包尔胡特果实的化学成分分析及综合质量评价Δ

郭晓宇[1*]，滕　亮[2]，张晓雪[1]，贾　乐[1]，马桂芝[1#]（1.新疆医科大学药学院，乌鲁木齐　830011；2.新疆医科大学第一附属医院药学部，乌鲁木齐　830054）

中图分类号　R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）14-1715-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.14.07

摘　要　目的　鉴定包尔胡特果实的化学成分，并建立其指纹图谱和同时测定4种成分含量的方法，以综合评价包尔胡特果实的质量。**方法**　采用超高效液相色谱四极杆-飞行时间串联质谱法鉴定包尔胡特果实中的化学成分。采用高效液相色谱（HPLC）法建立15批包尔胡特果实（编号S1～S15）的指纹图谱，并采用SPSS 26.0与SIMCA 14.1软件进行化学计量学分析；同法测定槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素的含量。**结果**　包尔胡特果实中共鉴定出35种化合物，包括28种黄酮类成分、5种蒽醌类成分、2种有机酸类成分；其HPLC指纹图谱中共标定19个共有峰，指认出槲皮素、山柰酚、山柰素和大黄素；15批样品的HPLC指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均大于0.9。聚类分析结果显示，15批样品聚为2类，其中S1～S5、S7、S9为一类，其余样品为一类，与主成分分析结果相同；正交偏最小二乘法-判别分析结果显示，2、6、1、11（槲皮素）、3、14、8、10、19（大黄素）、5号峰的变量重要性投影值均大于1。槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素的含量分别为0.710～10.478、0.236～0.660、0.334～3.039、0.261～0.504 mg/g。**结论**　所建化学成分鉴定方法、指纹图谱和含量测定方法简便可行、重复性好，结合化学计量学分析可用于包尔胡特果实质量的综合评价。

关键词　包尔胡特果实；UPLC-QTOF-MS^E；指纹图谱；含量测定；化学成分；质量评价

Analysis of chemical constituents and comprehensive quality evaluation of Rhamni Songoricae Fructus

GUO Xiaoyu[1], TENG Liang[2], ZHANG Xiaoxue[1], JIA Le[1], MA Guizhi[1]（1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To identify the chemical constituents of Rhamni Songoricae Fructus and to establish their fingerprints and the method for simultaneous determination of four constituents to comprehensively evaluate the quality of Rhamni Songoricae Fructus. **METHODS** The chemical constituents in Rhamni Songoricae Fructus were qualitatively analyzed by ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry. The fingerprints of 15 batches of Rhamni Songoricae Fructus were established by HPLC and chemometric analysis was performed by using SPSS 26.0 and SIMCA 14.1 software; the contents of quercetin, kaempferol, kaempferide and emodin were determined by the same method. **RESULTS** A total of 35 constituents were identified, including 28 kinds of flavonoids, 5 kinds of anthraquinones and 2 kinds of organic acids. A total of 19 common peaks were identified in the HPLC fingerprints, recognizing quercetin, kaempferol, kaempferide and emodin. The similarities between HPLC fingerprints of 15 batches of samples and control chromatograms were greater than 0.9. The results of cluster analysis showed that 15 batches of samples were divided into 2 classes, of which S1-S5, S7 and S9 were one class and the rest were one class, similar to the results of principal component analysis. The results of the orthogonal partial least squares-discriminant analysis showed that the variable importance projections of peaks No. 2, 6, 1, 11 (quercetin), 3, 14, 8, 10, 19 (emodin), 5 were all greater than 1. The contents of quercetin, kaempferol, kaempferide and emodin ranged from 0.710 to 10.478 mg/g, 0.236 to 0.660 mg/g, 0.334 to 3.039 mg/g, and 0.261 to 0.504 mg/g. **CONCLUSIONS** The constructed chemical constituent identification, fingerprint and content determination methods are simple, feasible and reproducible, which combined with chemometric analysis can be used for comprehensive evaluation of the quality of Rhamni Songoricae Fructus.

KEYWORDS　Rhamni Songoricae Fructus; UPLC-QTOF-MS^E; fingerprint; content determination; chemical constituents; quality evaluation

Δ **基金项目** 新疆维吾尔自治区重大科技专项（No.2022A030-19-3）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药质量标准。E-mail：gxy121225@gmail.com

＃**通信作者** 教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药（民族药）物质基础。E-mail：maguizhi000@126.com

包尔胡特*Rhamnus songorica* G.为鼠李科Rhamnaceae鼠李属*Rhamnus*多年生草本植物，主要分布于中亚地区及我国新疆伊犁地区，具有清热解毒、疏肝保肝、调节血脂的功效[1]，主要用于治疗肠燥便秘、习惯性便秘、高脂血症、酒精性肝病。虽然包尔胡特能够改善乙醇造

成的肝损伤[2]，但其药效物质基础尚不明确，而且目前关于包尔胡特的化学成分研究较少。新疆维吾尔自治区药品监督管理局虽然已颁布了包尔胡特的质量标准，但仅规定了鉴别、水分及灰分检查的方法[3]，无法全面评价其整体质量。

超高效液相色谱四极杆-飞行时间串联质谱（UPLC-QTOF-MS^E）能够快速全面地分析药材中的化学成分[4]，而化学计量学分析可通过将复杂数据进行降维化处理，分析药材中的主成分以及筛选样品批间差异成分[5]。基于此，本研究采用UPLC-QTOF-MS^{E}法鉴定包尔胡特果实的化学成分，采用高效液相色谱（HPLC）法建立其指纹图谱，通过化学计量学分析方法筛选影响该果实质量的差异标志物，并测定其差异标志物的含量，以期为完善包尔胡特果实的质量评价方法提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Acquity™型超高效液相色谱系统串联Waters Xevo-G2-XS-QTOF型质谱仪（美国Waters公司），LC-20AD型HPLC仪（日本Shimadzu公司），MS105DU型万分之一分析天平（美国Mettler Toledo公司），Exceed-Cd-16A型艾柯超纯水仪（成都唐氏康宁科技发展有限公司），KQ-5200DE型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 药品与试剂

槲皮素、山柰素、异槲皮苷、槲皮苷、水仙苷、二氢杨梅素、杨梅素、柚皮素对照品（批号分别为B20527、B21132、YY90439、YY90084、B21194、B20372、B21458、B21596，纯度均不低于98%）均购自上海源叶生物科技有限公司；大黄素、山柰酚对照品（批号分别为MUST-18110810、MUST-16032801，纯度均不低于98%）均购自曼斯特（成都）生物科技有限公司；芦丁、山柰酚-3-芸香糖苷对照品（批号分别为RP-210601、RP-210607，纯度均不低于98%）均购自成都麦德生科技有限公司；新绿原酸、隐绿原酸、圣草酚对照品（批号分别为WP-23072112、WP-23070501、WP-23090608，纯度均不低于98%）均购自四川省维克奇生物科技有限公司；亮氨酸-脑啡肽（批号W23051705，纯度≥98%）购自美国Waters公司；乙腈为质谱纯，甲醇、乙腈均为色谱纯，其余试剂均为分析纯。

15批包尔胡特果实药材，其中11批（编号S1～S11）采集于新疆伊犁哈萨克自治州巩留县伊勒格代镇（编号S1～S6采集日期为2023-09-12，编号S7～S11采集日期为2023-09-13），4批（编号S12～S15）采集于新疆伊犁哈萨克自治州巩留县库尔德宁镇（采集日期为2023-09-14），均经伊犁哈萨克自治州食品药品检验所敬松主任药师鉴定为*R. songorica* G. 的干燥果实。

2 方法与结果

2.1 包尔胡特果实药材中的主要化学成分分析

2.1.1 供试品溶液的制备

取样品粉末，约1 g（过80目筛），精密称定，加入甲醇50 mL，于50 ℃超声（功率100 W，频率40 kHz，下同）提取25 min，冷却，用甲醇补足减失的质量。精密量取0.5 mL，置于10 mL容量瓶中，加入甲醇定容，经0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.1.2 单一对照品溶液的制备

取槲皮素、山柰素、异槲皮苷、槲皮苷、水仙苷、二氢杨梅素、杨梅素、柚皮素、大黄素、山柰酚、芦丁、山柰酚-3-芸香糖苷、新绿原酸、隐绿原酸、圣草酚对照品各约1 mg，精密称定，分别置于10 mL容量瓶中，加甲醇溶解并定容，经0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得上述各成分质量浓度分别为0.103、0.102、0.102、0.102、0.102、0.107、0.103、0.097、0.098、0.103、0.103、0.101、0.104、0.105、0.105 mg/mL的单一对照品溶液。

2.1.3 色谱条件

以ACQUITY UPLC BEH C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）为色谱柱，以乙腈（A）-0.2%甲酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0～14.45 min，16%A→23%A；14.45～20.84 min，23%A→26%A；20.84～26.12 min，26%A→80%A；26.12～29.18 min，80%A→100%A；29.18～33.35 min，100%A→16%A）；流速为0.3 mL/min；柱温为40 ℃；进样量为2 μL。

2.1.4 质谱条件

采用电喷雾离子源以MS^{E}负离子模式进行扫描，质量扫描范围为质荷比（*m/z*）50～1 200；毛细管电压为2.5 kV；锥孔电压为40 V；锥孔气流速为50 L/h；脱溶剂氮气流量为900 L/h；离子源温度为120 ℃；脱溶剂气温度为450 ℃；低能通道中碰撞电压为6 V；高能通道中碰撞电压为20～40 V。

2.1.5 数据处理

采用Masslynx V4.2质谱分析工作站及Waters UNIFI V1.8软件进行数据处理，以亮氨酸-脑啡肽（100 ng/L）作为Lock Spray实时校正标准液，Lock Mass为554.262 0，质谱检测与理论分子量的误差应小于±5 ppm。将数据导入UNIFI软件，获得各分子离子峰的精确分子量和二级质谱碎片离子峰，同时结合对照品的保留时间以及参考相关文献进行分析。

2.1.6 包尔胡特果实药材中的化学成分分析与鉴定

取“2.1.1”项下供试品溶液，按“2.1.3”“2.1.4”项下条件进样分析，采集色谱信息，得到相应的总离子流图（图1）。结果显示，从供试品溶液中共鉴定出35种化合物，包括28种黄酮类成分、5种蒽醌类成分、2种有机酸类成分，详见表1。

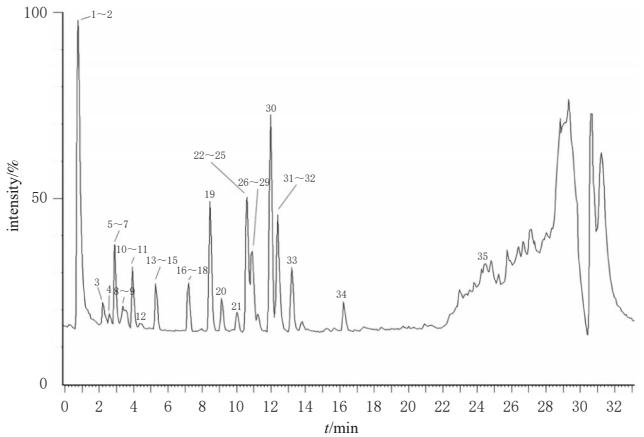


图1　供试品溶液在MS^E负离子模式下的总离子流图

黄酮类化合物在负离子模式下较容易生成相对稳定的离子化合物，具有相似的裂解规律，即易发生脱糖基、脱水、环的逆狄尔斯-阿尔德反应（RDA）裂解以及CO、CO_2、CHO等中性分子丢失。在负离子模式下，异戊烯基取代的黄酮类化合物易失去糖基而产生基峰离子，而苷元离子较难进一步裂解，因此可将苷元离子作为鉴别该类化合物的特征离子。以峰10为例，保留时间为3.78 min，该化合物一级质谱中出现分子离子峰*m/z* 593.153 1[M－H]$^-$，推断其分子式为$C_{27}H_{30}O_{15}$，通过丢失1分子葡萄糖和1分子鼠李糖生成碎片*m/z* 285.054 7[M－Glc－Rha－H]$^-$，再丢失1分子CH_2O，得到碎片*m/z* 255.032 6[M－Glc－Rha－CH_2O－H]$^-$，再丢失1分子CO，得到碎片*m/z* 227.038 6[M－Glc－Rha－$C_2H_2O_2$－H]$^-$。经与对照品、文献[6]比对，确定该化合物为山柰酚-3-芸香糖苷，可能的裂解方式见图2（鉴于本文篇幅较长，仅以黄酮类化合物为例展示质谱裂解规律）。

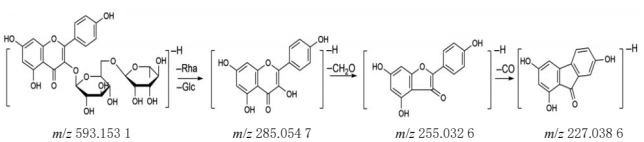


图2　山柰酚-3-芸香糖苷可能的质谱裂解规律

表1　包尔胡特果实中化学成分的分析结果

序号	保留时间/min	化合物	分子式	*m/z*理论值	*m/z*实测值	碎片离子
1	1.07	新绿原酸[a]	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 3	353.088 7	191.061 3,179.060 3,173.047 4
2	1.31	隐绿原酸[a]	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 3	353.088 7	191.060 8,179.061 3,135.049 7
3	2.18	二氢杨梅素[a]	$C_{15}H_{12}O_8$	319.045 4	319.045 9	301.014 1,193.019 3
4	2.45	芦丁[a]	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.145 6	609.144 5	300.034 6,271.037 3,255.032 6,243.032 0,151.006 5
5	2.85	异槲皮苷[a]	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.087 7	463.088 7	300.028 1,271.024 6,255.023 6,243.035 2,227.039 6
6	2.85	槲皮素-3-葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.087 7	463.086 8	300.038 8,271.029 7,255.034 2
7	2.87	牡荆素	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.097 8	431.098 4	340.815 4,311.021 4
8	3.45	金丝桃苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.087 7	463.085 5	301.881 4,149.005 1
9	3.52	紫云英苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.092 7	447.091 4	285.054 4,151.004 1
10	3.78	山柰酚-3-芸香糖苷[a]	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.150 6	593.153 1	285.054 7,255.032 6,227.038 6
11	3.96	水仙苷[a]	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.161 2	623.162 0	315.055 3,300.031 6,271.038 6,243.032 0
12	4.26	槲皮苷[a]	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.092 7	447.094 8	300.029 8,271.023 3
13	5.32	异鼠李素	$C_{16}H_{12}O_7$	315.050 5	315.051 7	300.028 1,271.024 6,151.002 3
14	5.32	杨梅素[a]	$C_{15}H_{10}O_8$	317.029 7	317.029 8	271.002 0,151.005 9
15	5.34	槲皮素[a]	$C_{15}H_{10}O_7$	301.034 8	301.034 3	273.047 6,179.003 2,151.007 3
16	7.12	山柰酚[a]	$C_{15}H_{10}O_6$	285.039 9	285.040 9	255.034 5,243.036 0
17	7.17	木犀草素-7-葡萄糖醛酸苷	$C_{21}H_{18}O_{12}$	461.072 0	461.071 1	285.024 5
18	7.30	大黄素[a]	$C_{15}H_{10}O_5$	269.045 0	269.045 6	241.055 5,225.058 2,210.032 1,182.039 8
19	8.64	大黄素-8-葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.097 8	431.096 9	269.051 4,120.971 4
20	9.28	圣草酚[a]	$C_{15}H_{12}O_6$	287.055 6	287.055 6	151.008 4,135.047 4
21	9.97	木犀草素	$C_{15}H_{10}O_6$	285.039 9	285.039 5	151.005 1,133.031 6
22	10.27	大黄素-3-甲醚	$C_{16}H_{12}O_5$	283.060 6	283.061 1	137.122 4
23	10.54	二氢鼠李素	$C_{16}H_{14}O_7$	317.066 1	317.066 8	125.025 5
24	10.67	异荭草素-6-鼠李糖苷	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.150 6	593.151 7	315.059 7,300.1124
25	10.71	槲皮素-3-*O*-新橙皮苷	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609.145 6	609.146 4	447.115 2,161.021 5
26	11.21	山柰酚-3-葡萄糖醛酸	$C_{21}H_{18}O_{12}$	461.072 0	461.073 4	284.032 1
27	11.32	芦荟大黄素	$C_{15}H_{10}O_5$	269.045 0	269.046 0	241.024 1
28	11.35	山柰酚-7-葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447.092 7	447.093 2	284.043 1,227.035 9
29	11.39	异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477.103 3	477.102 5	315.041 2,300.121 4
30	12.03	杨梅素-3-半乳糖苷	$C_{21}H_{20}O_{13}$	479.082 6	479.081 5	315.026 5,271.002 0
31	12.65	大黄素甲醚-8-*O*-*β*-D-葡萄糖苷	$C_{22}H_{21}O_{10}$	444.105 6	444.104 2	379.846 2,282.054 2
32	12.79	白杨素	$C_{15}H_{10}O_4$	253.050 1	253.051 2	142.825 4
33	13.88	柚皮素[a]	$C_{15}H_{12}O_5$	271.060 6	271.060 3	151.005 9,119.050 9
34	17.35	山柰酚-7-*O*-鼠李糖苷	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.097 8	431.098 7	285.159 7,227.125 4
35	24.21	山柰素[a]	$C_{16}H_{12}O_6$	299.055 6	299.054 7	284.037 7,151.005 9

a：该化合物经对照品确证。

2.2 包尔胡特果实药材HPLC指纹图谱的建立

2.2.1 供试品溶液的制备

取样品粉末，约1 g（过80目筛），精密称定，置于100 mL锥形瓶中，加入90%甲醇50 mL，于50 ℃超声提取25 min，冷却，以90%甲醇补足减失的质量。精密量取2 mL，置于10 mL容量瓶中，加入90%甲醇定容，经0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备

取槲皮素、山柰酚、大黄素、山柰素对照品适量，精密称定，加入90%甲醇溶解并定容，制成上述各成分质量浓度分别为40.02、2.71、0.83、3.62 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.3 色谱条件

以Agilent-5 TC-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）为色谱柱，以乙腈（A）-0.2%甲酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱，洗脱程序为：0～52 min，16%A→23%A；52～75 min，23%A→26%A；75～94 min，26%A→80%A；94～105 min，80%A→100%A；105～110 min，100%A→16%A；流速为1 mL/min；检测波长为360 nm；柱温为30 ℃；进样量为10 μL。

2.2.4 精密度考察

取“2.2.1”项下供试品溶液（编号S1）适量，按“2.2.3”项下色谱条件连续进样测定6次，以11号峰（槲皮素）为参照峰，得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.11%（n=6），相对峰面积的RSD均小于3.05%（n=6），表明方法精密度良好。

2.2.5 重复性考察

取样品（编号S1）适量，共6份，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，以11号峰（槲皮素）为参照峰，得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.64%（n=6），相对峰面积的RSD均小于3.47%（n=6），表明方法重复性良好。

2.2.6 稳定性考察

取“2.2.1”项下供试品溶液（编号S1）适量，分别于室温下放置0、2、4、6、12、24 h时，按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，以11号峰（槲皮素）为参照峰，得到各共有峰相对保留时间的RSD均小于0.18%（n=6），相对峰面积的RSD均小于3.43%（n=6），表明样品在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.2.7 指纹图谱的建立

取15批样品（编号S1～S15）粉末，按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.3”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》，以S1样品为参照，时间窗设定为0.1 min，采用中位数法进行Mark峰匹配，生成15批样品的叠加指纹图谱与对照指纹图谱（R）。结果（图3）显示，样品中共标定了19个共有峰，通过与混合对照品溶液（图4）保留时间、二极管阵列紫外吸收光谱图比对，指认了4个共有峰，分别为槲皮素（11号峰）、山柰酚（15号峰）、山柰素（17号峰）、大黄素（19号峰）。

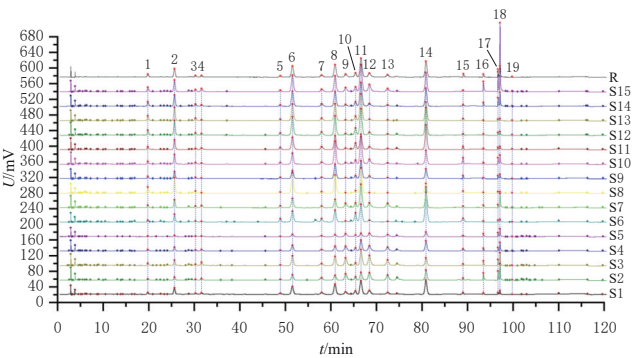
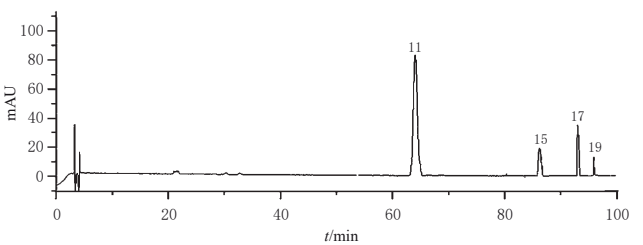


图3 15批样品的叠加HPLC指纹图谱和对对照指纹图谱



11：槲皮素；15：山柰酚；17：山柰素；19：大黄素。

图4 混合对照品的HPLC图

2.2.8 相似度分析

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》，以对照指纹图谱（R）为参照，评价15批样品HPLC图谱的相似度。结果显示，15批样品与对照指纹图谱的相似度为0.901～0.991，表明15批样品的质量一致性良好。

2.3 15批药材的化学计量学分析

2.3.1 聚类分析

采用SPSS 26.0软件对15批样品中的19个共有峰峰面积进行聚类分析（cluster analysis，CA）。结果（图5）显示，当平方欧氏距离为20时，15批样品聚为2类，其中S1～S5、S7、S9为一类，其余样品为一类，表明包尔胡特果实的生长环境对其质量未产生明显影响。

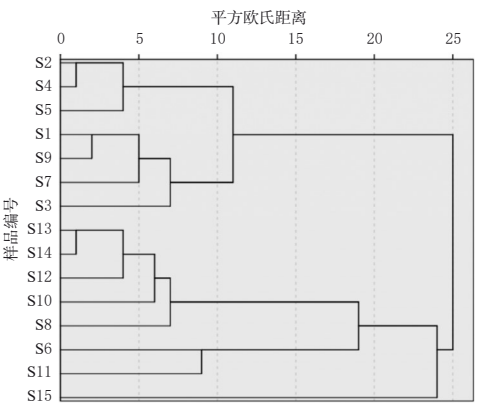


图5 15批样品的CA树状图

2.3.2　主成分分析

以15批样品中的19个共有峰峰面积为变量，采用SPSS 26.0软件进行主成分分析（principal component analysis，PCA）。结果显示，共得到4个主成分，累计方差贡献率为88.208%，表明这4个主成分包含了19个共有峰88.208%的信息，能较好地反映样品的主要特征，具有代表性[7]。第1个主成分信息主要来自于2、6、11（槲皮素）、1号峰；第2个主成分信息主要来自于4、16、17（山柰素）、18、19号峰（大黄素）；第3个主成分信息主要来自于5、10、15号峰（山柰酚）；第4个主成分信息主要来自于7号峰。以15批样品的19个共有峰峰面积为变量，利用SIMCA 14.1软件绘制散点图，结果（图6）显示，S1～S5、S7、S9位于PCA得分图的左侧，S6、S8、S10～S15位于PCA得分图的右侧，与CA结果相同。

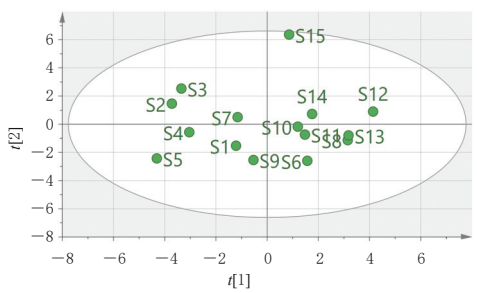


图6　15批样品的PCA散点图

2.3.3　正交偏最小二乘法-判别分析

以15批样品中的19个共有峰峰面积为变量，采用SIMCA 14.1软件进行正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares discrimination analysis，OPLS-DA）。结果（图7）显示，OPLS-DA模型中的所有数据点均在95%置信区间内，15批样品聚类良好，与CA和PCA结果一致。以变量重要性投影（variable importance in projection，VIP）值＞1为标准，筛选影响质量的差异标志物[8]，结果（图8）显示，2、6、1、11（槲皮素）、3、14、8、10、19（大黄素）、5号峰的VIP值均大于1。

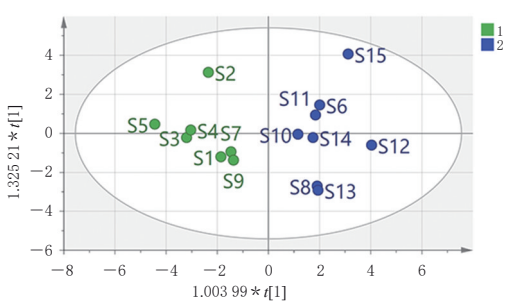


图7　15批样品的OPLS-DA散点图

2.4　包尔胡特果实药材中4种指认成分的含量测定

2.4.1　色谱条件

以Agilent-5 TC-C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）为色谱柱，以乙腈（A）-0.2%甲酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0～52 min，16%A→23%A；52～75 min，23%A→26%A；75～94 min，26%A→80%A，波长均为360 nm。94～105 min，80%A→100%A；105～110 min，100%A→16%A，波长均为287 nm）；流速为1 mL/min；柱温为30 ℃；进样量为10 μL。

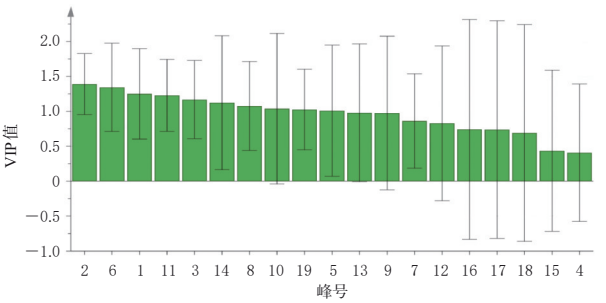


图8　15批样品19个共有峰的VIP值

2.4.2　溶液的制备

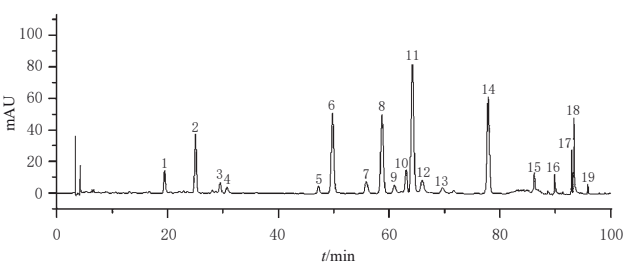
（1）混合对照品溶液。取槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素对照品适量，精密称定，加入90%甲醇定容，制成上述各成分质量浓度分别为640.0、40.00、40.00、20.00 μg/mL的混合对照品溶液。

（2）供试品溶液。制备方法同“2.2.1”项。

（3）空白溶液。以90%甲醇为空白溶液。

2.4.3　系统适用性试验

取“2.4.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶液，按“2.4.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果（图4、图9，空白溶液图略）显示，供试品溶液中4种成分的色谱峰峰形尖锐，与混合对照品中各成分色谱峰保留时间一致，理论板数均大于15 000，拖尾因子均在0.95～1.05范围内，空白溶液对测定无干扰。



11：槲皮素；15：山柰酚；17：山柰素；19：大黄素。

图9　供试品溶液（编号S1）的HPLC图

2.4.4　线性关系考察

取“2.4.2（1）”项下混合对照品溶液，用90%甲醇倍比稀释，制成系列质量浓度的混合对照品溶液，按“2.4.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以各待测成分质量浓度（X）为横坐标、峰面积（Y）为纵坐标绘制标准曲线。结果见表2。

表2　槲皮素等4种成分的回归方程和线性关系

待测成分	回归方程	线性范围/（μg/mL）	r
槲皮素	Y=3.622 5×10^4X−81 423.0	5.00～640.00	0.999 3
山柰酚	Y=4.409 3×10^4X−4 521.8	0.31～40.00	0.999 6
山柰素	Y=3.150 9×10^4X−6 882.7	0.31～40.00	0.999 6
大黄素	Y=4.310 5×10^4X−2 308.9	0.16～20.00	0.999 9

2.4.5　精密度试验

取“2.4.2(2)”项下供试品溶液(编号S1)适量,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素峰面积的RSD分别为0.68%、1.00%、1.45%、0.94%(n=6),表明方法精密度良好。

2.4.6　重复性试验

取样品(编号S1)适量,共6份,按“2.4.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果显示,槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素含量的RSD分别为0.44%、1.52%、1.32%、1.69%(n=6),表明方法重复性良好。

2.4.7　稳定性试验

取“2.4.2(2)”项下供试品溶液(编号S1)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、12、24 h时,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素峰面积的RSD分别为0.87%、0.59%、1.03%、1.09%(n=6),表明样品在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4.8　加样回收率试验

取样品(编号S1),每份0.5 g,共9份,精密称定,分别加入槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素对照品适量,按“2.4.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素的平均加样回收率分别为99.84%、99.27%、98.81%、100.81%(n=9),RSD分别为1.71%、1.15%、1.40%、1.64%(n=9)。

2.4.9　样品含量测定

取15批样品,按“2.4.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。每批样品平行测定3次,结果见表3。

表3　15批样品中槲皮素等4种成分的含量测定结果($\bar{x}\pm s$,n=3,mg/g)

编号	槲皮素	山柰酚	山柰素	大黄素
S1	4.960±0.063	0.451±0.004	0.405±0.006	0.261±0.001
S2	2.426±0.038	0.444±0.003	1.308±0.012	0.387±0.002
S3	5.808±0.016	0.441±0.005	0.967±0.010	0.361±0.003
S4	3.757±0.026	0.336±0.003	0.595±0.003	0.337±0.001
S5	0.710±0.040	0.236±0.006	0.723±0.003	0.354±0.002
S6	6.595±0.030	0.653±0.009	0.376±0.006	0.320±0.003
S7	8.768±0.075	0.349±0.004	0.590±0.000	0.368±0.003
S8	9.647±0.073	0.276±0.005	0.357±0.004	0.262±0.002
S9	6.614±0.085	0.410±0.004	0.583±0.008	0.380±0.008
S10	10.478±0.039	0.660±0.032	1.078±0.003	0.434±0.002
S11	5.461±0.078	0.463±0.003	0.488±0.001	0.316±0.003
S12	9.903±0.006	0.428±0.004	0.523±0.003	0.360±0.003
S13	10.048±0.003	0.244±0.002	0.334±0.003	0.290±0.001
S14	8.865±0.051	0.297±0.002	1.288±0.013	0.472±0.012
S15	10.076±0.037	0.394±0.004	3.039±0.024	0.504±0.001

3　讨论

3.1　试验条件的优化

本课题组前期以槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素的总含量为指标,通过单因素试验结合Box-Behnken响应面法对提取溶剂、提取时间、提取温度、超声频率、提取次数、料液比等因素及水平进行优化,最终确定了本研究中所用的供试品处理方法。

本课题组前期分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.2%甲酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液5种流动相体系,结果表明,以乙腈-0.2%甲酸溶液为流动相时,各色谱峰分离度良好,基线平稳。全波长扫描结果表明,在360 nm波长下,各色谱峰分离度较好,除大黄素外,其余色谱峰响应良好,因此HPLC指纹图谱分析时以360 nm为检测波长,含量测定时使用双波长切换法,在采集大黄素色谱峰时将检测波长切换至287 nm。

3.2　包尔胡特果实的化学成分分析

本课题组前期对比了包尔胡特果实在正、负离子模式下化学成分的采集情况,结果发现,在MS^E负离子模式下采集到的化合物信息更多,响应强度更好,因此采用MS^E负离子模式采集质谱信息。本研究共鉴定出35种化合物,包括28种黄酮类成分、5种蒽醌类成分、2种有机酸类成分,表明黄酮类化合物是包尔胡特果实的主要化学成分。天然产物中的黄酮类化合物已被证实具有抗炎、抗氧化、抑菌、抗肿瘤等多种作用[9]。本研究所得分析结果也揭示了包尔胡特果实可能的物质基础组成,为该药材的药效物质基础与质量控制研究提供了实验基础。

3.3　指纹图谱及化学计量学分析

本研究共标定了19个共有峰,相似度评价结果显示,15批样品的相似度均大于0.9,表明不同批次样品的相似度较高,整体质量较稳定。CA、PCA和OPLS-DA结果显示,15批样品可分为2类,4个主成分信息主要来自于槲皮素、山柰酚、大黄素、山柰酚等13个共有峰;共筛选出了10个质量差异标志物,包括已指认的槲皮素和大黄素。

3.4　含量测定指标选择与含量测定结果分析

19个共有峰中共指认出4种成分(槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素),其中槲皮素具有抗炎和抗氧化应激的作用[10];山柰酚可通过减轻氧化应激来发挥保护肝脏的作用[9];山柰素可治疗重金属污染引起的大鼠肝损伤[11];大黄素具有显著的抗炎和抗氧化活性,对肝癌也有一定的治疗作用[12—13]。这些均与包尔胡特果实的药理活性密切相关,因此本研究选择上述4种成分作为含量测定的指标。此外,PCA与OPLS-DA结果也从侧面表明,这4种成分作为含量测定指标的合理性:这4种成分既是主成分的主要贡献峰,也是导致15批样品质量差异的标

志物，且药理作用很可能与包尔胡特果实发挥抗酒精性肝损伤作用有关。含量测定结果显示，15批样品中槲皮素、山柰酚、山柰素、大黄素含量分别约为0.710～10.478、0.236～0.660、0.334～3.039、0.261～0.504 mg/g，表明不同批次样品之间虽然相似度较高，但含量差异较大，这可能与其种植条件有关。

综上所述，本研究所建化学成分鉴定方法、指纹图谱和含量测定方法简便可行、重复性好，结合化学计量学分析可用于包尔胡特果实质量的综合评价。

参考文献

[1] 叶静. 包尔胡特提取物对高脂血症大鼠调脂及抗氧化作用的研究[D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2013.
YE J. The studies of regulating blood lipid and antioxidant of the Kazakh medicine *Rhamnus songorica* extract on hyperlipidemia rats[D]. Urumqi：Xinjiang Medical University，2013.

[2] 厉彦翔. 哈药包尔胡特提取物对大鼠酒精性肝病的作用[D]. 乌鲁木齐：新疆医科大学，2012.
LI Y X. Effect of the Kazakh medicine *Rhamnus songorica* extract on rats with alcoholic liver disease[D]. Urumqi：Xinjiang Medical University，2012.

[3] 新疆维吾尔自治区药品监督管理局. 新疆中药维吾尔药饮片炮制规范：2020年版包尔胡特果实[EB/OL].（2020-11-16）[2022-09-10]. https://db.ouryao.com/dfbz/view.php?bookid=xjzywweyyppzgf2020&idx=45.
Xinjiang Uygur Autonomous Region Drug Administration. Processing specification for Xinjiang traditional Chinese medicine and Uyghur medicinal pieces：2020 edition Rhamni Songoricae Fructus[EB/OL].（2020-11-16）[2022-09-10]. https://db.ouryao.com/dfbz/view.php?bookid=xjzywweyyppzgf2020&idx=45.

[4] YANG Z R，WANG Z H，TANG J F，et al. UPLC-QTOF/MS^{E} and bioassay are available approaches for identifying quality fluctuation of Xueshuantong lyophilized powder in clinic[J]. Front Pharmacol，2018，9：633.

[5] 郝壮壮，曹宇欣，刘朦朦，等. 基于HPLC指纹图谱及多指标成分测定结合化学计量学的不同商品规格山慈菇质量差异分析[J]. 中草药，2023，54(6)：1935-1945.
HAO Z Z，CAO Y X，LIU M M，et al. Quality differences of different commercial specifications of Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus based on HPLC fingerprint，multi-index component determination and chemometrics[J]. Chin Tradit Herb Drugs，2023，54(6)：1935-1945.

[6] XU X J，GUO Y L，CHEN M L，et al. Hypoglycemic activities of flowers of *Xanthoceras sorbifolia* and identification of anti-oxidant components by off-line UPLC-QTOF-MS/MS-free radical scavenging detection[J]. Chin Herb Med，2024，16(1)：151-161.

[7] 卢立欣，郑磊，李志明，等. 黄花败酱HPLC多组分定量控制及PCA、OPLS-DA联合GRA法综合质量评价[J]. 中国药师，2023，26(12)：510-518.
LU L X，ZHENG L，LI Z M，et al. Comprehensive quality evaluation of *Patrina scabiosaefolia* Fisch based on HPLC multi-component quantitative control and PCA，OPLS-DA combined with gray correlation analysis[J]. China Pharm，2023，26(12)：510-518.

[8] 李艳荣，段丽颖，魏红，等. 指纹图谱结合一测多评法评价山楂叶质量[J]. 中国药房，2023，34(22)：2727-2733.
LI Y R，DUAN L Y，WEI H，et al. Quality evaluation of *Crataegus pinnatifida* leaves by fingerprint combined with quantitative analysis of multi-components by single-marker[J]. China Pharm，2023，34(22)：2727-2733.

[9] ALKANDAHRI M Y，PAMUNGKAS B T，OKTOBA Z，et al. Hepatoprotective effect of kaempferol：a review of the dietary sources，bioavailability，mechanisms of action，and safety[J]. Adv Pharmacol Pharm Sci，2023，2023：1387665.

[10] 司丽君，王雪，王林林，等. 槲皮素的抗炎免疫及部分机制研究[J]. 中国医药导报，2021，18(27)：26-29，34.
SI L J，WANG X，WANG L L，et al. Research on anti-inflammatory and immune effects of quercetin and its partial mechanism[J]. China Med Her，2021，18(27)：26-29，34.

[11] IJAZ M U，AZIZ S，HAMZA A，et al. Curative effects of kaempferide on cadmium-instigated hepatotoxicity in male albino rats[J]. J King Saud Univ Sci，2023，35(8)：102885.

[12] YU L Y，ZHAO Y L，ZHAO Y L. Advances in the pharmacological effects and molecular mechanisms of emodin in the treatment of metabolic diseases[J]. Front Pharmacol，2023，14：1240820.

[13] ZHU X J，GUO S Q，ZHANG M Y，et al. Emodin protects against apoptosis and inflammation by regulating reactive oxygen species-mediated NF-κB signaling in interleukin-1β-stimulated human nucleus pulposus cells[J]. Hum Exp Toxicol，2023，42：9603271221138552.

（收稿日期：2024-02-21　修回日期：2024-06-13）
（编辑：陈　宏）