

不同产地大枣的 UPLC-MS/MS 多指标含量测定及化学模式识别研究

冯玉¹, 胡婧楠¹, 郝仲玟¹, 田宇柔^{1,2,3,4}, 牛丽颖^{1,2,3,4*} (1.河北中医学院, 石家庄 050091; 2.河北省中药配方颗粒技术创新中心, 石家庄 050091; 3.中药材品质评价与标准化河北省工程研究中心, 石家庄 050091; 4.河北省高校中药配方颗粒应用技术研发中心, 石家庄 050091)

摘要: 目的 建立不同产地大枣多指标含量测定的 UPLC-MS/MS 方法, 为大枣的质量控制提供参考。方法 采用 UPLC-MS/MS 多反应监测负离子扫描模式, Shim-pack GIST C₁₈(2.1 mm×100 mm, 2 μm)色谱柱进行分离, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 进行梯度洗脱, 测定 25 批大枣中环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸和齐墩果酮酸的含量, 并结合主成分分析(principal component analysis, PCA)、层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)和偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)评价不同产地大枣中 7 种成分的差异。结果 7 种成分在相应的浓度范围内线性关系良好, 相关系数(r)≥0.995 6, 仪器精密度 RSD<3.55%, 平均加样回收率为 99.17%~100.74%, RSD<3.48%。PCA 和 HCA 结果表明, 不同产地的大枣可明显分开, 组内样品成分具有很强的相似性, 而组间差异较大。通过 PLS-DA 中变量重要性投影分析发现 4 个差异性指标成分, 分别为白桦脂酸、齐墩果酮酸、路路通酸及芦丁。结论 建立了专属性强、灵敏度高的大枣多指标含量测定方法, 且通过统计方法证明白桦脂酸、齐墩果酮酸、路路通酸及芦丁为大枣质量差异性评价的指标成分, 为不同产地大枣的区分及质量控制提供参考。

关键词: 大枣; 多指标含量测定; 化学模式识别; 质量控制

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)13-1709-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.13.008

引用本文: 冯玉, 胡婧楠, 郝仲玟, 等. 不同产地大枣的 UPLC-MS/MS 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(13): 1709-1715.

UPLC-MS/MS Based Quantification of Multi-index Components and Chemical Pattern Recognition Study for Jujubae Fructus from Different Producing Areas

FENG Yu¹, HU Jingnan¹, XI Zhongwen¹, TIAN Yurou^{1,2,3,4}, NIU Liying^{1,2,3,4*} (1.Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; 2.Hebei Traditional Chinese Medicine Formula Granule Engineering & Technology Innovate Center, Shijiazhuang 050091, China; 3.Quality Evaluation & Standardization Hebei Province Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; 4.TCM Formula Granule Research Center of Hebei Province University, Shijiazhuang 050091, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish UPLC-MS/MS method for the determination of multiple indexes of Jujubae Fructus from different producing areas, and to provide reference for the quality control of Jujubae Fructus. **METHODS** The separation was performed on a Shim-pack GIST C₁₈(2.1 mm×100 mm, 2 μm) column using UPLC-MS/MS multiple reaction monitoring in negative ion scanning mode. Gradient elution was performed with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid in water(A) and acetonitrile(B) to determine the contents of adenosine cyclophosphate, chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, betulinic acid, betulonic acid and oleanolic acid in 25 batches of Jujubae Fructus. In addition, chemometrics methods including principal component analysis(PCA), hierarchical cluster analysis(HCA) and partial least squares discriminant analysis(PLS-DA) were used to evaluate the differences of 7 components between Jujubae Fructus from different producing areas. **RESULTS** The linear relationship of the 7 components was good in the corresponding concentration range, the correlation coefficient(r) was ≥ 0.995 6, the RSD of instrument precision was <3.55%, the average recoveries were between 99.17% and 100.74%, and RSD was <3.48%. The results of PCA and HCA showed that the Jujubae Fructus from different producing areas could be separated obviously, and the composition of the samples within the groups had strong similarity, but the differences among the groups were great. According to the variable importance in project analysis of PLS-DA, 4 different index components were found, namely betulinic acid, oleanolic acid, betulonic acid and rutin. **CONCLUSION** A method with strong specificity and high sensitivity is established for the determination of multiple indexes of Jujubae Fructus, and the statistical method proves that betulinic acid, oleanolic acid, betulonic acid and rutin are the index components for the quality evaluation of Jujubae Fructus from different producing areas, which can providing reference for the distinction and quality control of Jujubae Fructus from different producing areas.

KEYWORDS: Jujubae Fructus; multi-index content determination; chemical pattern recognition; quality control

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目(206Z2501G); 河北省重点研发计划项目(20372502D); 河北省自然科学基金项目(H2019423050)

作者简介: 冯玉, 女, 博士 E-mail: fengyuht@163.com *通信作者: 牛丽颖, 女, 硕士, 教授, 博导 E-mail: niuliyinygy@163.com

大枣 *Jujubae Fructus* 为鼠李科(Rhamnaceae)枣属 *Ziziphus* Mill.植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill.的干燥成熟果实, 又名华枣、红枣。始载于《神农本草经》, 被列为上品, 性甘、温, 归脾胃心经, 具有补中益气、养血安神、缓和药性的功效, 主要用于脾虚食少、乏力便溏、妇人脏躁。大枣的化学成分主要包括三萜类、有机酸类、皂苷类、黄酮类等化合物^[1], 现代药理研究表明大枣具有多种药理作用, 大枣中的环磷酸腺苷是改善心肌缺氧、扩张冠脉、增强心肌收缩力、增加心排血量的一种重要的活性物质, 三萜类化合物具有抗肿瘤、保肝、抗炎、抗微生物及免疫兴奋的药理活性, 黄酮类化合物具有舒张血管作用, 可以清除自由基, 延长戊巴比妥干预睡眠时间^[2-3]。目前, 关于大枣的多指标成分含量测定研究有较多报道, 采用不同的研究方法对大枣中芦丁、齐墩果酸、熊果酸、环磷酸腺苷、桦木酮酸等指标成分进行了含量测定, 为大枣药材质量标准的评价提供了借鉴^[4-7]。但是, 关于不同产地大枣的比较研究报道较少, 因此, 有必要对不同产地的大枣药材化学成分的差异进行更深入的比较研究, 并为不同产地大枣的鉴别和质量控制提供依据。液质联用技术作为中药质量控制中最为突出的检测手段之一, 具有选择性强、灵敏度高等优点^[8]。化学计量学是以计算机和近代计算技术为基础的一门新兴交叉学科, 通过统计学或数学方法在化学体系的测量值与体系的状态之间建立联系, 在中药鉴别、定性表征、质量控制、组效关系等研究中均有广泛应用, 尤其在中药的质量控制与评价研究中具有重要意义^[9-11]。因此, 本研究采用 UPLC-MS/MS 对大枣中环磷酸腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸及齐墩果酮酸 7 种指标成分进行含量测定, 并结合化学模式识别方法, 比较不同产地大枣的差异, 寻找差异性标志物, 以期为大枣药材的质量控制和临床的合理使用提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Shimadzu LC-30A 超高效液相色谱仪(日本岛津公司, 包括 DGU-30A3 型在线真空脱气机、LC-30AD 型二元泵、SIL-30AC 型自动进样器、CTO-30A 型柱温箱); 4500 QTRAP 三重四级杆线性离子阱质谱仪(配有电喷雾离子源)、Analyst® TF 1.6 数据采集软件均来自美国 AB 公司; BSA224S-

CW、CPA225D 型电子分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); HYCD-282A 型医用冷藏冷冻箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司); JY10001 型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); YB-150 型多功能粉碎机(永康市速锋工贸有限公司); UPR-11-20L 型优普系列超纯水机(四川优普超纯科技有限公司); KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); TGL-16M 型高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 试药

对照品: 路路通酸(批号: PS011832; 纯度: 98.0%)、齐墩果酮酸(批号: PS000732; 纯度: 98.0%)、白桦脂酸(批号: PS011682; 纯度: 98.0%)、环磷酸腺苷(批号: PS020437; 纯度: 98.0%)均购自成都普思生物科技股份有限公司; 芦丁(批号: 100080-201610; 纯度: 91.9%)、绿原酸(批号: 110753-201716; 纯度: 99.3%)、咖啡酸(批号: 110885-200102; 纯度: 100%)均购自中国食品药品检定研究院。所有大枣药材均由神威药业集团有限公司提供, 经河北省药品检验院主任中药师孙宝惠鉴定为鼠李科(Rhamnaceae)枣属 *Ziziphus* Mill.植物枣 *Ziziphus jujuba* Mill.的干燥成熟果实。药材产地信息见表 1。

表 1 25 批大枣药材信息

Tab. 1 Information of 25 batches of *Jujubae Fructus*

序号	批号	产地信息
1	YF18082401	新疆
2	YF18082402	新疆
3	YF18082403	新疆
4	YF18082404	新疆
5	YF18082405	新疆
6	YF18082406	新疆
7	YF18082407	甘肃
8	YF18082408	甘肃
9	YF18082409	甘肃
10	YF180824010	甘肃
11	YF180824011	甘肃
12	YF180824012	甘肃
13	YF180824013	河北
14	YF180824014	河北
15	YF180824015	河北
16	YF180824016	河北
17	YF180824017	河北
18	YF180824018	河北
19	DZ1807262	山西闻喜
20	DZ1807263	山西闻喜
21	DZ180311	河南安阳
22	DZ180312	河南安阳
23	DZ180313	河南安阳
24	DZ180314	河南安阳
25	DZ180315	河南安阳

乙腈、甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);甲酸(色谱纯, Dikma, USA); 其他试剂均为分析纯;实验用水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制

分别称取环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸、齐墩果酮酸对照品适量,精密称定,加色谱甲醇溶解并定容,制成一定浓度的单一对照品储备液,保存于 4℃ 冰箱中备用;取储备液适量稀释制成含环磷腺苷 $1.0217 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、绿原酸 $0.0253 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、咖啡酸 $0.0256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、芦丁 $0.2215 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、白桦脂酸 $2.1815 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、路路通酸 $0.2648 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、齐墩果酮酸 $0.7137 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,所测定指标成分的结构式见图 1。

2.2 供试品溶液的制备

取大枣药材, -20℃ 冷冻 24 h, 粉碎并过 40 目筛。精密称取上述大枣粉末 0.2 g, 置于 25 mL 具塞锥形瓶中, 加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 精密称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 取出放冷, 再称定, 用 70% 甲醇补足损失质量, 摇匀, $10000 \times g$ 10 min, 取上清液, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3 色谱质谱条件

2.3.1 色谱条件 Shim-pack GIST C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 2 μm), 柱温 35℃, 0.1% 甲酸

水溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0~16 min, 98%→79%A; 16~17 min, 79%→32%A; 17~27 min, 32%A; 27~29 min, 32%→98%A; 29~33 min, 98%A), 体积流量 $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 2 μL 。

2.3.2 质谱条件 采用多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)的扫描方式下负离子监测, 离子源为电喷雾离子源, 离子化电压为 -4 500 V, 离子源温度为 550℃, 喷雾气(N₂)为 380 kPa(55 psi), 辅助气(N₂)为 380 kPa(55 psi), 接口持续加热, 全程通入氮气, 气帘气(N₂)为 242 kPa(35 psi), 碰撞气压力为 medium, 每个离子对的滞留时间为 100 ms。每个待测化合物的监测离子对、解簇电压及碰撞能量见表 2。在此条件下大枣样品及混合对照品的色谱图见图 2。

表 2 7 种指标成分的质谱参数

Tab. 2 Mass spectrum parameters of 7 index components

指标成分	分子量	MS ₁ (m/z)	MS ₂ (m/z)	解簇电压/V	碰撞能量/eV
环磷腺苷	329.21	327.8[M-H] ⁻	133.5	-146.7	-30.0
绿原酸	354.31	353.2[M-H] ⁻	190.7	-62.0	-23.0
咖啡酸	180.16	178.6[M-H] ⁻	134.7	-109.0	-21.0
芦丁	610.52	609.1[M-H] ⁻	299.6	-195.9	-42.2
白桦脂酸	456.71	455.4[M-H] ⁻	455.4	-210.6	-20.0
路路通酸	454.34	453.4[M-H] ⁻	453.4	-208.3	-16.0
齐墩果酮酸	454.68	453.4[M-H] ⁻	453.4	-53.8	-26.2

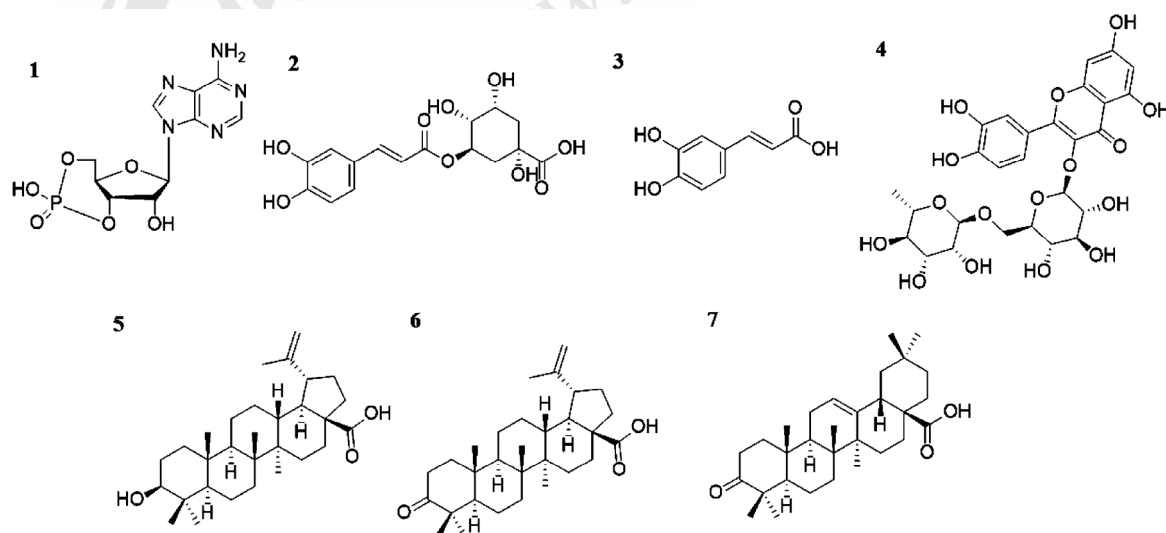


图 1 7 种指标成分的化学结构式

1-环磷腺苷; 2-绿原酸; 3-咖啡酸; 4-芦丁; 5-白桦脂酸; 6-路路通酸; 7-齐墩果酮酸。

Fig. 1 Chemical structural formulae of 7 index components

1-adenosine cyclophosphate; 2-chlorogenic acid; 3-cafeic acid; 4-rutin; 5-betulinic acid; 6-betulonic acid; 7-oleanolic acid.

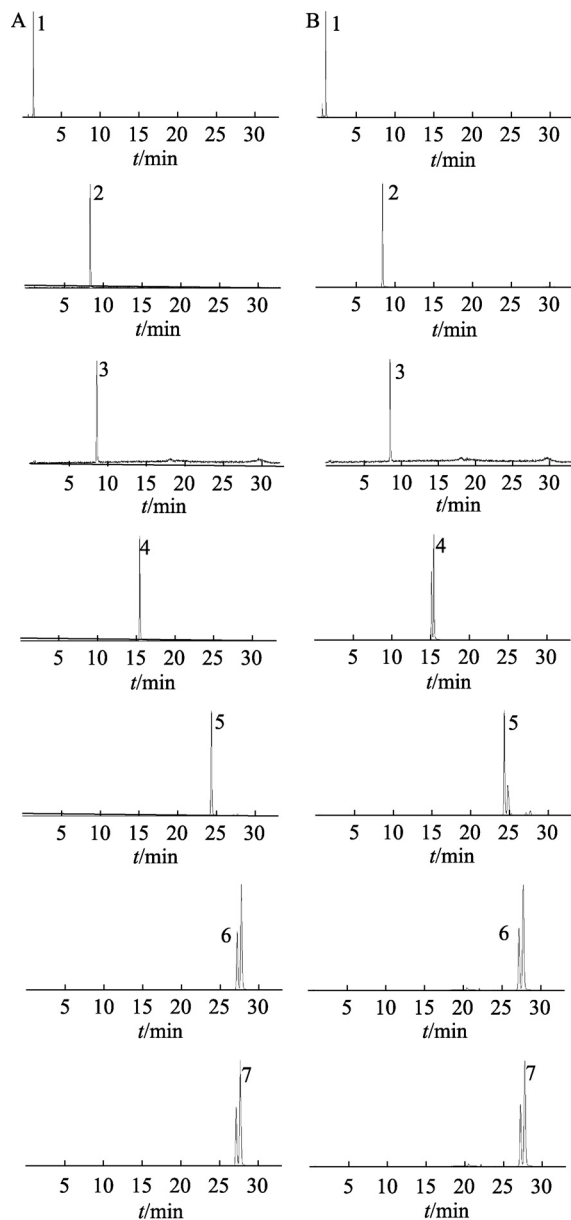


图2 混合对照品溶液(A)和大枣样品(B)中7种指标成分的MRM质谱图
1-环磷腺苷; 2-绿原酸; 3-咖啡酸; 4-芦丁; 5-白桦脂酸; 6-路路通酸; 7-齐墩果酮酸。

Fig. 2 MRM mass spectra of 7 index components in mixed standard solutions(A) and Jujubae Fructus(B)
1-adenosine cyclophosphate; 2-chlorogenic acid; 3-caffeic acid; 4-rutin; 5-betulinic acid; 6-betulonic acid; 7-oleanolic acid.

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 取“2.1”项下对照品溶液, 加甲醇逐级稀释制成6种质量浓度梯度的标准曲线工作溶液。按“2.3”项下液质联用条件进行样品分析, 记录色谱图及峰面积。以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X), 进行线性回归, 结果表明, 在考察范围内, 7种测定成分的质量浓度与峰面积呈良好的线性关系, r 均 ≥ 0.9956 , 见表3。

表3 7个指标成分的线性关系及线性范围

Tab. 3 Regression equations and linear ranges of 7 index components

待测成分	回归方程	r	线性范围/ng·mL ⁻¹
环磷腺苷	$Y=4.00 \times 10^9 X + 1.89 \times 10^6$	0.995 6	165.56~3 218.38
绿原酸	$Y=5.27 \times 10^9 X + 2.83 \times 10^3$	0.999 4	3.52~68.40
咖啡酸	$Y=1.80 \times 10^{10} X - 8.87 \times 10^3$	0.999 3	3.56~69.20
芦丁	$Y=1.29 \times 10^9 X + 1.40 \times 10^3$	0.999 4	30.77~598.18
白桦脂酸	$Y=2.95 \times 10^9 X + 9.40 \times 10^4$	0.999 0	302.98~5 890.00
路路通酸	$Y=5.29 \times 10^9 X + 1.07 \times 10^3$	0.999 9	36.78~714.96
齐墩果酮酸	$Y=1.40 \times 10^9 X - 4.19 \times 10^4$	0.997 7	99.13~1 927.03

2.4.2 仪器精密度试验 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液2 μ L, 按“2.3”项下液质联用条件进样分析, 连续进样6次, 测定7种待测成分的峰面积, 并计算峰面积的RSD值。结果显示环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸及齐墩果酮酸的RSD值分别为2.11%, 3.55%, 1.32%, 1.41%, 0.73%, 0.58%, 2.06%, 表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验 称取大枣(批号: DZ1807262)样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于0, 5, 10, 14, 18, 24 h按“2.3”项下液质联用条件进样分析测定, 记录各待测成分的峰面积, 计算RSD值。结果显示环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸、齐墩果酮酸峰面积RSD分别为2.70%, 3.05%, 4.10%, 2.29%, 1.41%, 0.94%, 4.37%, 表明供试品溶液24 h内稳定性良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批次的大枣(批号: DZ1807262)样品9份, 分别精密称取低(0.10 g)、中(0.20 g)、高(0.30 g)3个水平样品量, 每个水平3份样品, 按“2.2”项下方法平行制备供试品溶液, 精密吸取各供试品溶液2 μ L, 按“2.3”项下液质联用条件进样分析测定, 计算含量。结果显示环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸、齐墩果酮酸含量的RSD分别为3.34%, 1.95%, 3.69%, 1.80%, 1.83%, 3.78%, 2.66%($n=9$), 结果表明该方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验 取同一批次的大枣(批号: DZ1807262)样品9份, 每份取约0.10 g, 精密称定, 按每3份为1组, 每组精密加入对照品环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸、齐墩果酮酸的量相当于大枣样品中各对照品含量的50%, 100%, 150%, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取各供试品溶液

2 μ L, 按“2.3”项下液质联用条件进样分析, 测定峰面积, 计算含量, 分别计算 7 个成分的加样回收率。结果显示环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸、齐墩果酮酸平均加样回收率分别为 100.74%, 99.22%, 99.97%, 100.74%, 100.30%, 100.28%, 99.17%($n=9$), 其 RSD 值分别为 1.83%, 1.96%, 1.37%, 2.36%, 2.50%, 3.48%, 2.80%, 表明该方法准确度良好。

2.5 含量测定

取 25 批次大枣样品, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.3”项下液质联用条件进样分析测定, 记录各待测成分的峰面积, 计算不同批次大枣样品中环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸和齐墩果酮酸的含量。测定结果见表 4。

2.6 多元统计分析

为了比较直观地比较不同产地大枣中 7 种化学成分存在的差异以及使其产生差异的化学成分, 采用 SIMCA 14.1 软件分别对 25 批不同产地的大枣中 7 种成分的含量进行了主成分分析 (principal

component analysis, PCA)、层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 和偏最小二乘判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)。通过 PCA, 前 3 个主成分的累计贡献率为 80.08%, 可以反映大枣样品的整体质量。从 PCA 得分图可以看出, YF18082401- YF18082406 为新疆产大枣; YF18082407- YF18082412 为甘肃产大枣, 但批号为 YF18082411 的大枣与其他批次距离较远, 说明这一批次与其他批次差异较大; YF18082413- YF18082418 为河北产大枣; DZ1807262- DZ1807263 为山西闻喜产大枣; DZ180311- DZ180315 为河南安阳产大枣, 同甘肃产大枣一样, 也有一批差异性较大, 但不同产地的大枣基本可以各自分为一类, 结果见图 3。从 HCA 图中可以看出, 其分析结果与 PCA 分析结果一致, 结果见图 4。以变量 VIP 值 > 1.0 为显著影响, 共找到大枣药材 4 个差异性标志物, 分别为白桦脂酸、齐墩果酮酸、路路通酸、芦丁, 可以用于区分不同产地的大枣, 根据 VIP 值大小进行排序, 分别为白桦脂酸 > 齐墩果酮酸 > 路路通酸 > 芦丁, 结果见图 5。

表 4 大枣 7 种指标成分的含量

Tab. 4 Contents of 7 index components from Jujubae Fructus

序号	批号	含量/mg·g ⁻¹						
		环磷腺苷	绿原酸	咖啡酸	芦丁	白桦脂酸	路路通酸	齐墩果酮酸
1	YF18082401	0.116 4	0.000 1	0.000 4	0.117 1	0.893 1	0.349 8	0.680 4
2	YF18082402	0.118 0	0.000 1	0.000 5	0.187 7	1.138 7	0.487 2	0.947 0
3	YF18082403	0.160 4	0.000 5	0.000 5	0.138 7	1.095 4	0.433 0	0.855 1
4	YF18082404	0.129 2	0.000 2	0.000 4	0.150 6	0.859 4	0.308 1	0.618 6
5	YF18082405	0.131 4	0.000 1	0.000 4	0.140 3	1.066 0	0.435 0	0.923 0
6	YF18082406	0.122 1	0.000 0	0.000 5	0.136 9	1.094 8	0.377 7	0.781 8
7	YF18082407	0.043 3	0.000 1	0.000 6	0.078 7	0.617 7	0.446 9	1.089 5
8	YF18082408	0.075 4	0.000 0	0.000 5	0.128 1	0.815 3	0.432 9	1.070 0
9	YF18082409	0.093 2	0.000 1	0.000 4	0.104 0	0.663 7	0.416 6	0.944 4
10	YF18082410	0.036 6	0.000 2	0.000 4	0.082 1	0.724 6	0.496 0	1.138 3
11	YF18082411	0.180 7	0.005 4	0.000 7	0.086 7	1.090 9	0.426 0	0.647 6
12	YF18082412	0.062 3	0.000 4	0.000 5	0.112 9	0.748 0	0.480 3	1.030 7
13	YF18082413	0.068 0	0.000 4	0.001 4	0.121 7	0.934 7	0.407 9	1.000 9
14	YF18082414	0.047 6	0.000 2	0.001 0	0.176 9	1.162 9	0.559 6	1.279 5
15	YF18082415	0.050 4	0.000 1	0.000 9	0.140 4	1.018 1	0.501 1	1.111 1
16	YF18082416	0.062 8	0.000 1	0.001 1	0.130 0	1.023 3	0.459 6	0.920 8
17	YF18082417	0.064 2	0.000 1	0.001 2	0.125 7	1.000 4	0.441 0	1.017 4
18	YF18082418	0.078 9	0.000 1	0.001 3	0.148 9	1.139 2	0.522 0	1.183 6
19	DZ180311	0.163 2	0.001 5	0.000 6	0.073 2	1.116 3	0.476 6	0.731 1
20	DZ180312	0.120 4	0.000 5	0.000 6	0.105 5	0.990 8	0.334 5	0.574 1
21	DZ180313	0.141 8	0.007 3	0.000 4	0.100 5	1.092 8	0.445 8	0.753 9
22	DZ180314	0.045 5	0.000 0	0.000 5	0.102 1	0.746 6	0.466 8	1.014 1
23	DZ180315	0.243 4	0.001 3	0.000 7	0.061 9	1.048 3	0.501 3	0.801 2
24	DZ1807262	0.184 9	0.000 1	0.000 8	0.046 8	0.851 8	0.233 7	0.512 6
25	DZ1807263	0.175 3	0.000 1	0.000 8	0.048 0	0.816 6	0.224 2	0.475 6

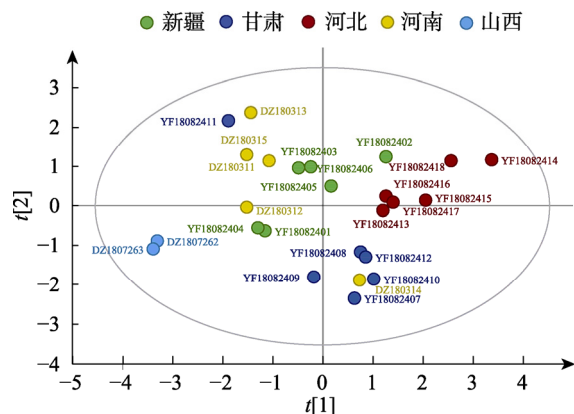


图 3 25 批大枣 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score chart of 25 batches of Jujubae Fructus

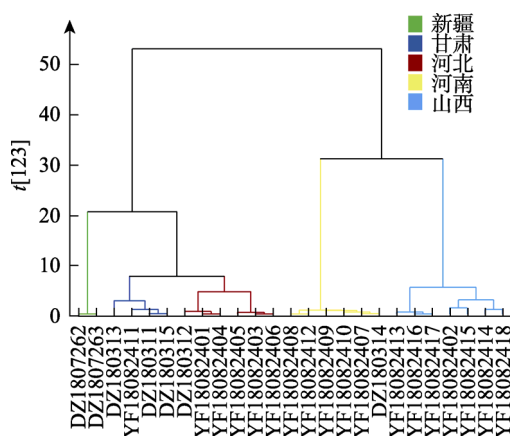


图 4 25 批大枣 HCA 得分图

Fig. 4 HCA score chart of 25 batches of Jujubae Fructus

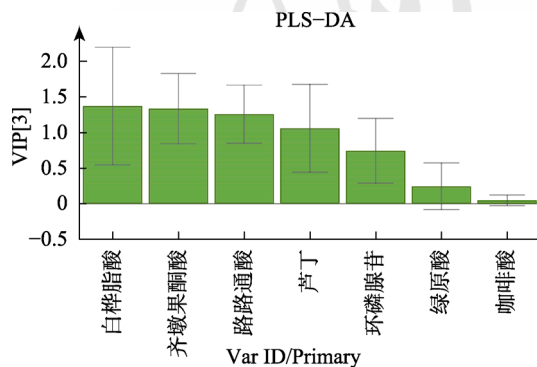


图 5 25 批大枣 VIP 得分图

Fig. 5 VIP score chart of 25 batches of Jujubae Fructus

3 讨论

液质联用技术具有选择性强、灵敏度高、分离性能好等优势,目前已广泛应用于中药及其复方制剂的化学成分定性定量分析、中药材质量控制、中药药动学等方面的研究^[8]。研究采用 UPLC-MS/MS,在 33 min 内完成对大枣主要色谱峰的良好分离。在流动相的筛选过程中,考察了乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.5%乙酸铵溶液 2

种不同溶剂系统对大枣药材中主要成分的洗脱和分离效果,结果显示,以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相时各色谱峰能在较短时间内出峰,且分离度较好。另外对供试品溶液的制备方法进行了考察,分别考察了甲醇、50%甲醇、70%甲醇、乙醇、50%乙醇和 70%乙醇提取溶媒的提取效果,以指标成分的含量测定结果作为考察指标,结果发现 70%甲醇及 70%乙醇的提取效率较高,但 70%乙醇对环磷腺苷的提取效率较低,最终确定 70%甲醇为提取溶媒。还考察了超声时间对大枣中指标成分的提取效果,分别考察了超声 20, 30, 40 min 对指标成分含量的影响,结果发现超声 30 min 时,已提取完全,所以将 70%甲醇超声的时间定为 30 min。

本研究对大枣中的环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸、齐墩果酮酸 7 种指标成分进行了含量测定,所选择的指标成分在大枣中均具有一定的药理活性。环磷腺苷在大枣中含量较高,牟德华等^[12]研究表明环磷腺苷参与人体多种生理反应,对人体糖代谢、脂肪代谢、蛋白质代谢及免疫功能等具有重要的调节作用,并且是细胞内传递激素和递质作用的中介因子,起着放大激素的作用信号和控制遗传信息的作用,能舒张平滑肌、扩张血管、改善肝功能、激活蛋白。白桦脂酸、齐墩果酮酸及路路通酸为大枣中的三萜类化合物,研究表明大枣中的三萜类化合物具有抗肿瘤作用,能够诱导肿瘤细胞凋亡,对多种肿瘤细胞具有选择性细胞毒性,对四氯化碳所致的肝损伤具有保护作用。芦丁能够舒张血管,且具有拮抗血小板活化因子的作用^[2]。咖啡酸及绿原酸等有机酸类成分具有抗炎反应、抗氧化、抑制血小板聚集的药理作用,对心血管疾病的防治具有重要的临床应用价值^[13],但咖啡酸及绿原酸在大枣中的含量比较低。

化学模式识别技术可对 HPLC、UPLC-Q-TOF/MS、IR、NMR 等多种现代仪器分析获取的数据进行客观分析,将整个图谱信息数量化,进而使其可以被计算机识别与处理,从而可以更加客观地反映中药的质量信息,达到全面控制中药质量的目的^[14]。化学模式识别技术已在中药质量控制研究中得到了广泛应用,HCA 和 PCA 为无监督的模式识别方法,被广泛应用在中药不同产地的研究中,PLS-DA 是一种有监督的模式识别方

法,适用于区分 2 类及更多类别的样本,同时具备线性判别分析的分类能力又兼具 PLS 降维、降噪的优势^[15]。本研究对不同产地大枣中多种指标成分的含量进行了 PCA、HCA、PLS-DA 的分析,通过 PCA、HCA 发现,PCA 与 HCA 结果一致,均将 25 批大枣分为 5 类,YF18082401-YF18082406 为新疆产大枣,YF18082407-YF18082412 为甘肃产大枣,YF18082413-YF18082418 为河北产大枣,DZ1807262-DZ1807263 为山西闻喜产大枣,DZ180311-DZ180315 为河南安阳产大枣,不同产地的大枣基本可以各自分为一类。本研究又通过 PLS-DA 的 VIP 功能,以变量 VIP 值>1.0 为显著影响,共找到大枣药材 4 个差异性标志物,分别为白桦脂酸、齐墩果酮酸、路路通酸及芦丁,根据 VIP 值大小进行排序,分别为白桦脂酸>齐墩果酮酸>路路通酸>芦丁,结果表明白桦脂酸、齐墩果酮酸、路路通酸、芦丁是不同产地大枣中的差异性指标成分,可以用于区分不同产地的大枣。

本研究建立了一种采用 UPLC-MS/MS 同时测定大枣中环磷腺苷、绿原酸、咖啡酸、芦丁、白桦脂酸、路路通酸和齐墩果酮酸的多指标含量测定方法,该方法分析时间短、专属性强、灵敏度高、重复性、稳定性及准确度良好,并将其成功应用于 25 批不同产地大枣样品的多指标含量测定中。并对其含量测定结果进行了多元统计分析,结果表明 25 批大枣样品能够在不同的产地之间达到分类,即这 7 种成分的含量可以有效区分不同产地的大枣样品,且白桦脂酸、齐墩果酮酸、路路通酸、芦丁为主要差异性指标成分,为进一步将其作为质量差异性评价的指标成分提供依据,为不同产地的大枣质量差异性评价及质量控制提供参考。

REFERENCES

- [1] LIU S J, TANG Z S, CUI C L, et al. Advances in studies on chemical constituents of *Ziziphus jujuba*[J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med(云南中医学院学报), 2015, 38(3): 96-100.
- [2] 郭盛, 唐于平, 段金殿. 大枣的化学成分及药理作用研究进展[C]//全国第 8 届天然药物资源学术研讨会论文集, 2008: 567-574.
- [3] WU G T, HE X F, NIU T H, et al. Research progresses of chemistry, pharmacology and application of *ziziphus jujuba*[J]. China Fruit Veg(中国果菜), 2016, 36(10): 25-28.
- [4] XU X Y, ZHENG Y M, FU S Q, et al. Quantitative determination in *Ziziphus jujuba* of rutin by HPLC[J]. Food Sci(食品科学), 2004, 25(4): 147-149.
- [5] HOU G Y, ZHAI Z H, ZHOU L L, et al. Determination of oleanolic acid, ursolic acid, cyclic adenosine monophosphate and cyclic guanosine monophosphate in *Jujubae Fructus* by high performance liquid chromatography[J]. Chin J Heal Lab Technol(中国卫生检验杂志), 2018, 28(13): 1548-1551.
- [6] GUO S, DUAN J N, ZHU S Q, et al. Establishment of a method for determination of triterpenic acids in *Jujubae Fructus* based on quantitative analysis of multi-components by single-marker[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(21): 3884-3889.
- [7] CHEN X, LIU Y G, WANG Y X, et al. Simultaneous determination of rutin and jujuboside B in *Ziziphus jujuba* by HPLC[J]. China Pharm(中国药房), 2010, 21(3): 247-248.
- [8] WANG D, YU J, ZHAN G, et al. Advance in application of chromatography-mass spectrometry technology in study of traditional Chinese medicine[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2022, 40(2): 68-71.
- [9] MA S Y, SHEN L, HONG Y L, et al. Application of chemometrics in quantitative characterization of traditional Chinese medicine[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol(世界科学技术-中医药现代化), 2014, 16(12): 2700-2707.
- [10] YOU M, XIA M Q, YU Y Y, et al. Quality control research of compound *Chupencao* decreasing enzyme granules based on fingerprint combined with multi-components chemical pattern analysis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020(21): 2610-2616.
- [11] LI Z L, ZHOU L, WANG X H, et al. Quality control research of qishen Yiqi dripping pills based on UPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(14): 1754-1760.
- [12] MOU D H, ZHU Y L, ZHANG Y F, et al. The cyclic AMP within *Ziziphus jujube* and its biological properties[J]. Food Sci Technol(食品科技), 2007, 32(5): 273-275.
- [13] TANG X L, LIU J X, LI L. Pharmacological effects of organic acids in Chinese herbs and its application in cardiovascular diseases[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(5): 243-246.
- [14] SUN L L, WANG M, REN X L. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(20): 4339-4345.
- [15] WONG K H, RAZMOVSKI-NAUMOVSKI V, LI K M, et al. Differentiating *Puerariae Lobatae Radix* and *Puerariae Thomsonii Radix* using HPTLC coupled with multivariate classification analyses[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014(95): 11-19.

收稿日期: 2021-12-09

(本文责编: 李艳芳)