

·实验研究·

本文引用:陈定芳,李文姣,田丽,肖美凤,秦裕辉,贺福元.基于超分子“印迹模板”整合成分簇的龙牙百合谱量学研究[J].湖南中医药大学学报,2022,42(8):1247-1254.

基于超分子“印迹模板”整合成分簇的 龙牙百合谱量学研究

陈定芳^{1,2},李文姣^{1,2},田丽^{1,2},肖美凤^{1,2},秦裕辉^{1,3*},贺福元^{1,3,4,5*}

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室,湖南长沙410208;
3.湖南省中医药研究院,湖南长沙410208;4.湖南中医药大学中医药超分子机理与数理特征化实验室,
湖南长沙410208;5.中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室,湖南长沙410208)

〔摘要〕目的 基于超分子“印迹模板”的分布特征划分龙牙百合指纹图谱成分簇,并进行谱量学研究。方法 采用UPLC法建立采集自邵阳地区的39批次龙牙百合的指纹图谱,采用匹配频数法和段带总量统计矩法划分“印迹模板”成分簇,并构建新指纹图谱;根据朗伯-比尔定律进行总峰面积与浸出率的线性回归,建立谱量学方程。结果 39批次龙牙百合UPLC指纹图谱可被划分为12个“印迹模板”成分簇,其总峰面积与浸出率的回归系数分别为 -1.10×10^{-3} 、 3.88×10^{-4} 、 1.75×10^{-3} 、 3.91×10^{-5} 、 -1.23×10^{-4} 、 -4.65×10^{-3} 、 -1.88×10^{-4} 、 -1.61×10^{-4} 、 2.18×10^{-7} 、 -2.25×10^{-5} 、 7.57×10^{-4} 、 1.01×10^{-4} ,常数为0.244, $R=0.959$ 。结论 匹配频数法可整合39批龙牙百合指纹图谱成12个“印迹模板”成分簇,据此可建立其峰面积与浸出率的多元谱量学数学关系,可用于龙牙百合的总浸出物的定量分析。

〔关键词〕 谱量学;龙牙百合;超分子“印迹模板”;成分簇;指纹图谱

〔中图分类号〕R285.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.08.004

Chromatometer study of *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker based on supramolecular "imprinting templates" integrated into component clusters

CHEN Dingfang^{1,2}, LI Wenjiao^{1,2}, TIAN Li^{1,2}, XIAO Meifeng^{1,2}, QIN Yuhui^{1,3*}, HE Fuyuan^{1,2,4,5*}

(1. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification of TCM, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Laboratory of Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 5. Key Laboratory of Property and Pharmacodynamics of TCM, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To classify the fingerprint clusters of *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker based on the distribution characteristics of supramolecular "imprinting templates" and to conduct a chromatometer study. Methods The UPLC method was used to establish the fingerprint profiles of 39 batches of *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker collected from Shaoyang area, and the matching frequency method and the statistical moment method of the total number of bands were used to classify the "imprinting templates" component clusters and construct new fingerprint profiles; a linear regression of total peak

〔收稿日期〕2022-04-06

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81573691,81874507);湖南省科技厅重点实验室建设项目(2016TP1017);湖南中医药大学药学一流学科基金项目(2021YX15);湖南省科技厅高新技术产业科技创新引领计划(科技攻关)项目(S2020GXXKJGG0301)。

〔第一作者〕陈定芳,男,硕士研究生,研究方向:中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化研究。

〔通信作者〕* 秦裕辉,男,硕士,教授,博士研究生导师,E-mail:1243695133@qq.com;贺福元,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:pharmshark-ing@tom.com。

area and leaching rate was performed according to the Lambert-Bier law to establish the chromatometer equation. **Results** The UPLC fingerprint profiles of 39 batches of *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker can be divided into 12 "imprinting templates" component clusters, and the regression coefficients of total peak area and leaching rate were -1.10×10^{-3} , 3.88×10^{-4} , 1.75×10^{-3} , 3.91×10^{-5} , -1.23×10^{-4} , -4.65×10^{-3} , -1.88×10^{-4} , -1.61×10^{-4} , 2.18×10^{-7} , -2.25×10^{-5} , 7.57×10^{-4} , $1.01 \times 10^{-4} \% \cdot s \cdot \mu A^{-1}$, respectively, with a constant of 0.244%, $R=0.959$. **Conclusion** The matched frequency method can integrate 39 batches of *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker fingerprint profiles into 12 "imprinting templates" component clusters. The multivariate chromatometer mathematical relationship between the peak area and the leaching rate can be established, which can be used for the quantitative analysis of the total leachate of *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker.

[**Keywords**] chromatometer; *Lilium brownii* F. E. Brown var. *viridulum* Baker; supramolecular "imprinting templates"; component clusters; fingerprint profiles

在过去的数十年里,指纹图谱作为一种稳定、有效、精确的质量表征方法,在国际上得到了广泛认可和应用^[1]。针对中药复杂的化学成分,指纹图谱能将其大部分化学成分以色谱峰的形式表现出来,整个指纹图谱表征了该样品所含化学成分的多少和含量的大小。目前,指纹图谱的定量分析大都是通过测定单个有效成分含量得到,然而中药具有化学成分复杂、活性成分含量低及多成分协同发挥整体调节作用的特点,少数几个特征峰难以代表一味中药或者一个复方的物质基础^[2]。本课题组前期提出,建立以 Q-Marker 印迹性为评价指标的中药质量评价体系^[3],根据成分群“印迹模板”印迹性作用规律分析,实现成分间印迹性作用大小的表征。正如指纹图谱呈现出化学成分的具相似印迹结构聚集行为,以超分子“印迹模板”为中心成簇状分布,故宜从超分子“印迹模板”印迹性的角度来展开研究。超分子“印迹模板”属于空间中一定的空间结构或结合位点,是指以特定模板分子为客体分子,对主体分子表现出特异选择性或亲和性的过程,属于超分子化学中主客体作用研究范畴^[4]。具有相似“印迹模板”特征的化学成分在色谱学上表现为具有相同(似)的印迹作用,其指纹图谱特征相同(似),在指纹图谱相似度评价软件中进行匹配就会出现以“印迹模板”成分簇为中心的指纹峰聚集现象,出现保留时间与匹配频数呈凹凸状分布,据此可用匹配频数法进行“印迹模板”成分簇的划分。

中药指纹图谱与成分含量的关系称为谱量学,也可指成分群含量与浸出率之间的关系^[5]。中药指纹图谱能表征“印迹模板”成分簇种类的多少与含量的大小。通过关联不同批次中药材指纹图谱“印迹模板”成分簇总峰面积和浸出率建立谱量学方程,可以对药材各“印迹模板”成分簇峰面积与成分含量的关系进行定量描述,相当于将中药众多的化学信息转化成数理信息,能更加全面和客观地反映出中药的质量信息和预测化学成分含量^[6]。

龙牙百合(*Lilium brownie* F.E. Brown var. *viridulum* Baker)是湖南邵阳地区特产,具有养阴润肺、清心安神等功效,是应用广泛的药食同源百合品种^[7]。由此基于团队前期提出的谱量学,对中药指纹图谱划分“印迹模板”成分簇,再根据朗伯-比尔定律关联指纹图谱“印迹模板”成分簇总峰面积与浸出率,建立二者谱量学方程,对中药浸出率进行预测。这项研究采用龙牙百合作为研究对象,基于超分子“印迹模板”理论对谱量学进行更进一步探讨和研究,为创新中药材生产加工过程中定量分析方法提供参考和思路。

1 基本原理

1.1 中药化学成分的色谱行为呈现超分子“印迹模板”成分簇作用规律

本课题组前期提出超分子“印迹模板”理论^[8]:中药与人体为自然界生物超分子的聚集体,各级分子按“印迹模板”有序作用。中药成分群进入体内按“印迹模板”进行吸收、分布、代谢和排泄而产生综合生物药剂学行为,具有相同(似)“印迹模板”的客体成分产生相同(似)的药效^[9];同样在体外色谱学上表现为具相同(似)“印迹模板”结构的化学成分,在一定的压力和温度下随机与固定相基质颗粒进行结合-迁移-解结合-再结合-再迁移等印迹作用^[10],组成不同的“印迹模板”成分簇,随后在不同极性的流动相洗脱作用下在一定的保留时间依次出峰,最终综合印迹特征以保留时间的形式体现出来。中药指纹图谱上每个峰对应一个以上化学成分,每个化学成分的“印迹模板”结构特征不同,而“印迹模板”结构特征相近的成分保留时间也相近;峰面积即表明其化学含量的高低,其受色谱条件、药材成分相互作用等的综合影响。因此,根据“印迹模板”特征与色谱印迹性相一致原则,众多化学成分并不是在固定相和流动相作用下无序排列出峰,而是“印迹模板”特征相近的化学成分在相近的保留时间下出峰,在指

纹图谱上呈现为以最接近“印迹模板”结构特征成分为中心的簇状分布,其分离度的大小表示“印迹模板”的相似程度,与匹配频数相关。

总量统计矩法可作为一种定性、定量评价中药印迹性的方法^[11]。具体来说,它将每张完整的动态指纹图谱看作是一个由时间变量和对应的指纹峰响应值所构成的二维图谱^[12],按统计学原理可获得总量零阶矩(area under curve of total quantum, AUCT)、总量一阶矩(mean chromatographic retention time of total quantum, MCRTT)、总量二阶矩(variance of chromatographic retention time of total quantum, VCRTT)等一系列总量统计矩参数。同时,总量统计矩具有加和性特征^[13],将整张指纹图谱按照一定的方式分段处理,即段带,通过计算可获得各个段带的总量统计矩参数。

1.2 划分出的“印迹模板”成分簇的总峰面积与浸出率可建立谱量学关系

紫外检测器是高效液相色谱最为常用的检测器,适合于所有具有紫外光吸收的物质^[14]。根据朗伯-比尔定律,段带色谱峰峰面积与浓度呈线性关系,整合后的段带色谱峰总面积也与段带成分总浓度呈线性关系^[15],呈现线性的叠加性,亦为式(1)和式(2)。目前,常用的指纹图谱分析方法有气相色谱法、高效液相色谱法、色谱/质谱联用分析法、毛细管电泳法、薄层色谱法、荧光分析法、标记免疫分析法(酶联免疫方法、放射免疫技术测定法和化学发光酶免疫测定法)等^[16],其检测器输出的响应值与药物质量呈线性,为式(1)。

$$c_i = A_i K_i + B_i \quad (1)$$

式中: c_i 、 A_i 、 K_i 为单成分浓度、峰面积和响应系数, B_i 为仪器测定时单成分响应常数。若整合成第 m 成分簇后,其色谱峰峰数目从 f 到 g 压缩为1个,则为式(2)。

$$C_m = A_m K_m + B_m = \sum_{i=f}^g A_i k_i + \sum_{i=f}^g b_i \quad (2)$$

式中: C_m 、 A_m 、 k_m 为按匹配频数法划分出的“印迹模板”成分簇的段带总浓度、总峰面积和总响应系数, B_m 为仪器测定时成分簇响应常数。其中 K_i 、 K_m 因不同的检测器而异^[17]。

据此建立段带色谱峰总面积与浸出率的谱量学关系是指当整个指纹图谱由 n 个段带成分簇构成,各段带色谱峰总面积与总浸出率呈线性关系,体现

线性的叠加性^[18],可得总浓度与段带色谱峰总面积的谱量学关系,为式(3)。

$$C_T = \sum_{m=1}^n A_m K_m + \sum_{m=1}^n B_m = \sum_{m=1}^n A_m K_m + B_T \quad (3)$$

式中成分簇共有 n 个, C_T 为总成分簇浓度; B_T 为仪器测定时总成分簇响应常数。对划好界值的“印迹模板”成分簇按段带统计矩法计算出新的保留时间,而峰面积相加得新的成分簇峰面积^[19],构成体现不同批次龙牙百合“印迹模板”成分簇色谱峰表征体系,以此展开谱量学数学关系分析。

2 材料与方法

2.1 主要仪器

超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司,型号:ACQUITY UPLC H-Class);真空冷冻干燥机(美国 GOLD-SIM 公司,型号:FD5-3);真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司,型号:DZF-6050);低速台式离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司,型号:TDZ4-WS);电子天平(上海良平仪器仪表有限公司,型号:MA110);循环水式真空泵[巩义市予华仪器有限责任公司,型号:SHZ-D(Ⅲ)];超声波清洗器(上海科寻超声仪器有限公司,型号:SK3300H);超纯水机(长沙市科临电子科技有限公司,型号:EKup-II-20T)。

2.2 主要试剂与试药

乙腈(批号:20075279)、甲醇(批号:20075141)均为色谱纯,均购于美国天地试剂公司;甲酸(上海麦克林生化科技有限公司,批号:20181201)、甲醇(太仓沪试剂有限公司,批号:20200105)、磷酸(重庆川东化工有限公司,批号:20190629)均为分析纯;怡宝纯净水(华润怡宝饮料有限公司,批号:14310Z10J);0.22 μm 微孔滤膜(天津津腾实验设备有限公司,批号:160531014)。阿魏酸、王百合苷 A(上海源叶生物科技有限公司,批号:B20007、B25344,纯度 $\geq 98\%$);龙牙百合为湖南省邵阳市隆回县百合加工厂提供,由湖南中医药大学药学院石继连教授按 2020 版《中华人民共和国药典》有关项下进行鉴定^[20],其中 S5、S8、S16、S19 批次龙牙百合浸出率不符合 2020 版《中华人民共和国药典》标准,其余均符合标准。

2.3 方法

取 39 批次干燥龙牙百合按 2020 版《中华人民共和国药典》采用冷浸法测定浸出率^[20];并采用 U-

PLC 获得 39 批次百合指纹图谱^[21]。

2.3.1 供试品制备 参考相关文献进行百合供试品溶液制备^[21]:百合粉碎后过 4 号筛,取粉末 0.5 g,置于 50 mL 锥形瓶中,精密称定,加入 50%甲醇 20 mL,称重,记录重量,室温下静置 1 h,超声提取 40 min,50%甲醇补足失重,放入 12 000 r/min 离心机(离心半径 93 mm)离心 10 min,去上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,置于进样小瓶中,待测。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称定王百合苷 A 1.00 mg,定容到 10 mL 容量瓶,分别吸取一定量配制浓度为 10、20、40、80 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液,过 0.22 μm 微孔滤膜后备用;精密称定阿魏酸 5.00 mg 定容到 10 mL 容量瓶,分别吸取一定量配制浓度为 1、10、40、75、150 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,过 0.22 μm 滤膜后备用。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEHC₁₈(2.1 mm \times 100 mm,1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸水(B),梯度洗脱:0~2 min,3% A;2~6 min,3%~10% A;6~9 min,10%~15% A;9~12 min,15% A;12~16 min,15%~25% A;16~18 min,25%~30% A;18~22 min,30%~40% A;22~25 min,40%~80% A;25~27 min,80%~95% A;27~30 min,95% A;30~36 min,3% A;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;流速 0.4 mL/min;进样量 3 μL 。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度实验 精密取百合粉末样品 0.5 g,按照“2.3.1”项下方法制备供试品,在“2.3.3”项下的色谱条件连续进样 6 次,测得王百合苷 A 相对保留时间 RSD 为 0.06%,峰面积 RSD 为 0.21%,表明仪器的精密度良好。

3.1.2 重复性实验 精密取鲜百合粉末 6 份,每份精密称取 0.5 g,按照“2.3.1”项下方法制备供试品,在“2.3.3”项下色谱条件下进样,计算王百合苷 A 的

相对峰保留时间 RSD 为 0.04%,峰面积的 RSD 为 4.93%,表明实验重复性良好。

3.1.3 稳定性实验 精密称取百合粉末 0.5 g,按照“2.3.1”制备供试品,按照“2.3.3”项下的色谱条件在 0、2、4、6、8、12 h 进样,以王百合苷 A 为对照峰,计算相对保留时间 RSD 为 0.11%,相对峰的 RSD 为 2.55%,表明供试品 12 h 内稳定性良好。

3.1.4 加样回收实验 平行精密称取已知含量(0.409 7 mg/g)的百合粉末 9 份,精密称定,按照已知量的 50%、100%、150%水平精密加入王百合苷 A 和阿魏酸对照品,按照“2.3.1”制备供试品溶液,每个质量浓度制成 3 份,按照“2.3.3”项下色谱条件进样计算得到王百合 A 的平均回收率为 100.51%,RSD 值为 2.60%,详见表 1,结果表明该方法准确性良好。

3.1.5 线性关系考察 王百合苷 A 和阿魏酸对照品溶液按“2.3.3”项下色谱条件测定样品。以对照品浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标,相应峰面积($\mu\text{A}\cdot\text{s}$)为纵坐标,得到各指标成分的线性回归方程和线性范围。得到王百合苷 A 和阿魏酸回归方程分别为: $Y=63\ 247X-17\ 113,R=0.998\ 2$; $Y=42\ 957X-25\ 800,R=0.999\ 5$,表明王百合苷 A、阿魏酸分别在 10~100,10~150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。

3.2 不同批次龙牙百合 UPLC 指纹图谱的建立

取 39 批龙牙百合样品,按“2.3.1”项下方法制备龙牙百合供试品溶液,进样得到指纹图谱,如 S1;按“2.3.2”项下方法制备的混标溶液,标注为 S2;按“2.3.3”项下色谱条件测定 UPLC 图谱,并采用国家药典委员会 2012 版中药指纹图谱相似度评价软件进行图谱处理,详见图 1。

3.3 龙牙百合指纹图谱“印迹模板”成分簇的划分

将 39 批次龙牙百合指纹图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统,经校正、匹配后导出数据,获得不同保留时间的匹配频数,详见图 2,其中高匹

表 1 王百合苷 A 加样回收率结果

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.499 9	0.204 8	0.204 8	0.398 1	102.90		
0.499 3	0.204 6	0.204 8	0.418 9	97.74		
0.500 4	0.205 0	0.204 8	0.397 7	103.05		
0.500 9	0.205 2	0.409 7	0.598 9	102.68		
0.499 7	0.204 7	0.409 7	0.597 2	102.89	100.51	2.60
0.500 5	0.205 1	0.409 7	0.643 5	95.53		
0.500 3	0.205 0	0.614 6	0.805 6	101.73		
0.499 1	0.204 5	0.614 6	0.832 0	98.45		
0.501 0	0.205 3	0.614 6	0.822 7	99.65		

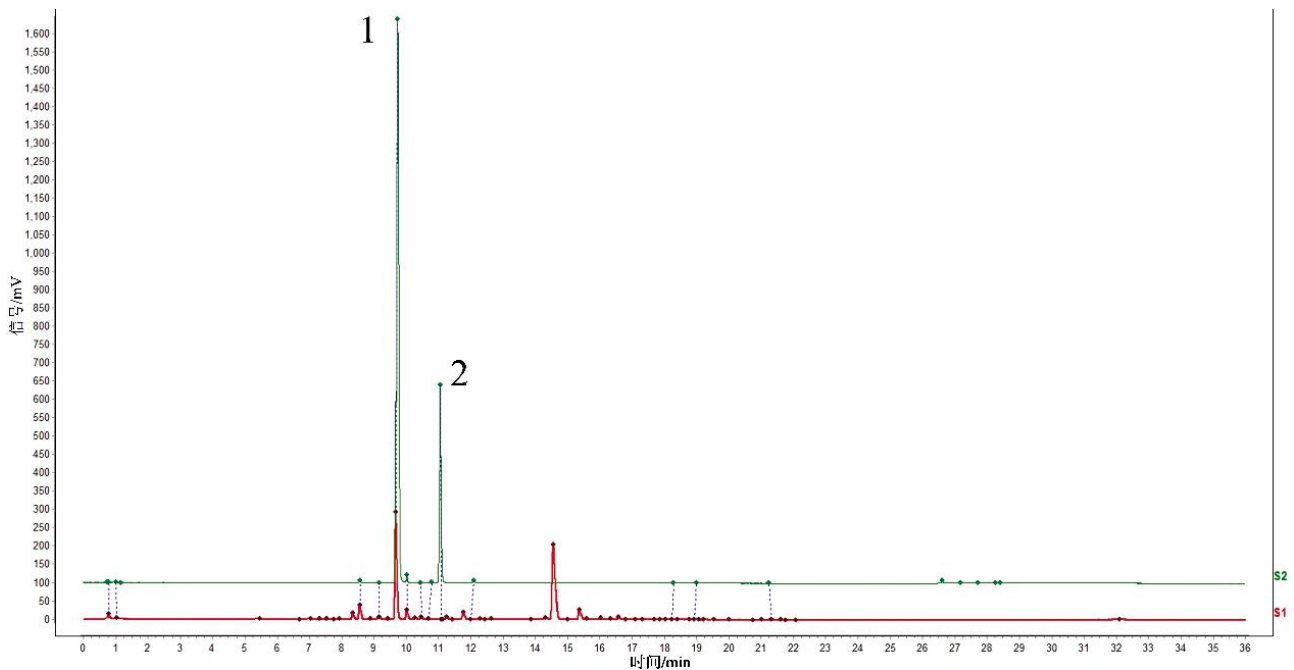


图1 龙牙百合样品及标准品的UPLC指纹图谱

注:1.王百合苷A;2.阿魏酸。

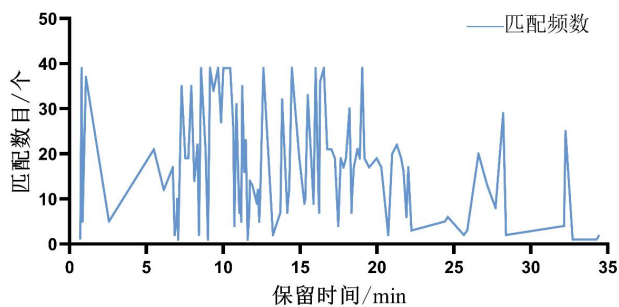


图2 39批次龙牙百合不同保留时间的共有峰匹配频数图

配频数的成分主要集中在 7.29~19.03 min,说明共有成分主要集中在该保留时间段内;39批次龙牙百合指纹图谱共有峰有 12 个。按式(1)公式计算出 39 批次龙牙百合成分簇划成“印迹模板”中心成分的最少匹配频数为 40.93 个,所以取大于最大匹配频数 39 的匹配频数色谱峰为“印迹模板”成分簇中心成分,共确定了 12 个“印迹模板”成分簇;再根据式(2)划分出每个“印迹模板”成分簇间的界线,再根据段带统计矩法计算出新保留时间和新峰面积,其划分后生成新的指纹图谱的保留时间和峰面积见表 2。

3.4 谱量学方程的建立及验证

3.4.1 谱量学方程的建立 所有数据采用 Excel 收集,将数据导入 SPSS 26.0 软件,以浸出率(C_T)作为因变量,12 个“印迹模板”成分簇总峰面积参数作为自变量,进行线性回归,建立龙牙百合谱量学方程:

$$C_T = 0.244 - 1.10 \times 10^{-3} A_1 + 3.88 \times 10^{-4} A_2 + 1.75 \times 10^{-3} A_3 +$$

$$3.91 \times 10^{-5} A_4 - 1.23 \times 10^{-4} A_5 - 4.65 \times 10^{-3} A_6 - 1.88 \times 10^{-4} A_7 - 1.61 \times 10^{-4} A_8 + 2.18 \times 10^{-7} A_9 - 2.25 \times 10^{-5} A_{10} + 7.75 \times 10^{-4} A_{11} + 1.01 \times 10^{-4} A_{12} (R=0.959, P<0.001)$$

由于中药化学成分受到遗传、产地、加工炮制等因素的影响,使得其化学成分种类和含量存在动态多样性。然而中药材化学成分呈现“印迹模板”稳定和随株随域随法变化的规律^[22],可基于“印迹模板”成分簇构建的谱量学模型进行成分的印迹性分析。回归系数反映一个变量对因变量的响应值,回归系数越大,代表这个变量内的值变化更容易被检测到,说明这个“印迹模板”成分簇的成分种类或含量较大,而回归系数标准差可表征出“印迹模板”成分簇中化学成分的变异程度。当回归系数与成分簇总峰面积联系起来时,体现出成分簇的药效属性大小^[23],即该成分簇的作用量大小,因此回归系数与总峰面积(即 AUCT)的乘积可表示该“印迹模板”成分簇对浸出物体系印迹量的占比,可表征出成分簇的印迹作用大小。而回归系数的正负代表“印迹模板”成分簇对浸出物体系中“印迹模板”成分变化的作用方向,可表征其对浸出率的贡献,而作用量的标准差可以表征成分簇浓度变化的上下限。

对 12 个“印迹模板”成分簇的回归系数、回归系数与总峰面积乘积和回归系数的正负进行排序,详见表 3。由表可知,“印迹模板”成分簇 6 中的成分种

表 2 39 批次龙牙百合浸出率及“印迹模板”成分簇划分后的新指纹图谱

编号	序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	浸出率/%
	保留时间/min	1.88	7.66	9.15	9.66	9.94	10.25	10.88	12.20	14.38	15.81	16.92	22.04	
S1		62.02	56.84	4.82	482.80	49.67	5.90	38.02	124.30	209.00	8.14	5.77	184.70	18.17
S2		63.32	133.30	10.45	954.40	101.90	9.41	46.55	190.10	427.00	24.21	10.05	12.93	18.17
S3		119.70	398.20	24.44	2747.00	208.90	29.05	111.70	485.80	1240.00	72.65	36.70	206.20	20.66
S4		61.51	98.39	7.57	750.80	79.29	7.26	40.57	160.30	338.80	20.61	8.15	145.00	21.90
S5		76.96	116.10	6.74	873.60	87.98	8.00	44.71	171.60	393.50	24.37	10.27	173.40	16.93
S6		66.71	87.21	14.55	682.30	116.10	9.88	50.05	160.40	293.20	18.30	11.55	134.80	18.17
S7		65.20	97.79	7.86	717.40	73.66	7.04	36.36	139.10	319.90	20.27	7.59	130.00	18.17
S8		64.67	50.15	5.24	420.20	54.35	5.58	36.59	106.30	183.40	6.83	5.90	142.00	16.93
S9		68.35	117.80	8.78	866.00	90.54	8.11	44.48	171.20	392.20	22.47	8.69	133.60	19.41
S10		74.30	107.00	10.39	827.9	110.60	8.91	45.03	158.70	360.10	19.09	8.04	177	21.90
S11		59.31	58.18	4.76	483.10	50.28	5.89	39.80	126.00	209.00	8.27	5.68	157.70	18.17
S12		71.12	118.90	8.04	873.40	86.43	7.52	44.60	172.90	394.90	23.31	8.91	137.10	19.41
S13		123.00	408.70	24.27	2837.00	116.40	28.10	109.10	481.80	1237.00	72.12	35.01	159.70	21.90
S14		62.07	101.00	7.79	751.40	81.07	7.50	40.69	154.80	339.40	16.98	7.36	128.60	20.66
S15		75.91	129.90	10.43	957.20	104.10	9.41	45.43	181.20	427.80	24.48	8.71	170.80	18.17
S16		73.19	88.42	15.43	673.70	115.80	9.58	46.65	142.80	290.00	18.18	10.89	9.97	16.93
S17		71.86	118.40	8.68	875.20	88.95	8.04	43.90	170.70	393.90	21.87	8.89	19.49	19.41
S18		57.33	50.54	5.74	422.30	56.01	6.24	37.19	105.20	181.50	6.77	6.04	159.70	20.66
S19		63.67	99.28	7.01	738.40	86.22	7.41	39.76	147.40	337.20	17.26	7.39	135.50	16.93
S20		66.19	109.00	10.56	821.70	108.40	8.35	44.92	156.30	358.00	21.25	7.73	183.80	21.90
S21		98.82	316.40	49.96	1251.00	116.90	23.63	84.37	145.70	1437.00	181.80	68.41	256.50	29.85
S22		97.62	268.20	50.74	1079.00	153.30	21.08	76.21	115.70	1243.00	226.60	64.32	65.03	27.36
S23		101.70	304.40	50.04	1288.00	120.00	24.40	89.21	118.20	1466.00	184.10	70.20	71.71	27.43
S24		103.30	308.20	55.68	1199.00	161.60	23.59	88.97	134.80	1372.00	238.40	69.19	77.70	25.06
S25		101.80	299.80	52.74	1241.00	140.60	23.66	87.25	118.70	1404.00	208.80	65.63	73.13	31.33
S26		98.10	314.40	48.69	1306.00	104.70	24.50	90.79	119.90	1501.00	170.00	70.25	61.18	28.82
S27		95.70	265.70	52.41	1073.00	163.30	20.84	76.76	112.70	1215.00	240.90	64.66	228.20	31.33
S28		102.30	337.30	54.47	1401.00	127.30	27.08	95.47	122.90	1590.00	186.90	80.13	249.40	28.75
S29		94.62	295.80	42.58	1155.00	84.14	21.76	80.58	127.10	1469.00	30.99	60.52	242.20	31.25
S30		95.81	340.30	55.51	1336.00	134.80	25.22	92.20	141.00	1507.00	207.10	89.87	156.70	32.42
S31		99.43	317.80	51.10	1255.00	118.70	23.79	90.61	151.80	1583.00	38.12	72.43	344.70	31.09
S32		94.12	266.50	48.61	1091.00	150.70	20.39	78.80	109.70	1261.00	228.50	68.62	206.10	29.85
S33		100.50	314.50	51.07	1288.00	129.60	24.49	89.13	118.40	1624.00	33.14	70.06	370.10	33.67
S34		102.00	311.00	55.63	1205.00	162.50	23.10	86.48	141.40	1571.00	36.81	72.37	139.20	31.33
S35		100.20	303.90	53.98	1241.00	142.10	23.68	86.81	127.80	1570.00	37.50	73.07	83.35	28.82
S36		101.10	313.30	50.28	1284.00	120.50	24.25	90.48	128.90	1605.00	37.81	73.93	142.30	28.82
S37		94.88	270.10	52.92	1071.00	165.20	20.42	77.07	117.90	1412.00	45.60	49.74	321.40	27.57
S38		103.20	341.40	55.22	1399.00	129.00	27.33	97.19	133.30	1717.00	48.15	60.69	151.10	27.50
S39		95.27	306.00	42.70	1174.00	76.95	21.62	81.38	137.60	1469.00	42.53	48.78	135.80	30.00

类或含量变化最大,“印迹模板”成分簇 12 变化最小;“印迹模板”成分簇 1 在龙牙百合化学多成分体系的“印迹模板”作用最大,“印迹模板”成分簇 9 作用最小;在龙牙百合化学多成分体系中,“印迹模板”成分簇 2、3、4、9、11、12 可能是促进浸出物生成的“印迹模板”成分簇,而“印迹模板”成分簇 1、5、6、7、8、10 可能是减少浸出物生成的成分簇,两者相互作

用,达到平衡时的浸出率为 24.40%,而 RSD 为 21.72%,超出了一般中药制剂质量允许变化的 10% 范围。

3.4.2 实验验证 王百合苷 A 和阿魏酸在多批次百合药材中都存在^[24],王百合苷 A 按保留时间划分归属于“印迹模板”成分簇 3,阿魏酸则归属于“印迹模板”成分簇 7,对二者进行含量测定。39 批次龙牙

表3 12个“印迹模板”成分簇的贡献率、回归系数、作用量及标准差排序表

成分簇序号	作用量/%	贡献率/%	累积贡献率/%	回归系数	回归系数标准差	作用量标准差
1	9.417×10^{-2}	13.630	13.63	-140 400.00×10^{-4}	9.96×10^{-4}	8.49×10^{-2}
2	8.294×10^{-2}	12.000	25.63	3.88×10^{-4}	8.52×10^{-4}	18.21×10^{-2}
6	7.651×10^{-2}	11.070	36.71	-494 800.00×10^{-4}	77.69×10^{-4}	12.79×10^{-2}
3	5.289×10^{-2}	7.655	44.36	17.50×10^{-4}	20.45×10^{-4}	6.18×10^{-2}
4	4.217×10^{-2}	6.104	50.47	0.39×10^{-4}	85.11×10^{-4}	9.19×10^{-2}
11	2.934×10^{-2}	4.247	54.71	7.57×10^{-4}	6.81×10^{-4}	2.64×10^{-2}
8	2.534×10^{-2}	3.668	58.38	-201 200.00×10^{-4}	4.55×10^{-4}	7.16×10^{-2}
12	1.571×10^{-2}	2.274	60.66	1.01×10^{-4}	42.88×10^{-4}	0.67×10^{-2}
5	1.374×10^{-2}	1.988	62.64	-162 700.00×10^{-4}	2.43×10^{-4}	2.72×10^{-2}
7	1.264×10^{-2}	1.830	64.47	-227 800.00×10^{-4}	0.23×10^{-4}	16.00×10^{-2}
10	16.700×10^{-2}	0.242	64.72	-275 300.00×10^{-4}	1.51×10^{-4}	1.12×10^{-2}
9	0.020×10^{-2}	0.003	64.74	0.00 220.00×10^{-4}	1.59×10^{-4}	15.00×10^{-2}
B	24.400×10^{-2}	35.260	100.00	2 440.00×10^{-4}	530×10^{-4}	5.30×10^{-2}

表4 39批次龙牙百合中王百合苷A和阿魏酸含量测定结果

编号	王百合苷A含量/(mg/g)	阿魏酸含量/(mg/g)
S1	0.316 2	0.120 9
S2	0.614 4	0.178 8
S3	1.748 1	0.142 5
S4	0.485 7	0.154 2
S5	0.563 3	0.170 5
S6	0.442 4	0.150 9
S7	0.464 5	0.144 8
S8	0.276 6	0.115 8
S9	0.558 5	0.169 9
S10	0.534 4	0.158 9
S11	0.316 4	0.124 8
S12	0.563 2	0.171 0
S13	1.804 9	0.331 2
S14	0.486 1	0.155 9
S15	0.616 2	0.177 8
S16	0.436 9	0.143 0
S17	0.564 3	0.169 0
S18	0.277 9	0.115 1
S19	0.477 8	0.148 8
S20	0.530 5	0.156 9
S21	0.802 0	0.121 2
S22	0.693 5	0.094 2
S23	0.825 7	0.102 4
S24	0.769 2	0.111 4
S25	0.796 2	0.098 6
S26	0.836 8	0.104 0
S27	0.689 7	0.097 2
S28	0.896 8	0.105 3
S29	0.741 3	0.113 0
S30	0.855 7	0.123 8
S31	0.804 4	0.122 3
S32	0.701 1	0.097 4
S33	0.825 2	0.103 0
S34	0.772 9	0.115 3
S35	0.795 4	0.103 1
S36	0.822 9	0.103 2
S37	0.688 2	0.098 0
S38	0.895 7	0.105 2
S39	0.753 0	0.112 9

百合中王百合苷A和阿魏酸含量见表4。王百合苷A的含量在0.277~1.805 mg/g范围之内,RSD值为44.23%,说明“印迹模板”成分簇3中成分含量变化较大;阿魏酸含量在0.094~0.331 mg/g之间,RSD值为30.93%,较之王百合苷A变化少;结果表明“印迹模板”成分簇3中成分含量比“印迹模板”成分簇7大,变化趋势初步验证上述结果。

另取上述龙牙百合样品($n=3$),按“2.3.1”制备处理得供试液,进样后获得指纹图谱并划分“印迹模板”成分簇,将各“印迹模板”成分簇的总峰面积代入谱量学方程,回归方程得 C_T 分别为22.74%、22.78%、31.84%,平均偏差为8.98%,两组数据相关系数为0.983,并在质量控制10%以内。验证结果说明建立的谱量学方程能较好地预测不同批次龙牙百合的浸出率。

4 讨论

综上,当中药用量确定、药材的产地确定、色谱的条件固定时,各“印迹模板”成分簇的响应系数、保留时间、印迹性及成分构成比是稳定的,AUCT、MCRTT为一定值^[22],呈现“三稳三不稳”变化规律;用不同“印迹模板”成分簇总峰面积对浸出率进行多元线性回归可建立谱量学模型,并对成分进行定量分析:首先获得中药或中药复方的指纹图谱,再运用匹配频数法划分“印迹模板”成分簇^[25],根据朗伯-比尔定律将其总峰面积与浸出率关联可建立谱量学模型。通过分析谱量学模型参数即可确定质量控制的成分簇种类;并根据回归系数的可信区间范围确定

各成分簇浓度的变化范围;此外还能将常数项的贡献程度作为预测浸出率平均值的参考。本文基于超分子“印迹模板”理论建立了龙牙百合的谱量学方程,可用于龙牙百合的总浸出物的定量分析,为龙牙百合及其制剂制备生产中质量评价方法提供了新的思路。后续还需要更进一步的实验验证,包括不同时期中药化学成分变化规律的检测、“印迹模板”成分簇的分离以及药效验证。

参考文献

- [1] 刘东方,赵丽娜,李银峰,等.中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J].中草药,2016,47(22):4085-4094.
- [2] 刘昌孝,陈士林,肖小河,等.中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J].中草药,2016,47(9):1443-1457.
- [3] 李海英,贺琪珺,邓凯文,等.基于超分子“气析”理论构建中药质量标志物的印迹性新评价体系[J].中草药,2021,52(16):4771-4778.
- [4] 潘雪,樊启猛,余格,等.基于超分子“印迹模板”特性的中药质量标志物研究模式的思考[J].中草药,2019,50(19):4569-4575.
- [5] 聂志姣,贺福元,罗杰英,等.大黄特征成分簇谱量学的初步研究[J].中药材,2009,32(4):530-535.
- [6] 谢相贵.红花质量及其成分群间作用系数的研究[D].长沙:湖南中医药大学,2012.
- [7] 傅春燕,罗聪,龙佳欣,等.龙牙百合总黄酮的索氏提取工艺正交优化及抗氧化性研究[J].邵阳学院学报(自然科学版),2019,16(5):64-72.
- [8] 贺福元,周逸群,邓凯文,等.超分子化学对中医药理论的特殊影响[J].中国中药杂志,2014,39(8):1534-1543.
- [9] 吴月峰,陈定芳,朱志飞,等.“同源异效”中药用药现象及超分子作用机制的研究[J].中草药,2021,52(18):5729-5740.
- [10] 李海英,潘雪,王敏存,等.基于超分子“气析”理论定量整合与验证中药成分及靶点群[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(21):207-213.
- [11] 贺福元,周宏灏,邓凯文,等.指纹图谱的一种定性定量研究新方法:总量统计矩分析法[J].药学报,2008,43(2):195-201.
- [12] 贺鹏,樊启猛,李海英,等.古代经典名方芍药甘草汤质量稳定性与传递性研究[J].时珍国医国药,2020,31(5):1123-1126.
- [13] 朱志飞,刘金玲,樊启猛,等.基于指纹图谱段带总量统计矩法和信息熵的桑源药材成分比较分析研究[J].中国中药杂志,2021,46(10):2547-2555.
- [14] 王明娟,胡昌勤,金少鸿.蒸发光散射检测器在药物分析及其它方面的应用[J].中国药事,2002,16(7):47-49.
- [15] 辛伍红.朗伯-比尔定律的适用条件与限制[J].化工时刊,2020,34(7):49-51.
- [16] 王增绘,付娟,武拉斌,等.基于UPLC-Q-TOF/MS技术的补骨脂盐炙前后化学成分变化研究[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(16):51-55.
- [17] 张翮.桑叶中药用活性组分黄酮类化合物的提取精制研究[D].武汉:华中科技大学,2019.
- [18] 贺福元,邓凯文,樊启猛,等.基于中医药超分子“气析”理论破解中医药重大科学问题和工程技术难题[J].中草药,2020,51(20):5381-5388.
- [19] 杨岩涛,吴春英,吴德智,等.指纹图谱段带总量统计矩法对黄连解毒汤提取过程中成分变化的研究[J].中草药,2014,45(15):2157-2164.
- [20] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [21] 林美好,袁志鹰,曾琪,等.基于UPLC-Q-TOF-MS-E的百合化学成分分析[J].湖南中医药大学学报,2020,40(8):964-973.
- [22] 李海英,邓凯文,潘雪,等.中医药超分子“气析”理论的“智能”属性阐释及其与人工智能联合应用[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(5):227-233.
- [23] 毛超一.基于成分-药效关联的中药菊花质量标准与评价研究[D].北京:中国中医科学院,2020.
- [24] 袁志鹰,夏江南,刘月新,等.百合中王百合苷A对土壤肥力的响应分析[J].中成药,2019,41(10):2526-2529.
- [25] 欧阳少琴,陈宇霞,黄晨存,等.13味归肺经中药UPLC指纹图谱特征及“印迹模板”成分簇划分的研究[J/OL].湖南中医药大学学报:1-8(2022-04-08)[2022-07-13].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1472.R.20220407.1514.002.html>.

(本文编辑 周旦)