

基于化学识别法的女贞子油及不同炮制品的质量评价研究

徐浩然, 李欣怡, 陈启文, 赖嘉敏, 王乐琪, 肖雪*

(广东药科大学, 广东省广州市 510006)

摘要: 采用超临界 CO₂ 萃取技术的女贞子油具有良好的保肝、养胃等作用。而女贞子药材具有生品及多种炮制品, 由此所制得的女贞子油的质量是否有差异性不得而知。因此, 本研究基于 HPLC 技术构建女贞子油指纹图谱, 结合相似度评价、主成分分析及聚类分析等化学模式识别法, 对生女贞子油、酒女贞子油、醋女贞子油以及盐女贞子油进行质量评价。HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的方法为女贞子油及不同炮制品提供了科学、可靠的质量评价方法, 对女贞子油及不同炮制品质量标准的建立具有重要作用。

关键词: 女贞子油; 质量评价; 模式识别; 指纹图谱

1 引言

化学识别法是以计算机技术为基础的一门新兴交叉技术, 近年来被广泛应用于中药鉴定、定性表征、质量控制、质量评价等研究中^{[1][3]}。女贞子属于一种木犀科女贞属药用植物女贞的干燥成熟果实^[4], 含有三萜类、不饱和脂肪酸、总磷脂等成分^{[5]-[7]}。女贞子蕴含丰富的油脂, 基于超临界 CO₂ 萃取技术分离得到的女贞子脂溶性成分群一直备受关注^{[8][10]}, 含有三萜、黄酮及油脂类等成分^{[11][13]}。然而, 中药成分复杂, 不同产地、不同批次和不同加工工艺的女贞子油之间化学差异客观存在, 可能导致药理活性上的区别从而使其临床效果出现差异^{[14][15]}。

为研究女贞子油及不同炮制品质量控制方法及建立质量控制标准^[16], 本研究拟基于 HPLC 技术构建女贞子油指纹图谱, 结合化学模式识别法(相似度评价、主成分分析及正交偏最小二乘回归分析)对不同品种女贞子油化学成分的差异进行分析, 以完善不同炮制品女贞子的油的质量评价体系。

2 实验技术流程

2.1 炮制品制备

据《中国药典》2020 年版第四部 0213 炮制通则, 分别取净生女贞子 20 批次, 置密闭容器内, 分别加入适量药材量 20%黄酒、米醋、食盐, 与净生女贞子拌匀, 闷润 4h; 放入

蒸锅内隔水蒸 4h，蒸至规定的程度时取出，晾干，即得相应制品，分别对酒、醋和盐批次作记 J1~J20、C1~C20、Y1~Y20。

2.2 供试品溶液的制备

将女贞子粉碎，分别过 24 目筛，取上述女贞子粉末 200 g 投入萃取釜（容量：2 L）中，按照既定的萃取参数与设置，循环萃取开始，保持温度和压力参数稳定，2 h 后，分别从分离釜 I 出料口出料，得到女贞子油。精密称取女贞子油 50 mg，加甲醇 3mL，溶解后，密封并称量，混匀后超声处理 5 min（功率 300 W，频率 40 kHz），作为女贞子油供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱：Kromasil 100-5-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相：乙腈（A）~0.1% 磷酸水（B），洗脱梯度：0~10 min，65%~70% A；10~23 min，70%~79% A；23~31 min，79%~79.4% A；31~40 min，79.4%~95% A；40~50 min，95% A，检测波长：215 nm，柱温：25 °C，流速：1.0 mL/min，进样量：20 μL。

2.4 方法学考察

精密度考察 精密称取女贞子油 50 mg，按“2.2”项制备供试品溶液 1 份，按照“2.2.3”项方法，连续进样 6 针，记录谱图中各色谱峰保留时间及峰面积。

重复性考察 精密称取女贞子油 50 mg，按“2.2”项制备供试品溶液，平行制备 6 份，按照“2.2.3”项方法进行检测，记录谱图中各色谱峰保留时间及峰面积。

稳定性考察 精密称取女贞子油 50 mg，按“2.2”项制备供试品溶液 1 份，分别在 0、2、4、8、12、24 h 依据“2.2.3”项条件进行检测，记录谱图中各色谱峰保留时间及峰面积。

2.5 相似度评价

2.5.1 指纹图谱的建立

80 批女贞子油样品按“2.2.2”项方法制备成供试品溶液，按照“2.3”项色谱条件进行分析，记录色谱图。

2.5.2 相似度分析

根据软件匹配所得 29 个共有峰，以生成的对照指纹图谱作为参考，保存各对照指纹图谱，记录峰面积匹配结果、非共有峰匹配结果以及相似度评价结果，计算指纹图谱的相似度。

将得到的 80 批不同品种女贞子油指纹图谱以及上述 4 个炮制品，每个炮制品各 20 批女贞子油指纹图谱以 AIA 格式分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012）”软件。

2.5.3 聚类分析

以 80 批样品中 29 个共有峰的峰面积为变量，导入 SPSS 18.0 软件，采用组间联接、平

方欧式距离法进行系统聚类分析。

2.5.4 主成分分析

以 80 批不同品种的女贞子油样品以及 20 批生品女贞子油与 60 批炮制后的女贞子油样品共有峰的峰面积为变量，分别使用 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析。

2.5.5 正交偏最小二乘回归分析

在主成分分析的基础上，以上述 4 个炮制品，每个炮制品各 20 批女贞子油样品以及 20 批生品女贞子油与 60 批炮制后的女贞子油样品的共有峰峰面积为变量，分别采用 SIMCA 14.1 软件进行正交偏最小二乘回归分析。

3 应用案例——女贞子油及不同炮制品指纹图谱及模式识别建立

3.1 HPLC 指纹图谱的建立及方法学考察

从色谱图中选取 15 个相应较高的色谱峰，见图 1。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价（2012 版）》软件进行评价分析，计算其保留时间和峰面积的相对标准偏差（RSD），结果表明，精密度试验、重复性试验、稳定性试验各峰保留时间和峰面积的 RSD 值均 $<5\%$ 。

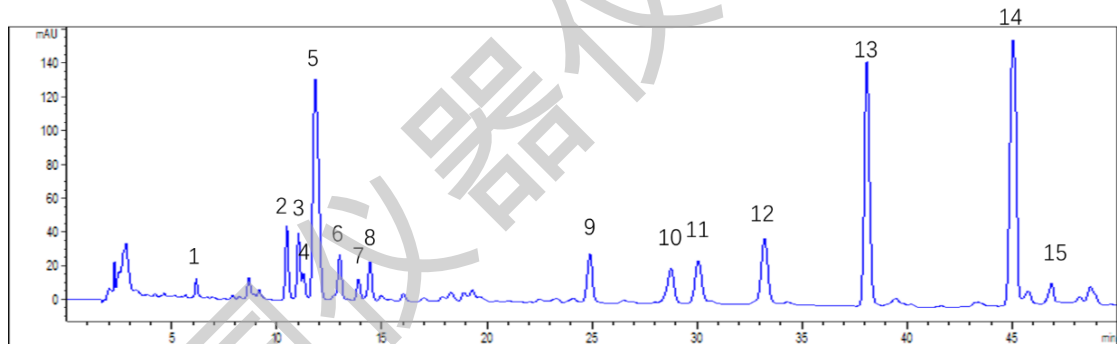


图 1 女贞子油的 HPLC 指纹图谱

3.2 模式识别的建立

通过对不同炮制品女贞子油的相似度评价、主成分分析、正交偏最小二乘回归分析和聚类分析，见表 1、图 2、图 3、图 4。结果表明：不同厂家、不同批次生女贞子油的质量较稳定，炮制后，各批次之间整体质量更加稳定。女贞子油炮制前后发生了一定的变化，由于批次、产地的差异以及炮制方法的影响，对部分女贞子油的区分效果较差，峰 7、峰 8、峰 13、峰 14、峰 16、峰 17、峰 19、峰 20、峰 22、峰 28 可能是引起女贞子油不同炮制品成分差异的主要标志性成分。女贞子油受产地、炮制方法等影响较大。

表1 生品、酒制品、醋制品及盐制品女贞子油指纹图谱的相似度评价结果

编号	20批	80批	编号	20批	80批	编号	20批	80批	编号	20批	80批
S1	0.990	0.989	J1	0.995	0.990	C1	0.994	0.987	Y1	0.998	0.989
S2	0.986	0.992	J2	0.993	0.987	C2	0.995	0.992	Y2	0.998	0.992
S3	0.988	0.990	J3	0.992	0.989	C3	0.995	0.989	Y3	0.999	0.993
S4	0.978	0.964	J4	0.992	0.988	C4	0.996	0.991	Y4	0.998	0.990
S5	0.990	0.986	J5	0.994	0.991	C5	0.996	0.993	Y5	0.999	0.992
S6	0.983	0.973	J6	0.992	0.989	C6	0.994	0.986	Y6	0.998	0.989
S7	0.987	0.990	J7	0.995	0.991	C7	0.995	0.993	Y7	0.999	0.992
S8	0.987	0.991	J8	0.992	0.989	C8	0.993	0.983	Y8	0.998	0.993
S9	0.976	0.986	J9	0.994	0.990	C9	0.996	0.988	Y9	0.999	0.992
S10	0.981	0.991	J10	0.992	0.989	C10	0.996	0.988	Y10	0.997	0.989
S11	0.976	0.983	J11	0.996	0.991	C11	0.995	0.987	Y11	0.997	0.989
S12	0.989	0.984	J12	0.992	0.988	C12	0.995	0.987	Y12	0.998	0.993
S13	0.988	0.983	J13	0.993	0.991	C13	0.997	0.991	Y13	0.998	0.990
S14	0.989	0.982	J14	0.995	0.990	C14	0.995	0.992	Y14	0.998	0.989
S15	0.985	0.991	J15	0.991	0.986	C15	0.996	0.993	Y15	0.999	0.991
S16	0.989	0.983	J16	0.994	0.990	C16	0.995	0.992	Y16	0.999	0.991
S17	0.978	0.987	J17	0.994	0.991	C17	0.996	0.989	Y17	0.999	0.991
S18	0.970	0.951	J18	0.993	0.990	C18	0.996	0.988	Y18	0.999	0.991
S19	0.966	0.945	J19	0.990	0.986	C19	0.996	0.99	Y19	0.998	0.992
S20	0.969	0.948	J20	0.995	0.992	C20	0.997	0.993	Y20	0.998	0.992

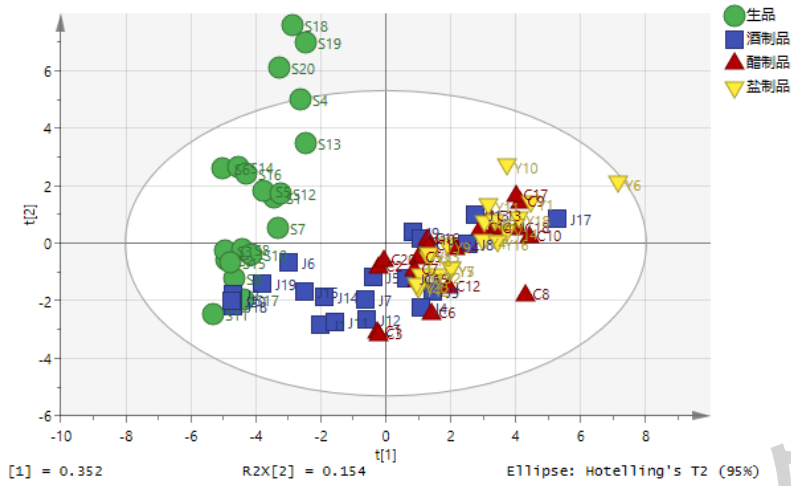


图2 不同产地多批次女贞子油及其炮制品指纹图谱 PCA 得分图

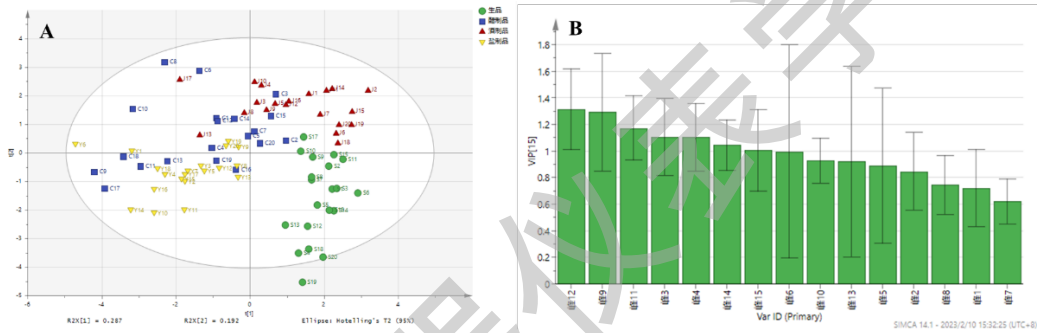


图3 PLS-DA 结果: (A) 80 批女贞子油 PLS-DA 得分图; (B) VIP 得分图

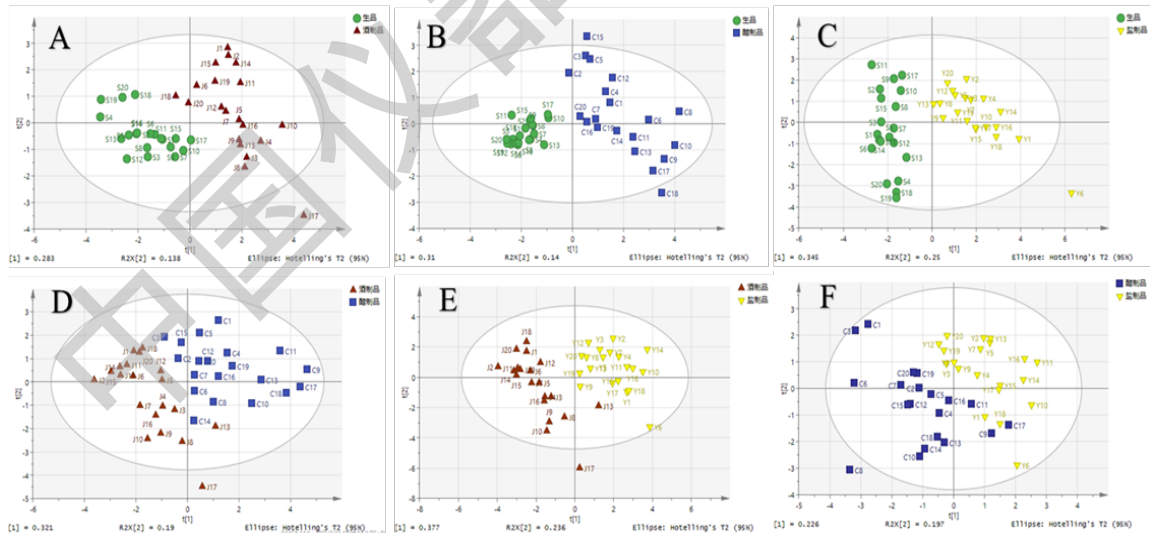


图4 女贞子油不同品种间 PLS-DA 得分图

4 结论

本研究通过 HPLC 技术构建女贞子油的指纹图谱，共确认 29 个共有峰；不同品种女贞子油的样品稳定，化学成分种类差异较小；聚类分析能够较好地分类生品女贞子油和酒女贞

子油；主成分分析和偏最小二乘法分析能较好地分类生女贞子油和其他炮制品的女贞子油，共分析得 10 个导致品种间差异的成分。本研究较全面的表征了女贞子油及其不同炮制品的化学信息，为女贞子油的质量标准提供了一定的理论依据。

参考文献：

- [1] 张明惠, 朱田田, 晋玲, 等. 基于 HPLC 多指标成分测定及指纹图谱多模式识别的不同产地不同品种当归质量差异分析[J]. 中草药, 2022, 53(19): 6187-6199.
- [2] 曲彤, 杨媛媛, 胡静, 等. 飞蛾藤属植物的多指标含量测定及化学模式识别研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(19): 2451-2456.
- [3] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [4] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 一部 2020 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.02.
- [5] 徐浩然, 程国良, 黄志伟, 等. 女贞药用价值及其相关上市药品的研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(5): 1663-1671.
- [6] Pang Z, Zhi-yan Z, Wang W, et al. The advances in research on the pharmacological effects of Fructus Ligustri Lucidi[J]. BioMed Research International, 2015, 2015(1): 281873.
- [7] Cao M, Wu J, Peng Y, et al. Ligustri Lucidi Fructus, a traditional Chinese Medicine: Comprehensive review of botany, traditional uses, chemical composition, pharmacology, and toxicity[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 301: 115789.
- [8] 孟江平, 李忠彬, 廖文利, 等. 超临界 CO₂ 流体萃取在中药有效成分提取中的应用[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(22): 13565-13567.
- [9] 刘川铭, 刘猛刚, 缪菊连. 超临界 CO₂ 萃取技术在中药提取中的应用研究进展[J]. 广州化工, 2021, 49(17): 26-28+39.
- [10] 赵杰, 肖雨, 谭朝阳, 等. 女贞子有效成分提取工艺及含量研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2022, 61 (15): 183-190.
- [11] 王佳丽, 单安山, 刘天阳, 等. 日粮中添加女贞子 CO₂ 超临界萃取物对于猪免疫性能的影响 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34 (4): 653-657+684.
- [12] 王佳丽, 单安山, 刘天阳, 等. 女贞子 CO₂ 超临界萃取物对断奶仔猪小肠绒毛、盲肠菌

群及血常规的影响 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44 (12): 10-15.

[13] 王雪雪, 陶柱萍, 厉颖, 等. 中药抗酒精性胃损伤作用机制的研究进展[J]. 中药材, 2020, 43(6): 1499-1507.

[14] 尹燕, 王淼, 阳志强, 等. 化学模式识别在中药炮制中的应用 [J]. 中草药, 2021, 52 (17): 5369-5377.

[15] 徐妍, 杨华蕊, 杨永寿, 等. 中药指纹图谱研究现状及展望 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (76): 91-94.

[16] REN S, LI Z, WANG J, et al. Comparative study of the content of eight components in Ligustri Lucidi Fructus pieces[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2015, 35(8): 1393-1402.

中国仪器仪表教学网