

基于 HPLC 指纹图谱与一测多评法结合的桑黄品质评价研究

彭思源^{1,2}, 邓元辉³, 丁婵^{1,2}, 孟俊华^{1,2}, 崔培梧^{1,2*} (1. 湖南中医药大学药学院菌物药研究室, 长沙 410208; 2. 国家中医药管理局中药药性与药效三级科研实验室, 长沙 410208; 3. 长沙时代基因医学检验实验室, 长沙 410000)

摘要: **目的** 基于 HPLC 特征图谱, 建立同时测定桑黄中原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、紫萁酮和牛奶树碱 5 种成分含量的一测多评方法 (quantitative analysis of multi-components with a single-marker, QAMS), 对不同来源的桑黄药材进行品质评价研究。 **方法** 收集了 3 个种源地共 10 个批次的桑黄药材样品, 采用 Wondasil C₁₈ Superb 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量 20 μL, 采用变波长程序, 建立内参物原儿茶醛与原儿茶酸、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱的相对校正因子并进行了相对校正因子的耐用性考察。采用外标法 (external standard method, ESM) 和 QAMS 法分别测定不同来源共 10 批桑黄药材中该 5 种成分的含量以验证 QAMS 法的准确性。 **结果** 采用 SPSS 与 Origin Pro 进行主成分分析、相似度分析和聚类分析。结果显示, 5 种成分专属性、精密度、重复性、稳定性、线性范围 ($r^2 > 0.999 0$) 均良好、平均加样回收率 99.74% ~ 102.78%, RSD 1.34% ~ 2.92%。以原儿茶醛为内参物, 原儿茶酸、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱的平均相对校正因子分别为 0.851 9、1.446 9、1.615 7、0.774 7; *t* 检验结果表明, ESM 法与 QAMS 法测定结果差异不显著。通过统计学分析实现了数据集的可视化, 聚类分析发现西藏和广东产地的桑黄样品呈现一定的地域差异, 但也发现了源于广东和长白山的个别桑黄样品与源于西藏的桑黄样品聚为一类的现象, 意味着不能仅仅依据产地评价桑黄品质优劣, 因为可能存在基源不清或品种混淆的状况。不同桑黄样品中牛奶树碱、原儿茶醛、紫萁酮的含量差异较大, 且此 3 类成分对主成分的贡献较多, 可能为桑黄的主要质量标志物。 **结论** 该研究基于 HPLC 指纹图谱建立的 QAMS 法简单、经济、实用, 可以实现对桑黄中主要成分的快速、科学分析, 也为其种质资源的品质评价提供了一定的科学依据。

关键词: 桑黄; 指纹图谱; 一测多评法; 外标法; 相对校正因子; 质量评价

doi: 10.11669/cpj.2024.06.009 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)06-0531-10

Quality Evaluation of *Sanghuangporus* by HPLC Fingerprint Combined with Quantitative Analysis of Multi-Components with a Single-Marker Method

PENG Siyuan^{1,2}, DENG Yuanhui³, DING Chan^{1,2}, MENG Junhua^{1,2}, CUI Peiwu^{1,2*} (1. Mycomedicine Research Lab, College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Tertiary Research Lab of TCM Property and Efficacy, National Administration of TCM, Changsha 410208, China; 3. Changsha Agen Medical Analytical Lab, Changsha 410000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a quantitative analysis of multi-components by a single-marker method (QAMS) for simultaneous determination of protocatechuic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, caffeic acid, osmundacetone, and hispidin in *Sanghuangporus* based on HPLC fingerprint analysis of *Sanghuangporus* samples. **METHODS** The analysis was performed on an HPLC system equipped with Wondasil C₁₈ Superb column (4.6 nm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid solution, and gradient elution procedure was employed. The flow rate was set at 1.0 mL · min⁻¹, column temperature was maintained at 25 °C, and the sample injection volume was 20 μL. The relative correction factors of protocatechuic acid, caffeic acid, osmundacetone and hispidin were calculated with 3,4-dihydroxybenzaldehyde as the internal reference, and the durability of the established method were also investigated. The contents of these five compounds in ten batches of *Sanghuangporus* from different producing areas or batches were determined by external standard method (ESM) and QAMS method, respectively. **RESULTS** SPSS, SIMCA and Origin Pro software were employed for principal components assay, similarity evaluation and cluster analysis. The specificity, precision, repeatability, stability and linear range ($r^2 > 0.999 0$) of the five components were all good. The average recovery was between 99.74% - 102.78% and RSD value was between 1.34% - 2.92%, respectively. Then 3,4-dihydroxybenzaldehyde was chosen as the internal reference for calculating the correction factors for the other four components, the average relative correction factors of protocate-

基金项目: 国家自然科学基金资助(81973211/C0033375); 湖南中医药大学研究生创新课题资助(校行研字[2022]20号-87); 湖南中医药大学中药炮制传承基地开放基金资助(2022ZYPZ07); 湖南中医药大学“十四五”重点学科-生物工程学科项目资助(校行发规字[2023]2号)

作者简介: 彭思源, 女, 硕士研究生 研究方向: 菌物药活性物质挖掘及生物合成 * **通讯作者:** 崔培梧, 男, 副教授, 硕士生导师 研究方向: 中药药效物质挖掘、分析及生物合成 Tel: (0731) 88458225

chelic acid, caffeic acid, osmundacetone, and hispidin were 0.851 9, 1.446 9, 1.615 7, and 0.774 7, respectively. Student's t-test results showed that there was no significant difference between the data analyzed by ESM method and the data obtained from QAMS method. Through data visualization analysis, the cluster analysis indicated that samples from Tibet and samples from Guangdong were clustered in significantly different categories. However, there was still one batch *Sanghuangporus* sample from Guangdong and one batch from Changbai mountains showing more similarities to Tibet category. This indicated that there was a certain relationship between the quality of *Sanghuangporus* and the origins of *Sanghuangporus* samples, but there were still other factors affecting the quality of *Sanghuangporus* such as the confusing species or unclear basic sources. The contents of hispidin, 3,4-dihydroxybenzaldehyde and osmundacetone in different samples showed significant differences, indicating that these three components might be the main quality markers of *Sanghuangporus* for giving more contributes to the principal components. **CONCLUSION** Based on HPLC fingerprint, the method of QAMS established in this study is a simple, economical and practical method with scientific and applicable characteristics for evaluating the quality of *Sanghuangporus* efficiently and scientifically, which can also provide a certain scientific basis for the quality evaluation of its germplasm resources.

KEY WORDS: *Sanghuangporus*; fingerprint analysis; quantitative analysis of multi-components with a single-marker; external standard method; relative correction factor; quality evaluation

桑黄为锈革孔菌目桑黄孔菌属真菌 (*Sanghuangporus sanghuang*) 的干燥子实体^[1], 古时别称“桑耳、桑臣、桑鸡、木麦、胡孙眼等”, 早于东汉时期便以桑耳之名记载于《神农本草经》, 在唐代的《药性论》首次出现“桑黄”之名, 其药性功效在历代古籍和医学论著中均有记载, 具有活血止血、滋阴补肾、软坚散结、止泻解毒之功效^[2], 常用于治疗妇科疾病、虚损性疾病、血证以及癥瘕积聚病^[3]。桑黄常散生在喜光的山区和较低温的环境, 在非洲、中美洲及东亚地区的中国、韩国和日本等国家均有分布, 国内在西藏、四川、云南、湖北、湖南、江西、浙江、山东、山西、河南、甘肃等多地均已发现野生桑黄^[4]。桑黄中主要化学成分有酚类、多糖、黄酮、生物碱、有机酸、三萜、木脂素及氨基酸类等^[5-6], 具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖、降血脂、抗病毒、抗炎、调节免疫功能、抗痛风和神经保护等药理活性^[7-9]。

近年来, 桑黄的化学成分和药理活性已经得到深入研究, 但其质量评价和控制相关研究报道甚少, 《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 尚未收录桑黄品种, 仅在湖北、安徽、甘肃和吉林的地方中药材标准有记载, 这限制了桑黄质量评价和控制的规范化。桑黄药材品质易受产地和加工炮制方式的影响, 且一直存在物种基源不清与拉丁学名使用混乱的问题^[10], 致使实际应用过程存在品种混乱、质量稳定性差等现象, 对桑黄资源的开发及用药规范带来干扰。因单一成分难以全面评价中药质量的优劣, 通过多指标同步质量控制反映中药质量已成为当前中药质量评价领域的共识。王智民等^[11]提出的一测多评法 (quantitative analysis of multi-components with a single-marker, QAMS) 技术因为通过

测定易得、廉价、有效的 1 个成分 (内参物) 从而实现多个成分含量的同步分析, 是一种较为简单和有效的中药质量控制模式, 已经在该领域多有应用^[12-14]。

检索文献发现, 目前基于光谱和色谱分析的桑黄质量控制和含量测定已有报道^[15-16], 主要围绕黄酮类和少部分桑黄代表性酚酸类成分, 如: 纤孔菌素 A (inoscavin A) 和 hypholomine B; 大多通过选择单一成分作为对照, 建立指纹图谱共有峰, 以期应用于桑黄的种属鉴别和质量评价^[17-20]; 但暂未见对桑黄多组分综合分析进行深入研究的报道, 而多组分、多靶点是中药、民族药发挥药效的特色机制。因此, 为更好地利用桑黄, 本研究拟通过高效液相色谱 (HPLC) 结合外标法 (external standard method, ESM) 和 QAMS 法建立可用于同时分析桑黄中包括多酚类、酚酸、有机酸类等共 5 种成分含量的分析策略, 以期对桑黄及其衍生产品的质量评价以及相关评价体系提升提供参考。

1 实验材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪、Agilent 5 TC-C₁₈ (2) 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (美国安捷伦科技公司); Wayeal 3100 型高效液相色谱仪 (安徽皖仪科技股份有限公司); EX224ZH 型万分之一电子分析天平 (美国奥豪斯公司); JS-40 型超声波清洗仪 (常州鸿泽实验科技有限公司); Wondasil C₁₈ Superb 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 日本岛津公司); Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 美国沃特世公司)。

1.2 药品与试剂

对照品原儿茶酸(批号:RP190605,质量分数99.99%)、原儿茶醛(批号:RH456013,质量分数98.00%)、咖啡酸(批号:RP20061,质量分数99.32%)、紫萸酮(批号:AF21052102,质量分数98.00%)、牛奶树碱(批号:AFBJ2606,质量分数98.00%);乙腈为色谱纯,水为怡宝纯净水,其余试剂均为分析纯。10批源于吉林长白山、西藏、广东等产地的桑黄样品(图1,表1),菌盖呈半球形、马蹄形或不规则形状,表面均呈龟裂、木质化,菌肉为浅咖啡色(长白山地区)、锈褐色(广东地区)或深咖啡色(多为西藏地区)。

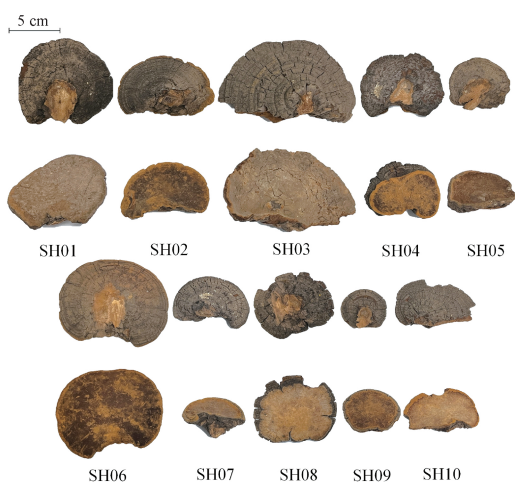


图1 10批桑黄样品菌盖图

Fig. 1 Pileus diagram of 10 batches of *Sanghuangporus* samples

表1 10批桑黄样品基本信息

Tab. 1 Information of 10 batches of *Sanghuangporus* samples

No.	Origin(in Chinese)	Lot No.
SH01	Changbai mountains(吉林长白山)	20220820
SH02	Xizang(西藏)	20220910
SH03	Xizang(西藏)	20220910
SH04	Xizang(西藏)	20220828
SH05	Xizang(西藏)	20230420
SH06	Guangdong(广东)	20230519
SH07	Xizang(西藏)	20230420
SH08	Guangdong(广东)	20220428
SH09	Guangdong(广东)	20220915
SH10	Guangdong(广东)	20230510

2 方法

2.1 色谱分析条件

色谱柱为Wondasil C₁₈ Superb(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水(B),梯度洗脱:0~12 min,13.0% A;12~21 min,13.0%~20.0%

A;21~28 min,20.0% A;28~50 min,20.0%~40.0% A;50~54 min,40.0%~55.0% A;54~56 min,55.0%~58.0% A;56~60 min,58.0% A;60~67 min,58.0%~65.0% A;67~70 min,65.0%~13.0% A。检测波长0~8 min,260 nm;8~14 min,240 nm;14~16 min,300 nm;16~30 min,344 nm;30~35 min,380 nm;35~47 min,370 nm;47~70 min,415 nm。

2.2 对照品溶液制备

分别取对照品各适量,精密称定,用体积分数50%甲醇溶解制成含原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、紫萸酮和牛奶树碱浓度分别为0.159 4、0.209 5、0.178 6、0.153 4、0.287 4 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液,作为混合对照品溶液1#备用。分别量取混合对照品溶液1# 0.80、0.67、0.57、0.50、0.44、0.40 mL,置1 mL量瓶中,加体积分数50%甲醇至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液2#~7#[21],供相对校正因子(*f*)测定使用。

2.3 供试品溶液的制备

取桑黄样品粉末2.0 g(过60目筛),精密称定,置于100 mL干燥具塞锥形瓶中,精密加入体积分数50%甲醇10 mL,称定质量,60℃加热回流处理30 min,放冷,再称定质量,用体积分数50%甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.22 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 线性关系考察

将混合对照品溶液1#依次稀释至4/5、3/5、2/5、1/5、1/10、1/20、1/50,分别精密吸取20 μL,注入高效液相色谱仪,测定对照品的色谱峰面积。以各对照品浓度(ρ)对相应峰面积(γ)进行线性回归分析,得到桑黄中5种成分的回归方程及线性范围(表2)。

2.5 专属性考察

分别精密吸取含有原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、紫萸酮和牛奶树碱的混合对照品溶液5#、桑黄供试品溶液(SH07样品)、空白供试品溶液(不含桑黄样品的提取液),按本实验色谱条件测定。

2.6 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液(SH07样品)20 μL,连续进样6次,每次20 μL,记录峰面积,计算相对标准偏差(RSD)值。

2.7 重复性试验

精密称取同一批号样品(SH07样品),按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别注入20 μL进样分析,记录色谱图,以原儿茶醛峰为参照峰,记

录各色谱峰与原儿茶酸峰相对保留时间与相对峰面积,计算 RSD 值。

2.8 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(SH07 样品)20 μL ,分别于0、2、4、8、12、24 h 进样分析,记录各个测定时间点的峰面积,计算 RSD 值。

2.9 加样回收率试验

精密称取适量已知含量样品(SH07 样品),按“2.3”项下方法将称样量减半平行制备6份供试品溶液,并以1:1的比例加入定量对照品进样分析,计算原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、紫萸酮、牛奶树碱的平均加样回收率。

2.10 HPLC 指纹图谱的研究及相似度评价

分别取10个不同批次的桑黄药材样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下条件进样分析,分别记录药材样品和对照品的色谱图,将10个批次的HPLC图导入至《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》进行分析,得到其相似度数据,进行分析。

2.11 相对校正因子(f)的测定

在建立的梯度洗脱HPLC色谱条件下,取不同浓度的混合对照品溶液2#~7#按“2.1”项下条件分别进样,记录各成分的峰面积,以原儿茶酸为内参物,计算待测成分与内参物的 f 值(公式1^[22])。

$$f = (A_i/c_i)/(A_s/c_s) \quad \text{公式(1)}$$

式中, A_i 为待测成分峰面积, c_i 为待测成分摩尔浓度, A_s 为内参物峰面积, c_s 为内参物浓度。

不同色谱柱对 f 的影响:取混合对照品溶液,进样量为20 μL ,分别考察柱1:Wondasil C₁₈ Superb 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、柱2:Agilent 5TC-C₁₈(2) 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、柱3:Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)共3根色谱柱对桑黄中5种成分 f 的影响。

不同柱温对 f 的影响:采用Wondasil C₁₈ Superb 色谱柱,分别在不同柱温(20、25、30 $^{\circ}\text{C}$)条件下测定桑黄中5种成分的 f 值。

不同流动相体积流量对 f 值的影响:采用Wondasil C₁₈ Superb 色谱柱,考察不同流速(0.8、1.0、1.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)对桑黄中5种成分 f 值的影响。

不同仪器对 f 值的影响:采用Wondasil C₁₈ Superb 色谱柱,考察不同仪器(Agilent 1200、Wayeal 3100)对桑黄中5种成分 f 值的影响。

2.12 色谱峰定位参数

色谱峰的准确定位是保证QAMS法应用的前

提,色谱峰的定位方法有保留时间差法(Δt)和相对保留时间法(t_R),按公式2~3计算^[23-24](式中 t_s 为内参物保留时间, t_i 各待测成分保留时间)。本实验以原儿茶醛为内参物,取混合对照品溶液进样20 μL ,考察不同色谱柱[Wondasil C₁₈ Superb 色谱柱,Agilent 5 TC-C₁₈(2) 色谱柱、Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱]、不同柱温、不同流速时原儿茶醛、咖啡酸、紫萸酮、牛奶树碱相对于原儿茶醛的 Δt 和 t_R 。

$$\Delta t = t_s - t_i \quad \text{公式(2)}$$

$$t_R = t_i/t_s \quad \text{公式(3)}$$

2.13 QAMS 法与 EMS 法测定结果比较

采用本实验建立的变波长-梯度洗脱HPLC法对10批桑黄饮片样品进行分析,首先采用ESM法分别计算出桑黄样品中原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、紫萸酮、牛奶树碱5种成分的含量;然后以原儿茶醛为QAMS法的内参物,依据实验测得的各成分对应的平均相对校正因子 f ,参照公式4计算其余4种成分的含量^[14,25]。

$$f = (A_i/W_i)/(A_s/W_s) \quad \text{公式(4)}$$

式中 W_i 为待测成分含量, A_i 为待测成分峰面积, W_s 为内参物含量, A_s 为内参物峰面积, f 为待测成分与参照物的相对校正因子,分别计算出其余4个成分的含量。将ESM法实测值与QAMS法计算值进行配对 t 检验^[26]。

2.14 定量和统计学上的多变量方法

以桑黄10批样品中5种成分质量分数为变量,导入Origin Pro 2021软件进行样品相关性分析、层次聚类分析,导入SPSS 26.0、SIMCA 14.1软件进行主成分分析,绘制相关系数图、聚类分析热图、计算主成分分析主成分特征值、方差贡献率及因子载荷矩阵。聚类分析时,行标签为样本编号,列标签为5种成分名称,对行数据进行标准化使得行数据具有可比性,并采用平均聚类方法、曼哈顿距离类型。

3 结果

3.1 方法学验证结果

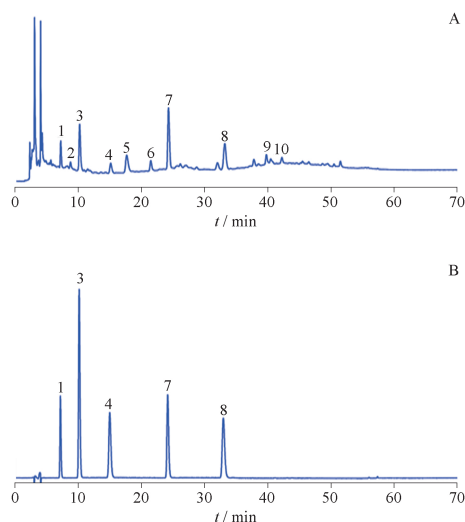
3.1.1 线性关系考察 结果显示,此5种成分的线性关系良好, r^2 均大于0.9990,见表2。

3.1.2 专属性考察 结果表明各成分保留时间基本一致,特征峰紫外吸收光谱高度吻合、各色谱峰分离度均大于1.5,表明方法专属性良好,见图2。

表2 桑黄中5种成分的线性回归方程

Tab. 2 Linear regression equations of five components from *Sanghuangporus*

Component	Regression equation	r^2	Linearity range/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
Protocatechuic acid	$y = 17.635x - 46.299$	0.999 4	4.72 - 236.00
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	$y = 20.013x - 4.543 7$	0.999 3	15.00 - 300.00
Caffeic acid	$y = 29.33x - 28.662$	0.999 7	4.00 - 200.00
Osmundacetone	$y = 33.495x - 81.005$	0.999 8	4.00 - 200.00
Hispidin	$y = 15.542x - 7.919 3$	0.999 8	4.00 - 200.00



1 - 原儿茶酸; 3 - 原儿茶醛; 4 - 咖啡酸; 7 - 紫萁酮; 8 - 牛奶树碱; 2, 5, 6, 9, 10 - 未知。

1 - Protocatechuic acid; 3 - 3,4 - Dihydroxybenzaldehyde; 4 - Caffeic acid; 7 - Osmundacetone; 8 - Hispidin; 2, 5, 6, 9, 10 - Unknown.

图2 桑黄样品(A)及混合对照品(B)的高效液相色谱图(HPLC)

Fig. 2 HPLC chromatograms of *Sanghuangporus* samples (A) and mixed reference substances (B)

3.1.3 精密度实验 原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱色谱峰峰面积 RSD 分别为 1.07%、0.70%、2.71%、0.42%、2.21%，表明仪器的精密度良好。

3.1.4 重复性实验 原儿茶酸、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱峰相对于原儿茶醛峰的相对保留时间 RSD 分别 0.66%、0.42%、0.83%、1.04%，相对峰面积 RSD 分别为 2.93%、1.60%、2.96%、2.66%，表明方法重复性良好。

3.1.5 稳定性实验 原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱峰面积 RSD 分别为 1.84%、1.93%、4.25%、1.02%、1.35%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.1.6 加样回收率实验 原儿茶酸、原儿茶醛、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱的平均加样回收率分别为

102.78%、100.81%、100.15%、101.36%、99.74%，RSD 分别为 1.34%、2.82%、2.92%、1.86%、2.80%。

3.2 相对校正因子(f)的测定

结果表明,原儿茶醛作为内参物时原儿茶酸、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱的 f 分别为 0.851 9、1.446 9、1.615 7、0.774 7, RSD 均小于 2%。

3.3 f 的耐用性评价

3.3.1 不同色谱柱对 f 的影响 原儿茶醛作为内参物时原儿茶酸、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱的 f 分别为 0.835 3、1.431 4、1.582 5、0.773 0。RSD 均小于 3%，表明色谱柱更换对各成分 f 无显著性影响。

3.3.2 不同柱温对 f 的影响 原儿茶醛作为内参物时原儿茶酸、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱的 f 分别为 0.835 9、1.435 2、1.583 7、0.773 5。RSD 均小于 3%，表明柱温对各成分的 f 值无显著性影响。

3.3.3 不同流动相体积流量对 f 值的影响 原儿茶醛作为内参物时原儿茶酸、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱的 f 分别为 0.834 8、1.432 3、1.584 2、0.773 5。RSD 均小于 3%，表明不同体积流量对各成分 f 值无显著性影响。

3.3.4 不同仪器对 f 值的影响 原儿茶醛作为内参物时,考察 Agilent 1200 和 Wayeal 3100 两台仪器对原儿茶酸、咖啡酸、紫萁酮、牛奶树碱 f 值的影响,计算所得 4 种成分的 f 值分别为 0.841 1、1.445 1、1.639 3、0.775 5 和 0.881 1、1.465 5、1.673 6、0.776 6,同一成分在两台仪器上对应的 f 因子 RSD 均小于 3%，表明不同仪器对各成分 f 值无显著性影响。

3.4 色谱峰定位参数

考察结果表明采用 t_R 较 Δt 更好,其 RSD 均小于 0.1% (表 3),因此采用相 t_R 值对色谱峰定位。

3.5 QAMS 法与 EMS 法测定结果比较

结果显示, P 值均 > 0.05 ,表明 2 种方法测定结果之间无显著差异,提示建立的 QAMS 法有较好的准确性和可行性,见表 4。

表3 不同色谱柱、不同柱温、不同流速条件下桑黄样品中4种成分的保留时间差(Δt)和相对保留时间值(t_R)

Tab. 3 Retention time difference and relative retention time values of the four components from *Sanghuangporus* under different chromatographic column, column temperature and flow velocity conditions

Project	Factor	Protocatechuic acid		Caffeic acid		Osmundacetone		Hispidin	
		Δt	t_R	Δt	t_R	Δt	t_R	Δt	t_R
Chromatographic column	Wondasil C ₁₈ Superb	2.977	0.707	4.837	1.476	14.019	2.380	22.823	3.247
	Agilent 5 TC-C ₁₈	3.280	0.687	4.631	1.441	13.992	2.334	21.793	3.077
	Waters-Symmetry-C ₁₈	3.091	0.648	2.746	1.313	13.135	2.495	18.421	3.097
Column temperature/°C	20	3.066	0.706	5.209	1.499	14.243	2.366	23.485	3.252
	25	2.977	0.707	4.837	1.476	14.019	2.380	22.823	3.247
	30	2.856	0.711	4.424	1.448	13.660	2.383	21.733	3.200
$v/ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	0.8	3.004	0.708	5.009	1.487	14.156	2.377	23.244	3.261
	1.0	2.977	0.707	4.837	1.476	14.019	2.380	22.823	3.247
	1.2	2.553	0.698	3.980	1.471	14.088	2.666	22.391	3.648
Average value		2.979	0.700	4.456	1.446	13.807	2.394	21.946	3.211
RSD/%		0.07	0.03	0.17	0.04	0.02	0.04	0.07	0.05

表4 一测多评法(QAMS)和外标法(ESM)测定桑黄样品中5种成分的含量

Tab. 4 Contents of five components by QAMS and ESM in *Sanghuangporus*

No.	3,4-Dihydroxybenzaldehyde		Protocatechuic acid		Caffeic acid		Osmundacetone		Hispidin	
	/mg · g ⁻¹		/mg · g ⁻¹		/mg · g ⁻¹		/mg · g ⁻¹		/mg · g ⁻¹	
	ESM	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	
SH01	0.378 3	0.174 1	0.175 2	0.081 2	0.083 4	0.292 4	0.297 2	0.226 0	0.224 5	
SH02	0.397 8	0.177 2	0.178 8	0.078 9	0.080 7	0.376 3	0.390 1	0.360 1	0.360 6	
SH03	0.352 3	0.190 2	0.194 4	0.085 1	0.088 1	0.270 0	0.272 5	0.178 0	0.175 8	
SH04	0.512 4	0.240 8	0.253 8	0.086 9	0.090 0	0.274 8	0.277 3	0.234 3	0.232 5	
SH05	0.609 2	0.281 3	0.301 5	0.077 2	0.078 7	0.241 0	0.239 7	0.211 1	0.208 8	
SH06	0.421 9	0.287 2	0.309 0	0.065 8	0.065 4	0.218 6	0.215 3	0.360 1	0.360 5	
SH07	0.324 9	0.172 4	0.173 3	0.075 2	0.076 5	0.323 3	0.331 8	0.398 9	0.400 5	
SH08	0.215 7	0.106 7	0.095 8	0.048 5	0.045 5	0.192 4	0.187 3	0.695 7	0.704 8	
SH09	0.289 0	0.134 3	0.128 2	0.049 5	0.046 5	0.181 6	0.174 7	0.498 4	0.502 1	
SH10	0.240 6	0.109 3	0.098 7	0.056 3	0.054 6	0.214 7	0.211 9	0.622 5	0.629 5	
Student's <i>t</i> test		0.895 8		0.885 0		0.853 1		0.964 4		

3.6 相似度评价

以SH07样品为参照图谱,经多点校正和Mark峰匹配后生成对照指纹图谱(R),对照指纹图谱和10个批次的HPLC指纹图谱见图3(SH01~SH10)。共标定10个共有峰,通过与混合对照品溶液的色谱图比对,指认出5种共有峰,分别为原儿茶酸(1号峰)、原儿茶醛(3号峰)、咖啡酸(4号峰)、紫萹酮(7号峰)、牛奶树碱(8号峰)。以生成的对照指纹图谱为标准,计算10个批次药材样品的相似度。结果显示,10个批次的药材样品与桑黄对照指纹图谱的相似度范围为0.897~0.986,药材样品与对照指纹图谱相似度均达0.8以上,表明不同批次的药材具有良好的相似性。采用ESM法测定桑黄10批样品中5种成分的质量分数,以其作为变量,导入Origin 2021软件进行样品相关性分析;根据5种成分质量分数数据绘制的相关系数图显示,除去SH05和

SH10呈负相关,其余样品全部呈现正相关,整体相似度在0.018~0.99之间,相似度有较大波动情况;其中样品SH03~SH05同SH08~SH10的相似度相对较低,表明不同产地不同批次的桑黄样品质量存在着较大差异。见图4。

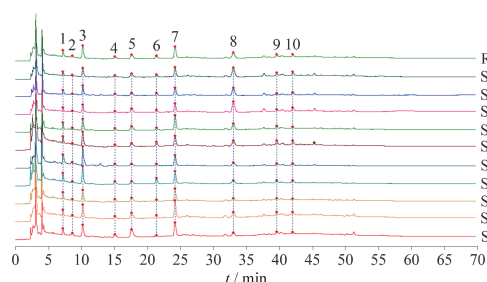


图3 10批桑黄样品的指纹图谱

Fig. 3 Superimposed HPLC fingerprints of 10 batches of *Sanghuangporus*

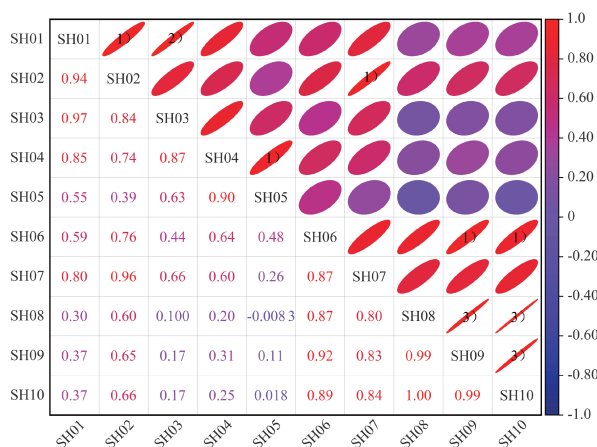


图4 10批桑黄样品的相关系数图

红色 - 正相关; 蓝色 - 负相关; 圈的朝向代表正负相关性, 圈越大越圆表示相关系数绝对值越小, 数值越大代表相关性越接近; P 值代表样品相关性显著程度, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ 。

图4 10批桑黄样品的相关系数图

Fig. 4 Correlation coefficient diagram of 10 batches of *Sanghuangporus*

3.7 聚类分析

基源、产地等都是影响药材质量的重要因素, 其中不同产地的生长环境对药材的质量及代谢产物的积累具有直接影响, 故而在相似度评价的基础上, 进一步依据所测桑黄样品中5种成分的质量常数作为变量导入 Origin 2021 软件进行聚类分析^[27], 从而建立样本间的质量评价。行标签为10个批次桑黄药材编号, 列标签为5种桑黄成分名称, 分别对行(图5)和列进行标准化(图6), 色带由红至橙表示5种成分含量在不同批次桑黄药材中的差异程度。图5结果显示, 可将10批桑黄样品分为两大类, 西藏产地和广东产地的桑黄各自聚为一类, 说明桑黄药材存在一定的地域性差异, 地理环境接近的区域生长的桑黄质量比较相似; 而在西藏大类中, 出现了长白山产地的SH01样品与广东产地的SH06样品, 说明同一产地桑黄药材可能存在基源不清或基源混淆的问题, 有待进一步考证。图6结果显示, 不同批次的桑黄样品中牛奶树碱含量均很高, 其中样品SH06~SH10较为显著; 紫萹酮含量次之, 其中SH01~SH04、SH07较为显著; 原儿茶醛含量位于第三, SH04和SH05较为显著。结合相似度进行分析, 广东产地的桑黄样品牛奶树碱含量较高, 西藏产地的样品紫萹酮含量较高, 结果表明不同产地的桑黄一

定程度上可以通过酚酸类物质及其含量的多少进行区分。

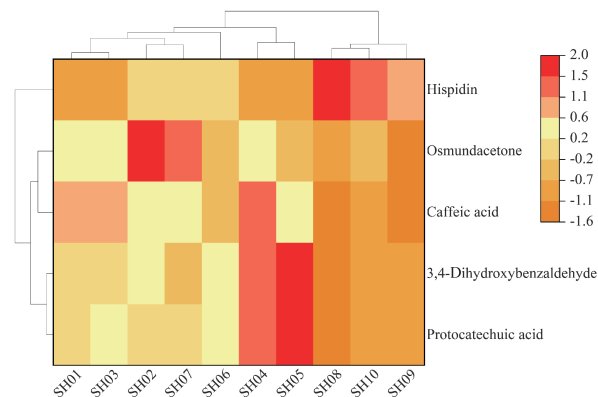


图5 10批桑黄样品中5种成分的含量聚类分析(标准化行)

Fig. 5 Heat map and HCA analysis of 5 component in 10 batches of *Sanghuangporus* (standardization line)

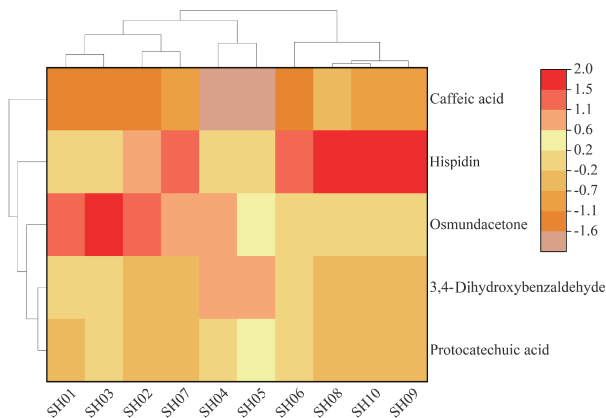


图6 10批桑黄样品中5种成分的含量聚类分析(标准化列)

Fig. 6 Heat map and HCA analysis of 5 component in 10 batches of *Sanghuangporus* (standardization column)

3.8 主成分分析 (principal component analysis, PCA)

将所测桑黄样品10个共有峰的峰面积为原始数据进行标准化处理后导入 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析。分析结果(图7)可知10批样品均在95%置信区间内, 其中SH08~SH10分布相对集中, SH07、SH02~SH05分布相对集中, SH01~SH07分布相对集中, 与聚类分析结果基本一致。

以所测桑黄样品5种成分的质量常数为原始数据进行标准化处理后导入 SPSS 26.0 软件通过降维进行因子分析, 其结果满足各变量间的相关系数 > 0.3、KMO 数值 ≥ 0.6、显著性 Sig 数值 ≤ 0.05, 说明

各变量间存在关联,可进行成分分析,结果见表5~6,第一主成分和第二主成分的特征根分别为3.787、0.865;其能够解释的总变异分别为75.73%、17.30%,第二主成分的累积贡献达93.03%,远远高于85%,可代表桑黄样品93.03%的信息;将计算所得的主成分得分取绝对值进行评

价,第一主成分的信息主要来源于牛奶树碱、紫萁酮、原儿茶醛,第二成分的信息主要来源于原儿茶醛、牛奶树碱和原儿茶酸;特征向量越大,原始变量对主成分的贡献信息就越多。因此,桑黄中牛奶树碱、原儿茶醛、紫萁酮或可作为质量标准含量测定项成分。

表5 10批桑黄样品的主成分特征值与方差贡献度

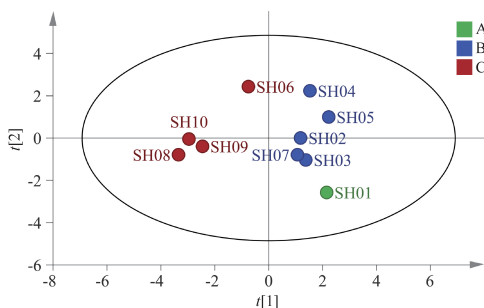
Tab. 5 PCA eigenvalues and variance contribution rate in 10 batches of *Sanghuangporus*

Principal component	Initial eigenvalue			Extract the sum of loads squared		
	Eigen value	Variance contribution rate/%	Cumulative variance contribution rate/%	Eigen value	Variance contribution rate/%	Cumulative variance contribution rate/%
1	3.787	75.733	75.733	3.787	75.733	75.733
2	0.865	17.299	93.032	0.865	17.299	93.032

表6 10批桑黄样品的主成分因子载荷阵

Tab. 6 PCA factor loading matrix in 10 batches of *Sanghuangporus*

Component	First principal component	Second principal component
Protocatechuic acid	0.221 3	0.597 2
3,4-Dihydroxybenzaldehyde	0.298 4	1.877 8
Caffeic acid	0.261 2	0.273 9
Osmundacetone	0.581 9	-0.482 6
Hispidin	0.646 5	-1.675 5



A - 长白山产地; B - 西藏产地; C - 广东产地。

A - Changbai mountains; B - Xizang; C - Guangdong.

图7 10批桑黄样品的主成分分析得分图

Fig. 7 Score plot for principal component analysis of 10 batches of *Sanghuangporus*

3.9 正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)

相较于PCA, OPLS-DA对相关性较小的变量更为敏感。结合聚类分析及PCA结果,将10批桑黄样品分为两大类,以10个共有峰的峰面积作为因变量,不同批次作为自变量,拟通过OPLS-DA进行分析,分析显示本次分析中的自变量拟合指数(R^2_x)

为0.759,因变量拟合指数(R^2_y)为0.988,模型预测指数(Q^2)为0.816, R^2 和 Q^2 超过0.5表示模型预测能力及稳定性较好,拟合结果可接受,结果见图8A,其相关性亦与聚类分析结果基本一致。再采用变量重要性投影值(VIP值)筛选差异成分,以VIP>1为条件共筛选出7个化合物,按大小排序依次为:共有峰4(咖啡酸)、共有峰8(牛奶树碱)、共有峰10(未知)、共有峰2(未知)、共有峰7(紫萁酮)、共有峰1(原儿茶酸)、共有峰3(原儿茶醛),均为引起不同批次不同基源样品质量的主要成分,结果见图8B。通过200次置换检验(permutation test),见图8C,回归线与纵轴的相交点小于零,说明该模型不存在过拟合,模型验证有效,认为该结果可用于桑黄药材品质的鉴别分析。

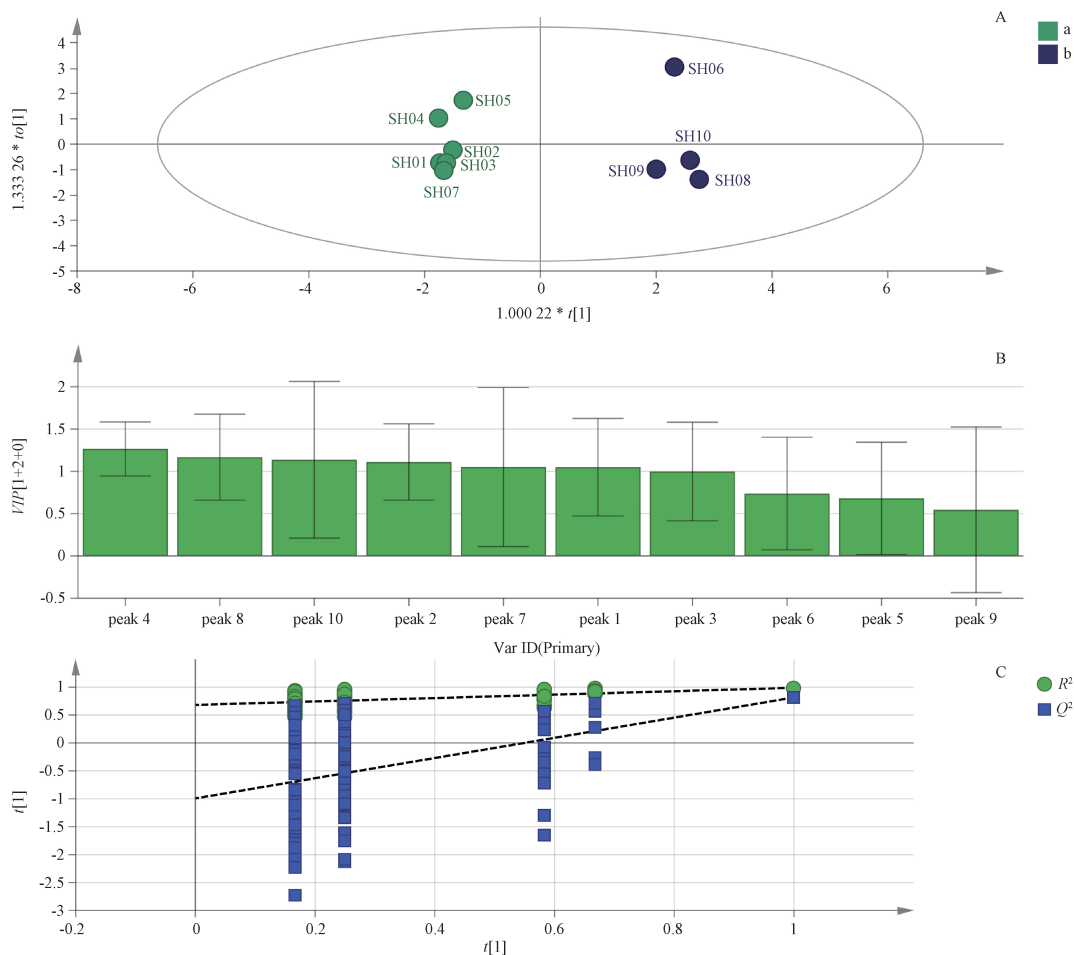
4 讨论

本研究通过单因素实验对不同提取溶剂(体积分数10%、25%、50%、70%甲醇、50%乙醇和纯水)、不同料液比(体积比1:5、1:10、1:25)、不同提取方式时间(加热回流、超声)、不同流动相水相组成(0.1%甲酸、0.1%磷酸)进行考察,以峰面积的个数、峰面积的大小最终选定以体积分数50%甲醇作为提取溶剂、料液比1:5、60℃加热回流30min作为样品的提取方法。综合此色谱洗脱方法流动相水相比比例较大,因此,此研究选择了耐水性更好的Wondasil C₁₈ Superb色谱柱。而在流动相中有机相的选择中,乙腈的强度因子高于甲醇,在此研究中洗脱速率明显较甲醇更好;在水相的选择中,当酸浓度达到千分之一时,能一定程度抑制桑黄成分的水解电离,减少色谱峰的拖尾。因此选择乙腈-0.1%甲

酸水为流动相。

桑黄中酚酸类化合物的紫外最大吸收波长迥然不同,设置单一波长只能满足单一物质达到最大吸收波长,也未达到桑黄中有机酸成分的最大吸收波长,且考虑色谱图整体基线受末端吸收的影响,因此设计了变波长程序。此外,本实验中相对校正因子 f 考察项单因素的变化会引起色谱峰保留时间的变

化。因此,目标成分峰将偏移出所设定的波长时间范围内,从而引起峰面积的变化,故本实验在进行影响 f 的单因素实验考察项中,根据实际情况改变了变波长范围的时间,使得所有成分色谱峰均控制在特定光谱波长下;同时,在影响 f 单因素实验考察项中发现,因素的改变虽对 f 影响较小,但是会影响桑黄供试样品色谱峰的分离度。



a - 图7中正X轴的桑黄样品;b - 图7中负X轴的桑黄样品。

a - *Sanghuangporus* samples with the positive values on X-axis in Fig. 7; b - *Sanghuangporus* samples with the negative values on X-axis in Fig. 7.

图8 10批桑黄样品的正交偏最小二乘判别分析的评分图(A)、VIP图(B)和置换检验图(C)

Fig. 8 Score plot (A), VIP plot (B) and permutation test (C) for orthogonal partial least squares-discriminant analysis of 10 batches of *Sanghuangporus*

检索文献发现,目前暂未有QAMS法测定桑黄成分含量的研究,其他关于桑黄质量评价的研究也主要侧重于指纹图谱和少部分成分的含量测定,而本研究建立了内参物原儿茶醛与原儿茶酸、咖啡酸、紫萸酮、牛奶树碱的 f 值,涉及酚酸、有机酸类成分,考察了 f 的耐用性及色谱峰定位参数,并测定了10批不同产地/批次的桑黄样品。结果显示,QAMS法

含量测定数据与ESM法测定数据无显著性差异。因此,可用QAMS法代替ESM法对桑黄中此5种成分进行含量测定,能更加经济和快捷地为桑黄的质量控制做出评价。

综上所述,本研究建立了准确可靠的可同时分析桑黄多组分的HPLC方法,并对该方法进行了验证,显示所建立的方法具有较高的灵敏度、重现性和

准确性,并从所建立的 HPLC 图上指认了 5 种共有成分,建立了内参物原儿茶醛与待测成分原儿茶酸、咖啡酸、紫萸酮、牛奶树碱的 f ,通过对 10 批市售不同产地桑黄子实体中 5 种成分含量的测定,以传统 ESM 法测定结果验证 QAMS 法测定结果的准确性,并采用 SPSS、Origin Pro、SIMCA 软件对 10 批不同产地桑黄子实体样品进行相似度分析、聚类分析和主成分分析,实现了数据集的可视化和降维,为桑黄药材的质量评价和控制提供了参考。

REFERENCES

- [1] WU S H, DAI Y C. Species clarification of the medicinal fungus Sanghuang [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2020, 39(5):781-794.
- [2] WU F. An analysis of the clinical application of *Phellinus linteus* based on the excavation of ancient books [J]. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2022, 14(29):1-5.
- [3] CHENG Y P, LI X H, LIU S J, *et al.* Advances in pharmacology of *Sanghuangporus* [J]. *J Guangdong Pharm Univ* (广东药科大学学报), 2022, 38(1):137-142.
- [4] LIANG X W, LIU Y C, HUANG L H, *et al.* Advances in the genus of *Sanghuangporus* study [J]. *J Microbiol* (微生物学杂志), 2017, 37(6):98-104.
- [5] PENG R, XU R P, XIN R, *et al.* Research progress on phenol compounds in Sanghuang [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2023, 54(9):2978-2992.
- [6] WANG H, QIAN K, SI J, *et al.* Research advances on polysaccharides from Sanghuang [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2021, 40(4):895-911.
- [7] LIU X Z, WU X M, FENG L, *et al.* Research progress on immunomodulatory activity of chemical constituents in "Sanghuang" [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2023, 41(11):127-133.
- [8] LIU M H, ZENG J H. Chemical components of *Phellinus* and antitumor mechanism: a review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2023, 29(8):275-282.
- [9] LI Y H, YIN C M, FAN X Z, *et al.* *In vitro* anti-oxidant hypoglycemic and hypouricemic activities of *Sanghuangporus vaninii* extracts [J]. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技), 2022, 38(5):71-80.
- [10] WU S H, HUANG G J, CHEN Y P, *et al.* Taxonomy and development prospects of Sanghuang (*Sanghuangporus sanghuang*) [J]. *J Fungal Res* (菌物研究), 2016, 14(4):187-200, 185.
- [11] WANG Z M, GAO H M, FU X T, *et al.* Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31(23):1925.
- [12] LONG K H, LIU F, ZHANG H, *et al.* Simultaneous determination of 10 components in Guanxinshutong capsules by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 2022, 57(6):1880-1886.
- [13] XU H Y, HE C X, LUO S X, *et al.* Determination of five triterpenes in *Centellae Herba* by a combinative method of HPLC fingerprint and quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2021, 56(3):181-188.
- [14] BAO L E, CHEN H M, WU J S, *et al.* Simultaneous determination of four components in Zhachong shisanwei pills by QAMS [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2022, 57(1):69-75.
- [15] HAN S F, HE L, LIU Y Q, *et al.* Quick determination of β -glucan from *Phellinus* by fluorometry method [J]. *Mod Chem Ind* (现代化工), 2014, 34(6):156-158.
- [16] CHEN L J, CHENG J W, WEI H L, *et al.* Study on infrared fingerprint of *Sanghuangporus sanghuang* powder from different origins with cluster analysis and principal component analysis [J]. *Chin Food Addit* (中国食品添加剂), 2020, 31(9):1-7.
- [17] ZHONG S, CAO Y L, WANG W Q, *et al.* HPLC fingerprint of cultivated *Sanghuangporus* and content determination of main component [J]. *Acta Agricul Zhejiangensis* (浙江农业学报), 2023, 35(3):658-665.
- [18] DONG Y, CHEN L J, LI H Y, *et al.* Simultaneous determination of inoscavin A and hypholomine B in *Phellinus* spp. by UPLC [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2014, 32(10):2483-2485.
- [19] CHEN L J, LI H Y, SHOU D, *et al.* Comparison and determination of inoscavin A in different species of *Phellinus* spp. from different origins [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药杂志), 2014, 29(3):719-722.
- [20] YU Z M, DONG Y, LI H Y, *et al.* Study on HPLC fingerprint of ethanol extract of *Phellinus igniarius* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2014, 37(1):38-41.
- [21] YANG F, WANG Z M, ZHANG Q W, *et al.* A quantitative method for simultaneous of five ingredients with one marker in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36(17):2372-2379.
- [22] XU W W, XIE T, LVD F, *et al.* Simultaneous determination of 11 saponins components in red ginseng by QAMS method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52(7):2099-2105.
- [23] HUANG Y, DONG F Y, LI C Y, *et al.* Simultaneous quantitative determination of 10 chemical constituents in *Radix isatidis* by QAMS method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52(3):845-851.
- [24] WANG Z M, QIAN Z Z, ZHANG Q W, *et al.* A technical guide established by QAMS method [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36(6):657-658.
- [25] LUO Z L, QIU F, WEIR W, *et al.* Application of relative correction factor in multi-index determination of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2012, 43(7):1448-1452.
- [26] LUI Y F, DUAN F, ZHANG Q, *et al.* Quality evaluation of Lidanshi granules based on HPLC-QAMS and chemometrics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53(19):6044-6053.
- [27] MENG J H, DING C, PENG S Y, *et al.* Simultaneous determination of seven different components in *Cynomorium songaricum* Rupr By QAMS [J]. *Acta Pharm Sin* (药科学报), 2023, 58(9):2763-2770.

(收稿日期:2023-09-04)