

不同产地铁线蕨药材指纹图谱的建立、分析及差异成分的含量测定^Δ

肖丹^{1*}, 范东生², 刘星¹, 孔毅¹, 雪锦菁¹, 高源^{1#} (1. 贵州省食品检验检测院, 贵阳 550004; 2. 贵州中医药大学第一附属医院药剂科, 贵阳 550001)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)17-2085-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.17.07



摘要 目的: 建立不同产地铁线蕨药材的指纹图谱, 并进行化学计量学分析和差异成分的含量测定, 为铁线蕨药材质量控制提供参考。方法: 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器法(HPLC-DAD)检测并结合《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)建立19批不同产地铁线蕨药材(S1~S19)的指纹图谱, 同时进行共有峰指认和相似度评价。采用聚类分析、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等化学计量学分析方法对19批不同产地铁线蕨药材的质量进行评价, 筛选差异成分, 并对部分差异成分进行含量测定。结果: 19批不同产地铁线蕨药材中, 共确定22个共有峰, 并指认了9号峰为绿原酸、17号峰为槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、20号峰为山柰酚-3-O-芸香糖苷; 19批药材的相似度为0.530~0.962。经聚类分析发现, S7、S10聚为一类, S15、S18聚为一类, S1~S6、S8、S9、S11~S14、S16、S17、S19聚为一类; 经PCA、OPLS-DA发现, S7、S10聚为一类, S15为一类, S18为一类, S1~S6、S8、S9、S11~S14、S16、S17、S19聚为一类; 筛选出绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷以及14号峰所代表的化学成分为该药材的差异成分。19批铁线蕨药材中, 绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸和山柰酚-3-O-芸香糖苷的平均含量分别为0.10~4.25、0.31~7.11、0.61~12.00 mg/g。结论: 本研究建立了不同产地铁线蕨药材的HPLC-DAD指纹图谱, 指认了3个共有峰; 筛选出了4个影响铁线蕨药材质量的差异成分, 其中绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷在不同产地铁线蕨药材中的含量差异明显。

关键词 铁线蕨; 高效液相色谱-二极管阵列检测器; 指纹图谱; 化学计量学分析; 差异成分; 含量测定

Establishment and Analysis of the Fingerprints of *Adiantum capillusveneris* from Different Producing Areas and Content Determination of Its Differential Components

XIAO Dan¹, FAN Dongsheng², LIU Xing¹, KONG Yi¹, XUE Jinjing¹, GAO Yuan¹ (1. Guizhou Provincial Institute for Food Inspection, Guiyang 550004, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the fingerprint of *Adiantum capillusveneris* from different producing areas, and to conduct chemometric analysis and content determination of differential components, so as to provide reference for quality control of *A. capillusveneris*. METHODS: HPLC-DAD combined with *Similarity Evaluation System of TCM Chromatogramtic Fingerprint* (2004 A edition) were used to establish fingerprint of 19 batches of *A. capillusveneris* from different producing areas (S1-S19). Common peaks were confirmed and their similarities were evaluated. Chemometric analysis methods such as cluster analysis, principle component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to evaluate the quality of 19 batches of *A. capillusveneris* from different producing areas, screen the differential components, and determine the contents of some differential components. RESULTS: Among 19 batches of *A. capillusveneris* from different producing areas, 22 common peaks were confirmed; peak 9 was chlorogenic acid, peak 17 was quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside, peak 20 was kaempferol-3-O-rutinoside; the similarity of 19 batches of sample were 0.677-0.962. Through cluster analysis, it was found that S7 and S10 were clustered into one category; S15 and S18 were clustered into one category; and S1-S6, S8, S9, S11-S14, S16, S17 and S19 were clustered into one category. PCA and OPLS-DA found that S7 and S10 were clustered into one category; S15 were clustered into one category; S18 were clustered into one category; S1-S6, S8, S9, S11-S14, S16, S17 and S19 were clustered into one category. Chlorogenic acid, quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-rutinoside and chemical composition

^Δ 基金项目: 贵州省科技计划项目(No.黔科合支撑[2017]2841); 贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2019]2-7号)

* 主管检验师。研究方向: 食品药品质量控制与研发。电话: 0851-86614212。E-mail: 346691298@qq.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 食品药品质量控制与研发。电话: 0851-86614212。E-mail: youaremygy@163.com

represented by peak 14 were the differential components of the medicinal material. Among 19 batches of *A. capillusveneris*, average contents of chlorogenic acid and quercetin-3-O-β-D-glucopyranoside and kaempferol-3-O-rutinoside were 0.10-4.25, 0.31-7.11, 0.61-12.00 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: HPLC-DAD fingerprints of *A. capillusveneris* from different

producing areas are established in the study, and three common peaks are identified. Four differential components affecting the quality of *A. capillusveneris* are screened, and the contents of chlorogenic acid, quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside and kaempferol-3-*O*-rutoside in *A. capillusveneris* from different producing areas were significantly different.

KEYWORDS *Adiantum capillusveneris*; HPLC-DAD; Fingerprint; Chemometric analysis; Differential component; Content determination

铁线蕨为铁线蕨科铁线蕨属植物 *Adiantum capillusveneris* L. 的新鲜或干燥全草, 是贵州少数民族常用药材之一; 其原植物广泛分布于贵州、湖北、河北等地, 主要生长于流水溪旁石灰岩上、石灰岩洞底或滴水岩壁上, 为钙质土的指示植物^[1]。研究发现, 铁线蕨具有清热解毒、利湿消肿、利尿通淋的功效, 也具有较好的抗菌、抗癌、抗氧化等药理作用^[2]。目前, 以铁线蕨药材为主药的成方制剂已被用于治疗前列腺炎或前列腺增生等疾病^[3]。由于铁线蕨药材来源较多, 虽然该药材已收载于2003年版《贵州中药材、民族药材质量标准》中, 但缺乏对不同产地铁线蕨药材的质量控制及其主要成分的定量研究, 导致其质量控制较为困难^[4]; 且该药材并未收载于2020年版《中国药典》中, 缺乏权威的质量控制方法。因此, 有必要对不同产地铁线蕨药材进行质量控制。

基于此, 本研究收集了19批不同产地铁线蕨药材, 采用高效液相色谱-二极管阵列检测器法(HPLC-DAD)建立不同产地铁线蕨药材的指纹图谱, 并进行化学计量学分析及差异成分的含量测定, 以期对铁线蕨药材的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有: XS205DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)、KQ500-DA型超声仪(昆山市超声仪器有限公司)、DK98-II A型电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司)、E2695型HPLC仪(美国Waters公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用铁线蕨药材(编号S1~S19)采自贵州、湖北、河北等地(药材样品来源详见表1), 经贵州中医药大学药学院药用植物教研室吴之坤副教授鉴定为铁线蕨科铁线蕨属植物 *A. capillusveneris* L. 的新鲜或干燥全草; 所有铁线蕨药材经自然晾晒后, 粉碎过四号筛备用。其他药品与试剂有: 绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号110753-201817, 纯度96.8%), 槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷对照品、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷对照品(成都普思生物科技股份有限公司, 批号分别为 MUST-19052825、MUST-19041507, 纯度均大于98%); 甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈(250 mm×

表1 铁线蕨药材样品信息

Tab 1 Information of *A. capillusveneris*

编号	产地	编号	产地
S1	贵州省安顺市平坝区	S11	贵州省兴义市顶效镇
S2	贵州省毕节市纳雍县	S12	贵州省遵义市凤冈县
S3	贵州省毕节市黔西县	S13	贵州省遵义市湄潭县
S4	贵州省贵阳市花溪大学城	S14	贵州省遵义市绥阳县
S5	贵州省贵阳市花溪区高坡乡	S15	河北省石家庄市元氏县
S6	贵州省贵阳市花溪大道	S16	湖北省襄阳市保康县
S7	贵州省贵阳市乌当区	S17	湖北省宜昌市秭归县
S8	贵州省贵阳市云岩区	S18	江西省抚州市宜黄县
S9	贵州省黔南州罗甸县	S19	陕西省高洛市镇安县
S10	贵州省铜仁市松桃县		

4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇(A)-0.05%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~10 min, 5% A; 10~20 min, 5% A→20% A; 20~60 min, 20% A→40% A; 60~75 min, 40% A→50% A; 75~85 min, 50% A→100% A; 85~95 min, 100% A; 95~96 min, 100% A→5% A; 96~110 min, 5% A); 流速为1 mL/min; 柱温为35 $^{\circ}$ C; 二极管阵列检测器波长为280 nm; 进样量为20 μ L。

2.2 不同产地铁线蕨药材的 HPLC-DAD 指纹图谱的建立

2.2.1 供试品溶液的制备 取铁线蕨药材粉末1.0 g, 精密称定, 置于100 mL具塞锥形瓶中, 加入80%甲醇50 mL, 加热回流提取60 min; 趁热过滤, 滤液于80 $^{\circ}$ C水浴条件下浓缩至浸膏状; 取浸膏, 以80%甲醇溶解并定容至10 mL, 经0.45 μ m的微孔滤膜滤过后, 即得供试品溶液。

2.2.2 单一对照品溶液的制备 分别精密称定绿原酸、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷的对照品各适量, 置于10 mL量瓶中, 加80%甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为1.001、1.100、1.017 mg/mL的单一对照品溶液。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 分别精密量取“2.2.2”项下单一对照品溶液各适量, 置于同一50 mL量瓶中, 加80%甲醇定容, 摇匀, 即得含绿原酸、槲皮素-3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷的质量浓度分别为0.100 1、0.110 0、0.101 7 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.4 精密密度试验 取铁线蕨药材粉末(编号S9)适量, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录色谱图。以12号峰(该峰保留时间居中、峰形较好且峰面积稳定, 下同)为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 各共有峰相对保留时间的RSD为0.01%~

0.26%, 相对保留峰面积的RSD为0.30%~2.98%, 均小于3% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取铁线蕨药材粉末(编号S9)适量, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液后, 分别于室温下放置0、2、4、8、24、48 h时, 再按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。以12号峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 各共有峰相对保留时间的RSD为0.01%~0.21%, 相对保留峰面积的RSD为1.00%~2.98%, 均小于3% ($n=6$), 表明供试品溶液在室温下放置48 h内稳定性良好。

2.2.6 重复性试验 取铁线蕨药材粉末(编号S9)适量, 按“2.2.1”项下方法平行制备6份供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。以12号峰为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 各共有峰相对保留时间的RSD为0.01%~0.26%, 相对保留峰面积的RSD为2.06%~2.99%, 均小于3% ($n=6$), 表明该方法重复性良好。

2.2.7 铁线蕨药材指纹图谱的生成 取19批铁线蕨药材粉末适量, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版), 以样品S8的图谱为参照图谱(该图谱的色谱峰峰形较好), 设定时间窗宽度为0.3 s, 采用多点校正的方法和平均数图谱生成法, 对19批铁线蕨药材的指纹图谱进行数据整合, 生成19批铁线蕨药材的叠加指纹图谱和对照指纹图谱R, 详见图1、图2。

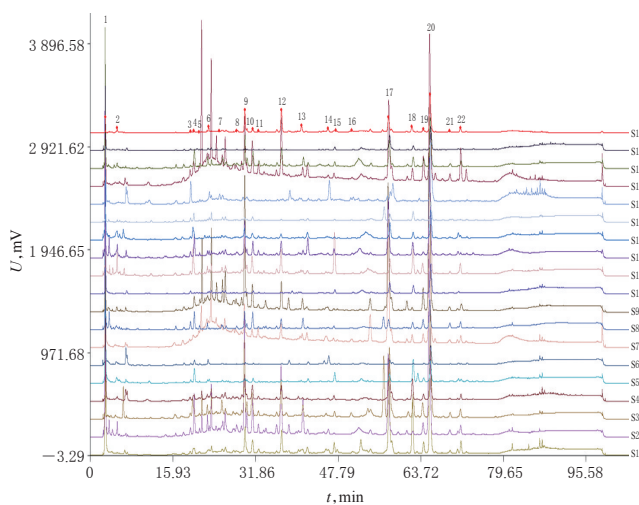


图1 19批铁线蕨药材的叠加指纹图谱

Fig 1 Superimposed fingerprint of 19 batches of *A. capillusveneris*

2.2.8 共有峰指认 取“2.2.3”项下混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 详见图3。由图2和图3比对可知, 19批铁线蕨药材共有22个共有峰, 其中9号峰为绿原酸、17号峰为槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、20号峰为山奈酚-3-O-芸香糖苷。

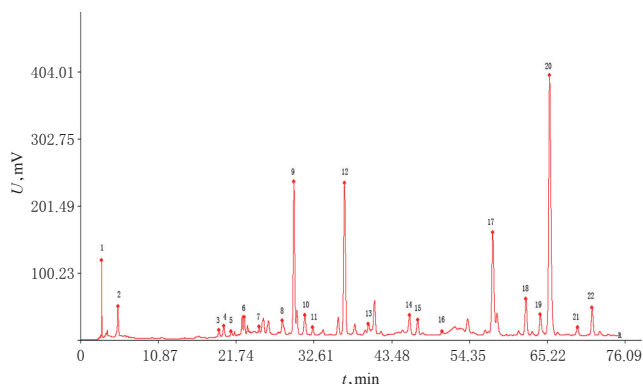


图2 铁线蕨药材的对照指纹图谱R

Fig 2 Control fingerprint R of *A. capillusveneris*

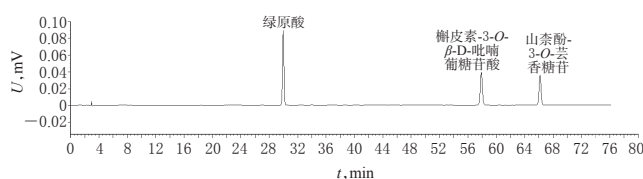


图3 混合对照品溶液的HPLC-DAD图谱

Fig 3 HPLC-DAD chromatogram of mixed control solution

2.2.9 相似度评价 将19批铁线蕨药材的HPLC-DAD指纹图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A版)进行相似度评价。结果显示, 19批铁线蕨药材的相似度范围为0.530~0.962, 表明不同产地铁线蕨药材间的成分存在一定差异, 详见表2。

2.3 化学计量学分析

2.3.1 聚类分析 将19批铁线蕨药材22个共有峰的相对峰面积导入SPSS 26.0软件, 采用组间连接法, 以平方欧氏距离作为样品的测度进行聚类分析^[5], 详见图4。由图4可知, 19批铁线蕨药材可聚为3类: S7、S10聚为一类, S15、S18聚为一类, S1~S6、S8、S9、S11~S14、S16、S17、S19聚为一类。

2.3.2 主成分分析(PCA) 将19批铁线蕨药材的22个共有峰的相对峰面积导入SIMCA 14.1软件中, 采用非监督模式识别法进行PCA^[6], 并绘制PCA得分散点图, 详见图5。由图5可知, 19批铁线蕨药材样品可聚为4类: S7、S10聚为一类, S15为一类, S18为一类, S1~S6、S8、S9、S11~S14、S16、S17、S19聚为一类。

2.3.3 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA) 为更好地反映19批铁线蕨药材的成分差异, 笔者基于PCA结果, 采用监督模式识别法进行OPLS-DA, 并绘制OPLS-DA模型得分图, 详见图6。由图6可知, 19批铁线蕨药材样品可聚为4类, 与PCA结果一致。另外, OPLS-DA模型中的拟合参数 $R^2X=0.854$, $R^2Y=0.918$, 模型预测参数(Q^2)=0.776, 均大于0.5, 表明所建立的模型稳定且预测能力较强^[6]。以模型变量投影重要性(VIP)值>1为指标筛选19批铁线蕨药材的差异成分^[6], 结果详见图7。由图7可知, 9号峰(绿原酸)、17号峰(槲

表2 19批铁线蕨药材的指纹图谱相似度

Tab 2 Fingerprint similarity of 19 batches of *A. capillusveneris*

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	对照指纹图谱R
S1	1.000																			
S2	0.873	1.000																		
S3	0.890	0.908	1.000																	
S4	0.949	0.904	0.908	1.000																
S5	0.801	0.591	0.618	0.771	1.000															
S6	0.652	0.590	0.543	0.629	0.596	1.000														
S7	0.924	0.842	0.837	0.873	0.673	0.655	1.000													
S8	0.835	0.860	0.821	0.887	0.777	0.559	0.737	1.000												
S9	0.870	0.956	0.896	0.889	0.620	0.557	0.803	0.864	1.000											
S10	0.907	0.917	0.896	0.907	0.632	0.642	0.941	0.787	0.877	1.000										
S11	0.886	0.717	0.709	0.804	0.802	0.712	0.888	0.688	0.702	0.822	1.000									
S12	0.929	0.921	0.860	0.915	0.719	0.657	0.938	0.822	0.859	0.942	0.861	1.000								
S13	0.659	0.626	0.615	0.758	0.679	0.530	0.661	0.742	0.603	0.647	0.609	0.687	1.000							
S14	0.783	0.668	0.666	0.733	0.723	0.560	0.778	0.675	0.757	0.732	0.786	0.766	0.567	1.000						
S15	0.713	0.635	0.627	0.662	0.603	0.909	0.756	0.586	0.607	0.721	0.792	0.736	0.526	0.658	1.000					
S16	0.923	0.946	0.908	0.919	0.646	0.599	0.866	0.867	0.945	0.892	0.766	0.888	0.628	0.685	0.653	1.000				
S17	0.832	0.895	0.857	0.852	0.602	0.540	0.779	0.810	0.883	0.839	0.667	0.829	0.581	0.646	0.587	0.881	1.000			
S18	0.892	0.724	0.728	0.833	0.758	0.677	0.926	0.688	0.698	0.854	0.943	0.887	0.649	0.765	0.766	0.769	0.678	1.000		
S19	0.847	0.965	0.881	0.872	0.584	0.580	0.819	0.851	0.948	0.874	0.719	0.871	0.593	0.677	0.653	0.943	0.885	0.714	1.000	
对照指纹图谱R	0.958	0.961	0.934	0.958	0.723	0.677	0.935	0.883	0.939	0.962	0.846	0.962	0.702	0.772	0.744	0.962	0.895	0.858	0.940	1.000

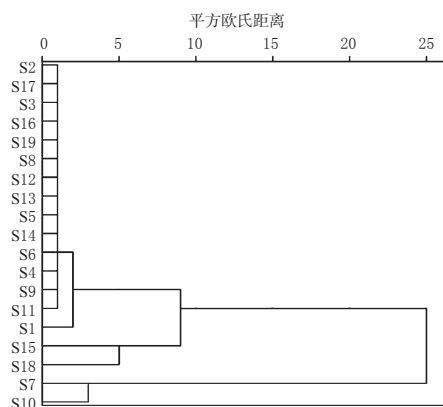


图4 19批铁线蕨药材的聚类分析图

Fig 4 Cluster analysis diagram of 19 batches of *A. capillusveneris*

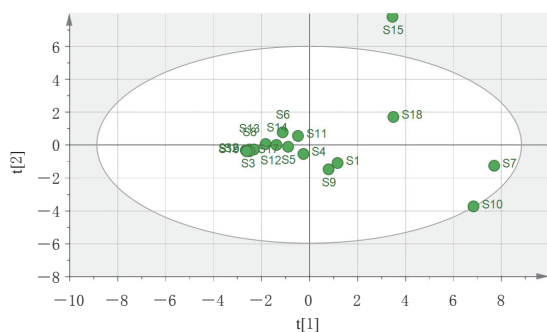


图5 19批铁线蕨药材的PCA得分散点图

Fig 5 PCA scatter plot of 19 batches of *A. capillusveneris*

皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸)、20号峰(山柰酚-3-O-芸香糖苷)和14号峰所代表的化学成分为19批铁线蕨药材的差异成分。

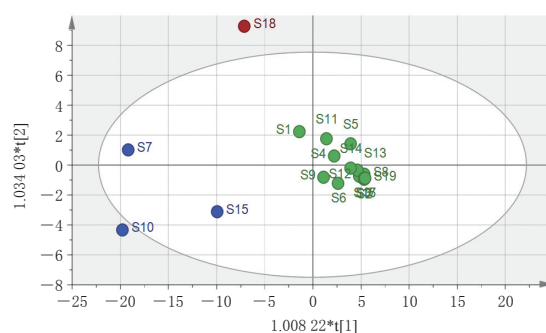


图6 19批铁线蕨药材的OPLS-DA得分图

Fig 6 OPLS-DA plot of 19 batches of *A. capillusveneris*

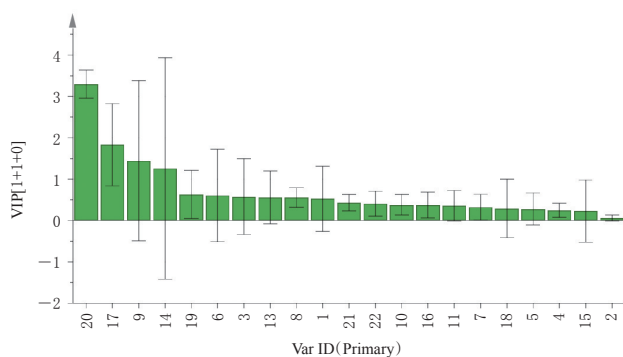


图7 19批铁线蕨药材的OPLS-DA模型中共有峰的VIP值

Fig 7 VIP value of common peaks in OPLS-DA model of 19 batches of *A. capillusveneris*

2.4 铁线蕨药材中3种差异成分的含量测定

根据化学计量学分析结果,选择已指认出的3种差异成分(绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷)为指标,采用HPLC-DAD法进行含量测定。

2.4.1 色谱条件 笔者在进行铁线蕨药材差异成分含量测定研究时发现,若采用“2.1”项下色谱条件,会导致分析时间较长、各成分分离度较差。故笔者在原色谱条件基础上,调整梯度洗脱程序为甲醇(A)-0.05%磷酸水溶液(B)(0~30 min, 30% A→48% A)。

2.4.2 专属性试验 取“2.2.1”“2.2.3”项下供试品溶液、混合对照品溶液和空白溶液(即溶剂80%甲醇)适量,按“2.4.1”项下调整后的色谱条件进样分析,记录色谱图。结果显示,空白溶液不干扰绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷的测定,说明该方法专属性良好,详见图8。

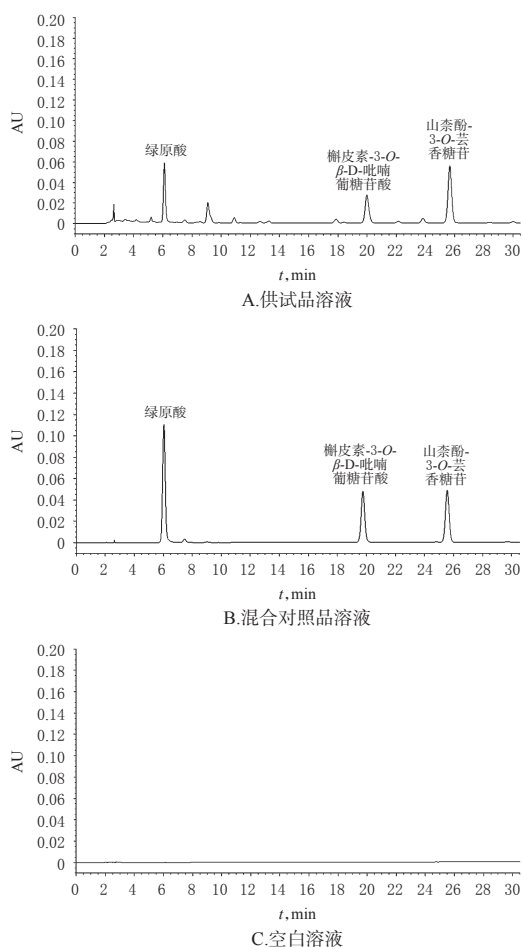


图8 铁线蕨药材中3种差异成分含量测定的专属性试验 HPLC-DAD 图谱

Fig 8 HPLC-DAD chromatograms of specificity test of content determination of 3 differential components in *A. capillusveneris*

2.4.3 线性关系考察 分别精密吸取“2.2.2”项下单一对照品溶液适量,置于同一10 mL量瓶,加80%甲醇定容至刻度,制成同时含绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷的系列线性工作溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。以待测成分的质量浓度(x , mg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果,上述3种待测成分的回归

方程分别为 $y=1\ 308\ 445x-7\ 632$ ($R^2=0.995\ 5$)、 $y=724\ 515x-38\ 962$ ($R^2=0.997\ 1$)、 $y=806\ 074x-22\ 310$ ($R^2=0.998\ 1$),检测质量浓度线性范围分别为10.0~200.2、11.0~220.0、10.2~203.4 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.4 精密性试验 取铁线蕨药材粉末(编号S9)适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷峰面积的RSD分别为0.87%、1.12%、0.29% ($n=6$),表明仪器精密性良好。

2.4.5 重复性试验 取铁线蕨药材粉末(编号S9)适量,按“2.2.1”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并根据标准曲线法计算待测成分含量。结果,绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷的平均含量分别为1.483 4、1.218 9、3.542 6 mg/g, RSD分别为1.49%、2.83%、2.56% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.4.6 稳定性试验 取铁线蕨药材粉末(编号S9)适量,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、24、48 h时,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷峰面积的RSD分别为1.61%、2.70%、0.87% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置48 h内稳定性良好。

2.4.7 加样回收率试验 取已知成分含量的铁线蕨药材粉末(编号S9)9份,每份0.5 g,分为3组;分别按待测成分已知含量的80%、100%、120%分组加入单一对照品,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

2.4.8 样品含量测定 取19批铁线蕨药材粉末1.0 g,精密称定,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并根据标准曲线法计算样品含量。平行操作2次,取平均值。结果显示,19批铁线蕨药材中绿原酸、槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷的平均含量分别为0.10~4.25、0.31~7.11、0.61~12.00 mg/g,详见表4。由表4可见,不同产地铁线蕨药材中上述3种成分的含量差异明显。

3 讨论

本研究的前期预实验考察了不同体积分数提取溶剂(25%、50%、80%、100%甲醇)、不同提取时间(30、60、90、120 min)等因素对铁线蕨药材供试品溶液制备的影响,结果发现,以80%甲醇加热回流提取60 min的条件最优;同时,考察了不同柱温(25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)、不同流速(0.8、1.0、1.2 mL/min)和不同流动相系统[水-甲醇、水-乙腈、甲醇-0.05%磷酸溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液]对HPLC-DAD色谱图的影响,结果发现,当流动相为甲醇(A)-0.05%磷酸溶液(B)、流速为1 mL/min、柱温为

表3 3种待测成分的加样回收率试验结果($n=9$)Tab 3 Results of recovery tests of 3 components to be determined($n=9$)

成分	称样量, g	已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	0.509 7	0.756 1	0.455 9	1.181 3	93.3	95.8	1.98
	0.505 2	0.749 5	0.455 9	1.181 4	94.7		
	0.505 5	0.749 9	0.455 9	1.177 4	93.8		
	0.501 4	0.743 8	0.759 5	1.493 6	98.7		
	0.502 2	0.745 0	0.759 5	1.473 0	95.9		
	0.502 7	0.745 7	0.759 5	1.461 1	94.2		
	0.512 6	0.760 4	1.062 1	1.792 6	97.2		
	0.510 6	0.757 5	1.062 1	1.789 9	97.2		
	0.509 9	0.756 4	1.062 1	1.789 5	97.3		
槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷酸	0.503 5	0.613 7	0.387 9	1.015 1	103.5	99.4	2.67
	0.501 2	0.610 9	0.387 9	1.001 5	100.7		
	0.501 4	0.611 2	0.387 9	0.993 4	98.5		
	0.503 2	0.613 4	0.645 5	1.278 9	103.1		
	0.503 8	0.614 1	0.645 5	1.241 6	97.2		
	0.501 1	0.610 7	0.645 5	1.225 4	95.2		
	0.501 4	0.611 2	0.904 2	1.501 1	98.4		
	0.504 4	0.614 8	0.904 2	1.511 4	99.2		
	0.509 9	0.621 5	0.904 2	1.514 1	98.7		
山柰酚-3-O-芸香糖苷	0.508 3	1.800 7	1.104 3	2.852 2	95.2	98.5	3.77
	0.505 2	1.789 8	1.104 3	2.841 2	95.2		
	0.507 6	1.798 2	1.104 3	2.838 8	94.2		
	0.501 4	1.776 3	1.840 2	3.580 6	98.0		
	0.502 2	1.779 1	1.840 2	3.635 9	100.9		
	0.504 1	1.785 9	1.840 2	3.681 2	103.0		
	0.512 6	1.816 0	2.576 1	4.265 5	95.1		
	0.510 6	1.808 9	2.576 1	4.465 7	103.1		
	0.509 9	1.806 4	2.576 1	4.430 0	101.8		

表4 19批铁线蕨药材中3种成分含量的测定结果($n=2$, mg/g)Tab 4 Results of content determination of 3 components in 19 batches of *A. capillusveneris*($n=2$, mg/g)

样品编号	绿原酸	槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷酸	山柰酚-3-O-芸香糖苷
S1	0.52	2.14	2.86
S2	4.05	4.79	11.01
S3	2.87	4.09	6.58
S4	0.60	1.41	1.71
S5	0.22	0.31	0.86
S6	0.25	0.38	0.61
S7	0.60	2.88	4.50
S8	1.32	0.64	2.94
S9	1.51	1.35	3.53
S10	4.25	7.11	12.00
S11	0.14	0.68	1.77
S12	1.32	3.64	6.61
S13	0.49	0.76	1.55
S14	0.28	0.32	1.06
S15	0.20	0.90	2.04
S16	0.65	2.87	4.14
S17	1.18	1.40	2.58
S18	0.10	0.89	1.44
S19	1.83	1.60	5.53

35 ℃时的色谱条件最优。本研究建立了铁线蕨药材的HPLC-DAD指纹图谱,共确定了22个共有峰,并指出9号峰为绿原酸、17号峰为槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷酸、20号峰为山柰酚-3-O-芸香糖苷;相似度评价结果显示,不同产地铁线蕨药材的相似度为0.530~0.962,表明不同产地铁线蕨药材的成分差异较大,其原因可能与该药材产地环境差异有关。

化学计量学分析可解析和发掘中药材指纹图谱中的特征信息,建立有效的鉴定模型^[7]。本文采用该方法分析,识别了不同产地药材的聚类相关性,筛选出主要影响药材质量的差异成分,对提升药材质量具有重要意义。经聚类分析发现,19批铁线蕨药材可聚为3类,其中S7、S10聚为一类,S15、S18聚为一类,S1~S6、S8、S9、S11~S14、S16、S17、S19聚为一类;经PCA、OPLS-DA发现,19批铁线蕨药材可聚为4类,其中S7、S10聚为一类,S15为一类,S18为一类,S1~S6、S8、S9、S11~S14、S16、S17、S19聚为一类;筛选得出9号峰(绿原酸)、17号峰(槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷酸)、20号峰(山柰酚-3-O-芸香糖苷)以及14号峰所代表的化学成分为该药材的差异成分。为进一步评价铁线蕨药材质量,笔者又对上述3种已指认成分进行了定量分析。结果显示,19批铁线蕨药材中绿原酸、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷的平均含量分别为0.10~4.25、0.31~7.11、0.61~12.00 mg/g,表明不同产地铁线蕨药材中上述3种成分的含量差异明显。

综上所述,本研究建立了不同产地铁线蕨药材的HPLC-DAD指纹图谱,共指认了3个共有峰,筛选出了4个影响铁线蕨药材质量的差异成分,其中绿原酸、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷酸、山柰酚-3-O-芸香糖苷在不同产地铁线蕨药材中的含量差异明显,可为铁线蕨药材质量控制提供参考。

参考文献

- [1] 高源,方灿,彭源,等.苗药猪鬃草研究进展综述[J].海峡药学,2020,32(1):42-45.
- [2] 汪金梅,于旭东,蔡泽坪,等.铁线蕨属植物的研究进展[J].分子植物育种,2019,17(1):255-263.
- [3] 何伟,孙自学,王光策.磁共振电治疗仪联合前列倍喜胶囊治疗慢性前列腺炎/慢性骨盆疼痛综合征的临床疗效观察[J].中华男科学杂志,2020,26(5):452-456.
- [4] 贵州省市场监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].2003年版.贵阳:贵州科技出版社,2003:347.
- [5] 杨浩.基于SPSS的聚类分析在行业统计数据中的应用[D].长春:吉林大学,2013.
- [6] 徐锋,杨澜,成婷婷,等.地瓜藤的UPLC指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析[J].中国药房,2019,30(24):3388-3392.
- [7] 荆文光,张权,邓哲,等.指纹图谱、多成分定量与化学计量学相结合的厚朴药材质量评价[J].中国中药杂志,2019,44(5):975-982.

(收稿日期:2021-04-18 修回日期:2021-07-19)

(编辑:唐晓莲)