 8、11、20、21 经质谱数据分析和文献比对,分别鉴定为 toosenoside A、meliatoosenin D、toosendanin、meliatoosenin Q(表 3)。

4 川楝子样品聚类分析

聚类分析结果见图 3。从树状图可以看出,当分类距离取 21 时,20 批次川楝子药材被分为 3 大类(I 类、II 类和 III 类),分类结果与相似度结果一致。第 I 类由相似度高于 0.935 的川楝子药材组成,第 II 类由相似度介于 0.866~0.923 之间的川楝子药材组成,第 III 类则由相似度最低的川楝子药材组成。

5 川楝子样品主成分分析

结果显示第 1、2、3 位的主成分方差贡献率分别为 35.971%、17.378%和 12.484%,前 3 个主成分累计贡献率为 65.833%,因此前 3 个主成分的分析结果基本显示出了不同批次川楝子饮片之间的相似度和差

Table 3 Characterization of some constituents in Toosendan Fructus by UPLC-Q-TOF-MS^E. *Compound identified by comparing with reference standard

Peak No.	MS and MS/MS information	Molecular weight	Constituent	Reference
8	349 [M-H] ⁻ , 373 [M+Na] ⁺ , 368 [M+NH ₄] ⁺	350	Toosenoside A	11
11	531 [M-H] ⁻ , 578 [M+HCOO] ⁻ , 533 [M+H] ⁺ , 555 [M+Na] ⁺ , 515 [M+H-H ₂ O] ⁺	532	Meliatoosenin D	12
15	573 [M-H] ⁻ , 619 [M+HCOO] ⁻ , 575 [M+H] ⁺ , 597 [M+Na] ⁺ , 557 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 497 [M+H-H ₂ O-CH ₃ COOH] ⁺ , 537 [M+Na-CH ₃ COOH] ⁺	574	Toosendanin*	13, 14
16	573 [M-H] ⁻ , 619 [M+HCOO] ⁻ , 575 [M+H] ⁺ , 597 [M+Na] ⁺ , 557 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 497 [M+H-H ₂ O-CH ₃ COOH] ⁺ , 537 [M+Na-CH ₃ COOH] ⁺	574	Toosendanin* (tautomeric form)	13, 14
20	557 [M+H] ⁺ , 579 [M+Na] ⁺ , 539 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 574 [M+NH ₄] ⁺	556	Toosendanal	15
21	613 [M+H] ⁺ , 595 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 635 [M+Na] ⁺ , 630 [M+NH ₄] ⁺ , 1 247 [2M+Na] ⁺	612	Meliatoosenin Q	16

异性。以 3 个主成分建立坐标系得到 PCA 得分分布图, 见图 4。由图 4 可见, 不同批次的川楝子饮片在三维图上可分为 3 类, 所得结果与相似度评价结果和聚类分析结果一致。

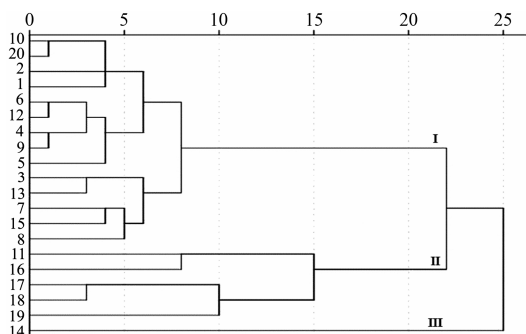


Figure 3 The results of dendrograms from hierarchical cluster analysis of Toosendan Fructus

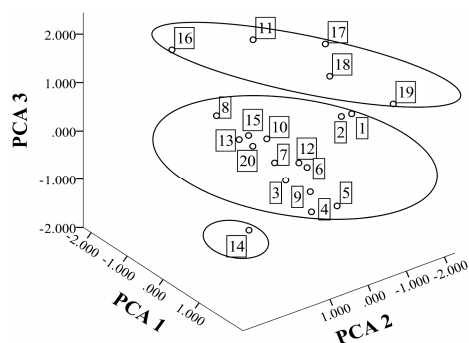


Figure 4 The results of scores plots from principle components analysis of Toosendan Fructus

讨论

通过对比发现, CAD 检测器有明显的优势: CAD 指纹图谱较 ELSD 指纹图谱有着更高的灵敏度, 能够表征出川楝子饮片更多的色谱峰信息; CAD 指纹图谱与 UV 指纹图谱相比, 更适用于川楝子药材中无紫外吸收或弱紫外吸收化合物的检测, 特别是指标成分川楝素在 CAD 检测器下得到了良好的分离。与

此同时, 通过系统的方法学考察, 结果显示采用 HPLC-CAD 方法所建立的川楝子指纹图谱, 精密性、重复性和稳定性良好, 表明该方法稳定、可靠。

本实验采用相似度评价、聚类分析和主成分分析等方法, 对不同来源、不同产地的川楝子饮片进行分析评价。20 批次川楝子饮片均按 2015 版《中国药典》项下规定的川楝子饮片含量测定方法进行了含量测定, 结果显示 20 批次的饮片川楝素含量均符合药典规定。同时采用上述 3 种分析方法得到的分类结果具有良好的 consistency。结果显示, 20 批次川楝子饮片分为 3 大类, 第 I 类由相似度高于 0.935 的川楝子饮片组成 (包括 S10、S20、S2、S1、S6、S12、S4、S9、S5、S3、S13、S7、S15 和 S8), 第 II 类由相似度介于 0.866~0.923 之间的川楝子饮片组成 (包括 S11、S16、S17、S18 和 S19), 第 III 类则由相似度最低的 S14 批次川楝子饮片组成。通过分析各饮片产地来源发现: 第 I 类主要由 10 批产自四川、3 批产自云南的饮片和川楝子标准药材组成, 且各批次相似度结果高于 0.935, 说明产自四川和大多数产自云南的川楝子饮片差异不明显, 且与标准药材有着良好的一致性。第 II 类由 4 批产自甘肃的饮片和 1 批产自云南的饮片组成, 相似度介于 0.866~0.923, 说明产自甘肃的川楝子饮片与产自四川和云南的饮片存在一定的差异性, 可能是由于甘肃与四川和云南的地理位置、生态环境等相差较大进而造成了饮片间的差异。第 III 类由 1 批产自云南的相似度最低的川楝子饮片组成。与此同时, 发现产自云南的 5 批饮片聚类结果分为了 3 类, 且相似度介于 0.861~0.975 之间, 说明产自云南的川楝子饮片之间差异性较大。初步分析原因可能为采收地点、产地初加工方法及药材的生长周期等因素的不同导致了饮片间的差异。

References

[1] Li ZH, Ju JM, Hua JL, et al. Research advances of Toosen-

- dan Fructus [J]. Chin J Exp Tradit Med Formula (中国实验方剂学杂志), 2015, 21: 219–223.
- [2] Zhang Q, Li QS, Liang JY, et al. Limonoids from fruits of *Melia toosendan* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 475–478.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 42–43.
- [4] Sheng YH, An R, Wang XH, et al. Chromatography fingerprint of the constituents of *Melia toosendan* Sieb [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2009, 31: 168–171.
- [5] Zhou N, Yang Q, Li YJ, et al. HPLC fingerprints of ethanolic part of *Toosendan Fructus* [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2012, 29: 814–818.
- [6] Li JY, Shen L. Study on HPLC fingerprints of *Fructus Toosendan* from different harvest times [J]. J Mod Med Health (现代医药卫生), 2013, 29: 983–985.
- [7] Shen LQ, Peng F, Cai JN, et al. Fingerprint analysis of limonoids in *Fructus Toosendan* by HPLC-ELSD [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2014, 34: 1431–1434.
- [8] Cintrón JM, Risley DS. Hydrophilic interaction chromatography with aerosol-based detectors (ELSD, CAD, NQAD) for polar compounds lacking a UV chromophore in an intravenous formulation [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 78-79: 14–18.
- [9] Eom HY, Park SY, Kim MK, et al. Comparison between evaporative light scattering detection and charged aerosol detection for the analysis of saikosaponins [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217: 4347–4354.
- [10] Wang L, He WS, Yan HX, et al. Performance evaluation of charged aerosol and evaporative light scattering detection for the determination of ginsenosides by LC [J]. Chromatographia, 2009, 70: 603–608.
- [11] Wang L, Li F, Yang CY, et al. Neolignans, lignans and glycoside from the fruits of *Melia toosendan* [J]. Fitoterapia, 2014, 99: 92–98.
- [12] Yi Z, Tang CP, Ke CQ, et al. Limonoids and triterpenoids from the stem bark of *Melia toosendan* [J]. J Nat Prod, 2010, 73: 664–668.
- [13] Li ZH, Xu JD, Jiu JM, et al. Chemical constituents from water extract of *Toosendan Fructus* by UPLC-ESI-Q-TOF/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2015, 46: 496–501.
- [14] Zhang CN, Sun XG, Zhao Y, et al. Quantitative analysis of toosendanin in the fruit of *Melia toosendan* Sieb. Et Zucc (Meliaceae) by high-performance liquid chromatography coupled with charged aerosol detection [J]. Chromatographia, 79: 1381–1386.
- [15] Tada K, Takido M, Kitanaka S. Limonoids from fruit of *Melia toosendan*, and their cytotoxic activity [J]. Phytochemistry, 1999, 51: 787–791.
- [16] Zhang Y, Tang CP, Ke CQ, et al. Limonoids from the fruits of *Melia toosendan* [J]. Phytochemistry, 2012, 73: 106–113.