

小檗皮 HPLC 指纹图谱建立及不同品种模式识别

徐鑫梅¹, 易 欢¹, 赖先荣², 冯 图³, 李 琪¹, 蒋桂华^{2*}, 范 刚^{2*}
(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137;
3. 贵州工程应用技术学院生态工程学院, 贵州 毕节 551700)

摘要: **目的** 建立小檗皮 HPLC 指纹图谱, 并进行不同品种模式识别。**方法** 小檗皮盐酸-70% 甲醇提取物的分析采用 WondaSil® C₁₈-WR 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.2% 磷酸, 梯度洗脱; 检测波长 210 nm。采用 SIMCA-P 软件, 对小檗皮 3 个主流品种的共有峰进行模式识别分析。**结果** 15 批样品 HPLC 指纹图谱中有 13 个共有峰, 并鉴定了其中 6 个, 相似度 0.779~0.964, 模式识别分析能够很好的区分 3 个基原品种。**结论** 该方法简便、可靠, 可用于小檗皮的基原鉴定及质量控制。小檗皮 3 个品种之间的化学成分存在明显差异。
关键词: 小檗皮; HPLC 指纹图谱; 模式识别
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)01-0264-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.01.052

小檗皮为小檗科植物甘肃小檗 *Berberis kansuensis* Schneid. 及其同属多种植物的干燥内皮^[1], 能清热、解毒、燥湿, 常用于治疗痢疾、尿路感染、肾炎、结膜炎等疾病^[2-3]。《晶珠本草》中记载有“小檗皮性凉、糙, 能敛诸毒, 干黄水”^[4]。现代药理学研究发现, 小檗皮可有效降低四氧嘧啶所致糖尿病模型小鼠血糖水平, 能防治糖尿病小鼠视网膜病变, 并能改善受损的视网膜微血管形态^[5-8]。小檗皮为典型的多基原藏药材, 同属多种植物均能入药。课题组前期对小檗皮进行了详细的资源调查及文献考证^[9], 发现目前各藏医院、藏药厂及药材市场上使用的主流品种包括甘肃小檗 *Berberis kansuensis* Schneid.、鲜黄小檗 *Berberis diaphana* Maxim. 和匙叶小檗 *Berberis verna* Schneid. 等。小檗皮药材的基原多样性和混淆使用不利于市场监管, 也影响其质量稳定性和临床使用。因此, 建立简便、可行的品种鉴别方法对于小檗皮药材的质量控制具有重要的意义。

现代研究表明, 小檗皮药材主要含有小檗碱、木兰花碱、巴马汀等生物碱类成分^[10-12]。张琦等^[13]采用 HPLC 法测定了小檗皮中小檗碱的含量; 莫家祺等^[14]采用紫外分光光度法测定了总生物碱含量; 李琪等^[15]采用 HPLC 法对小檗皮药材中 6 种成分进行含量测定。然而, 单一成分或多成分的含量测定仍不够全面, 不能完全反映小檗皮药材的内在质量。指纹图谱具有信息量大、特征性强、整体性和模糊性等特点, 可充分反映各成分分布的整体情况^[16-18]。

因此, 本研究首次建立了小檗皮药材的 HPLC 指纹图谱, 运用相似度评价、主成分分析 (PCA) 及偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA) 对不同品种的小檗皮药材进行综合评价, 以期为其基原鉴定及质量控制提供参考。

1 材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Sartorius BP121s 电子天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); ULUP-I-10T 优普超纯水机 (成都超纯科技有限公司); CQ-250 超声波清洗器 (上海必能信有限公司)。

蟾毒色胺内盐、阿魏酸 4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷对照品均由本课题组自制, 经 HPLC 检测纯度均>99%; 木兰花碱 (批号 MUST-18071701, 纯度>99%) 对照品购于成都曼思特生物科技有限公司; 药根碱 (批号 Y-023-141201)、巴马汀 (批号 H-015-150808)、小檗碱 (批号 Y-035-150818) 对照品均购于四川赛因斯特生物科技有限公司, 纯度均>98%。磷酸、乙腈为色谱纯; 甲醇、盐酸为分析纯; 水为超纯水。本研究共收集 15 批小檗皮, 采用植物分类学及课题组前期建立的 DNA 条形码方法^[9]鉴定分别为鲜黄小檗 *Berberis diaphana*、匙叶小檗 *Berberis verna* 和甘肃小檗 *Berberis kansuensis*, 具体信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 WondaSil® C₁₈-WR 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -0.2% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 5%~12% A; 10~15 min, 12%~15% A;

收稿日期: 2019-07-26
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81303310, 81874370); 成都市科技局项目 (2018-YFYF-00053-SN); 贵州省教育厅科技拔尖人才支持计划项目 (黔教合 KY 字 [2018] 072)
作者简介: 徐鑫梅 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中药品种、品质与资源开发研究。E-mail: 1483773389@qq.com
* 通信作者: 蒋桂华 (1970—), 女, 博士, 教授, 研究方向为中药品种与质量。Tel: (028) 61656141, E-mail: 11469413@qq.com
范 刚 (1983—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为民族药质量控制及药效物质基础。Tel: (028) 61656141, E-mail: fangang1111@163.com

表 1 样品信息

编号	品种	拉丁名	来源
S1	鲜黄小檗	<i>Berberis diaphana</i>	四川省康定县雅加埂
S2	鲜黄小檗	<i>Berberis diaphana</i>	四川省康定县折多山二台子
S3	鲜黄小檗	<i>Berberis diaphana</i>	甘肃省合作市
S4	匙叶小檗	<i>Berberis vernae</i>	青海省大通县
S5	匙叶小檗	<i>Berberis vernae</i>	甘肃省卓尼县地利村
S6	匙叶小檗	<i>Berberis vernae</i>	甘肃省卓尼县刀告乡
S7	匙叶小檗	<i>Berberis vernae</i>	青海省同仁县
S8	匙叶小檗	<i>Berberis vernae</i>	甘肃夏河县王格尔塘镇
S9	匙叶小檗	<i>Berberis vernae</i>	甘肃省夏河县达麦店村
S10	甘肃小檗	<i>Berberis kansuensis</i>	青海省泽库县麦秀乡
S11	甘肃小檗	<i>Berberis kansuensis</i>	青海省门源县
S12	甘肃小檗	<i>Berberis kansuensis</i>	青海省同仁县曲库乎乡
S13	甘肃小檗	<i>Berberis kansuensis</i>	甘肃省临潭县术布乡
S14	甘肃小檗	<i>Berberis kansuensis</i>	甘肃省卓尼县
S15	甘肃小檗	<i>Berberis kansuensis</i>	四川省成都国际贸易城中药材市场

15~20 min, 15%~18% A; 20~30 min, 18% A; 30~40 min, 18%~30% A); 柱温 30 ℃; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 210 nm; 进样量 10 μL。

2.2 对照品溶液制备 精密称取小檗碱、巴马汀、药根碱、木兰花碱、蟾毒色胺内盐、阿魏酸 4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷适量, 置于 5 mL 量瓶中, 甲醇制成 1.500、1.725、1.950、1.925、2.950、2.590 mg/mL 贮备液。分别精密量取 2 mL 置于同一 25 mL 量瓶中, 甲醇制成每 1 mL 含小檗碱 0.120 mg、巴马汀 0.138 mg、药根碱 0.156 mg、木兰花碱 0.154 mg、蟾毒色胺内盐 0.236 mg、阿魏酸 4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷 0.207 mg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.3 供试品溶液制备 取药材粉末(过 3 号筛)约 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入盐酸-70% 甲醇(1:100)溶液 50 mL, 称定质量, 超声 30 min, 放冷, 再称定质量, 盐酸-70% 甲醇(1:100)溶液补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 空白试验 取盐酸-70% 甲醇(1:100)溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样, 发现溶剂对小檗皮指纹图谱测定没有干扰。

2.4.2 完整试验 取样品(S15)约 0.2 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样, 记录 120 min 的色谱图。结果, 60 min 后未出现色谱峰, 可完整记录小檗皮样品各化学成分信息。

2.4.3 精密度试验 取样品(S15)约 0.2 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次。结果, 以木兰花碱为参照峰时, 各共有峰相对保留时间 RSD<0.6%, 相对峰面积 RSD<2.9%。将其色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 年 A 版)进行评价, 发现其相似度均大于 0.999, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取样品(S15)约 0.2 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条

件下于 0、1、2、3、4、6、12、24 h 进样。结果, 以木兰花碱为参照峰时, 各共有峰相对保留时间 RSD<0.6%, 相对峰面积 RSD<3.0%。将其色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 年 A 版)进行评价, 发现其相似度均大于 0.999, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取样品(S15)6 份各 0.2 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样。结果, 以木兰花碱为参照峰时, 各共有峰相对保留时间 RSD<2.9%, 相对峰面积 RSD<3.0%。将其色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 年 A 版)进行评价, 发现其相似度均大于 0.975, 表明该方法重复性良好。

2.5 样品含量测定 参照课题组前期建立的 HPLC 含量测定方法^[15], 对 15 批样品 6 种成分含量进行测定, 并将结果导入 SIMCA-P 14.1 软件进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)。PCA 模型自动拟合选择了 4 个主成分, 其累计贡献率为 94.6%, PCA 得分图见图 3A, 可知鲜黄小檗和匙叶小檗不能得到有效的区分。此外, PLS-DA 分析参数分别为 R²X=84.6%、R²Y=81.3%、Q²=43.0%, 表明模型良好; PLS-DA 得分图见图 3B, 与 PCA 结果相似, 两者仍然不能得到明显的分类。

2.6 HPLC 指纹图谱建立及相似度评价

2.6.1 参照峰选择 木兰花碱为小檗皮质量评价的重要指标之一, 每批样品中均含有这种成分, 其色谱峰在色谱图中分离度良好, 峰面积最大, 保留时间和峰面积较为稳定, 故选择其作为参照峰。

2.6.2 指纹图谱建立 15 批药材按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样, 其色谱图以 AIA 格式导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004 年 A 版)。将 S1 号样品的图谱设为参照图谱, 采用中位数法, 时间窗宽度设为 0.5 min, 进行多点校正和色谱峰匹配, 最终确定了 13 个共有峰, 得到指纹图谱叠加图, 并生成对照指纹图谱, 见图 1。

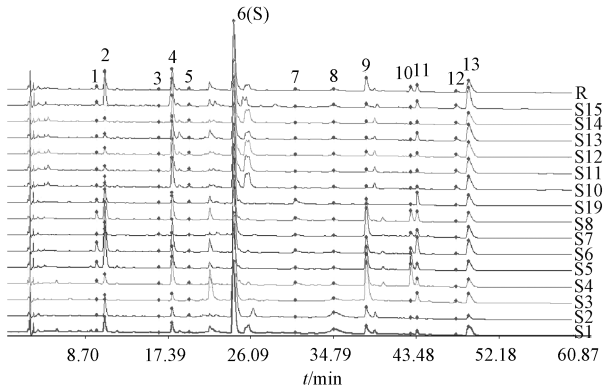
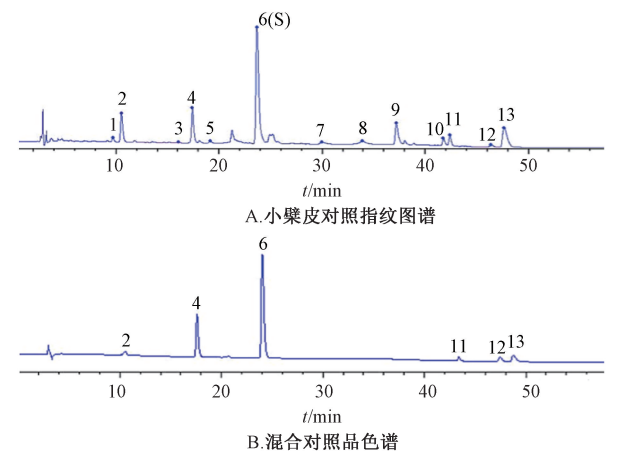


图 1 15 批样品 HPLC 指纹图谱

2.6.3 共有峰确认 将小檗皮对照指纹图谱与标准品图谱比对, 指认了其中 6 个共有峰, 分别为蟾毒色胺内盐(2 号峰)、阿魏酸 4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷(4 号峰)、木兰花

碱（6 号峰）、药根碱（11 号峰）、巴马汀（12 号峰）、小檗碱（13 号峰），见图 2。以木兰花碱（6 号峰）作为参照物峰（S），指定其相对峰面积值为 1.000，计算指纹图谱中其他共有特征峰的相对峰面积比值，见表 2。



2. 蟾毒色胺内盐 4. 阿魏酸 4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷 6. 木
兰花碱 11. 药根碱 12. 巴马汀 13. 小檗碱

图 2 小檗皮中各成分色谱图

2.6.4 相似度评价 将 15 批药材的 HPLC 指纹图谱

表 2 15 批样品指纹图谱共有峰相对峰面积													
编号	1	2	3	4	5	6(S)	7	8	9	10	11	12	13
S1	0.019	0.155	0.005	0.105	0.013	1.000	0.012	0.257	0.112	0.013	0.041	0.013	0.232
S2	0.006	0.161	0.005	0.067	0.022	1.000	0.005	0.236	0.122	0.009	0.011	0.004	0.051
S3	0.003	0.006	0.004	0.059	0.011	1.000	0.007	0.071	0.440	0.003	0.071	0.021	0.161
S4	0.028	0.104	0.010	0.303	0.023	1.000	0.087	0.052	0.497	0.245	0.083	0.007	0.170
S5	0.084	0.844	0.013	0.407	0.034	1.000	0.078	0.075	0.593	0.318	0.118	0.015	0.360
S6	0.073	0.491	0.007	0.331	0.015	1.000	0.066	0.042	0.210	0.053	0.169	0.014	0.298
S7	0.012	0.060	0.016	0.024	0.008	1.000	0.054	0.016	0.389	0.038	0.061	0.006	0.218
S8	0.076	0.600	0.011	0.388	0.018	1.000	0.101	0.048	0.405	0.151	0.147	0.013	0.269
S9	0.037	0.187	0.007	0.112	0.025	1.000	0.151	0.044	0.013	0.005	0.172	0.017	0.299
S10	0.014	0.041	0.007	0.342	0.030	1.000	0.018	0.049	0.027	0.008	0.032	0.044	0.336
S11	0.015	0.042	0.006	0.345	0.029	1.000	0.015	0.043	0.038	0.008	0.028	0.048	0.352
S12	0.015	0.062	0.006	0.336	0.028	1.000	0.017	0.046	0.051	0.012	0.036	0.046	0.351
S13	0.021	0.060	0.007	0.271	0.013	1.000	0.026	0.050	0.029	0.013	0.092	0.049	0.458
S14	0.013	0.044	0.006	0.320	0.031	1.000	0.011	0.047	0.023	0.009	0.030	0.042	0.328
S15	0.029	0.286	0.005	0.226	0.015	1.000	0.010	0.052	0.065	0.009	0.059	0.040	0.365

为进一步验证小檗皮不同品种之间的差异，采用有监督的模式识别方法（PLS-DA）对所有样品进行模式识别分析。结果，PLS-DA 模型参数为 $R^2X = 76.0\%$ ， $R^2Y = 97.2\%$ ， $Q^2 = 86.6\%$ ，表明建立的模型较稳定且预测性良好。PLS-DA 得分图见图 3D，可知分类结果与主成分分析结果一致，3 个品种被明显聚集在不同区域。由此表明，各品种之间成分组成存在一定的差异。

3 讨论

3.1 色谱条件优化 考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-

数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件（2004 年 A 版）进行相似度评价。结果，除 S5 相似度为 0.779 外，其余样品均大于 0.85，其中鲜黄小檗 0.895~0.956，匙叶小檗 0.779~0.962，甘肃小檗 0.955~0.964，大多数样品相似度较高，表明不同品种之间成分组成相似，见表 3。

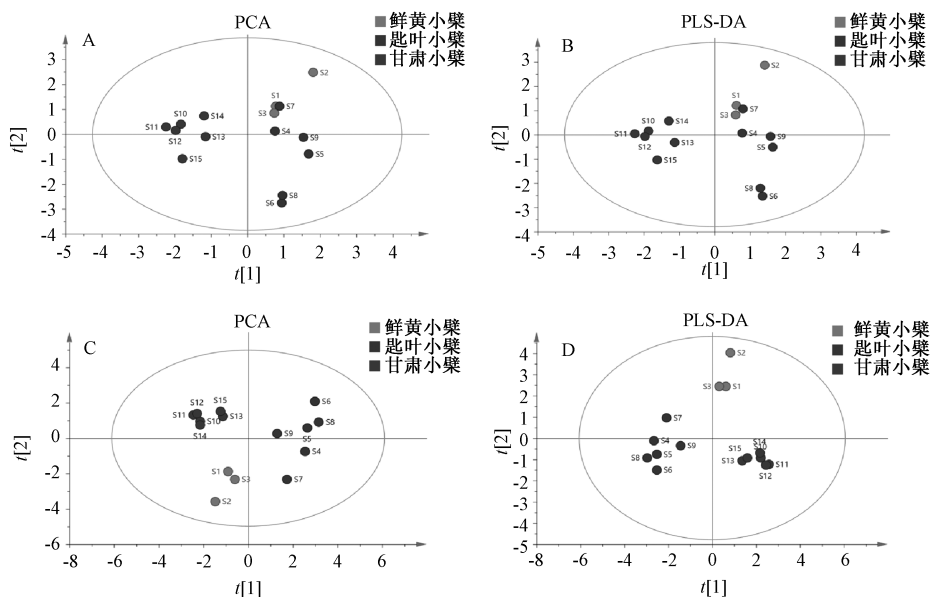
表 3 15 批样品相似度

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.956	S9	0.962
S2	0.940	S10	0.957
S3	0.895	S11	0.955
S4	0.911	S12	0.964
S5	0.779	S13	0.963
S6	0.925	S14	0.959
S7	0.930	S15	0.963
S8	0.871		

2.7 模式识别 将 15 批样品的 13 个共有色谱峰的峰面积导入 SIMCA-P 14.1 软件进行模式识别分析，包括 PCA 和 PLS-DA，数据采用自动规格化处理后，首先用无监督模式识别方法观察样品的自然聚集。模型自动拟合选择了 4 个主成分，其累计贡献率为 81.4%，表明前 4 个成分能反映原始数据 81.4% 的信息。所有样品的 PCA 得分图见图 3C，可知 3 个基原的小檗皮样品被明显分为 3 类。

0.2%磷酸、乙腈-0.2%磷酸流动相系统，结果表明以乙腈-0.2%磷酸洗脱时主要色谱峰的分离度明显提高，且峰形较好，保留时间适中。考察了 210、230、256、270、300 nm 等不同波长下的吸收图谱，发现在 210 nm 波长下色谱峰信息多，峰型良好，吸收较强。此外，还考察了色谱柱、柱温等条件，最终确定为“2.1”项下条件。

3.2 提取条件优化 考察了冷浸、回流、超声 3 种不同提取方法，结果表明超声提取效率高。考察了 30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇及盐酸-70% 甲醇（1：100），发



注：A、B 为 6 种成分含量测定数据，C、D 为指纹图谱数据。

图 3 15 批小檗皮样品 PCA、PLS-DA 分析得分图

现 70% 甲醇提取效果较好，加入 1% 盐酸后部分色谱峰峰型改善，提取效率提高。考察了 15、30、60 min 提取时间，发现 60 min 提取率接近 30 min，高于 15 min，最终选择超声 30 min 提取。考察了 20、50、100 mL 提取溶剂用量，发现 50 mL 溶剂可充分提取药材中的化学成分，并且各成分在色谱图上具有适合的响应值。

3.3 模式识别分析 本研究采用 HPLC 法建立了小檗皮化学指纹图谱，并以 6 号峰木兰花碱为参照峰，确定了 13 个特征峰，鉴定了其中 6 种成分，能全面反映药材内在质量。大部分药材样品的相似度均大于 0.85，表明所建立的 HPLC 指纹图谱可用于小檗皮质量控制。

15 批样品 HPLC 图谱轮廓基本一致，但共有峰峰面积相差较大。因此，在 HPLC 指纹图谱的基础上本研究对其进行 PCA 和 PLS-DA 分析，发现 2 种模式识别方法均能很好地区分 3 个品种，而以 6 种成分含量为指标时不能得到明显的分类。综上所述，HPLC 指纹图谱结合模式识别方法可有效区分小檗皮不同基原品种，表明体现整体性的 HPLC 指纹图谱能更好地检测各成分的种间变化，可为该药材基原鉴定和质量控制提供参考。

参考文献：

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准 (藏药第 1 册) [S]. 1995: 340.
[2] 西藏、青海、四川、甘肃、云南、新疆卫生局. 藏药标准 [S]. 西宁: 青海人民出版社, 1979: 11.
[3] 罗达尚. 中华藏本草 [M]. 北京: 民族出版社, 1997: 84-85.
[4] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1986: 175.
[5] 张 燕, 孟宪丽, 岳丽珺, 等. 藏药小檗皮对糖尿病模型小鼠血糖水平影响的初步研究 [J]. 现代生物医学进展,

2013, 13(19): 3619-3622; 3607.
[6] 叶 凡, 岳丽珺, 范 刚, 等. 小檗皮水浸膏对 db/db 糖尿病小鼠视网膜病变的影响 (I) [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(2): 82-86.
[7] 岳丽珺, 张 燕, 向 丽, 等. 藏药吉尔巴对糖尿病性视网膜病变的影响及机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 149-153.
[8] 郝 露. 藏药小檗皮提取物纯化工艺与质量控制及其肠吸收研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
[9] 李 艳. 藏药小檗皮 DNA 条形码鉴定及质量控制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
[10] 吕光华, 王立为, 陈建民, 等. 小檗属植物中的生物碱成分测定及资源利用 [J]. 中草药, 1999, 30(6): 428-430.
[11] 郑晓峰, 王 勤. 不同部位不同采收季节甘肃小檗属植物中生物碱类含量的比较 [J]. 兰州大学学报 (医学版), 2009, 35(1): 71-75.
[12] 李 艳, 吕秀梅, 林亚丽, 等. 藏药小檗皮的质量标准研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 592-596.
[13] 张 琦, 田淑琴, 郑丽琴, 等. 藏药小檗皮中小檗碱的含量测定 [J]. 中国民族医药杂志, 2000, 6(3): 41-42.
[14] 莫家祺, 王茂盛, 李 艳, 等. 紫外分光光度法测定藏药小檗皮中总生物碱的含量 [J]. 成都中医药大学学报, 2017, 40(4): 27-29.
[15] 李 琪, 杜 欢, 文焕松, 等. 藏族药小檗皮中 6 种成分的含量测定及不同品种比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 968-974.
[16] 李 强, 杜思逸, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望 [J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
[17] 邵建强. 中药指纹图谱的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 994-998.
[18] 谢培山. 中药制剂色谱指纹图谱 (图像) 鉴别 [J]. 中成药, 2000, 22(6): 391-395.