

西南地区有柄石韦 UPLC 指纹图谱的建立及酚酸类成分的测定[△]

邱韵静*, 索彩仙, 潘礼业, 何民友, 陈向东, 李国卫[#](广东一方制药有限公司/广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东佛山 528244)

中图分类号 R282 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)09-1093-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.09.12

摘要 目的:建立西南地区有柄石韦的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,并测定其中4种酚酸类成分(新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸)的含量。方法:采用 Waters Cortecs T3 C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.6 μm)色谱柱,以甲醇-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱,流速为0.35 mL/min,检测波长为326 nm,柱温为30 ℃,进样量为1 μL。以UPLC法结合《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)建立有柄石韦的UPLC指纹图谱,采用SPSS 20.0软件对数据进行聚类分析和主成分分析,并利用外标法测定来自西南地区20批有柄石韦中4种酚酸类成分的含量。结果:有柄石韦的UPLC指纹图谱中确定了9个共有峰,指认出峰1、峰3、峰4、峰5、峰9分别为新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸和异绿原酸C;不同批次有柄石韦中各色谱峰相对保留时间的RSD为0~0.68%,相对峰面积的RSD为0~62.35%;20批药材指纹图谱与对照图谱的相似度均不小于0.990。聚类分析结果显示,不同产地的有柄石韦可聚为3类;主成分分析结果表明,不同产地的有柄石韦质量存在一定差异。新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸检测浓度的线性范围分别为0.61~61.41、0.18~17.60、2.00~200.11、0.62~61.51 μg/mL(R^2 均大于0.999 9),精密性、重复性和稳定性试验的RSD均小于2.00%,加样回收率为96.23%~98.17%(RSD为0.96%~2.28%, $n=6$);20批样品中,上述4种酚酸类成分的含量分别为0.385 3~1.891 9、0.018 0~0.129 5、2.569 5~10.676 0、0.563 5~1.860 5 mg/g。结论:所建UPLC指纹图谱较全面地反映了有柄石韦的主要化学成分。酚酸类成分可作为有柄石韦质量的主要评定指标;西南地区有柄石韦药材的质量高低排序为重庆产药材>四川产药材>贵州产药材。

关键词 有柄石韦;指纹图谱;新绿原酸;咖啡酸;绿原酸;隐绿原酸;超高效液相色谱法;聚类分析;主成分分析

Establishment of UPLC Fingerprint of *Pyrrosia petiolosa* from Southwest China and Content Determination of Phenolic Acids Component

QIU Yunjing, SUO Caixian, PAN Liye, HE Minyou, CHEN Xiangdong, LI Guowei (Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd./Key Laboratory of Guangdong TCM Formula Granule Enterprise, Guangdong Foshan 528244, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a UPLC fingerprint of *Pyrrosia petiolosa* from southwest China, and to determine the contents of 4 kinds of phenolic acids (neochlorogenic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid). METHODS: The determination was performed on Waters Cortecs T3 C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 0.35 mL/min. The detection wavelength was set at 326 nm. The column temperature was 30 ℃, and injection volume was 1 μL. UPLC method was used to establish the UPLC fingerprint of *P. petiolosa* in combination with the *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprints* (2012 edition). Cluster analysis and principle component analysis (PCA) were performed by using SPSS 20.0 software. The contents of 4 kinds of phenolic acids in 20 batches of *P. petiolosa* were determined by external standard method. RESULTS: There were 9 common peaks for the UPLC fingerprint of *P. petiolosa*. Peaks 1, 3, 4, 5 and 9 were identified as neochlorogenic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and isochlorogenic acid C, respectively. RSDs of the relative retention time of each peak in different batches of *P. petiolosa* were 0-0.68%, and the RSDs of the relative peak area were 0-62.35%. The similarities between the fingerprint of 20 batches of medicinal materials and the control chromatogram were not less than 0.990. The result of cluster analysis showed that *P. petiolosa* from different regions could be sorted into three species. Results of PCA showed the differences among *P. petiolosa* from different regions. The linear range of neochlorogenic acid, caffeic acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid were 0.61-61.41, 0.18-17.60, 2.00-200.11, 0.62-61.51 μg/mL ($R^2 > 0.999 9$). RSDs of precision, reproducibility and stability tests were all lower than 2.00%. The recoveries were 96.23% -98.17% (RSD=0.96% -2.28%, $n=6$). Among 20 batches of samples, the contents of above 4 kinds of phenolic acids were 0.385 3-1.891 9, 0.018 0-0.129 5, 2.569 5-10.676 0, 0.563.5-1.860 5 mg/g. CONCLUSIONS:

△ 基金项目:广东省省级科技计划项目(No.2018B030323004)

* 学士。研究方向:中药配方颗粒质量标准。E-mail:365485924@qq.com

通信作者:主管中药师,硕士。研究方向:中药配方颗粒质量标准。E-mail:452048107@qq.com

The established UPLC fingerprint could reflect the main chemical constituents of *P. pedunculata*. Phenolic acids could be used as the main evaluation indexes for the quality of *P. petiolosa*. The quality order of *P. petiolosa* from southwest China was Chongqing product>Sichuan product>Guizhou product.

KEYWORDS *Pyrrhosia petiolosa*; Fingerprint; Neochlorogenic acid; Caffeic acid; Chlorogenic acid; Cryptochlorogenic acid; UPLC; Cluster analysis; Principal component analysis

2020年版《中国药典》(一部)中收录的石韦为水龙骨科植物庐山石韦 *Pyrrhosia sheareri* (Bak.) Ching、石韦 *P. lingua* (Thunb.) Farwell 或有柄石韦 *P. petiolosa* (Christ) Ching 的干燥叶,归肺、膀胱经,具利尿通淋、清肺止咳、凉血止血的功效,为传统利尿要药,可用于热淋、血淋、石淋、小便不通、淋漓涩痛、肺热喘咳、吐血、衄血、尿血、崩漏等症^[1]。

有柄石韦习称小叶石韦,主要分布于我国东北、华北、西北、西南及长江中下游地区,行销全国。跟其他石韦属植物一样,有柄石韦中富含多种化学成分,主要有酚酸类、黄酮类、皂苷类和挥发性成分等。其中,绿原酸有抗菌、降压、利胆、兴奋中枢神经和增加白细胞等作用^[2];芒果苷有抗炎、抗病毒、止咳化痰、退热及调节免疫等功效^[3-4];咖啡酸能抗炎、抗病毒,有较强的抑菌作用^[5];芦丁有软化血管、抗氧化、抗病毒、抗炎、吸收紫外线等作用^[6]。近年来,有采用高效液相色谱(HPLC)法、一测多评法等测定有柄石韦中芒果苷、绿原酸、木犀草素等化学成分的研究报道^[6-8],也有关于有柄石韦中黄酮类成分的提取工艺及含量分析的报道^[9-12]。根据已发表的各种文献可知,不同种类或不同产地、不同部位的有柄石韦药材之间的质量存在差异^[13-16]。鉴于此,本课题组对西南地区不同产地有柄石韦药材进行指纹图谱及其中4种酚酸类成分的含量测定研究,并应用聚类分析和主成分分析等化学计量学方法对其结果进行分析,旨在为该药材的进一步应用和质量控制提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:H-Class型超高效液相色谱(UPLC)仪(美国Waters公司),XP26型百万分之一电子天平、ME204E型万分之一电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司],KQ500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q Direct型超纯水系统(美国Millipore公司)。

1.2 主要试剂

本研究所用的主要试剂有:绿原酸、咖啡酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110753-201817、110885-201703,纯度分别为96.8%、99.7%),隐绿原酸对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号1512701,纯度98.0%),新绿原酸、异绿原酸C对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为wkq18030107、wkq1805905,纯度均为98.0%);甲醇为

色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

本研究所用20批有柄石韦药材均采自种植基地,产地包括重庆、贵州、四川(表1),经广东一方制药有限公司魏梅主任药师鉴定,均为水龙骨科植物有柄石韦 *P. petiolosa* (Christ) Ching 的干燥叶。

表1 20批有柄石韦药材样品的产地信息

Tab1 Information of the regions of 20 batches of *P. petiolosa*

编号	药材产地	编号	药材产地	编号	药材产地
S1	重庆市巫溪县	S8	贵州省黔东南州安龙县	S15	重庆市巫溪县
S2	重庆市巫溪县	S9	贵州省黔东南州安龙县	S16	重庆市巫溪县
S3	重庆市巫溪县	S10	贵州省黔东南州安龙县	S17	重庆市巫溪县
S4	四川省广元市青川县	S11	四川省广元市旺苍县	S18	贵州省黔东南州黄平县
S5	四川省广元市青川县	S12	四川省广元市旺苍县	S19	贵州省黔东南州黄平县
S6	四川省广元市青川县	S13	四川省广元市旺苍县	S20	贵州省黔东南州黄平县
S7	贵州省兴义市安龙县	S14	重庆市巫溪县		

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Waters Cortecs T3 C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.6 μm),柱温为30℃,流动相为甲醇(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 7% A→15% A; 15~18 min, 15% A→20% A; 18~25 min, 20% A→25% A; 25~30 min, 25% A; 30~35 min, 25% A→40% A; 35~40 min, 40% A→80% A; 40~45 min, 80% A),流速为0.35 mL/min,检测波长为326 nm,进样量为1 μL。

2.2 对照品溶液的制备

分别取新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸C对照品适量,精密称定,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,制备成质量浓度分别为614.07、352.06、400.21、615.05、400.85 μg/mL的单一成分对照品溶液。再分别吸取新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸C对照品贮备液1、0.5、5、1、1 mL,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇定容,制备成上述5种成分的质量浓度分别为61.41、17.60、200.11、61.51、40.09 μg/mL的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

称取有柄石韦粉末(过二号筛)约0.5 g,精密称定,置于50 mL具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,称定质量,超声处理(功率300 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.4 UPLC 指纹图谱研究

2.4.1 方法学考察

(1)精密性试验:精密吸取同一供试品溶液(编号S1)适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果,各主要成分相对峰面积的RSD为0.15%~2.63%,相对保留时间的RSD为0.02%~0.17%,表明该方法精密性良好。

(2)稳定性试验:精密吸取同一供试品溶液(编号S1)适量,按“2.1”项下色谱条件分别于室温下0、2、4、8、12、24 h进样测定,记录色谱图。结果,各主要成分相对峰面积的RSD为0.26%~2.92%,相对保留时间的RSD为0.04%~0.26%,表明供试品溶液在室温下24 h内稳定性良好。

(3)重复性试验:取同一批有柄石韦样品(编号S1)6份,每份约0.5 g,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各主要成分相对峰面积的RSD为0.22%~1.42%,相对保留时间的RSD为0.05%~0.20%,表明该方法重复性良好。

2.4.2 UPLC 指纹图谱的建立

取20批有柄石韦药材样品粉末,分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将所得数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)进行分析,以编号S1的样品图谱为参照(因其色谱峰峰形较明显、峰信号强度适中),设置时间窗宽度为0.1 s,采用多点校正法进行色谱峰匹配,生成20批样品的UPLC叠加指纹图谱,采用平均数法生成对照指纹图谱(R),如图1所示。

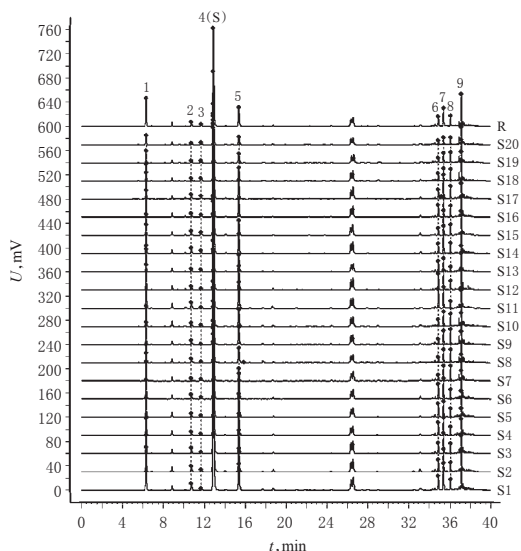


图1 20批有柄石韦的UPLC叠加指纹图谱

Fig 1 UPLC superimposed fingerprint of 20 batches of *P. petiolosa*

由图1可知,20批有柄石韦共含有9个共有峰,其峰面积之和占总峰面积的90%以上。因为峰4的分离度

较好、峰形对称、峰面积较大,故以其为参照峰(S),计算得各共有峰相对保留时间的RSD为0~0.68% ($n=20$),相对峰面积的RSD为0~62.35% ($n=20$),如表2、表3所示。

表2 20批有柄石韦指纹图谱的相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of fingerprint of 20 batches of *P. petiolosa*

编号	峰1	峰2	峰3	峰4(S)	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9
S1	0.489	0.836	0.909	1.000	1.194	2.704	2.744	2.798	2.880
S2	0.487	0.834	0.912	1.000	1.195	2.733	2.775	2.830	2.914
S3	0.488	0.835	0.911	1.000	1.195	2.729	2.771	2.825	2.909
S4	0.487	0.834	0.911	1.000	1.194	2.728	2.770	2.825	2.908
S5	0.487	0.834	0.910	1.000	1.195	2.729	2.771	2.825	2.907
S6	0.488	0.835	0.909	1.000	1.194	2.712	2.753	2.806	2.888
S7	0.489	0.835	0.907	1.000	1.194	2.699	2.739	2.792	2.873
S8	0.487	0.834	0.911	1.000	1.194	2.737	2.779	2.833	2.917
S9	0.488	0.834	0.909	1.000	1.194	2.707	2.748	2.801	2.884
S10	0.490	0.835	0.909	1.000	1.194	2.706	2.747	2.800	2.882
S11	0.490	0.836	0.907	1.000	1.194	2.687	2.727	2.780	2.860
S12	0.490	0.836	0.907	1.000	1.194	2.692	2.732	2.785	2.864
S13	0.488	0.834	0.908	1.000	1.194	2.701	2.741	2.794	2.875
S14	0.488	0.835	0.909	1.000	1.195	2.701	2.742	2.795	2.876
S15	0.490	0.835	0.909	1.000	1.195	2.700	2.741	2.794	2.876
S16	0.488	0.835	0.907	1.000	1.193	2.685	2.725	2.777	2.857
S17	0.488	0.835	0.908	1.000	1.195	2.696	2.737	2.789	2.869
S18	0.489	0.834	0.908	1.000	1.194	2.695	2.735	2.787	2.868
S19	0.487	0.833	0.907	1.000	1.194	2.692	2.731	2.783	2.862
S20	0.490	0.835	0.907	1.000	1.193	2.687	2.727	2.779	2.859
平均值	0.488	0.835	0.909	1.000	1.194	2.706	2.747	2.800	2.881
RSD, %	0.23	0.08	0.17	0	0.06	0.61	0.63	0.65	0.68

表3 20批有柄石韦指纹图谱的相对峰面积

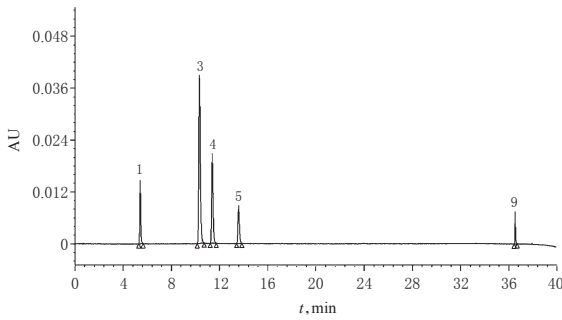
Tab 3 Relative peak area of fingerprint of 20 batches of *P. petiolosa*

编号	峰1	峰2	峰3	峰4(S)	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9
S1	0.165	0.031	0.010	1.000	0.160	0.041	0.078	0.028	0.072
S2	0.169	0.035	0.013	1.000	0.175	0.048	0.082	0.031	0.080
S3	0.154	0.031	0.010	1.000	0.164	0.039	0.069	0.030	0.071
S4	0.261	0.032	0.015	1.000	0.249	0.076	0.095	0.040	0.091
S5	0.271	0.033	0.014	1.000	0.276	0.084	0.088	0.043	0.092
S6	0.267	0.031	0.014	1.000	0.241	0.068	0.093	0.038	0.082
S7	0.158	0.027	0.026	1.000	0.166	0.035	0.094	0.086	0.105
S8	0.145	0.038	0.010	1.000	0.191	0.033	0.078	0.071	0.122
S9	0.153	0.034	0.004	1.000	0.191	0.028	0.072	0.071	0.105
S10	0.157	0.036	0.010	1.000	0.210	0.041	0.084	0.065	0.128
S11	0.269	0.048	0.010	1.000	0.261	0.099	0.098	0.030	0.110
S12	0.289	0.035	0.013	1.000	0.268	0.088	0.104	0.042	0.119
S13	0.287	0.041	0.033	1.000	0.311	0.104	0.113	0.039	0.139
S14	0.143	0.035	0.022	1.000	0.159	0.038	0.102	0.035	0.098
S15	0.129	0.034	0.031	1.000	0.149	0.034	0.113	0.045	0.108
S16	0.185	0.032	0.026	1.000	0.200	0.065	0.095	0.052	0.107
S17	0.134	0.031	0.026	1.000	0.151	0.039	0.092	0.044	0.095
S18	0.162	0.031	0.040	1.000	0.200	0.055	0.090	0.078	0.134
S19	0.160	0.030	0.043	1.000	0.196	0.047	0.096	0.096	0.154
S20	0.145	0.025	0.052	1.000	0.202	0.045	0.075	0.078	0.134
平均值	0.190	0.033	0.021	1.000	0.206	0.055	0.090	0.052	0.107
RSD, %	30.43	14.41	62.35	0	22.69	42.28	13.72	40.37	21.59

2.4.3 共有峰指认

取“2.2”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色

谱条件进样测定,记录色谱图(图2)。将图1与图2对比,指出其中峰1为新绿原酸、峰3为咖啡酸、峰4为绿原酸、峰5为隐绿原酸、峰9为异绿原酸C。



注:1.新绿原酸;3.咖啡酸;4.绿原酸;5.隐绿原酸;9.异绿原酸C
Note: 1. neochlorogenic acid; 3. caffeic acid; 4. chlorogenic acid; 5. cryptochlorogenic acid; 9. isochlorogenic acid C

图2 混合对照品溶液的UPLC图

Fig 2 UPLC chromatograms of mixed control solution

2.4.4 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)对20批有柄石韦的UPLC指纹图谱进行相似度评价。结果,20批药材指纹图谱的相似度均不小于0.990(表4),说明有柄石韦药材的整体质量比较稳定。

表4 20批有柄石韦的相似度评价结果

Tab 4 Similarity evaluation results of 20 batches of *P. petiolosa*

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.999	S6	0.998	S11	0.997	S16	0.995
S2	0.998	S7	0.999	S12	1.000	S17	0.993
S3	0.997	S8	0.999	S13	0.998	S18	0.999
S4	0.994	S9	0.990	S14	0.998	S19	0.997
S5	0.996	S10	0.998	S15	0.998	S20	0.998

2.5 聚类分析

运用SPSS 20.0软件,采用组间平均数联结法,以平方欧氏距离作为度量标准,对20批有柄石韦指纹图谱中9个共有峰的相对峰面积进行聚类。结果,当平方欧氏距离为5时,20批样品可聚为3类(图3),其中I类包括样品S1~S3、S14~S15、S17,均来自重庆;II类包括样品S4~S6、S11~S13,均来自四川;III类包括样品S7~S10、S16、S18~S20,其中除样品S16外均来自贵州。总体来看,聚类结果与药材按产地分类后结果基本一致,表明不同产地的有柄石韦药材存在一定差异。

2.6 主成分分析

将20批有柄石韦UPLC指纹图谱中9个共有峰的相对峰面积数据代入SPSS 20.0软件进行主成分分析,得出相关矩阵成分的特征值及其方差贡献率(表5)。以特征值>1为提取标准^[17],结果显示前3个主成分的特征值>1且累计方差贡献率达93.617%,表明前3个主成分可以代表有柄石韦指纹图谱中9个共有峰的大部分信息^[18]。同时,由主成分特征值的碎石图(图4)可知,曲线

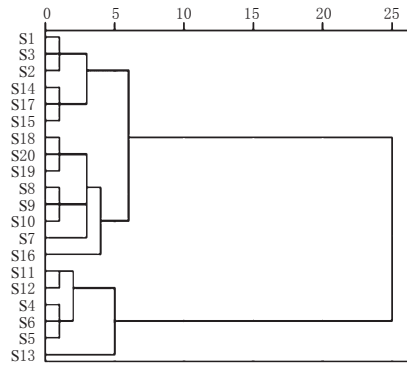


图3 20批有柄石韦的聚类分析树状图

Fig 3 Tree diagram of cluster analysis of 20 batches of *P. petiolosa*

在第3个主成分时的切线斜率最大,存在一个明显的拐点,说明前3个主成分的分析结果可基本显示出不同产地石韦药材之间的差异性^[19]。

表5 各主成分的特征值及其方差贡献率

Tab 5 Eigen value and variance contribution rate of each principal component

主成分	特征值	方差贡献率, %	累计方差贡献率, %
1	5.438	60.422	60.422
2	1.902	21.132	81.554
3	1.086	12.062	93.617
4	0.273	3.030	96.646
5	0.213	2.366	99.013
6	0.053	0.590	99.603
7	0.023	0.258	99.861
8	0.009	0.099	99.960
9	0.004	0.040	100.000

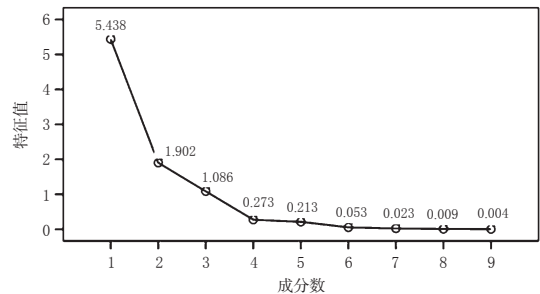


图4 主成分特征值的碎石图

Fig 4 Gravel plot of eigen value of principal component

采用R语言-K折交叉验证法计算出主成分1(PC1)、主成分2(PC2)、主成分3(PC3)的累计预测率(Q^2 值)分别为0.323 0、0.358 3、0.358 8, Q^2 (PC1) < Q^2 (PC2) < Q^2 (PC3),即增加1个主成分,能提高交叉验证的数据质量^[20]。其中,PC3的 Q^2 值最大,说明交叉验证得出主成分数为3时,主成分分析结果最佳,上述主成分分析模型未过度拟合。

采用SPSS 20.0软件对主成分进行矩阵分析可得,对主成分1产生较大影响的有峰1(新绿原酸)、峰2、峰4

(绿原酸)、峰5(隐绿原酸)、峰6、峰7和峰9(异绿原酸C),对主成分2影响较大的是峰8,对主成分3产生主要影响的是峰3(咖啡酸),如表6所示。因此,上述3个主成分能基本包括所有色谱峰信息。

表6 主成分矩阵

Tab 6 Main component matrix

色谱峰号	主成分1	主成分2	主成分3
1	0.894	-0.387	-0.041
2	0.945	0.196	-0.078
3	-0.074	0.542	0.819
4	0.888	0.341	-0.062
5	0.934	-0.305	-0.124
6	0.794	-0.527	0.154
7	0.900	0.349	0.203
8	-0.138	0.750	-0.566
9	0.787	0.498	-0.053

分别以3个主成分为变量,得到20批有柄石韦的主成分得分和综合得分(表7)及其空间分布图(图5)。单独分析主成分1轴(PC1,60.422%),由以上20批药材的得分可见,仅个别样品(S11、S16)存在交叉,总体上可认为实现3类区分,得分高低排序为I类(贵州产药材)<II类(四川产药材)<III类(重庆产药材)。单独分析主成分2轴(PC2,21.132%),由各产地药材得分可见,I类和III类得分相近,但II类在该维度上的得分远大于其余两类,能实现较好的区分。单独分析主成分3轴(PC3,12.062%),由各产地药材得分可见,总体上I类和III类得分相近,分布上交叉严重,而II类在该维度上的得分小于其余两类。由此得到的3个产地的分类结果与上述聚类分析结果一致,综合得分由低至高依次为贵州产药材<四川产药材<重庆产药材。

2.7 多指标成分含量测定

根据“2.6”项下主成分分析结果,酚酸类成分是评价有柄石韦药材质量的关键因素,因此本研究采用UPLC法同时测定了该药材中新绿原酸、咖啡酸、绿原酸和隐绿原酸的含量(由于异绿原酸C峰周围的杂质峰较多,故本研究未测定该成分的含量),为进一步评价有柄石韦的质量提供依据。

2.7.1 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液和“2.3”项下供试品溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸与相邻色谱峰的分度均大于1.5,理论板数按绿原酸峰计算应不低于5000,拖尾因子在1.00~1.05之间。混合对照品溶液和供试品溶液(编号S1)的UPLC图如图2、图6所示。

2.7.2 线性关系考察

分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液0.1、0.2、0.5、1、5 mL至10 mL量瓶中,加甲醇定容,制成新绿原酸质量浓度分别为0.61、1.23、3.07、6.14、30.71 μg/mL,

表7 20批有柄石韦的主成分综合得分及排名

Tab 7 Comprehensive score and ranking of principal component of 20 batches of *P. petioloza*

编号	产地	主成分1	主成分2	主成分3	综合得分	排名
S14	重庆市巫溪县	1.252	-0.222	1.384	2.413	1
S15	重庆市巫溪县	0.602	-0.492	1.943	2.053	2
S17	重庆市巫溪县	1.055	-0.646	1.559	1.967	3
S1	重庆市巫溪县	1.679	0.145	-0.277	1.548	4
S11	四川省广元市旺苍县	0.674	1.604	-0.793	1.485	5
S2	重庆市巫溪县	0.950	0.351	-0.049	1.251	6
S16	重庆市巫溪县	0.122	0.044	0.675	0.840	7
S13	四川省广元市旺苍县	-1.270	1.500	0.488	0.718	8
S6	四川省广元市青川县	0.293	0.995	-0.638	0.649	9
S3	重庆市巫溪县	0.856	0.109	-0.357	0.608	10
S12	四川省广元市旺苍县	0.176	0.959	-0.737	0.398	11
S4	四川省广元市青川县	-0.308	1.022	-0.551	0.163	12
S5	四川省广元市青川县	-0.416	1.087	-0.777	-0.105	13
S18	贵州省黔东南州黄平县	-0.782	-0.542	0.870	-0.454	14
S20	贵州省黔东南州黄平县	-2.329	0.293	0.777	-1.259	15
S19	贵州省黔东南州黄平县	-1.620	-0.452	0.500	-1.572	16
S7	贵州省黔东南州安龙县	-0.452	-1.465	0.026	-1.892	17
S10	贵州省黔东南州安龙县	-0.138	-1.102	-1.066	-2.306	18
S8	贵州省黔东南州安龙县	-0.395	-1.320	-1.092	-2.808	19
S9	贵州省黔东南州安龙县	0.053	-1.866	-1.885	-3.698	20

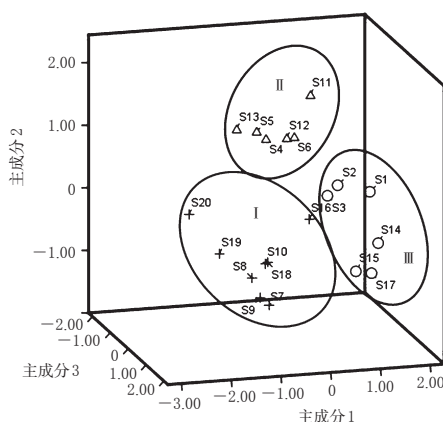
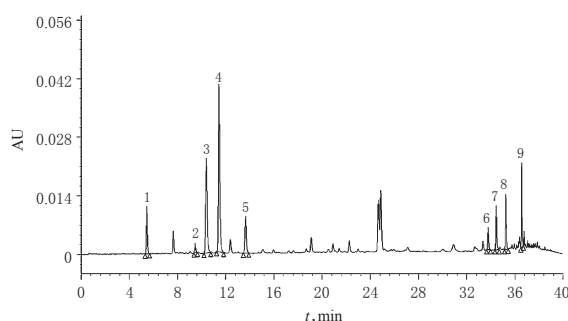


图5 20批有柄石韦的主成分得分图

Fig 5 Score plot of principal components of 20 batches of *P. petioloza*



注:1.新绿原酸;3.咖啡酸;4.绿原酸;5.隐绿原酸;9.异绿原酸C

Note: 1. neochlorogenic acid; 3. caffeic acid; 4. chlorogenic acid;

5. cryptochlorogenic acid; 9. isochlorogenic acid C

图6 有柄石韦供试品溶液的UPLC图

Fig 6 UPLC chromatograms of the sample solution of *P. petioloza*

咖啡酸质量浓度分别为0.18、0.35、0.88、1.76、8.80 $\mu\text{g/mL}$ ，绿原酸质量浓度分别为2.00、4.00、10.01、20.01、100.05 $\mu\text{g/mL}$ ，隐绿原酸质量浓度分别为0.62、1.23、3.08、6.15、30.76 $\mu\text{g/mL}$ 的线性混合对照品溶液。精密吸取上述各线性混合对照品溶液与“2.2”项下混合对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。以各成分峰面积(y)对对照品溶液的质量浓度(x)进行线性回归处理，得回归方程及线性范围，如表8所示。

表8 4种酚酸类成分的回归方程及线性范围

Tab 8 Regression equation and linear range of 4 kinds of phenolic acids

成分	回归方程	R^2	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
新绿原酸	$y=9\ 999.15x-2\ 237.95$	$>0.999\ 9$	0.61~61.41
咖啡酸	$y=17\ 688.30x-1\ 453.79$	$>0.999\ 9$	0.18~17.60
绿原酸	$y=10\ 166.71x-7\ 970.55$	$>0.999\ 9$	2.00~200.11
隐绿原酸	$y=9\ 449.59x-2\ 433.60$	$>0.999\ 9$	0.62~61.51

2.7.3 检测限和定量测定

取“2.2”项下混合对照品溶液，以甲醇按比例稀释，按“2.1”项下色谱条件进样测定，以信噪比3:1、10:1分别测定检测限和定量限。结果，新绿原酸、咖啡酸、绿原酸和隐绿原酸的检测限分别为0.102 9、0.060 7、0.106 3、0.118 3 $\mu\text{g/mL}$ ，定量限分别为0.343 2、0.102 2、0.354 4、0.394 3 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.7.4 精密度试验

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液适量，按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次，记录色谱图。结果，新绿原酸、咖啡酸、绿原酸和隐绿原酸峰面积的RSD分别为0.15%、1.18%、0.15%、0.27% ($n=6$)，表明仪器精密度良好。

2.7.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(编号S1)适量，室温下放置0.2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件分别进样测定，记录色谱图。结果，新绿原酸、咖啡酸、绿原酸和隐绿原酸峰面积的RSD分别为0.28%、1.42%、0.73%、0.26% ($n=6$)，表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.7.6 重复性试验

取同一批有柄石韦样品(编号S1)6份，每份约0.5 g，分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，采用外标法计算样品含量。结果，新绿原酸、咖啡酸、绿原酸和隐绿原酸的平均含量分别为1.76、0.07、10.73、1.80 mg/g，RSD分别为1.84%、1.88%、1.91%、1.74% ($n=6$)，表明该方法重复性良好。

2.7.7 加样回收率试验

取已知含量的有柄石韦样品(编号S14)粉末约0.25 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别按各成分含量1:1比例精密加入对照品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，

再按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，计算加样回收率(表9)。结果，新绿原酸、咖啡酸、绿原酸和隐绿原酸的平均加样回收率分别为97.92%、97.96%、96.23%、98.17%，RSD分别为1.14%、2.28%、2.25%、0.96% ($n=6$)，表明该方法准确度良好。

表9 4种酚酸类成分的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 9 Average recoveries of 4 kinds of phenolic acids ($n=6$)

成分	样品含量,mg	对照品加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%			
新绿原酸	0.336	0.307	0.634	97.01	97.92	1.14			
	0.337	0.307	0.638	98.09					
	0.340	0.307	0.638	97.04					
	0.339	0.307	0.639	97.48					
	0.346	0.307	0.653	100.03					
咖啡酸	0.341	0.307	0.642	97.90	97.96	2.28			
	0.033	0.022	0.054	96.55					
	0.033	0.022	0.055	98.69					
	0.033	0.022	0.054	95.28					
	0.033	0.022	0.055	99.14					
	0.034	0.022	0.056	101.45					
	0.033	0.022	0.055	96.64					
	绿原酸	2.335	2.335	4.349			94.64	96.23	2.25
		2.340	2.340	4.381			99.27		
		2.359	2.359	4.757			96.83		
2.357		2.357	4.298	93.30					
2.405		2.405	4.380	97.75					
隐绿原酸	2.369	2.369	4.403	95.56	98.17	0.96			
	0.397	0.308	0.696	97.12					
	0.398	0.308	0.698	97.65					
	0.401	0.308	0.702	97.90					
	0.401	0.308	0.703	98.24					
	0.409	0.308	0.716	99.90					
0.403	0.308	0.705	98.19						

2.7.8 样品含量测定

取20批有柄石韦药材样品粉末，分别按“2.3”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图，采用外标法计算样品中新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸的含量，并计算4种成分的总含量(表10)。结果显示，不同批次有柄石韦药材中4种酚酸类成分的含量具有一定差异；平均总含量排序为重庆产药材量>四川产药材>贵州产药材，与主成分分析结果一致。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

笔者分别考察了甲醇与不同浓度的磷酸、甲酸溶液组合的流动相体系，发现甲醇-0.1%磷酸溶液的梯度洗脱程序效果最佳，故选其作为本研究的流动相。后采用二极管阵列检测器，对供试品溶液在200~400 nm波长范围内进行全波长扫描，结果显示各主要成分色谱峰在326 nm波长处均有较强的紫外吸收，故选择326 nm为检测波长。

3.2 指纹图谱结果分析

本研究建立了有柄石韦的UPLC指纹图谱，该方法

表10 4种酚酸类成分的含量测定结果

Tab 10 Results of content determination of 4 kinds of phenolic acids

编号	新绿原酸, mg/g	咖啡酸, mg/g	绿原酸, mg/g	隐绿原酸, mg/g	总含量, mg/g	总含量 排名	产地平均总 含量,mg/g	产地
S1	1.796 2	0.063 5	10.676 0	1.844 2	14.379 9	4	11.246 4	重庆
S2	1.495 9	0.066 9	8.660 3	1.633 9	11.857 1	6		
S3	1.453 3	0.059 3	9.262 5	1.636 6	12.411 7	10		
S14	1.335 1	0.129 5	9.273 2	1.577 8	12.315 6	1		
S15	0.890 5	0.121 9	6.747 5	1.087 6	8.847 5	2		
S16	1.125 4	0.093 4	5.971 4	1.288 6	8.478 7	7		
S17	1.088 5	0.121 6	7.931 9	1.292 5	10.434 5	3		
S4	1.555 3	0.052 7	5.864 5	1.571 8	9.044 3	12	9.006 9	四川
S5	1.526 3	0.049 9	5.542 9	1.646 8	8.765 9	13		
S6	1.891 9	0.057 9	6.954 7	1.808 0	10.712 5	9		
S11	1.812 8	0.042 9	6.619 0	1.860 5	10.335 2	5		
S12	1.714 0	0.046 7	5.834 8	1.685 3	9.280 8	11		
S13	1.046 7	0.071 5	3.585 8	1.198 5	5.902 5	8		
S7	0.800 4	0.078 7	4.966 4	0.891 6	6.737 1	17	6.104 2	贵州
S8	0.745 0	0.033 5	5.020 5	1.036 2	6.835 2	19		
S9	0.934 2	0.018 0	5.983 4	1.236 6	8.172 2	20		
S10	0.847 3	0.033 8	5.264 9	1.195 2	7.341 2	18		
S18	0.697 4	0.099 1	4.200 4	0.908 8	5.905 7	14		
S19	0.485 3	0.076 6	2.950 1	0.627 7	4.139 8	16		
S20	0.385 3	0.079 6	2.569 5	0.563 5	3.598 0	15		

分离度较好、稳定、可靠,可为不同基原石韦的鉴别及进一步的成分研究提供参考。另外,利用UPLC可指出有柄石韦中含有新绿原酸、咖啡酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸C等5种成分,这些酚酸类成分是该药材抗菌、抗炎、抗病毒的主要活性成分^[2,4]。

3.3 含量测定结果分析

目前对有柄石韦的指标性成分研究大多只选择绿原酸作为单指标,但随着中药质量控制要求的日益严格,对药材进行多指标测定是必然趋势。本文通过主成分分析得出酚酸类成分对有柄石韦药材的品质有较大的贡献值;2020年版《中国药典》(一部)记载石韦具有利尿通淋、清肺止咳、凉血止血的功效,且将绿原酸作为石韦含量测定的指标,而酚酸类成分具有抗菌、抗炎、抗病毒的作用,与石韦的功效一致,因此本研究采用UPLC法同时测定了有柄石韦中新绿原酸、咖啡酸、绿原酸和隐绿原酸4种酚酸类成分的含量。结果可得,样品总含量由高到低依次为重庆、四川、贵州所产药材,该排序与主成分分析的综合得分排名一致。

综上所述,本研究建立的采用UPLC同时测定有柄石韦指标性成分含量及建立其指纹图谱的方法较全面地反映了该药材的主要化学成分,分析方法准确、可靠、专属性强,可有效评价有柄石韦的质量优劣。从药材中所含4种酚酸类成分的平均总含量而言,重庆产药材质量较优,四川产药材次之,贵州产药材质量相对较差。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:91-92.

[2] 肖培根.新编中药志:第三卷[M].北京:化学工业出版社,2002:441.

[3] 邓家刚,郑作文,郝二伟,等.芒果苷片治疗急性支气管炎的药效学研究[J].中成药,2010,32(2):300-303.

[4] 韦志疆.RP-HPLC法测定光石韦中芒果苷的含量[J].中国医药导报,2012,9(10):137-140.

[5] 陈娟,胡刚,张宇,等.四氮杂大环镍配合物催化的BR振荡体系的新应用:检测咖啡酸[J].阜阳师范学院学报,2016,33(1):31-36.

[6] 李玉山,王京安.T型关联度分析法优化芦丁提取纯化工艺[J].化学试剂,2009,31(4):305-306.

[7] 高贝,程丹丹,辛晓伟,等.HPLC法测定有柄石韦及华北石韦中绿原酸和木犀草素的含量及不同浸提物的指纹图谱分析[J].中国野生植物资源,2015,34(1):19-21,36.

[8] 陈贵,夏稷子,徐作刚.一测多评法测定不同来源石韦及其制剂中3个咖啡酰奎宁酸类成分[J].药物分析杂志,2020,40(2):169-175.

[9] 战妍妃,李媛媛,安欣欣,等.石韦的抗病毒黄酮部位及有效化学成分[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2018,39(6):470-480.

[10] 王自军,杨红兵,齐誉,等.正交设计研究石韦总黄酮和鞣质提取工艺[J].时珍国医国药,2007,18(2):463-464.

[11] 唐雅楠,曹雪原,邵尉,等.中药石韦中黄酮类化合物的含量及抗氧化活性研究[J].山东化工,2018,47(8):35-36,38.

[12] 刘燕芳,种贝贝,辛晓伟,等.不同产地、不同种类以及不同部位中的石韦总黄酮含量分析[J].中国野生植物资源,2016,35(4):37-39.

[13] 贾富娟,崔露露,张颖颖,等.HPLC测定不同品种石韦中绿原酸、芒果苷、咖啡酸、芦丁含量[J].食品与药品,2017,19(3):187-189.

[14] 邵尉,高德民.HPLC法同时测定有柄石韦中6种有效成分的含量[J].山东科学,2017,30(3):21-25.

[15] 薛愧玲,唐娜娜,姬志强,等.有柄石韦和绒毛石韦叶的挥发油成分分析[J].中国药房,2009,20(24):1881-1884.

[16] 龙毅,杨武德,袁吉虎.RP-HPLC法同时测定石韦中4种氨基酸的含量[J].中国药房,2015,26(27):3838-3840.

[17] 林秀敏,张振凌,王胜超,等.白芍饮片的HPLC指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析[J].中国药房,2019,30(24):3375-3382.

[18] 冯华,王祥培,王世俊,等.辣椒药材的HPLC指纹图谱建立及聚类分析和主成分分析[J].中国药房,2019,30(8):1078-1082.

[19] 张智敏,聂蕊,李亚梅,等.聚类分析结合主成分分析评价不同产地枳壳药材的一致性与差异性[J].亚太传统医药,2019,15(4):30-36.

[20] 朱文广,李映雪,杨为群,等.基于K-折交叉验证和Stacking融合的短期负荷预测[J].电力科学与技术学报,2021,36(1):87-95.

(收稿日期:2020-09-01 修回日期:2021-04-14)

(编辑:胡晓霖)