

胡桃楸枝和根中5个成分含量测定方法的建立及其含量差异分析[△]

刘宏*, 宋奇, 王添敏#, 张慧, 翟延君, 康廷国(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)08-0933-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.08.07

摘要 目的:建立同时测定胡桃楸枝和根中没食子酸、逆没食子酸、1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖等5个成分含量的方法,并分析枝和根中上述5个成分的含量差异。方法:采用高效液相色谱法,以Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈为色谱柱,以水(含0.2%甲酸)-乙腈(含0.2%甲酸)为流动相进行梯度洗脱,流速为0.3 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为270 nm,进样量为5 μ L。利用独立样本 *t* 检验和偏最小二乘法判别分析对5个成分含量进行比较分析。结果:没食子酸、逆没食子酸、1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖检测质量浓度的线性范围分别为0.989~63.3、1.58~101、1.01~64.7、3.31~212、3.34~214 μ g/mL ($r \geq 0.9973$);精密性、重复性、稳定性(12 h)试验的RSD均小于3.2%,平均加样回收率分别为103.2%、99.1%、101.5%、102.9%、104.7%(RSD分别为4.85%、2.80%、1.31%、2.73%、1.28%)。在胡桃楸枝中,上述成分的平均含量分别为0.296 5、0.621 1、0.562 5、3.111 7、3.451 3 mg/g;在根中,上述成分的平均含量分别为0.673 4、2.755 5、0.964 0、2.946 6、4.836 4 mg/g;在枝、根中上述成分的平均总量分别为8.043 2、12.175 9 mg/g。根中没食子酸、逆没食子酸和1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖含量均显著高于枝中的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而枝和根中其余2个成分的含量及5个成分的总量比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。偏最小二乘法判别分析所建模型的累积解释度(R^2X 、 R^2Y)、累积预测度(Q^2)分别为0.943、0.745、0.710;模型载荷图显示,逆没食子酸与原点距离最远,仅逆没食子酸含量的变量投影重要性值大于1。结论:成功建立了可同时测定胡桃楸枝和根中5个成分含量的方法。除1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖外,胡桃楸根中其余4个成分的含量及总含量均高于胡桃楸枝,逆没食子酸是区分两类样品的主要差异成分。

关键词 胡桃楸;枝;根;没食子酸;逆没食子酸;鞣质;含量测定

Establishment of Content Determination of 5 Components and Their Content Difference Analysis in the Branch and Root of *Juglans mandshurica*

LIU Hong, SONG Qi, WANG Tianmin, ZHANG Hui, ZHAI Yanjun, KANG Tingguo (School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Liaoning Dalian 116600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 5 components in the branch and root of *Juglans mandshurica* as gallic acid, ellagic acid, 1,6-di-*O*-galloyl- β -*D*-glucose, 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -*D*-glucose and 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -*D*-glucose, and to analyze the content difference of above 5 components between the branch and root samples. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of water (containing 0.2% formic acid)-acetonitrile (containing 0.2% formic acid). A gradient elution was performed at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 30 ℃ and the detection wavelength was 270 nm. The sample size was 5 μ L. Independent samples *t*-test and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were applied for statistical analysis of 5 components. RESULTS: The linear range of gallic acid, ellagic acid, 1,6-di-*O*-galloyl- β -*D*-glucose, 1,2,6-tri-*O*-galloyl- β -*D*-glucose and 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -*D*-glucose were 0.989-63.3, 1.58-101, 1.01-64.7, 3.31-212, 3.34-214 μ g/mL ($r \geq 0.9973$), respectively. RSDs of precision, reproducibility and stability tests (12 h) were all lower than 3.2%. The average recoveries of the 5 components were 103.2% (RSD=4.85%), 99.1% (RSD=2.80%), 101.5% (RSD=1.31%), 102.9% (RSD=2.73%) and 104.7% (RSD=1.28%), respectively. The average contents of the above components in the branch of *J. mandshurica* were 0.296 5, 0.621 1, 0.562 5, 3.111 7 and 3.451 3 mg/g, respectively. The average contents of above components in the root were 0.673 4, 2.755 5, 0.964 0, 2.946 6 and 4.836 4 mg/g, respectively. The total contents of the 5 components in the branch and root of

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81703658);辽宁省自然科学基金资助计划(No.2019-MS-223);沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目(No.RC190083)

* 硕士。研究方向:中药品质评价与药效物质基础。电话:0411-85890138。E-mail:2427882232@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药品质评价与药效物质基础。电话:0411-85890138。E-mail:wang_tm@163.com

J. mandshurica were 8.043 2 and 12.175 9 mg/g, respectively. The contents of gallic acid, ellagic acid and 1,6-di-*O*-galloyl- β -*D*-glucose in roots were significantly higher than those in branches ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no significant differences in the contents of the other 2 components and the total contents of the 5 components in branches and roots ($P > 0.05$). The cumulative interpretability (R^2X , R^2Y) and cumulative predictability (Q^2) of the model established by

PLS-DA were 0.943, 0.745, and 0.710 respectively. The model load diagram showed that the distance between the ellagic acid and the origin was the farthest, and only variable projection importance of the content of the ellagic acid was greater than 1. CONCLUSIONS: The established method can be used for the content determination of 5 components in the branch and root of *J. mandshurica*. Except for 1, 2, 6-tri-*O*-galloyl- β -*D*-glucose, the contents of other 4 components and total contents of the 5 components in the root of *J. mandshurica* are higher than those of the branch. Ellagic acid is selected as the potential marker for discriminating the branch and root samples.

KEYWORDS *Juglans mandshurica*; Branch; Root; Gallic acid; Ellagic acid; Tannins; Content determination

胡桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 为胡桃科植物, 又名核桃楸, 主要分布于我国东北和华北地区, 其青果皮、树皮和枝皮为传统中药、满药^[1]。据考证, 该药以“胡桃”之名入药的记载始于唐代, 《千金食治》和《食疗本草》中均有记载^[2]。《本草纲目》记载, 胡桃果实能“补气养血, 润燥化痰, 益命门, 利三焦, 温肺润肠”, 胡桃青皮能“止水痢”^[3]。满药文字记载较少, 但满族人民流传“楸树皮, 打鸡蛋, 治癌症, 别小看”之说^[4]。现《中药大辞典(上册)》以及《辽宁省中药材标准(第1册)》中均收录了胡桃楸果(未成熟果实或果皮)和胡桃楸皮(干皮或枝皮), 两者具有清热解毒、止痢、止痛、抗肿瘤等功效^[5-6]。

现代研究表明, 胡桃楸的枝、根和未成熟果皮等不同部位均具有抗肿瘤作用, 在临床上可用于治疗肿瘤^[7-10]。但该药并未被2020年版《中国药典》收录, 且其相关质量评价研究也主要集中在未成熟果皮以及有效部位的含量等方面^[11-13], 而关于该植物枝和根的质量评价研究较少, 亦未见同时测定多个成分含量的报道。本课题组前期采用液质联用法(LC-MS)对胡桃楸中不同部位的化学成分进行研究, 发现其枝和根中成分类似, 均主要含有鞣质类化合物, 其中1, 6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1, 2, 6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1, 2, 3, 6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖含量较高^[14]。基于此, 本研究拟建立测定胡桃楸枝和根中3个鞣质类成分(1, 6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1, 2, 6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1, 2, 3, 6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖)及2个组成鞣质类成分的有机酸(没食子酸、逆没食子酸)含量的高效液相色谱法(HPLC), 并利用独立样本 *t* 检验和偏最小二乘法判别分析法(PLS-DA)对其枝和根中上述5个成分的含量差异进行分析, 以期对胡桃楸枝和根的质量评价提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括1260型HPLC仪(美国Agilent公司)、JA21002型电子分析天平(舜宇恒平科学仪器有限公司)、Sartorius型电子天平(德国Sartorius公司)、TDZ4-WS型低速台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、KQ5200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

40批胡桃楸枝样品(编号SZ1~SZ40)、23批胡桃楸根样品(编号SG1~SG23)均为产地自采, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为胡桃科植物胡桃楸 *J. mandshurica* Maxim. 的枝或根。胡桃楸枝和根样品来源信息见表1。

表1 胡桃楸枝和根样品来源信息

Tab 1 Source information of branches and roots of *J. mandshurica* samples

编号	采集地	采收日期	编号	采集地	采收日期
SZ1	辽宁省铁岭市西丰县	2018年8月	SZ33	辽宁省抚顺市抚顺县峡河乡	2018年8月
SZ2	辽宁省铁岭市横道河子乡	2018年8月	SZ34	辽宁省抚顺市望花区	2018年4月
SZ3	辽宁省铁岭市鸡冠山乡	2018年8月	SZ35	辽宁省营口市盖州市	2017年7月
SZ4	辽宁省本溪市小市镇	2018年8月	SZ36	辽宁省丹东市东港市	2016年12月
SZ5	辽宁省本溪市桓仁县	2018年5月	SZ37	辽宁省鞍山市岫岩县	2016年12月
SZ6	辽宁省本溪市东营坊乡	2018年4月	SZ38	黑龙江省伊春市小兴安岭	2016年12月
SZ7	辽宁省鞍山市岫岩县	2018年7月	SZ39	吉林省珲春市	2016年12月
SZ8	辽宁省鞍山市岫岩县	2018年8月	SZ40	黑龙江省黑河嫩江	2016年12月
SZ9	辽宁省鞍山市千山区	2018年9月	SG1	辽宁省朝阳市凌源县	2018年8月
SZ10	辽宁省鞍山市千山区	2018年7月	SG2	辽宁省朝阳市喀喇沁左翼蒙古族自治县	2018年8月
SZ11	辽宁省辽阳市辽阳县	2018年8月	SG3	辽宁省朝阳市北票县	2018年8月
SZ12	吉林省吉林市龙潭区	2018年7月	SG4	辽宁省铁岭市西丰县	2018年8月
SZ13	吉林省吉林市蛟河市	2018年7月	SG5	辽宁省铁岭市横道河子乡	2018年8月
SZ14	内蒙古赤峰市热水镇	2018年4月	SG6	辽宁省铁岭市鸡冠山乡	2018年8月
SZ15	辽宁省丹东市五龙背镇	2018年4月	SG7	辽宁省鞍山市岫岩县	2018年8月
SZ16	辽宁省丹东市东港市	2018年4月	SG8	辽宁省鞍山市千山区	2018年7月
SZ17	辽宁省丹东市振兴区	2018年7月	SG9	辽宁省丹东市东港市	2018年9月
SZ18	辽宁省丹东市东港市	2018年8月	SG10	辽宁省丹东市东港市	2018年7月
SZ19	辽宁省丹东市东港市	2018年8月	SG11	辽宁省本溪市小市镇	2018年8月
SZ20	辽宁省营口市盖州市	2018年8月	SG12	辽宁省本溪市桓仁县	2018年4月
SZ21	辽宁省营口市盖州市	2018年8月	SG13	辽宁省本溪市连山关镇	2018年8月
SZ22	辽宁省抚顺市清原县南口前镇	2018年8月	SG14	辽宁省抚顺市红透山镇	2018年8月
SZ23	辽宁省抚顺市清原县红透山镇	2018年8月	SG15	辽宁省抚顺市南口前镇	2018年8月
SZ24	辽宁省抚顺市新宾县上夹河镇	2018年4月	SG16	辽宁省抚顺市木奇镇	2018年4月
SZ25	辽宁省抚顺市新宾县木奇镇	2018年4月	SG17	辽宁省抚顺市峡河乡	2018年8月
SZ26	辽宁省抚顺市新宾县南杂木镇	2018年4月	SG18	辽宁省抚顺市望花区	2018年4月
SZ27	辽宁省抚顺市抚顺县兰山乡	2018年4月	SG19	辽宁省抚顺市兰山乡	2018年4月
SZ28	辽宁省抚顺市新抚区	2018年8月	SG20	辽宁省抚顺市石文镇	2018年4月
SZ29	辽宁省抚顺市抚顺县上马乡	2018年4月	SG21	辽宁省抚顺市哈达乡	2018年4月
SZ30	辽宁省抚顺市抚顺县哈达乡	2018年4月	SG22	吉林省吉林市蛟河区	2018年7月
SZ31	辽宁省抚顺市抚顺县石文镇	2018年4月	SG23	吉林省吉林市龙潭区	2018年7月
SZ32	辽宁省抚顺市抚顺县救兵乡	2018年5月			

1, 6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1, 2, 6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖和1, 2, 3, 6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖对照品均由本课题组分离纯化, 经HPLC峰面积归一化法测定其纯度均大于95%; 没食子酸(批号410860050, 纯度>98%)、逆没食子酸(批号117710025,

纯度>98%)对照品均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;乙腈(色谱纯)购自德国Merck公司,甲醇(色谱纯)、甲酸(色谱纯)均购自天津科密欧化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液 分别称取没食子酸、1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、逆没食子酸对照品各适量,精密称定,以50%甲醇(含0.5%甲酸)溶解,配制成上述成分质量浓度分别为0.316 7、0.323 3、1.060 0、1.070 0、0.101 0 mg/mL的对照品贮备液。精密量取上述前4种贮备液各1 mL,置于5 mL量瓶中,加入50%甲醇(含0.5%甲酸)稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为0.063 3、0.064 7、0.212 0、0.214 0 mg/mL的没食子酸、1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖混合对照品贮备液,于4 ℃冰箱中保存,备用。逆没食子酸因其在甲醇中溶解度相对较差,故不与其他对照品混合配制。

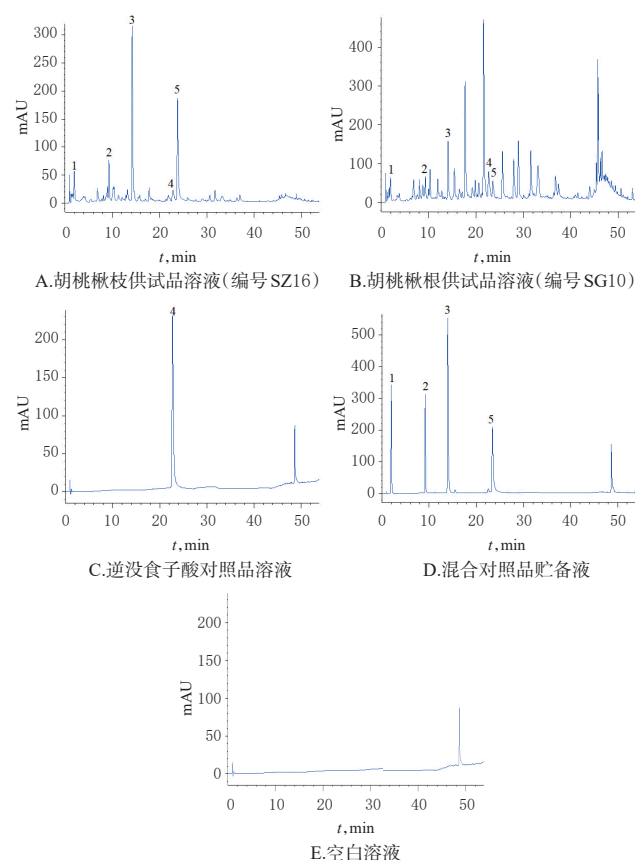
2.1.2 供试品溶液 将不同批次的胡桃楸枝、根样品切段,阴干后粉碎。取各样品粗粉(过二号筛)约0.2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,分别精密加入50%甲醇(含0.5%甲酸)10 mL,称定质量,超声(功率200 W,频率50 kHz)处理30 min,放冷,再次称定质量,用50%甲醇(含0.5%甲酸)补足减失的质量,以4 000 r/min离心5 min,取上清液,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 以Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm,2.7 μm)为色谱柱,Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(5 mm×2.1 mm,2.7 μm)为预柱,以水(含0.2%甲酸)为流动相A,乙腈(含0.2%甲酸)为流动相B进行梯度洗脱(0~5 min,5% B→10% B;5~25 min,10% B→16% B;25~40 min,16% B→22% B;40~45 min,22% B→45% B;45~50 min,45% B→65% B;50~52 min,65% B→100% B;52~55 min,100% B);流速为0.3 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为270 nm,进样量为5 μL。在该色谱条件下,没食子酸、逆没食子酸、1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖的色谱峰均能够较好地分离,分离度均大于1.5;其他成分对待测成分的测定无干扰,理论板数均大于3 000;空白对照溶液[50%甲醇(含0.5%甲酸)]对测定无干扰,详见图1。

2.2.2 线性关系考察 分别精密吸取逆没食子酸对照品贮备液和混合对照品贮备液各适量,用50%甲醇(含0.5%甲酸)逐级稀释,得稀释倍数分别为0、2、8、16、64倍的系列对照品溶液。按“2.2.1”项下色谱条件进样分

析,记录色谱图。以各待测成分质量浓度(x , μg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归分析,结果见表2。



注:1.没食子酸;2.1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖;3.1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖;4.逆没食子酸;5.1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖

Note: 1. gallic acid; 2. 1, 6-di-*O*-galloyl- β -*D*-glucose; 3. 1, 2, 6-tri-*O*-galloyl- β -*D*-glucose; 4. ellagic acid; 5. 1, 2, 3, 6-tetra-*O*-galloyl- β -*D*-glucose

图1 胡桃楸枝和根供试品和对照品、空白对照的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of test sample of branch and root samples of *J. mandshurica*, reference substances and blank control

表2 5个待测成分的回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equation and linear range for 5 components

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/mL
没食子酸	$y=49.235x+18.737$	0.999 9	0.989~63.3
逆没食子酸	$y=22.431x+8.110$	0.997 3	1.58~101
1,6-二- <i>O</i> -没食子酰基- β - <i>D</i> -葡萄糖	$y=39.083x+11.822$	0.999 9	1.01~64.7
1,2,6-三- <i>O</i> -没食子酰基- β - <i>D</i> -葡萄糖	$y=32.201x+16.975$	0.999 9	3.31~212
1,2,3,6-四- <i>O</i> -没食子酰基- β - <i>D</i> -葡萄糖	$y=20.083x-12.483$	0.999 3	3.34~214

2.2.3 精密度试验 取胡桃楸枝(编号SZ16)供试品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,没食子酸、逆没食子酸、1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖、

续表3

Continued tab 3

编号	没食子酸	逆没食子酸	1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	合计
SZ11	0.084 1	0.530 2	0.110 4	0.414 8	0.414 5	1.554 0
SZ12	0.235 7	0.619 8	0.380 6	2.118 9	3.687 0	7.042 0
SZ13	0.074 2	0.958 2	0.201 1	1.661 6	2.056 2	4.951 3
SZ14	0.397 9	0.984 2	1.204 9	5.710 1	3.983 2	12.280 3
SZ15	0.363 2	0.279 5	0.989 4	4.654 6	5.558 8	11.845 5
SZ16	0.520 8	1.709 6	0.781 2	6.612 5	6.482 9	16.107 0
SZ17	0.286 9	0.472 5	0.482 0	1.723 9	4.838 7	7.804 0
SZ18	0.049 7	0.271 4	0.136 8	0.577 7	1.139 1	2.174 7
SZ19	0.047 1	0.139 9	0.017 0	0.118 7	0.188 0	0.510 7
SZ20	0.068 2	0.610 4	0.241 6	0.801 2	0.921 4	2.642 8
SZ21	0.104 9	0.200 7	0.533 6	2.818 1	2.362 5	6.019 8
SZ22	0.038 0	0.268 8	0.106 0	0.511 0	1.039 0	1.962 8
SZ23	0.159 9	0.571 9	0.126 0	1.180 1	1.356 7	3.394 6
SZ24	0.572 7	1.213 9	0.892 6	2.461 2	6.372 2	11.512 6
SZ25	0.560 5	0.840 9	1.709 5	11.541 1	10.568 3	25.220 3
SZ26	0.331 5	0.081 3	0.731 4	3.355 1	3.422 4	7.921 7
SZ27	0.277 7	0.849 7	0.795 2	3.877 4	3.979 0	9.779 0
SZ28	0.114 3	0.470 8	0.078 4	0.568 1	0.862 5	2.094 1
SZ29	0.436 8	0.747 9	0.851 6	3.467 9	4.537 1	10.041 3
SZ30	0.366 1	0.341 5	0.983 0	5.569 3	4.637 8	11.897 7
SZ31	0.570 3	0.435 2	0.910 3	3.423 3	6.338 0	11.677 1
SZ32	0.242 0	0.326 2	0.802 8	5.188 8	5.270 4	11.830 2
SZ33	0.055 2	0.265 7	0.240 7	0.900 3	1.135 6	2.597 5
SZ34	0.294 4	0.386 9	0.671 5	4.953 4	5.646 1	11.952 3
SZ35	0.095 2	0.163 9	0.043 0	0.139 3	0.125 0	0.566 4
SZ36	0.483 5	0.634 9	1.156 6	4.374 5	3.817 4	10.466 9
SZ37	0.750 1	0.408 0	1.096 0	7.110 7	6.406 5	15.771 3
SZ38	0.610 1	1.085 3	0.922 5	5.716 6	7.437 4	15.771 9
SZ39	1.008 4	1.399 6	0.872 4	6.565 5	6.587 0	16.432 9
SZ40	0.644 7	0.791 6	0.816 4	4.868 9	5.728 1	12.849 7
SG1	0.248 4	2.543 9	0.731 1	1.352 2	2.718 8	7.594 4
SG2	0.283 8	3.471 1	0.753 4	1.485 6	4.450 3	10.444 2
SG3	0.383 9	3.434 4	0.615 9	1.940 4	5.290 9	11.665 5
SG4	3.802 3	5.008 7	5.983 2	18.338 4	33.585 3	66.717 9
SG5	0.340 8	1.427 5	1.081 7	2.871 3	1.665 9	7.387 2
SG6	0.646 4	1.508 4	0.950 4	3.019 0	1.579 5	7.703 7
SG7	0.954 1	3.012 2	0.975 7	2.604 1	4.635 0	12.181 1
SG8	0.272 1	1.537 8	0.527 8	1.489 8	2.561 2	6.388 7
SG9	0.357 9	2.664 8	1.115 0	3.805 3	3.228 8	11.171 8
SG10	0.619 8	3.773 0	0.806 3	2.428 4	3.753 1	11.380 6
SG11	0.267 2	2.793 8	0.704 4	0.857 0	2.744 3	7.366 7
SG12	0.801 1	2.482 2	0.637 5	1.317 0	3.006 3	8.244 1
SG13	0.764 1	4.754 1	0.662 3	1.297 0	2.692 9	10.170 4
SG14	0.246 7	3.218 8	0.534 1	1.248 1	2.415 2	7.662 9
SG15	0.317 8	2.728 4	0.714 8	0.952 8	2.902 0	7.615 8
SG16	0.944 2	1.651 5	0.619 7	5.274 6	8.365 5	16.855 5
SG17	0.593 1	2.516 1	0.518 4	2.651 0	3.645 7	9.924 3
SG18	0.978 1	3.087 9	1.000 2	2.669 6	4.751 4	12.487 2
SG19	0.324 0	1.107 8	0.409 5	0.401 1	1.022 5	3.264 9
SG20	0.552 9	2.410 6	0.323 0	3.638 0	9.312 1	16.236 6
SG21	0.608 6	1.949 3	1.030 0	4.082 5	2.002 9	9.673 3
SG22	0.729 4	3.476 2	0.910 1	2.900 6	2.132 7	10.149 0
SG23	0.451 8	2.818 8	0.567 6	1.147 7	2.776 0	7.761 9
枝平均	0.296 5	0.621 1	0.562 5	3.111 7	3.451 3	8.043 2
根平均	0.673 4 [*]	2.755 5 ^{***}	0.964 0 [*]	2.946 6	4.836 4	12.175 9

注:与枝中平均含量比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ Note: vs. the contents in branch samples, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖峰面积的RSD分别为0.58%、1.28%、0.29%、0.42%、0.57%($n=6$),表明方法精密度良好。

2.2.4 重复性试验 精密称取胡桃楸枝(编号SZ16)粗粉0.2 g,按“2.1.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,代入回归方程计算含量。结果,没食子酸、逆没食子酸、1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖、1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖、1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖平均含量的RSD分别为0.47%、3.19%、0.69%、0.93%、0.95%($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 取胡桃楸枝(编号SZ16)供试品溶液,于室温下放置0、2、4、8、10、12 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,没食子酸、逆没食子酸、1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖、1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖、1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖峰面积的RSD分别为0.81%、2.33%、0.89%、0.59%、0.88%($n=6$),表明样品在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.2.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的胡桃楸枝(编号SZ16)粗粉6份,每份0.1 g,精密称定,分别加入与样品中成分等量的各对照品贮备液,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积并计算加样回收率。结果,没食子酸、逆没食子酸、1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖、1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖、1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖的平均加样回收率分别为103.2%、99.1%、101.5%、102.9%、104.7%,RSD分别为4.85%、2.80%、1.31%、2.73%、1.28%($n=6$)。

2.3 样品含量测定

取各批胡桃楸枝、根样品各适量,分别按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,以原浓度或稀释/浓缩到适当浓度后,再按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,代入回归方程计算5个成分的含量,重复测定2次。采用SPSS 25.0软件进行独立样本 t 检验,比较枝和根样本中各成分含量的差异,结果见表3。

表3 胡桃楸枝和根中5个成分的含量(mg/g, $n=2$)Tab 3 Contents of 5 components in branch and root samples of *J. mandshurica* (mg/g, $n=2$)

编号	没食子酸	逆没食子酸	1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖	合计
SZ1	0.267 9	0.939 5	0.585 0	5.742 0	3.276 5	10.810 9
SZ2	0.050 9	0.198 2	0.093 7	0.422 7	0.585 9	1.351 4
SZ3	0.046 3	0.150 0	0.074 2	0.241 2	0.408 6	0.920 3
SZ4	0.445 5	1.616 5	0.162 2	2.246 5	1.345 6	5.816 3
SZ5	0.491 8	0.519 5	1.143 6	3.711 8	5.463 0	11.329 7
SZ6	0.364 2	0.853 7	0.831 9	4.046 3	3.212 2	9.308 3
SZ7	0.150 7	0.692 6	0.239 2	1.493 7	2.329 5	4.905 7
SZ8	0.067 6	0.863 8	0.124 6	1.849 8	2.543 1	5.448 9
SZ9	0.050 4	0.313 4	0.113 2	0.531 9	0.908 1	1.917 0
SZ10	0.078 7	0.637 1	0.249 5	1.198 2	1.082 0	3.245 5

由表3可知,1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖在胡桃楸枝和根样品中的平均含量均为最高,分别为3.451 3、4.836 4 mg/g;1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖的平均含量也较高,分别为3.111 7、2.946 6 mg/g;逆没食子酸在枝和根中的平均含量差异较大,分别为0.621 1、2.755 5 mg/g;1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖和没食子酸在枝和根中的平均含量均较低,前者在枝和根中分别为0.562 5、0.964 0 mg/g,后者在枝和根中分别为0.296 5、0.673 4 mg/g。从5个成分的总量看,胡桃楸枝和根中所测含量有所差异,两者的平均值分别为8.043 2、12.175 9 mg/g。

通过独立样本 *t* 检验显示,逆没食子酸在根中的含量显著高于其在枝中的含量 ($P < 0.01$),1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖和没食子酸在根中的含量也显著高于两者在枝中的含量 ($P < 0.05$)。对于1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖,枝中的含量稍高于根中的含量;对于1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖,根中的含量稍高于枝中的含量,但两者组间比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 PLS-DA

为了进一步明确能否通过上述5个成分的含量来区分胡桃楸枝和根样品,同时找出对枝和根分类贡献较大的成分,本研究采用SIMCA-P 12.0软件对样品数据进行PLS-DA。以63批枝和根样品中5个成分的含量为变量,得到63×5阶数据矩阵,导入SIMCA-P 12.0软件建立PLS-DA模型,提取2个主成分,模型的累积解释度(R^2X 、 R^2Y)分别为0.943、0.745,累积预测度(Q^2)为0.710,均大于0.5,说明模型稳定可靠^[15-16]。设定置换次数为200进行置换检验,结果见图2。由图2可见, R^2 拟合直线与Y轴的截距为-0.018, Q^2 拟合直线与Y轴的截距为-0.181,说明模型可靠、无过度拟合^[16]。

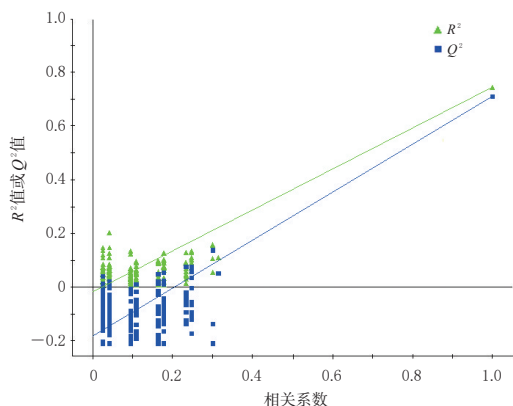


图2 200次置换的PLS-DA交叉验证模型图

Fig 2 Cross-validation model plot of PLS-DA with 200 permutations

63批胡桃楸枝和根样品的PLS-DA得分散点图见图3。由图3A可见,SG4和SG13两批根样品分布在95%置信区间外,说明两者与其他样品差异较大。SG4

样品2018年8月采自辽宁省铁岭市西丰县,其中5个待测成分的含量均明显高于其他样品;SG13样品2018年8月采自辽宁省本溪市连山关镇,其中逆没食子酸含量仅次于SG4样品,高于其他样品。除上述2批样品外,其余样品均在95%置信区间内。由图3B可见,大部分枝和根样品分布于不同区域,区分较明显,但仍有4批枝样品(SZ4、SZ16、SZ24、SZ39)与根样品无法区分。

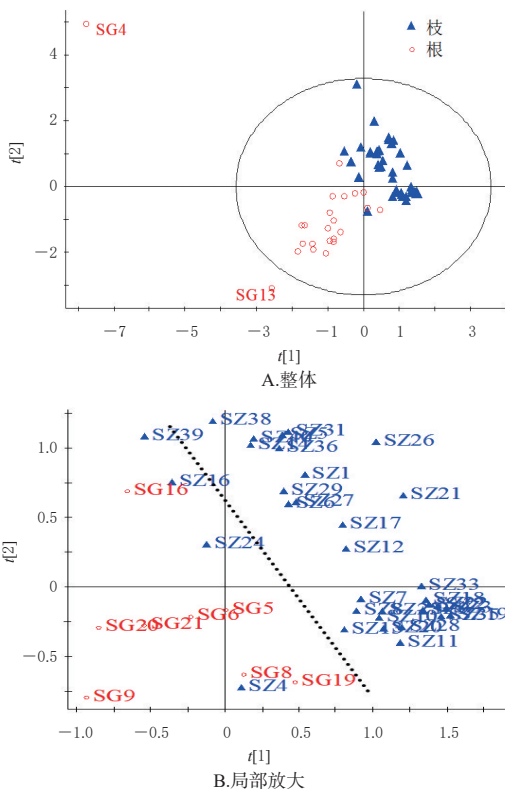


图3 63批胡桃楸枝和根样品的PLS-DA得分散点图

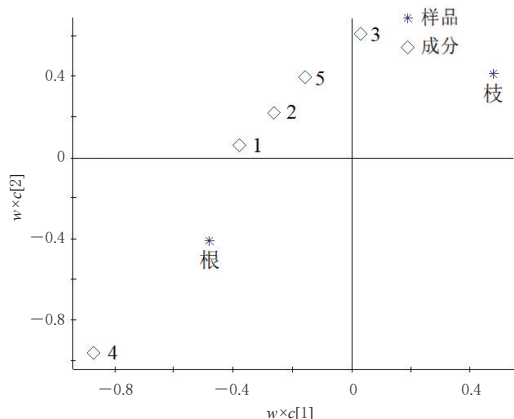
Fig 3 PLS-DA score scatter plots of branch and root samples of 63 batches of *J. mandshurica*

PLS-DA模型载荷图可反映5个成分含量对判别模型贡献的大小,离原点越远的成分对区别两组样品的贡献越大^[16],结果见图4。由图4显示,逆没食子酸(色谱峰4)与根的距离更近,且离原点距离最远;而其他成分位于根和枝之间,且与原点距离较近。

胡桃楸根和枝中5个成分的变量投影重要性(VIP)值见图5。由图5可见,5个成分中只有逆没食子酸含量的VIP值大于1,说明该成分含量是区分胡桃楸根和枝样品贡献较大的成分^[15-16]。

3 讨论

胡桃楸中的化学成分主要有萜醌、鞣质、二芳基庚烷、有机酸和黄酮等^[17]。本课题组前期对胡桃楸不同部位的LC-MS分析表明,其枝和根中主要含有鞣质和有机酸类化合物^[14]。其中,1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖和1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖是枝中含量最高的2个鞣质类化合物,两者在根中含量也较高;同时,本文选择了与上述2个鞣质化合物具有生源关系的

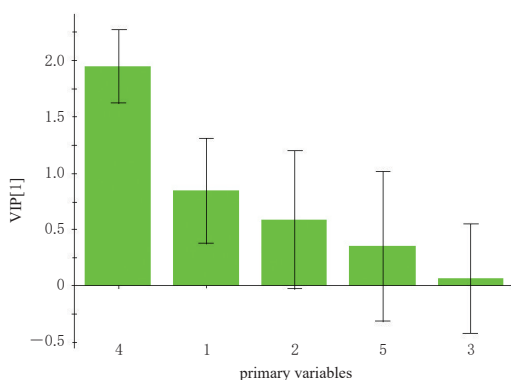


注:1.没食子酸;2.1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖;3.1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖;4.逆没食子酸;5.1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖

Note: 1. gallic acid; 2. 1, 6-di-O-galloyl-β-D-glucose; 3. 1, 2, 6-tri-O-galloyl-β-D-glucose; 4. ellagic acid; 5. 1, 2, 3, 6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose

图4 胡桃楸根和枝中5个成分的PLS-DA载荷图

Fig 4 PLS-DA loading scatter plot of 5 components in branch and root samples of *J. mandshurica*



注:1.没食子酸;2.1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖;3.1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖;4.逆没食子酸;5.1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖

Note: 1. gallic acid; 2. 1, 6-di-O-galloyl-β-D-glucose; 3. 1, 2, 6-tri-O-galloyl-β-D-glucose; 4. ellagic acid; 5. 1, 2, 3, 6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose

图5 胡桃楸根和枝中5个成分含量的VIP值

Fig 5 VIP value of the contents of 5 components in branch and root samples of *J. mandshurica*

没食子酸、1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖、逆没食子酸作为含量测定的指标成分。本课题组近期研究发现,上述5个成分对人肝癌细胞HepG2增殖均具有不同程度的抑制作用,因此这些成分能够为合理评价胡桃楸枝和根的质量提供依据。

本研究采集了东北省不同产地、不同采收时间的40批胡桃楸枝和23批胡桃楸根样品,样品量较多、具有一定的代表性。根据PLS-DA分析结果,可见大部分样品数据分布在95%置信区间内,但也有个别样品如SG4和SG13的测定数据离群,4个枝样品SZ4、SZ16、SZ24和

SZ39在PLS-DA模型中与根样品无法区分。在本研究中,这些样品的采收和处理与其他样品并无不同,植物中化学成分的累积受采收时间、产地、采收加工、生长年限、生境等多因素影响^[18]。胡桃楸为野生乔木,大都生长于沟谷两旁,结合研究目的本研究明确了采收时间、产地,统一了加工方法,但未对生长年限和生境进行详细考查,因此尚不能完全阐明几个样品数据离群的原因。若要进一步明确样品中成分含量的变化规律,仍需通过固定部分因素进行详细考察。

本研究结果表明,胡桃楸根中所测5个主要成分的总量稍高于胡桃楸枝中的总量,这与以往报道的根中总鞣质含量高于枝中总鞣质含量基本一致^[13]。本课题组前期研究表明,枝和根均主要含鞣质但又有所不同,枝中主要为没食子鞣质,根中包括没食子鞣质和逆没食子鞣质而以后者为多^[14]。因此,胡桃楸根中合成逆没食子鞣质的前体——逆没食子酸含量显著高于枝中的含量,并且该成分也是区分枝和根样品的主要差异成分。

综上所述,本研究成功建立了可同时测定胡桃楸枝和根中5个成分含量的方法。除1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖外,胡桃楸根中其余4个成分的含量及总含量均高于胡桃楸枝,逆没食子酸是区分两类样品的主要差异成分。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第21卷[M].北京:科学出版社,1979:32.
- [2] 朱凤琴,梁勇满,许亮,等.满药胡桃楸本草考证及DNA条形码鉴定研究[J].中药材,2018,41(9):2073-2078.
- [3] 李时珍.本草纲目:下册[M].刘衡如,刘山水,校注.4版.北京:华夏出版社,2011:1210.
- [4] 张凌巍.满族传统医药新编[M].北京:中医古籍出版社,2011:160.
- [5] 中药大辞典编委会.中药大辞典:上册[M].上海:上海科学技术出版社,1986:1793.
- [6] 辽宁省食品药品监督管理局.辽宁省中药材标准:第1册[S].沈阳:辽宁科学技术出版社,2009:144.
- [7] 姚大雷,姜丽君,周薇,等.胡桃楸根氯仿提取物对小鼠S180肉瘤抑制作用的研究[J].中药材,2009,32(4):595-596.
- [8] 王添敏,俞文婕,付莹,等.胡桃楸茎枝含药鸡蛋对小鼠H22肝癌实体瘤的抑制作用[J].现代药物与临床,2017,32(3):365-369.
- [9] 孙冬雪,郭雄飞,阿拉腾图雅,等.青龙衣中化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J].中国中药杂志,2019,44(11):2278-2282.
- [10] 张洪娟,桑树荣.高奎滨用青龙衣制剂治疗肿瘤用药经验[J].黑龙江中医药,2000(2):62.
- [11] 战金龙,姜玲玲,赵赫,等.不同种质资源的青龙衣质量标准研究[J].现代中药研究与实践,2019,33(2):39-42.
- [12] 霍金海,孙国东,董文婷,等.基于UPLC-Q-TOF-MS技术

黄连解毒汤通过调控巨噬细胞极化防治动脉粥样硬化的机制^Δ

李弼仁^{1*}, 李海怡², 朱泳², 罗川晋^{3#}(1.海南省中医院急诊科,海口 570100;2.广州中医药大学第一临床医学院,广州 510405;3.广州中医药大学第一附属医院心血管内科,广州 510405)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)08-0939-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.08.08

摘要 目的:研究黄连解毒汤对动脉粥样硬化(AS)模型小鼠M1、M2型巨噬细胞极化的调控作用,初步阐明其防治AS的机制。方法:将60只雄性ApoE^{-/-}小鼠随机分为空白对照组、模型组、辛伐他汀组[阳性对照,5 mg/(kg·d)]和黄连解毒汤低、中、高剂量组[5、10、20 mg/(kg·d),以生药总量计],每组10只。除空白对照组外,其余各组小鼠均饲以高脂饲料复制AS模型。造模结束后,各药物组小鼠灌胃相应药液,空白对照组和模型组小鼠灌胃生理盐水。每天给药1次,连续4周。给药结束后,采用全自动生化仪检测小鼠血清中三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量,采用天狼猩红染色法观察小鼠主动脉胶原纤维形成情况,采用酶联免疫吸附测定法检测小鼠血清中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、甘露糖受体(CD206)含量,采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法检测小鼠主动脉中白细胞介素1β(IL-1β)、iNOS、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、IL-10、类几丁质酶3样分子(YM1)、炎症区域分子1(Fizz1) mRNA的表达水平。结果:与空白对照组比较,模型组小鼠血清中TC、TG、LDL-C、iNOS含量以及主动脉中IL-1β、iNOS、TNF-α mRNA的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),血清中HDL-C、CD206含量以及主动脉中IL-10、YM1、Fizz1 mRNA的表达水平均显著降低($P<0.01$);主动脉血管内皮下可见厚厚一层胶原纤维。与模型组比较,各药物组小鼠上述血清指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且黄连解毒汤中、高剂量组小鼠主动脉中IL-1β、TNF-α、iNOS mRNA的表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),IL-10、YM1、Fizz1 mRNA的表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且其血管内皮相对光滑。结论:黄连解毒汤可通过抑制M1型巨噬细胞极化、促进M2型巨噬细胞极化,减少炎症反应,维持动脉内粥样斑块的稳定性,从而发挥抗AS的作用。

关键词 黄连解毒汤;动脉粥样硬化;巨噬细胞极化;小鼠

Mechanism of Huanglian Jiedu Decoction in Preventing and Treating Atherosclerosis by Regulating Macrophage Polarization

LI Biren¹, LI Haiyi², ZHU Yong², LUO Chuanjin³(1. Emergency Department, Hainan Provincial Hospital of TCM, Haikou 570100, China; 2. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 3. Dept. of Cardiovascular Disease, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

的北青龙衣有效成分动态变化分析[J].中国中药杂志, 2016,41(18):3379-3388.

[13] 王添敏,孙晓丽,彭雪,等.胡桃楸的根、茎枝、叶和果皮中总鞣质的含量测定[J].中国中药杂志,2011,36(1):32-36.

[14] WANG T M, LIU J, YI T, et al. Multiconstituent identification in root, branch, and leaf extracts of *Juglans mandshurica* using ultra high performance liquid chromatography

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81673923);广东省普通高校重点科研平台和科研项目(No.2018KQNCX043)

* 主治中医师,硕士。研究方向:中医内科学。电话:0898-66110120。E-mail:278701716@qq.com

通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:冠心病的中医药防治。E-mail:lcj_0124@126.com

with quadrupole time of flight mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2017,40(17):3440-3452.

[15] 袁静,戴文科,李京华. HPLC 指纹图谱技术结合 PLS-DA 在辛芩颗粒质量控制中的应用[J].药物分析杂志,2020,40(2):304-311.

[16] 石海培,包贝华,黄胜良,等.川芎饮片的HPLC指纹图谱建立、聚类分析及偏最小二乘判别分析[J].中国药房,2019,30(8):1066-1071.

[17] 沈广志,邹桂华,梁婷,等.核桃楸的化学成分研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(17):219-224.

[18] 康廷国.中药鉴定学[M].3版.北京:中国中医药出版社,2012:26.

(投稿日期:2020-12-02 修回日期:2021-02-24)

(编辑:邹丽娟)