

基于指纹图谱结合化学模式识别对翻白叶树的质量评价

邰通芝, 唐娟, 胡家震, 胡成刚* (贵州中医药大学, 贵阳 550025)

摘要:目的 采用指纹图谱结合聚类分析(hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)等进行化学模式识别,对翻白叶树药材指纹图谱数据进行分析,筛选特征性指标成分并以此建立翻白叶树有效成分的定量分析,为翻白叶树质量控制提供科学依据。方法 采用 ChromCore 120 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱,体积流量 0.8 mL · min⁻¹,检测波长为 280 nm,柱温 30 °C,进样量 10 μL, HPLC 法建立 12 个产地 30 批药材翻白叶树的指纹图谱,运用相似度分析、HCA、PCA 和 PLS-DA 等化学模式识别技术对差异性特征成分进行筛选,并定量分析。结果 建立的指纹图谱方法符合方法学要求,30 批翻白叶树 HPLC 指纹图谱标定 17 个共有峰,相似度在 0.863 ~ 0.975;通过聚类分析将不同产地翻白叶树分为 3 类,聚类分析与主成分分析结果一致;通过 HCA、PCA 和 PLS-DA 较好地地区分各产地翻白叶树,结合前期实验,综合分析筛选原儿茶酸、原花青素 B₂ 及表儿茶素 3 个成分作为翻白叶树有效成分,含量范围分别为 0.103 ~ 1.676、0.141 ~ 5.556、0.144 ~ 3.381 mg · g⁻¹。结论 该研究建立的翻白叶树药材指纹图谱及 3 个有效成分含量的测定方法稳定、可靠,重现性好,对评价翻白叶树的质量提供一定的科学依据。

关键词:翻白叶树;指纹图谱;相似度;化学模式识别;含量测定;原儿茶酸;原花青素 B₂;表儿茶素

doi:10.11669/cpj.2024.24.004 中图分类号:R282 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)24-2322-08

Quality Evaluation of *Pterospermum heterophyllum* Based on Fingerprint Combined with Chemical Pattern Recognition

TAI Tongzhi, TANG Juan, HU Jiazhen, HU Chenggang* (Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To use fingerprint combined with hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) to identify chemical patterns. **METHODS** Chrom Core 120 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) chromatographic column, 0.1% phosphoric acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) as mobile phase for gradient elution, volume flow rate of 0.8 mL · min⁻¹, detection wavelength of 280 nm, column temperature of 30 °C injection volume of 10 μL, HPLC method was used to establish the fingerprints of 30 batches of medicinal herbs from 12 origins, and similarity analysis, HCA, PCA and PLS-DA were used and other chemical pattern recognition technologies were used to screen and quantitatively analyze the differentially characteristic components. **RESULTS** The fingerprinting method established by the established fingerprint method met the methodological requirements, and 17 common peaks were indexed by HPLC fingerprint of 30 batches of *Pterospermum chinensis*, with a similarity of 0.863 - 0.975. HCA, PCA and PLS-DA were used to distinguish the PH from different origins, and combined with the previous experiments, three components, protocatechuic acid, proanthocyanidins B₂ and epicatechins, were comprehensively analyzed and screened as the active ingredients of the PH, and the content ranges were 0.103 - 1.676, 0.141 - 5.556 and 0.144 - 3.381 mg · g⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The fingerprint of the medicinal materials and the determination of the contents of the three active ingredients established in this study are stable, reliable and reproducible, which provides a certain scientific basis for evaluating the quality of *Pterospermum heterophyllum*.

KEY WORDS: *Pterospermum heterophyllum*; fingerprinting; similarity; chemical pattern recognition; content determination; protocatechuic acid; proanthocyanidins B₂; epicatechin

翻白叶树 (*Pterospermum heterophyllum* Hance) 为梧桐科翅子树属植物,又名异叶翅子树、红半枫

荷、斗枫荷、番张麻、阴阳叶等,以根入药,分布于江西、广东、广西、海南和贵州等地。查阅各个地

基金项目:贵州省 2019 年中药资源普查项目资助(3052-052190023)

作者简介:邰通芝,女,硕士研究生 研究方向:中药及民族药基础研究与开发

* 通讯作者:胡成刚,男,硕士,教授,硕士生导师

研究方向:中药及民族药基础研究与开发 Tel:(0855)5353416

区典籍与地方药材质量标准中半枫荷药材来源可知,多省收载品种为翻白叶树^[1-7],药用部位多为根,具有祛风除湿、活血通络的功能,主要用于治疗风湿痹痛、手足麻木、腰肌劳损、跌打损伤等疾病^[8-9]。

目前,翻白叶树质量控制相关报道较少,作为半枫荷药材的主要来源之一,有必要进一步优化翻白叶树的指纹图谱。基于课题组前期体外抗炎活性部位筛选和乙酸乙酯部位分离,本实验通过高效液相色谱(HPLC)指纹图谱结合化学模式识别技术整合分析指纹图谱中提取共有峰的面积数据,得到不同产地的特征化学成分并对其进行含量测定,以此反映不同批次药材之间的一致性、差异性,提升翻白叶树的质量控制水平。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-2030C 岛津高效液相色谱仪(日本岛津公

司);ChromCore 120 C₁₈ 色谱柱(纳谱分析技术有限公司);KQ5200DB 型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);JCS-31001C 型电子分析天平(哈尔滨众汇衡器有限公司);98-1-B 型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物

对照品原儿茶酸(批号 C100822,贵州迪大科技有限公司);表儿茶素(批号 110878-201703,中国食品药品检定研究院);原花青素 B₂(批号 29106-49-8,成都埃法生物科技有限公司,质量分数≥98%);乙腈(批号:AS1122-801,美国 TEDIA 公司);磷酸、甲酸、冰醋酸均为色谱纯,水为纯净水(怡宝)。

1.3 药材

翻白叶树药材采自贵州、广东、广西、海南、云南等地,共 30 批次。经贵州中医药大学胡成刚教授鉴定为梧桐科翅子树属翻白叶树(*Pterospermum heterophyllum*)的干燥根。翻白叶树药材来源见表 1。

表 1 30 批翻白叶树来源

Tab.1 Sources of 30 batches of *Pterospermum heterophyllum*

No.	Origin (in Chinese)	Collection time	No.	Origin (in Chinese)	Collection time
S1	Kaili City, Guizhou Province(贵州省凯里市)	2020.11	S16	Hainan Shounanshan Ginseng Industry Co., Ltd.(海南省寿南山参业有限公司)	2021.11
S2	Rongjiang County, Guizhou Province(贵州省榕江县)	2020.11	S17	Sichuan Lotus Pond Chinese Herbal Medicine Market 1(四川省荷花池中药材市场 1)	2020.11
S3	Jieyang City, Guangdong Province(广东省揭阳市)	2021.12	S18	Sichuan Lotus Pond Chinese Herbal Medicine Market 2(四川省荷花池中药材市场 2)	2020.11
S4	Hakka Baicao Direct Sales Center in Meizhou City, Guangdong Province(广东省梅州市客家百草直营中心)	2021.11	S19	Hainan Province Haikou Rizhongtian Pharmaceutical Co., Ltd(海南省海口市日中天制药有限公司)	2021.11
S5	Hongran Gu's Traditional Chinese Medicine Clinic in Guangzhou, Guangdong Province(广东省广州市弘然古氏中医诊所)	2021.11	S20	Huaxin Haiyi Hall, Haikou City, Hainan Province(海南省海口市华信海医堂)	2021.11
S6	Guangzhou City, Guangdong Province(广东省广州市)	2021.11	S21	Hainan Province Fuyitang Traditional Chinese Medicine Decoction Piece Company(海南省福益堂中药饮片公司)	2021.11
S7	Shenzhen, Guangdong Province(广东省深圳市)	2021.12	S22	Huatu Town, Bozhou City, Anhui Province(安徽省亳州市华佗镇)	2021.12
S8	Jianai Duoda Pharmacy in Guangzhou City, Guangdong Province(广东省广州市健爱多大药房)	2021.11	S23	Anhui Province Bozhou City Kangguan Chinese Herbal Medicine Trading Center(安徽省亳州市康关中药材交易中心)	2021.11
S9	Panlong District, Kunming City, Yunnan Province(云南省昆明市盘龙区)	2021.11	S24	Zhang Jiliang Pharmacy, Huangshan City, Anhui Province(安徽省黄山市张济良大药房)	2021.04
S10	Guandu District, Kunming City, Yunnan Province 1(云南省昆明市官渡区 1)	2021.11	S25	Wuyang County, Bozhou City, Anhui Province(安徽省亳州市涡阳县)	2021.11
S11	Guandu District, Kunming City, Yunnan Province 2(云南省昆明市官渡区 2)	2021.11	S26	Luzhai County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Liuzhou City, Guangxi Province(广西壮族自治区柳州市鹿寨县中医院)	2021.04
S12	Jiujiang, Jiangxi Province(江西省九江市)	2021.11	S27	Anguo City, Baoding City, Hebei Province(河北省保定市安国市)	2021.12
S13	Jiangxi Peng's Chinese Medicine Tang Decoction Pieces Co., Ltd.(江西彭氏国药堂饮片有限公司)	2021.11	S28	Shiyan City, Hubei Province(湖北省十堰市)	2021.12
S14	Guoxin Pharmacy, Yichun City, Jiangxi Province(江西省宜春市国信大药房)	2021.11	S29	Xuchang City, Henan Province(河南省许昌市)	2021.12
S15	Chengdu, Sichuan(四川省成都市)	2021.11	S30	Lishui City, Zhejiang Province(浙江省丽水市)	2021.12

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ChromCore 120 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色

谱柱,流动相为 0.1% 磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,0 ~ 35 min, 9% ~ 11% B; 35 ~ 50 min, 11% ~ 12% B; 50 ~ 110 min, 12% ~ 16% B; 110 ~ 115

min, 16% ~ 100% B; 体积流量 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 280 nm ; 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取半枫荷药材粉末(过3号筛) 1.0 g , 置具塞锥形瓶中, 加入体积分数75%甲醇 20 mL , 超声提取 30 min , $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别取表儿茶素 2.00 mg 、儿茶素 2.00 mg 、原花青素 B_2 1.80 mg 、原儿茶酸 4.23 mg 对照品, 精密称定, 置量瓶中, 加入体积分数75%甲醇制成含表儿茶素 $0.133 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、儿茶素 $0.133 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、原花青素 $0.121 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、原儿茶酸 $0.141 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度考察 取同一翻白叶树供试品(S1), 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液1份, 按“2.1”项下色谱条件连续进样6次, 以11号峰(表儿茶素)为参照峰(S), 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。各共有峰的相对保留时间相对标准偏差(RSD)值分别为 0.226% 、 0.312% 、 0.178% 、 0.125% 、 0.197% 、 0.106% 、 0.046% 、 0.047% 、 0.081% 、 0.058% 、 0.000% 、 0.085% 、 0.096% 、 0.125% 、 0.123% 、 0.123% 和 0.182% ($n=6$), 各共有峰的相对保留峰面积 RSD 值分别为 2.908% 、 2.548% 、 2.097% 、 2.206% 、 1.568% 、 2.836% 、 2.364% 、 0.980% 、 2.566% 、 2.745% 、 0.000% 、 2.324% 、 2.136% 、 2.261% 、 2.871% 、 2.581% 和 2.482% ($n=6$), 均小于 3% , 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性考察 取同一翻白叶树供试品(S1), 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液1份, 按“2.1”项下色谱条件分别于 $0, 4, 8, 12, 18, 24 \text{ h}$ 进样, 以11号峰(表儿茶素)为参照峰(S), 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。各共有峰的相对保留时间 RSD 值分别为 0.441% 、 0.180% 、 0.165% 、 0.116% 、 0.232% 、 0.114% 、 0.049% 、 0.209% 、 0.285% 、 0.257% 、 0.000% 、 0.074% 、 0.187% 、 0.276% 、 0.279% 、 0.280% 和 0.756% ($n=6$), 各共有峰的相对保留峰面积 RSD 值分别为 0.543% 、 0.401% 、 0.598% 、 1.486% 、 1.269% 、 2.388% 、 1.122% 、 1.126% 、 0.647% 、 1.243% 、 0.000% 、 1.150% 、 1.014% 、 2.701% 、 2.771% 、 2.390% 和 1.211% ($n=6$), 均小于 3% , 表明供试品溶液的稳定性良好。

2.3.3 重复性考察 取同一翻白叶树供试品(S1), 按“2.2.1”项下方法制备6份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 以11号峰(表儿茶素)为参照峰(S), 计算各共有峰的相对保留时间与相对峰面积。各共有峰的相对保留时间 RSD 值分别为 0.174% 、 0.247% 、 0.199% 、 0.115% 、 0.136% 、 0.063% 、 0.052% 、 0.039% 、 0.042% 、 0.039% 、 0.000% 、 0.112% 、 0.163% 、 0.172% 、 0.183% 、 0.215% 和 0.304% ($n=6$), 各共有峰的相对保留峰面积 RSD 值分别为 2.801% 、 2.281% 、 1.254% 、 2.572% 、 1.814% 、 1.960% 、 2.720% 、 1.328% 、 2.721% 、 2.481% 、 0.791% 、 1.521% 、 2.646% 、 2.870% 、 2.452% 、 2.454% 和 2.804% ($n=6$), 均小于 3% , 表明方法的稳定性良好。

2.4 翻白叶树指纹图谱的建立

2.4.1 共有峰的标定 取30批不同产地翻白叶树药材按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样并记录色谱数据, 将所得的30批翻白叶树色谱图以AIA格式导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.1版本)”, 设S14为参照峰、平均数为对照图谱生成方法、 0.5 为时间窗宽度, 多点校正以及峰匹配得到翻白叶树药材的指纹图谱和对照指纹图谱, 并进行相似度分析。见图1。

2.4.2 特征峰的指认 30批翻白叶树药材有17个共有峰, 通过对照品图谱对比, 指认其中4个色谱峰, 见图2。

2.4.3 相似度评价 对30批翻白叶树药材的指纹图谱进行相似度计算分析, 30批翻白叶树药材色谱图与对照指纹图谱的相似度在 $0.863 \sim 0.975$, 表明各个产地翻白叶树相似度较高。相似度结果见表2。

2.5 化学模式识别分析^[10-12]

2.5.1 聚类分析 利用SPSS 26.0软件以翻白叶树指纹图谱标定的17个共有峰峰面积为变量, 对30批翻白叶树药材数据进行聚类分析, 使用组间连接聚类方法, 以余弦离作为药材间的距离公式, 结果见图3。当类间距离为5时, 30批翻白叶树药材被分为3类, 其中S2(贵州省榕江县)、S27(河北省保定市安国市)聚为一类, S24(安徽省黄山市张济良大药房)和S26(广西壮族自治区柳州市鹿寨县中医院)聚为一类, 其余贵州产地、广东产地、云南产地、海南产地、四川产地、安徽产地、湖北产地、河南产地和浙江产地聚为一类。

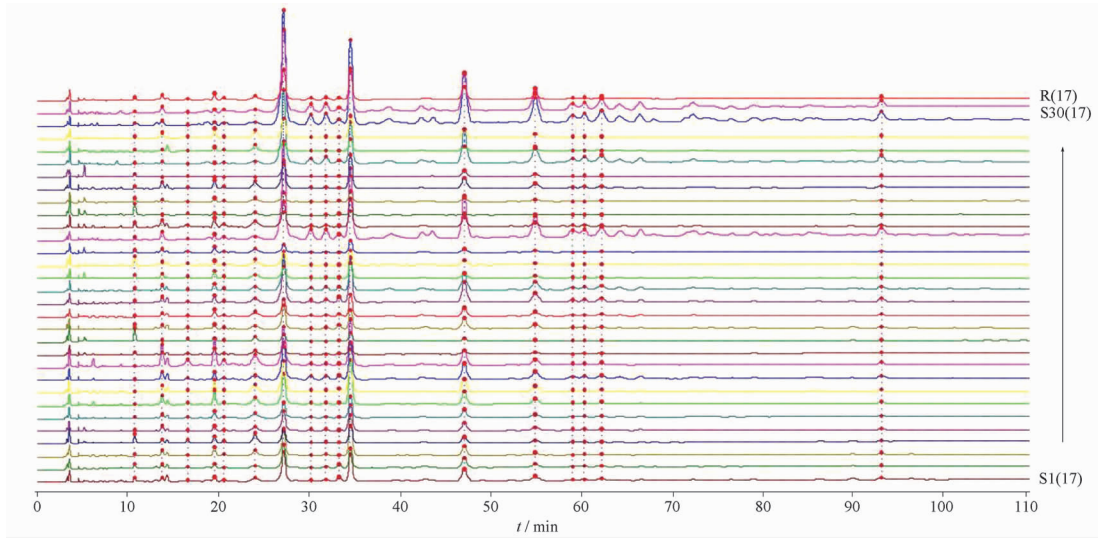
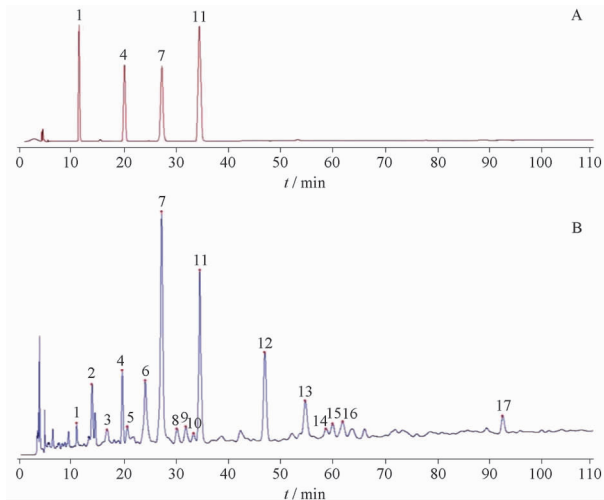


图1 30批翻白叶树药材 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 30 batches of *Pterospermum heterophyllum*



1 - 原儿茶酸; 4 - 儿茶素; 7 - 原花青素 B₂; 11 - 表儿茶素。

1 - protocatechuic acid; 4 - catechin; 7 - proanthocyanidin B₂; 11 - epicatechin.

图2 混合对照品(A)和样品(B)色谱图

Fig. 2 Chromatograms of sample (A) and reference (B)

表2 30批翻白叶树指纹图谱相似度评价结果

Tab. 2 Evaluation results of similarity of 30 batches of *Pterospermum heterophyllum* fingerprints

No.	Similarity	No.	Similarity	No.	Similarity
S1	0.863	S11	0.909	S21	0.957
S2	0.962	S12	0.907	S22	0.922
S3	0.925	S13	0.961	S23	0.961
S4	0.956	S14	0.947	S24	0.944
S5	0.949	S15	0.958	S25	0.926
S6	0.937	S16	0.937	S26	0.975
S7	0.974	S17	0.969	S27	0.955
S8	0.918	S18	0.971	S28	0.962
S9	0.939	S19	0.911	S29	0.954
S10	0.913	S20	0.945	S30	0.872

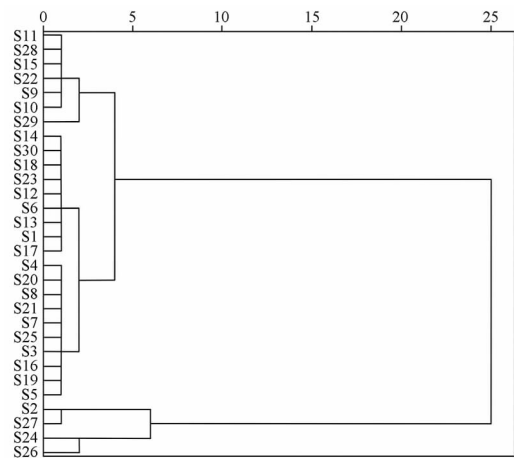


图3 30批翻白叶树药材聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis diagram of 30 batches of *Pterospermum heterophyllum*

2.5.2 主成分分析(PCA) 为了进一步区分各不同产地翻白叶树,将30批药材指纹图谱的17个共有峰峰面积为原始数据导入SPSS软件进行处理,进行PCA分析。首先,进行降维因子分析,结果显示,KMO值为0.684,大于0.5,表明各变量相关性较好,设置特征值大于1,提取得到3个主成分,其累计贡献率达到94.703%,结果见表3,能基本反映药材共有峰的信息,以主成分因子变量绘制公因子碎石图,结果显示特征值较高的3个主成分因子的斜率更大,说明所提取的3个主成分可以最大程度地代表翻白叶树药材的整体质量特征,前3个主成分评价翻白叶树质量具有一定的可行性,见图4。初始因子载荷矩阵见表4,将其进行正交旋转,旋转

后得到的 17 个共有峰成分在 3 个主成分中的旋转矩阵,反映了各变量对主成分的贡献大小,其绝对值越大对该成分在决定药材区分中的作用越大。载荷矩阵结果表明,第 1 主成分对应载荷量较大的峰为峰 9、峰 7(原花青素 B₂)、峰 8、峰 12、峰 13、峰 17、峰 14、峰 16、峰 11(表儿茶素)、峰 15、峰 10、峰 5,表明其对第 1 主成分的影响较大,可为翻白叶树的质量评价提供参考依据。第 2 主成分对应载荷量较大的峰为峰 4(儿茶素)、峰 3、峰 6、峰 5,表明其对第 2 主成分存在一定程度的影响。第 3 主成分对应峰 1(原儿茶酸)。

表 3 翻白叶树样品特征值及累积方差贡献率

Tab. 3 The eigenvalue and cumulative variance contribution rate of *Pterospermum heterophyllum*

Principal component	Initial eigenvalues	Variance contribution rate/%	Cumulative variance contribution rate/%
PC1	10.800	63.527	63.527
PC2	4.274	25.141	88.668
PC3	1.026	6.035	94.703

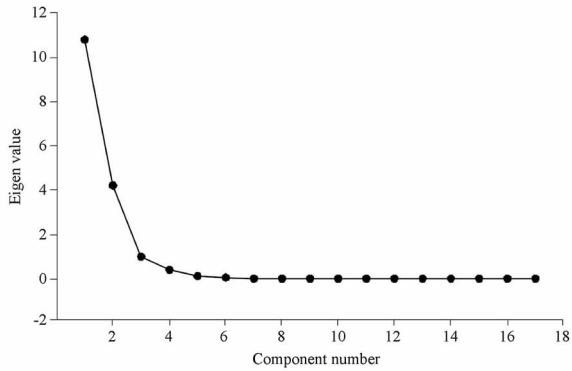


图 4 翻白叶树样品主成分分析碎石图

Fig. 4 Principal component analysis of *Pterospermum heterophyllum*

2.5.3 正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)

利用 SIMCA 14.1 软件,用 OPLS-DA 对 17 个共有峰的峰面积进行分析,结果见图 5,药材被显著的聚为 3 类,其结果与聚类分析结果一致。为了判断特征峰对翻白叶树的重要程度,提取 OPLS-DA 模型中 17 个变量的 VIP 值并从大到小排序,见图 6,结合 OPLS-DA 模型中变量重要性投影值(variable importance in the projection, VIP)进行分析,以 VIP > 1 为条件筛选出差异标志物,筛选出 4 个差异标志物,对翻白叶树药材的影响程度依次为峰 7(原花青素 B₂) > 峰 11(表儿茶素) > 峰 12(未知) > 峰 13

表 4 翻白叶树样品初始因子载荷矩阵

Tab. 4 Initial factor load matrix of the sample of *Pterospermum heterophyllum*

There are common peaks	Load		
	Principal component 1	Principal component 2	Principal component 3
A1	-0.176	0.058	0.972
A2	0.49	0.839	-0.092
A3	0.056	0.965	0.088
A4	0.083	0.976	-0.124
A5	0.659	0.731	0.098
A6	0.212	0.936	0.054
A7	0.99	-0.083	0.031
A8	0.987	-0.046	0.01
A9	0.991	-0.099	0.038
A10	0.893	-0.111	-0.095
A11	0.917	0.16	-0.081
A12	0.979	-0.179	0.037
A13	0.972	-0.208	0.047
A14	0.967	-0.192	0.023
A15	0.899	-0.257	0.112
A16	0.936	-0.073	-0.018
A17	0.97	-0.182	0.041

(新绿原酸),以上化学成分可能导致泛白叶树质量产生差异的因素,并且可看出原花青素 B₂及表儿茶素在各批次中含量较高,因此,能够为后续含量测定指标的选择提供参考。

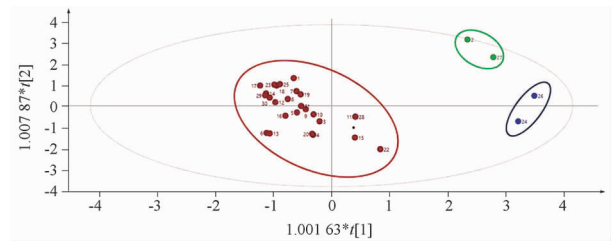


图 5 翻白叶树样品正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)得分图

Fig. 5 OPLS-DA scores of *Pterospermum heterophyllum*

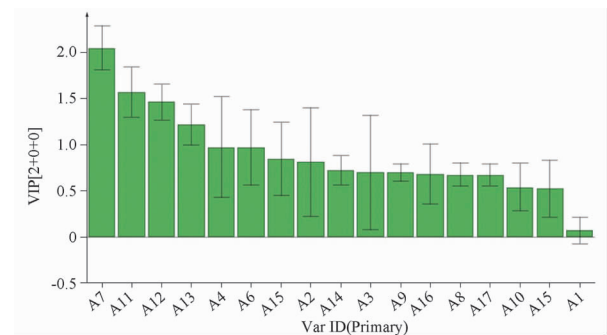


图 6 翻白叶树样品变量重要性投影值(OPLS-DA)的VIP图。n = 6

Fig. 6 VIP value from OPLS-DA load diagram of *Pterospermum heterophyllum*. n = 6

2.6 测定翻白叶树中3个已知成分含量

采用指纹图谱结合 CA、PCA 及 PLS-DA 对不同批次的翻白叶树药材进行研究分析,通过 PCA 可知峰 9、峰 7(原花青素 B₂)、峰 8、峰 12、峰 13、峰 17、峰 14、峰 16、峰 11(表儿茶素)、峰 15、峰 10、峰 5、峰 4(儿茶素)、峰 3、峰 6、峰 5 以及峰 1(原儿茶酸)是影响不同批次翻白叶树药材质量的特征化学成分。由 PLS-DA 结果可知, VIP > 1 的有峰 7(原花青素 B₂)、峰 11(表儿茶素)、峰 12(未知)及峰 13(新绿原酸),表明不同批次间的含量差异较大,是翻白叶树的差异性特征成分。

通过前期对翻白叶树不同极性部位进行体外抗炎作用筛选,经查阅文献,从乙酸乙酯部位得到化合物圣草酚、儿茶素、表儿茶素、原花青素 B₂均有一定

的抗炎作用,且表儿茶素与原花青素含量较高。考虑到中药材多成分、多靶点的协同作用,在地方药材质量标准中原儿茶酸的基础上,加上表儿茶素、原花青素 B₂这两个具有抗炎活性的主成分,综上,本实验以原儿茶酸、原花青素 B₂、表儿茶素作为翻白叶树差异特征成分进行含量测定。

2.6.1 线性关系考察 精密称取对照品原儿茶酸、表儿茶素、原花青素 B₂各 2.8、1.1、5.8 mg 分别至 20 mL,然后制成 0.14、0.055、0.29 mg · mL⁻¹的混合对照品溶液,分别取 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL 加甲醇定容至 10 mL,按“2.1”项下方法测定色谱峰面积,以进样浓度(μg · mL⁻¹)为横坐标 x ,色谱峰面积为纵坐标 y 绘制标准曲线,计算线性回归方程和相关系数(r),结果见表 5。

表 5 翻白叶树样品的线性方程、相关系数和线性范围

Tab. 5 Linear equation, correlation coefficient and linear range of *Pterospermum heterophyllum*

Comparisons	Regression equations	r	Linear range/μg · mL ⁻¹
Protocatechuic acid	$y = 4\ 152.7x + 359.3$	0.999 4	1.4 - 42.0
Proanthocyanidins B ₂	$y = 9\ 708.5x + 24\ 391$	0.999 3	0.55 - 165.0
Epicatechin	$y = 7\ 507.6x - 44.48$	0.999 6	2.9 - 87.0

2.6.2 重复性实验 取同一翻白叶树供试品(S1),按“2.2.1”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,测得原儿茶酸、表儿茶

素、原花青素 B₂含量的 RSD 值分别为 2.40%、0.71% 和 2.23% ($n = 6$),结果表明,本方法重现性良好。结果见表 6。

表 6 对照品重现性考察实验结果。n = 6

Tab. 6 The reproducibility of the control substance was examined by the experimental results. $n = 6$

Comparisons	Weigh the sample size/g	Peak area/mV · s	Content/mg	Average content/mg	RSD/%
Protocatechuic acid	1.000 3	45 226	0.432	0.416	2.40
	1.000 1	42 380	0.405		
	1.000 1	42 627	0.407		
	1.000 3	43 846	0.419		
	1.000 4	43 900	0.419		
Proanthocyanidins B ₂	1.000 0	43 175	0.412	1.941	0.71
	1.000 3	495 727	1.942		
	1.000 1	496 829	1.946		
	1.000 1	500 020	1.960		
	1.000 3	490 316	1.920		
Epicatechin	1.000 4	496 797	1.946	0.977	2.23
	1.000 0	493 461	1.933		
	1.000 3	186 373	0.993		
	1.000 1	179 876	0.959		
	1.000 1	189 137	1.008		
	1.000 3	180 247	0.961		
	1.000 4	185 071	0.986		
	1.000 0	179 080	0.954		

2.6.3 加样回收率实验 精密称取已知含量的翻白叶树药材粉末 0.5 g,共 6 份,精密称定,分别加入混合对照品溶液 1 mL,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定

峰面积,测得原儿茶酸、表儿茶素、原花青素 B₂加样回收率分别为 97.09%、98.36% 和 96.67%,RSD 值分别为 1.80%、0.86% 和 0.67%。结果见表 7。

表7 翻白叶树样品加样回收率实验结果。n=6

Tab.7 Experimental results of sample recovery of *Pterospermum heterophyllum*. n=6

Comparisons	m(Sample)	m(Original)	m(Added)	m(Found)	Recovery	Average	RSD
	/g	/mg	/mg	/mg	/%	recovery/ %	/%
Protocatechuic acid	0.501 7	0.208	0.210	0.414	99.043	97.09	1.80
	0.502 5	0.208	0.210	0.400	95.694		
	0.500 9	0.208	0.210	0.396	94.737		
	0.503 6	0.208	0.210	0.409	97.847		
	0.505 2	0.208	0.210	0.413	98.804		
	0.504 1	0.208	0.210	0.403	96.411		
Proanthocyanidins B ₂	0.501 7	0.971	0.970	1.905	98.145	98.36	0.86
	0.502 5	0.971	0.970	1.911	98.454		
	0.500 9	0.971	0.970	1.879	96.806		
	0.503 6	0.971	0.970	1.917	98.764		
	0.505 2	0.971	0.970	1.927	99.279		
	0.504 1	0.971	0.970	1.916	98.712		
Epicatechin	0.501 7	0.497	0.488	0.960	97.462	96.67	0.67
	0.502 5	0.497	0.488	0.945	95.939		
	0.500 9	0.497	0.488	0.953	96.751		
	0.503 6	0.497	0.488	0.959	97.360		
	0.505 2	0.497	0.488	0.950	96.447		
	0.504 1	0.497	0.488	0.946	96.041		

2.6.4 不同产地翻白叶树含量测定 精密称取不同批次翻白叶树药材粉末(过3号筛)各1.0 g,按“2.2.1”项下方法制备供试液。按“2.1”项下色谱条件进样,测定原儿茶酸、表儿茶素、原花青素 B₂ 含量。结果见表8。

3 讨论

本实验考察了不同提取方法(超声、回流)、不同提取溶剂(体积分数50%甲醇、75%甲醇、100%甲醇、50%乙醇、75%乙醇、100%乙醇)、不同提取时间(30、45、60 min)、不同料液比(1:10、1:20、1:30、1:40)对翻白叶树药材指纹图谱色谱图及含量测定的影响,结果发现:提取方法、提取时间及料液比对翻白叶树指纹图谱色谱图及含量测定无明显改变,而体积分数75%甲醇提取主峰面积较大,峰数量较多。料液比为1:20,体积分数75%甲醇超声提取30 min为最佳提取方法。通过全波长扫描发现,原儿茶酸、原花青素 B₂、表儿茶素均在230、280 nm处有最大吸收,在280 nm下目标峰分离度高,基线平稳,故选280 nm为测定波长;考察了乙腈-0.1%冰醋酸水、乙腈-0.1%磷酸水及乙腈-0.1%甲酸水3种流动相体系,结果显示,乙腈-0.1%磷酸水系统下各峰分离效果好,故选择乙腈-0.1%磷酸水作为流动相。

为了更好地地区分产地对质量的影响,本实验运用相似度评价、聚类分析、PCA分析和PLS-DA的

表8 30批翻白叶树3种指标性成分含量测定结果

Tab.8 Content determination of three chemical components in 30 batches of *Pterospermum heterophyllum*

No.	Content/mg · g ⁻¹		
	Protocatechuic acid	Proanthocyanidins B ₂	Epicatechin
S1	0.219	0.141	0.144
S2	0.117	1.434	0.811
S3	0.167	0.897	1.291
S4	0.625	1.221	1.093
S5	0.203	1.302	2.137
S6	0.103	0.277	0.52
S7	0.153	0.878	1.408
S8	0.249	0.747	1.293
S9	0.191	1.571	2.48
S10	0.179	1.419	2.276
S11	0.153	1.78	1.912
S12	0.58	0.413	0.809
S13	1.498	0.433	0.751
S14	0.627	0.351	0.713
S15	0.499	1.653	1.811
S16	0.763	0.98	1.457
S17	1.676	0.139	0.278
S18	0.664	0.272	0.477
S19	0.485	1.249	1.861
S21	0.265	0.979	1.492
S22	0.364	2.171	2.336
S23	0.401	0.409	0.746
S24	0.482	5.134	2.261
S25	0.349	0.612	0.86
S26	0.463	5.556	3.381
S27	0.297	4.419	2.501
S28	0.186	1.825	2.467
S29	0.443	0.363	0.71
S30	0.361	1.659	1.473

化学计量学方法对不同产地翻白叶树进行质量评价研究。相似度评价可知,30批翻白叶树药材色谱图与对照指纹图谱的相似度在0.863~0.975,而对于Chen等^[13]建立的翻白叶树指纹图谱,不同批次之间相似度在0.444~0.904之间,相比之下,本研究各个产地翻白叶树相似度较高。聚类分析可知,30批翻白叶树药材被分为3类,其中S2(贵州省榕江县)、S27(河北省保定市安国市)聚为一类,S24(安徽省黄山市张济良大药房)和S26(广西壮族自治区柳州市鹿寨县中医院)聚为一类,其余贵州产地、广东产地、云南产地、海南产地、四川产地、安徽产地、湖北产地、河南产地和浙江产地聚为一类。说明产地的生态环境、气候条件等因素相关造成不同的差异性。PCA和OPLS-DA与CA结果一致,表明30批翻白叶树药材化学成分既有相似性又有差异性,采用OPLS-DA模型VIP值筛选出原花青素B₂、表儿茶素、新绿原酸是翻白叶树的差异性特征成分。通过前期对翻白叶树不同极性部位进行体外抗炎作用筛选,从乙酸乙酯部位得到的儿茶素、表儿茶素、原花青素B₂均有一定的抗炎作用,且表儿茶素与原花青素含量较高。因此本实验以原儿茶酸、原花青素B₂、表儿茶素作为翻白叶树差异特征成分进行含量测定。

由含量测定结果可知,这30批泛白叶树药材中大多数药材中原花青素B₂和表儿茶素的含量均高于原儿茶酸,S13、S14、S17、S18中原儿茶酸高于原花青素B₂和表儿茶素,分别产自贵州、江西、海南、海南;S24、S26、S27为广西产地,这3个批次原花青素B₂及表儿茶素含量远高于其他批次;其中原儿茶酸含量最高的批次S17是原儿茶素含量最低的S6的16倍,原花青素B₂含量最高的批次S26是原花青素B₂含量最低的批次S1的39倍,表儿茶素含量最高的批次S26是表儿茶素含量最低的批次S1的23倍,各批药材含量差异较大,且没有明显规律,说明市场上流通的翻白叶树药材质量差异大,而造成这种因素的原因包括生长环境(海拔、土壤、水源、光照等)、采收时间、气候、产地、贮藏时间、加工方法、炮制方法等。

本实验首次建立了翻白叶树药材中3种成分原

儿茶酸、原花青素B₂及表儿茶素的HPLC含量测定方法,为进一步完善翻白叶树的质量控制提供科学依据。

REFERENCES

- [1] Guangdong Drug Administration. *Quality Standard of Chinese Medicinal Materials of Guangdong Province* (广东省中药材质量标准). Volume 1 [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2004.
- [2] Guangxi Drug Administration. *Quality Standard of Yao Medicinal Materials in Guangxi Zhuang Autonomous Region* (广西壮族自治区药材质量标准) [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 2014.
- [3] Shanghai Municipal Health Bureau. *Shanghai Standard of Chinese Medicinal Materials* (上海中药材标准) [M]. Shanghai: Shanghai Health Bureau, 1994.
- [4] Hunan Food and Drug Administration. *Changsha; Processing Standard of TCM Decoction Pieces in Hunan Province* (湖南省中药饮片加工标准) [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 2010.
- [5] XIE Z J. *Guangdong Province Traditional Chinese Medicine Slices Processing Standards* (广东省中药饮片加工标准) [M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 2011.
- [6] Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. *Dictionary of Chinese Medicine* (中医药大词典) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006.
- [7] WANG G Q. *National Compilation of Chinese Herbal Medicine* (全国中草药汇编) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2014.
- [8] Chinese Materia Medica Editorial Committee, State Administration of Traditional Chinese Medicine. *Chinese Materia Medica* (中药材). Volume V [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999:389-390.
- [9] Jiangsu Provincial Institute of Botany. *Xinhua Compendium of Materia Medica* (新华本草纲要). Book 2 [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1991:299.
- [10] XIAO X J, LI M M, GU J F, et al. Comprehensive evaluation of germplasm quality of *Spatholobus suberectus* Dunn based on combinative method of HPLC fingerprint, chemical pattern recognition and quantitative analysis of multicomponents [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2023, 58(12):1123-1132.
- [11] LU H X, WU F Y, JIANG M X, et al. Tzumin A and B, two new lignan derivatives from the barks of *Sassafras tzumu*. [J]. *Nat Prod Res* (天然产物研究), 2017, 31(7):829-834.
- [12] SUN Y Q, HUO J X, ZHONG S, et al. Chemical structure and anti-inflammatory activity of a branched polysaccharide isolated from *Phellinus baumii* [J]. *Carbohydrate Polymers* (碳水化合物聚合物), 2021, 268:118214-118214.
- [13] CHEN J M. Study on chemical constituents of petroleum ether extract and fingerprint of root of Rhizome *Aplakia* L. [D]. Guangzhou: Jinan University, 2013.

(收稿日期:2024-04-02)