

基于 HPLC 指纹图谱结合多元统计分析的木瓜鉴别研究

张靖年, 毕晓黎, 李养学, 李素梅, 陈 昭, 肖观林

(广东省中医药工程技术研究院/广东省中医药研究开发重点实验室, 广东 广州 510095)

摘要 目的: 建立木瓜的 HPLC 指纹图谱, 结合多元统计分析区分宣木瓜、皱皮木瓜、光皮木瓜。方法: 采用 HPLC 法, 分别建立 15 批木瓜的指纹图谱共有模式和 4 批光皮木瓜的色谱图, 通过相似度评价、聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)法对 19 批样品进行鉴别、分类。结果: HPLC 指纹图谱相似度分析可大致区分木瓜与光皮木瓜, 但存在一定偏差; 结合多元统计分析, 可将 19 批样品明确地区分为宣木瓜、皱皮木瓜和光皮木瓜, 并筛选出 5 个质量差异标志物。结论: 该研究建立的指纹图谱方法稳定可靠, 结合多元统计分析法, 可为木瓜的道地性和真伪鉴别提供参考。

关键词 宣木瓜; 皱皮木瓜; 光皮木瓜; 指纹图谱; 多元统计分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2021)09-2137-05

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2021.09.023

木瓜又称皱皮木瓜、贴梗木瓜、铁脚梨等, 为蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实, 具有舒筋活络、和胃化湿的功效, 用于治疗湿痹拘挛、腰膝关节酸重疼痛、暑湿吐泻、转筋挛痛、脚气水肿等^[1]。以道地产区安徽省宣城市的木瓜品质最佳, 被称为宣木瓜。现代研究表明木瓜含有三萜类、苯丙素类、黄酮类和有机酸等成分, 具有抗炎、镇痛、抗胃溃疡等作用^[2-4]。光皮木瓜又称榧楂、木李、海棠等, 为蔷薇科植物木瓜 *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne 的干燥成熟果实, 味涩, 水煮或浸渍糖液中供食用, 入药可和胃舒筋、祛风湿、消痰止咳, 用于治疗吐泻转筋、风湿痹痛、咳嗽痰多、泄泻、痢疾、脚气水肿等^[5]。木瓜与光皮木瓜为同科同属亲缘相近种, 但 2020 年版中国药典仅收录了木瓜, 而光皮木瓜多收录于湖北、四川、陕西等地方标准, 说明二者虽在基原、成分、功效、主治等方面较为接近, 但不可混为一谈^[6]。两者在性状上可通过果皮的皱缩情况进行区分, 若经炮制、粉碎后入药, 则无法通过传统的性状进行鉴别。目前关于木瓜、光皮木瓜 HPLC 指纹图谱的研究已有报道^[7,8], 但鲜见利用该法对宣木瓜、皱皮木瓜与光皮木瓜进行比较鉴别的相关研究。鉴于此, 本研究利用 HPLC 指纹图谱结合聚类分析、主成分分析等方法对宣木瓜、皱皮木瓜及光皮木瓜进行对比分析, 以期对木瓜的道地性和真伪鉴别提供更全面的参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); XS205DU 型电子分析天平(瑞士梅特

勒-托利多公司); KQ5200DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料 原儿茶酸(批号: 110809-201205)、绿原酸(批号: 110753-201817)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 甲醇为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。实验用 19 批木瓜及光皮木瓜样品来源信息见表 1, 经广东省中医药工程技术研究院刘法锦研究员鉴定 S1~S15 号样品为蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的近成熟果实, S16~S19 号样品为蔷薇科植物木瓜 *Chaenomeles sinensis* (Thouin) Koehne 的成熟果实, 所有样品均置沸水中烫至外皮灰白色, 对半纵剖, 于 60℃ 烘干。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 Phenomenex Luna Omega PS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇(A)-0.5%冰醋酸溶液(B)为流动相, 梯度洗脱(0~10 min, 0%~10% A; 10~15 min, 10%~30% A; 15~35 min, 30%~55% A; 35~40 min, 55%~90% A); 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30℃; 检测波长为 254 nm; 进样量为 10 μL。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取原儿茶酸、绿原酸对照品适量, 加甲醇制成浓度分别为 57.2、71.0 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取木瓜样品粉末(过三号筛) 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 25 mL, 密塞, 称重, 超声(280 W, 40 kHz) 30 min, 再称重, 用甲醇补重, 摇匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 广东省科技计划项目(2017A070701017)

作者简介: 张靖年(1991-), 男, 硕士, 中药师, 研究方向: 中药鉴定及质量标准研究; E-mail: zjn9110@163.com。

表 1

19 批木瓜及光皮木瓜样品来源信息

编号	产地	样品名称	采集时间	编号	产地	样品名称	采集时间
S1	安徽宣城	宣木瓜	2019. 9	S11	湖北宜昌	皱皮木瓜	2019. 8
S2	安徽宣城	宣木瓜	2019. 9	S12	湖北宜昌	皱皮木瓜	2019. 8
S3	安徽宣城	宣木瓜	2019. 9	S13	湖北恩施	皱皮木瓜	2019. 8
S4	安徽宣城	宣木瓜	2019. 9	S14	湖北恩施	皱皮木瓜	2019. 8
S5	安徽宣城	宣木瓜	2019. 9	S15	湖北恩施	皱皮木瓜	2019. 8
S6	安徽宣城	宣木瓜	2019. 9	S16	河南南阳	光皮木瓜	2019. 9
S7	四川广元	皱皮木瓜	2019. 8	S17	河南南阳	光皮木瓜	2019. 9
S8	四川广元	皱皮木瓜	2019. 8	S18	河南南阳	光皮木瓜	2019. 9
S9	四川广元	皱皮木瓜	2019. 8	S19	安徽亳州	光皮木瓜	2019. 9
S10	湖北宜昌	皱皮木瓜	2019. 8				

2.4 方法学考察

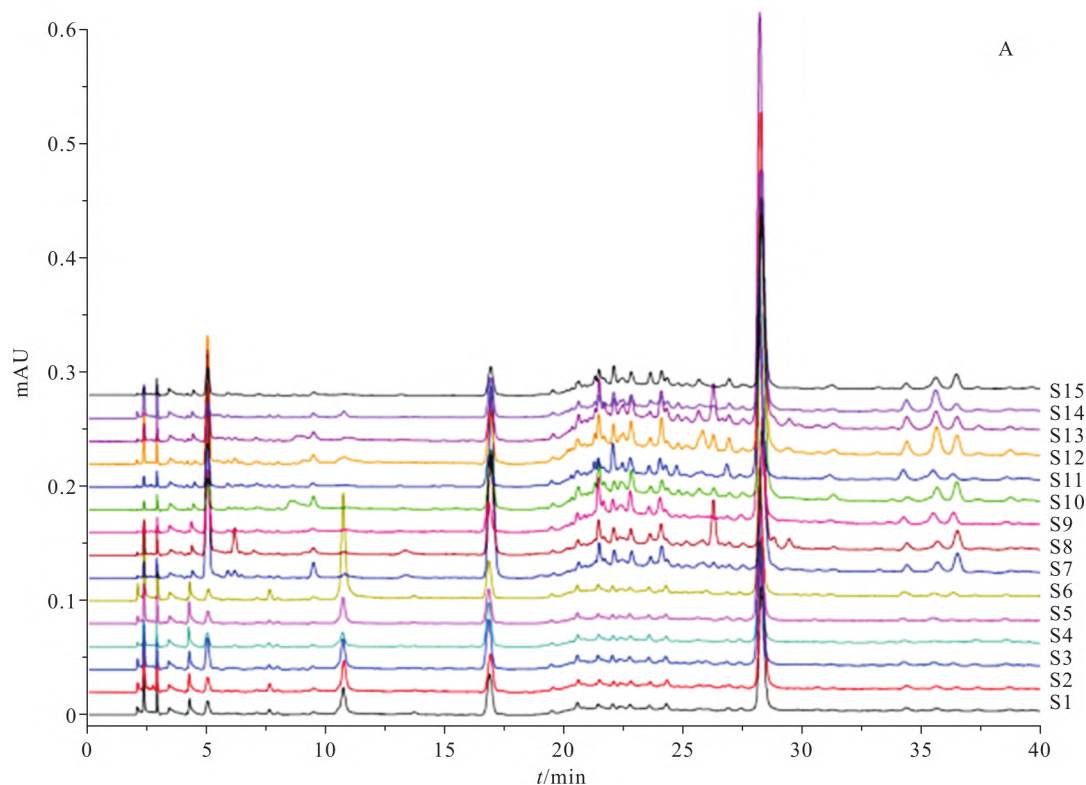
2.4.1 精密度试验: 取木瓜供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 以 3 号原儿茶酸色谱峰为参照峰(S), 计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD<0.50%, 相对峰面积 RSD<1.34%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验: 取木瓜供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 以 3 号原儿茶酸色谱峰为参照峰(S), 计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD<0.74%, 相对峰面积 RSD<1.62%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验: 取同一批木瓜供试品(S1), 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 以 3 号原儿茶酸色谱峰为参照峰(S), 计算得到各共有峰的相对保留时间 RSD<0.88%, 相对峰面积

RSD<1.81%, 表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立及相似度评价 取 19 批木瓜及光皮木瓜样品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”, 建立木瓜的 HPLC 叠加图谱及对照图谱, 见图 1, 光皮木瓜拟合色谱图见图 2。木瓜指纹图谱含有 14 个共有峰, 光皮木瓜色谱图含有 10 个共有峰, 通过与对照品(图 3) 比对, 指认其中 3、12 号色谱峰分别为原儿茶酸和绿原酸。相似度评价结果见表 2。与各自对照图谱对比, 15 批木瓜样品除 S7、S8 号外相似度均>0.980, 而 4 批光皮木瓜均<0.900, 木瓜和光皮木瓜之间存在较明显的差异。并且可以发现 S16 号样品相似度>S7、S8 号样品, 说明仅通过 HPLC 指纹图谱相似度分析结果无法准确辨别木瓜与光皮木瓜, 宣木瓜与皱皮木瓜的差异更小。



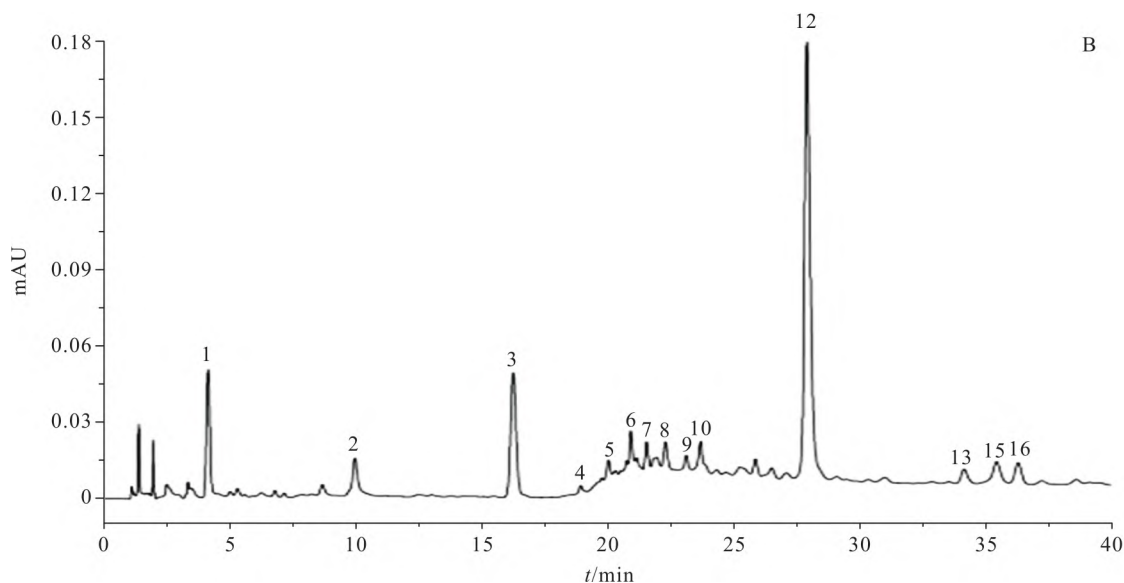


图1 15批木瓜样品 HPLC 叠加图谱(A) 及对照图谱(B)

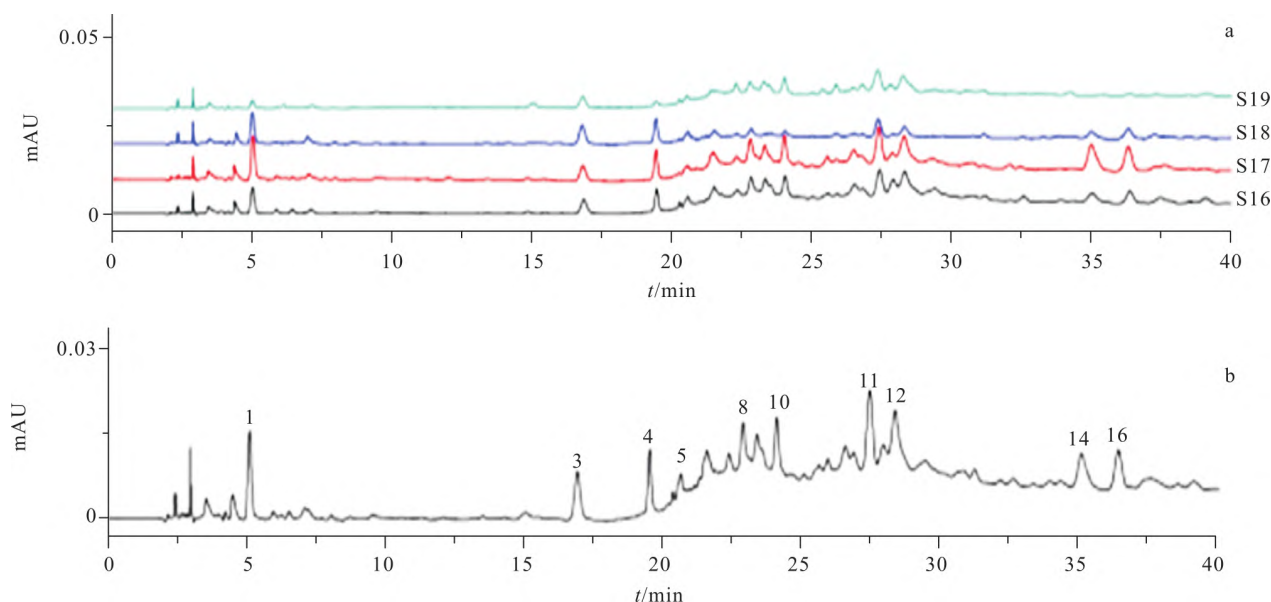


图2 4批光皮木瓜样品拟合叠加色谱图(a) 及对照图谱(b)

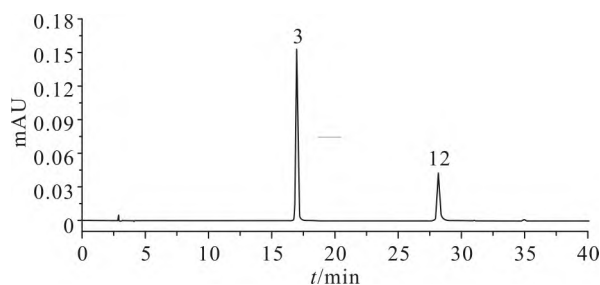


图3 混合对照品溶液的 HPLC 色谱图

3. 原儿茶酸 12. 绿原酸

表2 19批木瓜及光皮木瓜样品指纹图谱
相似度评价结果

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.992	S8	0.835	S15	0.991
S2	0.991	S9	0.993	S16	0.857
S3	0.993	S10	0.990	S17	0.546
S4	0.986	S11	0.988	S18	0.490
S5	0.991	S12	0.991	S19	0.658
S6	0.992	S13	0.981		
S7	0.762	S14	0.984		

品聚为第2类,S7、S8号样品聚为第3类,S10、S12、S13号样品聚为第4类。第1类样品又可细分为2类,分别为6批宣木瓜和4批皱皮木瓜,表明 HPLC 指纹图谱结合聚类分析大致可将宣木瓜与皱皮木瓜区分开,但部分批次皱皮木瓜与宣木瓜聚类趋势较

2.6 多元统计分析

2.6.1 聚类分析(HCA):将19批木瓜及光皮木瓜样品的 HPLC 色谱图中16个共有峰峰面积(缺失色谱峰的峰面积以0计)导入 SPSS 19.0 软件进行聚类分析,结果见图4。19批样品聚为4类,S1~S6、S9、S11、S14、S15号样品聚为第1类,S16~S19号样

一致,因此仍存在一定偏差;光皮木瓜单独聚为第 2 类,表明其与木瓜的化学成分之间存在较明显的差异。第 3 类和第 4 类样品与其余 10 批木瓜样品的差异较大,第 3 类样品均产自四川广元,S10、S12 号样品均产自湖北宜昌,有产地聚类趋势,但同产地的 S9、S11 号样品未分别按产地归类,说明产地只是木瓜药材质量的影响因素之一。

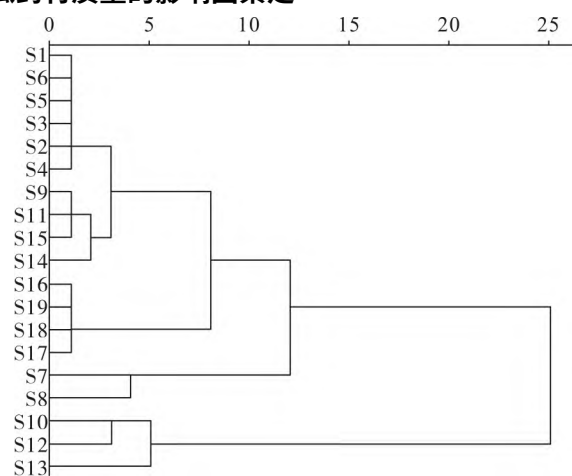


图 4 19 批木瓜及光皮木瓜样品 HCA 树状图

2.6.2 主成分分析(PCA):将 19 批木瓜及光皮木瓜样品的色谱图数据(缺失的色谱峰峰面积以 0 计)导入 SIMCA-P 13.0 软件进行主成分分析,取特征值>1 的主成分作为衡量指标,结果见表 3。3 个主成分的累计方差贡献率为 97.709%,能解释原变量的大部分信息。三维得分图见图 5。15 批木瓜样品与 4 批光皮木瓜样品有较明显的区分,表明主成分分析可以反映木瓜和光皮木瓜之间的差异。而 S10、S12、S13 号样品与各批次木瓜样品的聚集中心稍有偏离,S7、S8 号样品的偏离程度较大,与相似度评价及聚类分析结果相符。但宣木瓜与皱皮木瓜之间的区分程度不够明显。

2.6.3 偏最小二乘判别分析(PLS-DA):运用 SIMCA-P 13.0 软件将 19 批样品的 HPLC 色谱图共有峰峰面积按宣木瓜(S1~S6 号)、皱皮木瓜(S7~S15 号)和光皮木瓜(S16~S19 号)分为 3 组,进行有监督的 PLS-DA 判别分析,相关参数($R^2X=0.962$, $R^2Y=0.834$, $Q^2=0.721$)表明该分析模型解释能力和预测能力均较好。散点图见图 6,6 批宣木瓜呈明显聚集状态,分布于散点图第一象限;9 批皱皮木瓜虽较分散,但均分布于散点图左侧;而 4 批光皮木瓜则分布于散点图第四象限。19 批样品可明显聚为 3 个中心,相较于聚类树状图和主成分分析得分图,宣木瓜和皱皮木瓜的区分趋势更为明显,表明 HPLC 指纹图谱结合 PLS-DA 法可有效区分宣木瓜、皱皮木瓜和光皮木瓜。同时,为确认对上述分类结果贡献

表 3 19 批木瓜及光皮木瓜样品主成分特征值及方差贡献率

主成分	特征值	方差贡献率/%	累计方差贡献率/%
1	14.854	78.180	78.180
2	2.392	12.590	90.770
3	1.318	6.939	97.709

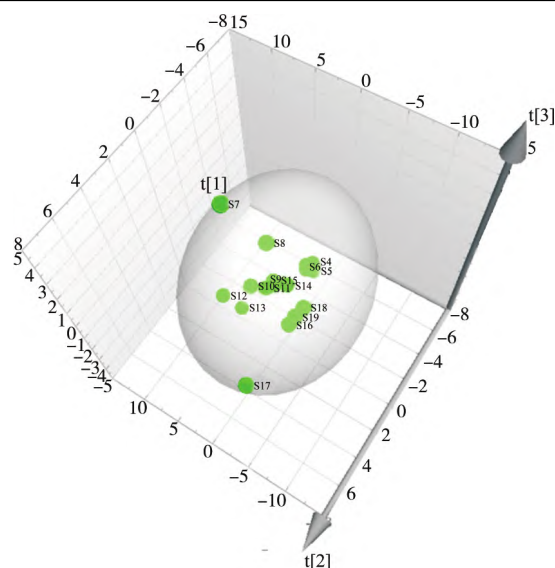


图 5 19 批木瓜及光皮木瓜样品 PCA 得分散点图

较大的成分,在 PLS-DA 的基础上,以变量投影重要度(VIP)>1.0 为筛选标准得到色谱峰 12(绿原酸)、16、1、11、3(原儿茶酸)号可能是宣木瓜、皱皮木瓜和光皮木瓜之间的分类差异的质量标志物,见图 7。

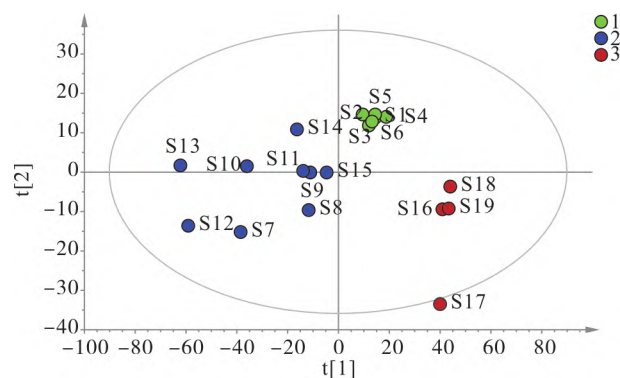


图 6 19 批木瓜及光皮木瓜样品 PLS-DA 散点图

3 讨论

3.1 样品前处理及色谱条件考察 木瓜及光皮木瓜主要有效成分均为有机酸类、萜类和酚酸类等^[2,6],本试验采取甲醇、70% 甲醇及 50% 甲醇等溶剂进行提取,结果发现不同浓度甲醇对色谱图影响较小,因此选取甲醇作为提取溶剂;齐墩果酸和熊果酸为药典中木瓜的质量控制指标成分^[1],其检测波长为 210 nm,柱温为 16~18 ℃,在该条件下,2 个成分在色谱图中有较好的色谱行为,但由于对检测波

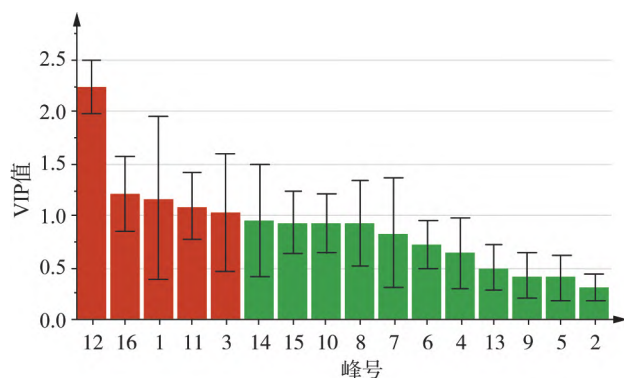


图7 19批木瓜及光皮木瓜样品 PLS-DA VIP 值图

长及柱温的要求较为严苛,导致色谱峰数量较少且重复性较差。考虑到指纹图谱应尽可能多地反映药材化学成分信息并保证试验的可重复性,本试验经过对色谱条件的优化,最终确定检测波长为 254 nm,柱温为 30 ℃。本研究得到的 HPLC 指纹图谱共有模式图中,存在基线上漂的现象,经过更换液相色谱仪、色谱柱、调整流动相梯度等手段均无法使之完全平缓,其原因可能是流动相中酸的比例较高,因前期考察发现含酸较多的流动相有利于色谱峰的分离,故最终保留该流动相及相关色谱数据。

3.2 多元统计分析 在 HPLC 指纹图谱的基础上,仅凭相似度评价无法准确区分木瓜与光皮木瓜,利用 SPSS 19.0 软件进行聚类分析后,光皮木瓜单独聚为一类,可与木瓜鉴别区分;通过 SIMCA-P 13.0 软件进行主成分分析、偏最小二乘判别分析,可将 19 批样品区分为宣木瓜、皱皮木瓜和光皮木瓜,

并筛选出 5 个质量差异标志物,后续可通过 LC/MS 或 Q-TOF-MS 等技术鉴定其中的未知成分,以便进一步开展药理药效等相关实验研究。

综上,本研究建立的 HPLC 指纹图谱方法简便易行,准确性、重复性良好,结合多元统计分析,可为木瓜药材的道地性和真伪鉴别提供一定的参考。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 62-63.
- [2] 邹妍, 鄢海燕. 中药木瓜的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(7): 507-515.
- [3] 马阮昕, 詹晓婷, 谢静文, 等. 木瓜水提液抗炎、镇痛及免疫调节作用的实验研究 [J]. 中国中医药科技, 2017, 24(5): 581-583.
- [4] 覃慧林, 张永峰, 王心怡, 等. 木瓜乙酸乙酯萃取部位对急性胃溃疡小鼠胃黏膜中 miR-423-5p、TFF1 和 p53 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(3): 80-82.
- [5] 湖北省食品药品监督管理局. 湖北省中药材质量标准 [S]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2009.
- [6] 尹震花, 赵晨, 张娟娟, 等. 光皮木瓜的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9): 221-229.
- [7] 王光宁, 廖华卫, 陈权, 等. 木瓜饮片 HPLC 指纹图谱的研究及不同炮制品的比较 [J]. 中药材, 2013, 36(11): 1758-1761.
- [8] 杨惠辛, 刘苏伟, 陈随清. 河南产光皮木瓜药材的质量分析 [J]. 中医学报, 2018, 33(10): 1981-1986.