

# 不同产地水冬瓜叶 HPLC 指纹图谱建立、化学模式识别分析及含量测定<sup>△</sup>

韩忠耀<sup>1\*</sup>, 向 军<sup>1</sup>, 陈建宇<sup>2#</sup>, 宋义勇<sup>1</sup>, 李仕外<sup>1</sup>, 唐文双<sup>1</sup>, 叶祖军<sup>1</sup>, 张林魁<sup>1</sup>, 田 浩<sup>1</sup>, 王万乐<sup>1</sup>(1. 黔南民族医学高等专科学校药学系, 贵州 都匀 558000; 2. 南开大学农药国家工程研究中心, 天津 300071)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)10-1224-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.10.11

**摘 要** 目的: 为水冬瓜叶药材的质量控制提供参考。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC), 以 Agela Promosil C<sub>18</sub> 为色谱柱, 以 0.2% 磷酸水溶液-乙腈(梯度洗脱)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 10 μL。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A 版)》建立 10 批不同产地水冬瓜叶的 HPLC 指纹图谱并进行相似度评价, 通过与对照品色谱图比对进行色谱峰的指认。采用聚类分析、主成分分析(PCA)法和偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)法进行化学模式识别分析, 并筛选质量差异标志物。采用相同 HPLC 法对水冬瓜叶中金丝桃苷和异槲皮苷的含量进行测定。结果: 10 批不同产地水冬瓜叶 HPLC 指纹图谱与对照指纹图谱的相似度为 0.923~0.983。共确定了 11 个共有色谱峰, 并指认出了峰 4、5 分别为金丝桃苷、异槲皮苷。聚类分析和 PCA、PLS-DA 结果均显示, 10 批水冬瓜叶可分为 2 类, 其中, Y10 聚为一类、其余聚为一类; 经 PLS-DA 分析, 筛选出了 6 个变量投影重要性值大于 1 的共有峰(峰 4、3、10、2、6、11)。10 批样品中金丝桃苷和异槲皮苷的平均含量分别为 0.47~6.97、0.21~1.87 mg/g。结论: 所建立的 HPLC 指纹图谱和含量测定方法稳定、可靠, 初步筛选出了不同产地水冬瓜叶中金丝桃苷等 6 个质量差异性标志物, 可用于不同产地水冬瓜叶药材的质量控制。

**关键词** 水冬瓜叶; 指纹图谱; 化学模式识别; 高效液相色谱; 金丝桃苷; 异槲皮苷

## Establishment of HPLC Fingerprint, Chemical Pattern Recognition Analysis and Content Determination of the Leaves of *Toricellia angulata* from Different Regions

HAN Zhongyao<sup>1</sup>, XIANG Jun<sup>1</sup>, CHEN Jianyu<sup>2</sup>, SONG Yiyong<sup>1</sup>, LI Shiwai<sup>1</sup>, TANG Wenshuang<sup>1</sup>, YE Zujun<sup>1</sup>, ZHANG Linsu<sup>1</sup>, TIAN Hao<sup>1</sup>, WANG Wanle<sup>1</sup>(1. Dept. of Pharmacy, Qiannan Medical College for Nationalities, Guizhou Duyun 558000, China; 2. Pesticide National Engineering Research Center, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To provide reference for the quality control of the leaves of *Toricellia angulata*. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agela Promosil C<sub>18</sub> column with 0.2% phosphoric acid solution-acetonitrile (gradient elution) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and column temperature was 35 ℃. The sample size was 10 μL. HPLC fingerprint of 10 batches of the leaves of *T. angulata* was established and similarity evaluation was conducted by using *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2004 edition). The chromatographic peak was identified by comparing with the chromatogram of reference substance. Cluster analysis, PCA and PLS-DA were used to identify chemical patterns, and the quality differential markers were screened. The contents of hyperoside and isoquercitrin were determined by the same HPLC. RESULTS: The similarities of HPLC fingerprint of 10 batches of the leaves of *T. angulata* with control fingerprint were 0.923-0.983. A total of 11 common peaks were identified, and the peaks 4 and 5 were hyperoside and isoquercitrin, respectively. Results of cluster analysis, PCA and PLS-DA showed that 10 batches of leaves of *T. angulata* could be divided into two categories, Y10 was clustered into one category, and others were clustered into one category. PLS-DA analysis showed that 6 common peaks (peaks 4, 3, 10, 2, 6 and 11) with variable importance projection (VIP) greater than 1 were selected. Average contents of hyperoside and isoquercitrin in 10 batches of the leaves of *T. angulata* were 0.47-6.97, 0.21-1.87 mg/g, respectively. CONCLUSIONS: Established HPLC fingerprint and the method for content determination are stable and reliable, and can be used for the quality control of the leaves of *T. angulata* from

<sup>△</sup> 基金项目: 贵州省科技计划项目(No. 黔科合基础[2020]1Y390); 黔南民族医专 2020 年度校科研基金资助项目(No. qnyz202023, No. qnyz202034)

\* 副教授, 硕士。研究方向: 中药、民族药质量控制。E-mail: 317230913@qq.com

# 通信作者: 高级实验师。研究方向: 药物分析。E-mail: jerryrnk@nankai.edu.cn

different areas. Six quality differential markers including hyperoside in the leaves of *T. angulata* from different areas are preliminarily screened.

**KEYWORDS** Leaves of *Toricellia angulata*; Fingerprint; Chemical pattern recognition; HPLC; Hyperoside; Isoquercitrin

水冬瓜叶又称大接骨丹叶,为山茱萸科植物有齿鞘柄木 *Toricellia Angulata* Oliv. var. *intermedia* (Harms) Hu 的干燥叶<sup>[1]</sup>。为贵州省少数民族用药,在黔南布依族苗族自治州辖区的苗族聚集地用作“苗药”,在水族聚集地用作“水药”。目前,该药暂未收载于2020版《中国药典》及2003年版《贵州省中药材、民族药材质量标准》中。据《贵州省中药材、民族药材质量标准》《湖北中草药志》等标准记载,有齿鞘柄木是以根皮入药<sup>[1-2]</sup>;但《中华本草(苗药卷)》中却指出,有齿鞘柄木是以根、根皮、树皮和叶入药<sup>[3]</sup>。据调研,依据有齿鞘柄木植物体生长期冬季落叶与早春萌芽(通常3月中旬)的特性,有齿鞘柄木在少数民族聚集地民间或民族医疗机构临床应用时,呈现出春、夏、秋季用“叶”,而冬季、初春用根皮的习药特点,且水冬瓜叶为部分民族医疗机构治疗骨折或摔伤愈合院内制剂的重要组成成分之一,这提示有齿鞘柄木的地上部位——水冬瓜叶具有一定的药用开发研究价值。

当前针对有齿鞘柄木的研究主要集中在其不同用药部位中紫丁香苷、总黄酮含量的经时变化特征分析和根皮部位的化学成分、生物活性、工艺优化、质量控制以及树皮部位的抗炎、镇痛活性上<sup>[4-14]</sup>,本课题组前期也建立了有齿鞘柄木根皮和树皮部位成分分析的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱<sup>[15-17]</sup>,但目前关于有齿鞘柄木地上部分——水冬瓜叶成分分析的报道仍较少。鉴于此,本研究拟在前期研究的方法基础上,以不同产地的水冬瓜叶为研究对象,建立其HPLC指纹图谱;利用化学模式识别法对其进行质量差异性评价,筛选出质量差异标志物;并同时测定指认出的主要成分的含量,以期为水冬瓜叶药材的质量控制、质量标准制订及民间、临床安全用药提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

1260型HPLC仪购自美国Agilent公司;FA1004B型万分之一电子天平购自温州瑞昕仪器有限公司;PX125DZH型十万分之一电子天平购自成都川弘科生物技术有限公司;KQ3200型超声仪购自昆山市超声仪器有限公司;WK-1000A型高速粉碎机购自潍坊市北方制药设备制造有限公司。

### 1.2 主要药品与试剂

10批水冬瓜叶药材均于2020年6—10月由本课题组自行采集(其来源信息见表1),经黔南民族医学高等专科学校药学系韩志耀副教授鉴定均为山茱萸科植物有齿鞘柄木 *T. Angulata* Oliv. var. *intermedia* (Harms) Hu 的叶。所有药材均于58℃下烘干,粉碎后过四号筛,备用。

金丝桃苷对照品(批号CHB180214,纯度≥98%)、异槲皮苷对照品(批号CHB180628,纯度≥98%)均购自成都克洛玛生物科技有限公司;乙腈为色谱纯,其余试

剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯净水。

表1 10批水冬瓜叶药材来源信息

Tab 1 Source information of 10 batches of the leaves of *T. angulata*

样品编号	采集地	经度	纬度	海拔,m	采集时间
Y1	贵州沿河县	28.841 111°	108.299 722°	674	2020-08-30
Y2	贵州丹寨县	26.274 722°	107.831 389°	814	2020-08-28
Y3	贵州绥阳县	28.114 545°	107.176 743°	940	2020-08-13
Y4	贵州福泉市	26.721 893°	107.582 513°	981	2020-10-05
Y5	贵州荔波县	25.510 634°	107.839 798°	911	2020-09-28
Y6	贵州都匀市	26.262 822°	107.514 536°	807	2020-07-06
Y7	贵州都匀市	26.229 444°	107.642 500°	675	2020-06-01
Y8	贵州都匀市	26.229 444°	107.642 500°	675	2020-07-01
Y9	贵州都匀市	26.229 444°	107.642 500°	675	2020-08-01
Y10	贵州凤冈县	27.728 841°	107.680 490°	876	2020-08-19

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为Agela Promosil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为0.2%磷酸水溶液(A)-乙腈(C),梯度洗脱(0~20 min, 10% C→13% C; 20~25 min, 13% C→19% C; 25~40 min, 19% C→25% C; 40~50 min, 25% C→45% C; 50~65 min, 45% C→70% C; 65~65.1 min, 70% C→10% C; 65.1~70 min, 10% C);检测波长为210 nm;柱温为35℃;流速为1.0 mL/min;进样量为10 μL;运行时间为70 min。

### 2.2 水冬瓜叶HPLC指纹图谱的建立与分析

2.2.1 混合对照品溶液 分别取金丝桃苷、异槲皮苷对照品适量,精密称定,置于10 mL量瓶中,先加适量甲醇超声(功率500 W,频率40 kHz)处理2 min,再加甲醇稀释到刻度,摇匀,即得金丝桃苷、异槲皮苷质量浓度分别为0.089 0、0.083 0 mg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 称取药材粉末1.0 g,精密称定,置于250 mL具塞锥形瓶中,加甲醇100 mL,加热回流提取60 min,放冷,过滤;收集滤液于100 mL棕色量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。用0.45 μm微孔滤膜过滤,收集滤液,即得。

2.2.3 精密度试验 取同一份样品(编号Y9)粉末适量,按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,再按照“2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。以4号峰(该峰保留时间居中、峰形较好且峰面积稳定)为参照,分别计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD均不高于1.56%、相对峰面积的RSD均不高于2.17% (n=6),表明该方法精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取同一份样品(编号Y9)粉末适量,精密称取6份,分别按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,再按照“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图。以4号峰为参照,分别计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD

均不高于0.95%、相对峰面积的RSD均不高于2.89% ( $n=6$ ),表明该方法重复性良好。

**2.2.5 稳定性试验** 取同一份样品(编号Y9)粉末适量,按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,分别于室温下放置0、2、6、10、12、24 h时按照“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱图。以4号峰为参照,分别计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,各共有峰相对保留时间的RSD均不高于2.21%、相对峰面积的RSD均不高于3.00% ( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

**2.2.6 10批水冬瓜叶HPLC指纹图谱的建立、相似度评价及色谱峰的指认** 分别取10批样品粉末,按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液。取“2.2.1”项下混合对照品溶液及10批样品的供试品溶液,分别按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。然后,将10批样品的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)》中,以Y1样品的图谱为参照图谱进行共有峰匹配,设置时间窗宽度为0.2 min,生成叠加图谱,采用中位数法生成对照指纹图谱(R),并进行相似度评价。通过比对混合对照品色谱图(按同一色谱条件测得)和对照指纹图谱(R)中各色谱峰的出峰时间,进行色谱峰的指认。结果,共得到11个共有成分峰,并指认出峰4、5分别为金丝桃苷和异槲皮苷。以色谱峰4(金丝桃苷)为参照(Y)计算得到11个共有峰相对保留时间的RSD均不高于0.39%;相对峰面积的RSD值波动较大,为27.05%~156.07%(除参照峰外)。以上结果表明,不同产地水冬瓜叶中化学成分组成相似,但含量差异较大。相似度评价结果显示,10批不同产地水冬瓜叶图谱与对照指纹图谱(R)的相似度为0.923~0.983,表明不同产地水冬瓜叶药材间化学成分种类相似度较高,药材质量整体稳定、可控。10批不同产地水冬瓜叶HPLC叠加图谱、对照指纹图谱分别见图1、图2,金丝桃苷和异槲皮苷混合对照品的HPLC图见图3,11个共有峰相对保留时间、相对峰面积的测定结果分别见表2、表3,10批不同产地水冬瓜叶的相似度评价结果见表4。

### 2.3 化学模式识别分析

**2.3.1 聚类分析** 以10批样品的11个共有峰峰面积为变量,分别将其导入SPSS 25.0统计学软件中,采用组间均联法,选择平方Euclidean距离为测度进行系统聚类分析。结果显示,当分类距离约为5时,10批样品可被分为2类:其中,编号为Y10的样品单独聚为一类;其他批次的样品聚为另一类。10批不同产地水冬瓜叶的聚类分析树状图见图4。

**2.3.2 主成分分析** 将10批样品的11个共有峰峰面积导入SIMCA-P+12.0.0.0软件中进行主成分分析(PCA),绘制PCA得分散点图。结果显示,10批样品大致可聚为2类,与聚类分析结果基本一致。10批不同产地水冬瓜叶的PCA得分散点图见图5。

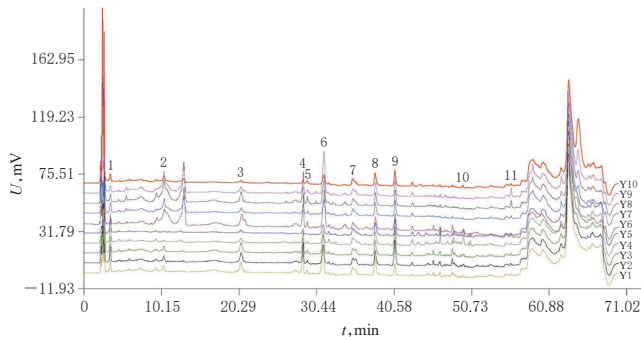


图1 10批不同产地水冬瓜叶的HPLC叠加指纹图谱  
Fig 1 HPLC superimposed fingerprint of 10 batches of the leaves of *T. angulata* from different regions

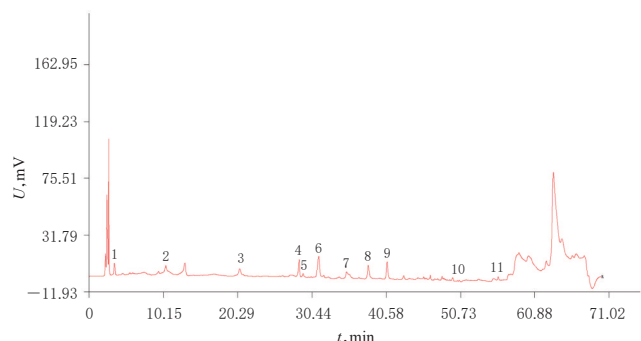
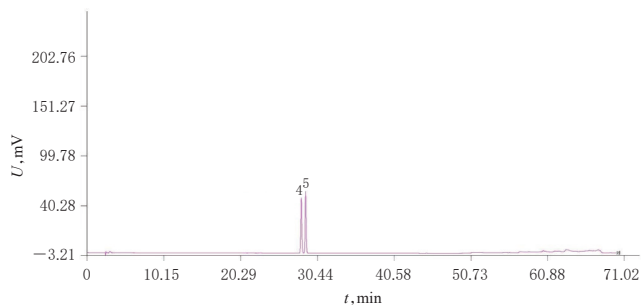


图2 10批不同产地水冬瓜叶的HPLC对照指纹图谱(R)

Fig 2 HPLC control fingerprint (R) of 10 batches of the leaves of *T. angulata* from different regions



注:4.金丝桃苷;5.异槲皮苷

Note: 4. hyperoside; 5. isoquercitrin

图3 金丝桃苷和异槲皮苷混合对照品的HPLC图谱  
Fig 3 HPLC chromatogram of hyperoside and isoquercitrin mixed control

**2.3.3 偏最小二乘法-判别分析** 参照文献[17-18],将10批样品的11个共有峰峰面积导入SIMCA-P+12.0.0.0软件中进行偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA),绘制PLS-DA散点得分图。结果显示,10批样品大致可聚为2类,与聚类分析结果基本一致;所建模型变量解释度 $R^2Y$ 为0.945,模型预测度 $Q^2$ 为0.902,表明此模型稳定、可靠。10批不同产地水冬瓜叶的PLS-DA散点得分图见图6。

为找出10批样品中差异贡献度大的成分,提取了模

表2 11个共有峰的相对保留时间测定结果

Tab 2 Relative retention time of 11 common peaks

共有峰	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	均值	RSD, %
1	0.120 8	0.120 6	0.120 5	0.120 6	0.121 3	0.121 0	0.121 1	0.121 1	0.121 1	0.121 0	0.120 9	0.22
2	0.363 2	0.364 6	0.364 7	0.364 9	0.366 6	0.366 0	0.365 4	0.365 2	0.366 6	0.366 4	0.365 4	0.30
3	0.716 7	0.717 7	0.716 5	0.716 3	0.719 4	0.717 6	0.717 3	0.717 0	0.718 6	0.716 2	0.717 3	0.14
4(Y)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0
5	1.018 9	1.018 9	1.018 8	1.018 8	1.018 7	1.018 9	1.019 0	1.018 9	1.018 8	1.019 0	1.018 9	0.01
6	1.091 8	1.091 8	1.090 8	1.091 8	1.095 2	1.095 1	1.094 8	1.094 8	1.095 0	1.095 0	1.093 6	0.17
7	1.226 0	1.225 8	1.226 6	1.226 5	1.225 4	1.225 6	1.226 0	1.226 1	1.226 0	1.226 0	1.226 0	0.03
8	1.329 0	1.328 5	1.329 4	1.329 4	1.328 4	1.328 0	1.328 9	1.328 8	1.328 7	1.328 7	1.328 8	0.03
9	1.418 9	1.418 2	1.419 1	1.419 5	1.418 1	1.417 8	1.419 3	1.418 8	1.418 7	1.418 7	1.418 7	0.04
10	1.681 6	1.680 1	1.680 8	1.681 0	1.679 7	1.678 6	1.679 3	1.659 4	1.679 3	1.680 0	1.678 0	0.39
11	1.948 3	1.946 0	1.946 5	1.946 5	1.947 4	1.946 6	1.947 7	1.948 1	1.947 4	1.948 0	1.947 3	0.04

表3 11个共有峰的相对峰面积测定结果

Tab 3 Relative peak areas of 11 common peaks

共有峰	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	均值	RSD, %
1	0.444 6	0.747 5	0.155 5	0.210 3	0.209 1	1.063 5	0.231 3	0.391 8	0.297 8	2.362 6	0.611 4	110.92
2	0.260 1	0.312 5	0.047 7	0.182 1	1.567 5	3.224 7	1.912 5	4.066 0	2.335 1	2.703 1	1.661 1	86.10
3	0.888 2	1.045 1	1.038 4	0.766 0	0.784 3	0.783 6	0.780 3	0.452 3	0.852 8	1.356 0	0.874 7	27.05
4(Y)	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	1.000 0	0
5	0.186 7	0.209 8	0.229 5	0.200 3	0.187 2	0.418 4	0.279 8	0.374 4	0.279 1	1.577 8	0.394 3	107.36
6	1.741 6	1.522 0	0.280 2	1.928 6	2.014 3	2.390 7	1.292 2	4.311 8	3.682 3	5.235 3	2.439 9	62.03
7	0.207 4	0.201 0	0.307 0	0.470 8	0.497 5	1.761 8	0.561 2	0.327 3	0.802 5	5.739 9	1.087 6	156.07
8	1.215 6	1.118 6	0.376 0	0.540 2	0.637 5	2.158 4	0.687 2	1.273 8	0.886 9	6.699 8	1.559 4	120.31
9	0.619 8	1.690 2	0.498 9	0.583 8	0.702 1	2.193 5	0.676 3	1.246 2	0.921 3	6.908 4	1.604 0	121.15
10	0.171 8	0.300 8	0.205 6	0.208 3	0.212 9	0.159 5	0.034 5	0.047 8	0.105 4	0.505 2	0.195 2	69.43
11	0.049 0	0.069 3	0.033 8	0.075 1	0.131 6	0.235 9	0.200 7	0.427 4	0.210 0	0.616 2	0.204 9	91.13

表4 10批不同产地水冬瓜叶的相似度评价结果

Tab 4 Similarity evaluation results of 10 batches of the leaves of *T. angulata* from different regions

样品编号	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y7	Y8	Y9	Y10	对照指纹图谱(R)
Y1	1.000	0.906	0.906	0.893	0.968	0.963	0.942	0.919	0.918	0.852	0.966
Y2	0.906	1.000	1.000	0.992	0.911	0.833	0.945	0.921	0.921	0.862	0.965
Y3	0.906	1.000	1.000	0.992	0.911	0.833	0.945	0.921	0.921	0.862	0.965
Y4	0.893	0.992	0.992	1.000	0.913	0.823	0.952	0.903	0.905	0.854	0.957
Y5	0.968	0.911	0.911	0.913	1.000	0.922	0.922	0.875	0.876	0.815	0.946
Y6	0.963	0.833	0.833	0.823	0.922	1.000	0.920	0.907	0.897	0.782	0.928
Y7	0.942	0.945	0.945	0.952	0.922	0.920	1.000	0.948	0.953	0.895	0.983
Y8	0.919	0.921	0.921	0.903	0.875	0.907	0.948	1.000	0.990	0.931	0.976
Y9	0.918	0.921	0.921	0.905	0.876	0.897	0.953	0.990	1.000	0.944	0.977
Y10	0.852	0.862	0.862	0.854	0.815	0.782	0.895	0.931	0.944	1.000	0.923
对照指纹图谱(R)	0.906	0.965	0.965	0.957	0.946	0.928	0.983	0.977	0.923	1.000	

型中11个共有峰所代表化学成分的变量投影重要性(VIP)值,并将VIP值大于1的成分确定为贡献较大的成分<sup>[19]</sup>。结果显示,11个共有峰的VIP值均大于0.50, VIP值普遍较高,证实了峰1~11作为不同产地水冬瓜叶质量差异性化学成分具有较典型的代表性与构建的HPLC指纹图谱共有峰的科学性<sup>[20]</sup>。其中,峰4、3、10、2、6、11这共6个共有峰峰面积的VIP值大于1,可初步拟定为不同产地水冬瓜叶的质量差异性标志物。10批不同产地水冬瓜叶中11个共有峰的VIP值测定结果见图7。

## 2.4 金丝桃苷、异槲皮苷的含量测定

2.4.1 金丝桃苷、异槲皮苷混合贮备液的制备 分别取金丝桃苷、异槲皮苷对照品适量,精密称定,置于100 mL

量瓶中,加入适量甲醇溶解后,再加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得金丝桃苷、异槲皮苷质量浓度分别为0.136 9、0.039 6 mg/mL的混合对照品贮备液。

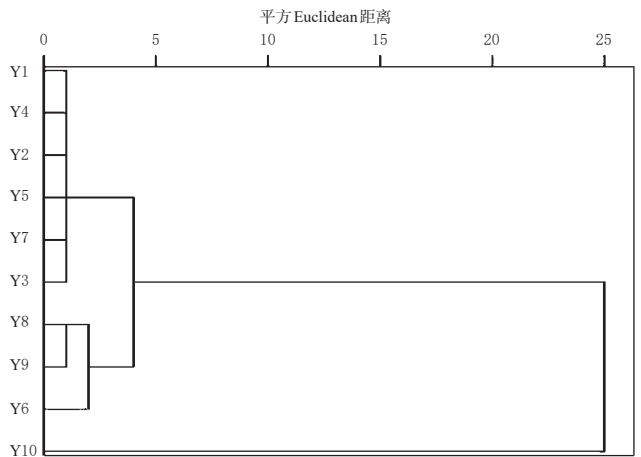


图4 10批不同产地水冬瓜叶的聚类分析树状图

Fig 4 Dendrogram of cluster analysis for 10 batches of the leaves of *T. angulata* from different regions

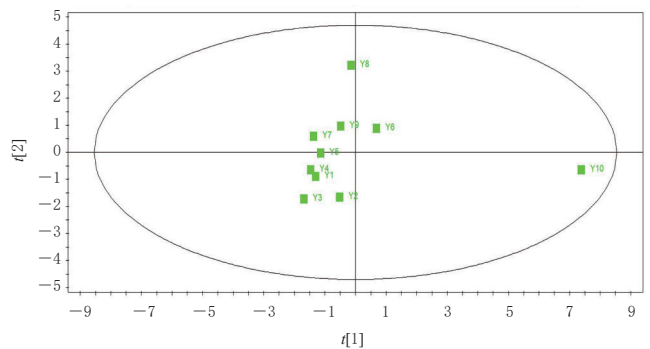


图5 10批不同产地水冬瓜叶的PCA得分散点图

Fig 5 PCA scatter plot of 10 batches of the leaves of *T. angulata* from different regions

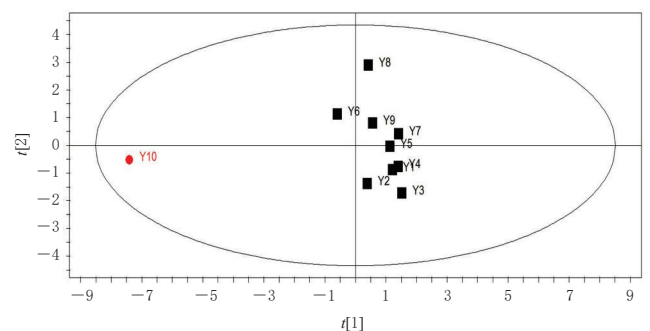


图6 10批不同产地水冬瓜叶的PLS-DA得分散点图

Fig 6 PLS-DA score scatter plot of 10 batches of the leaves of *T. angulata* from different regions

2.4.2 线性关系考察 分别精密“2.4.1”项下混合对照品贮备液0.5、1.0、2.0、5.0 mL,置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得1~4号混合对照品溶液。另取1号混合对照品溶液5 mL置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得0号混合对照品溶

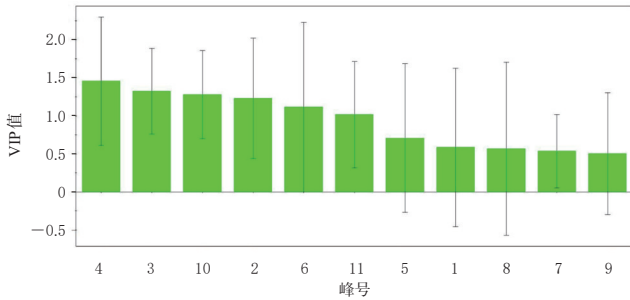


图7 10批不同产地水冬瓜叶中11个共有峰的VIP值测定结果

Fig 7 VIP values of 11 common peaks of 10 batches of the leaves of *T. angulata* from different regions

液。精密吸取上述混合对照品溶液(0~4号)和混合对照品贮备液(5号)各10 μL,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度为横坐标(X)、对应峰面积为纵坐标(Y)作线性回归,得到金丝桃苷、异槲皮苷的线性回归方程分别为 $Y=8\ 103.7X+27.906(r=0.999\ 7)$ 、 $Y=54\ 478X-5.390\ 2(r=0.999\ 9)$ ,其检测质量浓度的线性范围分别为0.003 42~0.136 90、0.000 99~0.039 60 mg/mL。

2.4.3 精密度试验 精密吸取“2.4.2”项下3号混合对照品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,连续进样6次,记录峰面积。结果,金丝桃苷、异槲皮苷峰面积的RSD分别为2.93%、1.42%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一样品(编号Y10)粉末6份,每份0.5 g,精密称定,按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,分别于室温下放置0、2、6、10、12、24 h时按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,金丝桃苷、异槲皮苷峰面积的RSD分别为0.15%、2.35%( $n=6$ ),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一样品(编号Y10)粉末共6份,每份0.5 g,精密称定,分别按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,再按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并根据外标法分别计算金丝桃苷、异槲皮苷的含量。结果,金丝桃苷、异槲皮苷含量的RSD分别为2.82%、2.87%( $n=6$ ),表明该方法重复性较好。

2.4.6 加样回收率试验 取同一批已知含量的样品(编号Y1)粉末0.5 g,共6份,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入混合对照品贮备液(按“2.4.1”项下方法另配制金丝桃苷、异槲皮苷质量浓度分别为0.129 8、0.053 4 mg/mL的混合对照品溶液)2 mL,再分别加入甲醇98 mL,其余按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液,然后按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。采用外标法分别计算样品中金丝桃苷、异槲皮苷的含量,并计算其加样回收率。结果,金丝桃苷、异槲皮苷的平均加样回收率分

别为102.51%、99.16%,RSD分别为2.05%、2.58%( $n=6$ ),表明该方法准确度高。金丝桃苷、异槲皮苷的加样回收率测定结果见表5。

表5 金丝桃苷、异槲皮苷的加样回测定结果( $n=6$ )

Tab 5 Results of recovery tests of hyperoside and isoquercitrin( $n=6$ )

待测成分	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, %
金丝桃苷	0.501 1	0.235 5	0.259 6	0.501 2	102.34	102.51	2.05
	0.498 8	0.234 4	0.259 6	0.497 7	101.41		
	0.510 2	0.239 8	0.259 6	0.511 3	104.59		
	0.499 3	0.234 7	0.259 6	0.502 2	103.05		
	0.498 7	0.234 4	0.259 6	0.491 6	99.08		
	0.505 6	0.237 6	0.259 6	0.509 2	104.61		
异槲皮苷	0.501 1	0.105 2	0.106 8	0.207 4	95.69	99.16	2.58
	0.498 8	0.104 7	0.106 8	0.214 2	102.52		
	0.510 2	0.107 1	0.106 8	0.211 9	98.09		
	0.499 3	0.104 9	0.106 8	0.213 6	101.82		
	0.498 7	0.104 7	0.106 8	0.210 3	98.85		
	0.505 6	0.106 2	0.106 8	0.210 9	98.06		

2.4.7 含量测定 分别称取10批样品粉末约2 g,按照“2.2.2”项下方法制成供试品溶液后,再按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并采用外标法分别计算样品中金丝桃苷、异槲皮苷的含量。每批样品重复测定3次,取平均值。结果,10批样品中金丝桃苷、异槲皮苷的平均含量分别为0.47~6.97、0.21~1.87 mg/g,详见表6。

表6 10批不同产地水冬瓜叶中金丝桃苷、异槲皮苷的含量测定结果( $n=3$ )

Tab 6 Results of content determination of hyperoside and isoquercitrin in 10 batches of *T. angulata* from different regions( $n=3$ )

样品编号	金丝桃苷,mg/g	异槲皮苷,mg/g	样品编号	金丝桃苷,mg/g	异槲皮苷,mg/g
Y1	0.47	0.21	Y6	6.97	1.77
Y2	3.84	0.67	Y7	6.75	1.87
Y3	2.53	0.47	Y8	4.81	1.08
Y4	0.77	0.27	Y9	2.13	0.81
Y5	5.44	1.34	Y10	5.28	1.07

### 3 讨论

#### 3.1 样品提取方法和提取溶剂考察

在前期预实验中,笔者分别考察了浸渍、超声、回流等不同提取方法对样品HPLC指纹图谱的影响,同时考察了水、10%~90%乙醇、无水乙醇以及不同体积分数甲醇(10%~90%)等不同提取溶剂对样品HPLC指纹图谱的影响。结果发现,以甲醇为提取溶剂且采用水浴回流提取时,样品的出峰最为丰富且峰形较好,故最终确定了本研究的提取溶剂与提取方法。

#### 3.2 色谱条件的优化

前期笔者采用二极管阵列检测器分别考察了样品在210、220、230、240、250、260、270、280 nm等不同波长下的响应效果。结果发现,在210 nm波长下,样品的出峰数量最多且响应普遍较强,故最终确定以210 nm作为

本研究的检测波长。此外,笔者还考察了5、10、20  $\mu\text{L}$ 的进样量对样品色谱峰峰形及分离度的影响。结果发现,当进样量为10  $\mu\text{L}$ 时,样品中色谱峰的峰形较好且共有峰的分度均符合分析检测要求,因此本研究将10  $\mu\text{L}$ 作为进样量。同时,笔者也考察了以甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.2%磷酸水溶液、甲醇-0.5%磷酸水溶液、甲醇-0.2%醋酸水溶液、甲醇-0.5%醋酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.5%磷酸水溶液、乙腈-0.2%醋酸水溶液、乙腈-0.5%醋酸水溶液等作为流动相时对样品色谱图的影响。结果发现,当以乙腈-0.2%磷酸水溶液和乙腈-0.5%磷酸水溶液为流动相时,样品中各色谱峰的峰形较好且分离度较高,但考虑到流动相中磷酸浓度过高对色谱柱和液相操作系统的不良影响,故本研究最终选择乙腈-0.2%磷酸水溶液作为流动相。

### 3.3 水冬瓜叶药材质量综合评价分析

本研究基于HPLC指纹图谱技术,通过相似度分析初步评价了10批不同产地水冬瓜叶药材的相似性。同时,本研究利用PCA和PLS-DA等化学模式识别分析技术评价了不同产地水冬瓜叶药材间的质量差异,初步筛选出了影响不同产地药材质量的6个质量差异性标志物。由相关文献报道可知,金丝桃苷具有保护心肌缺血/再灌注损伤等活性<sup>[21]</sup>,异槲皮苷具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、抗菌、抗病毒、降血压、降血脂、保护神经等生物活性<sup>[22]</sup>。为进一步深入评价药材质量,故本研究对民族药水冬瓜叶中的代表性成分金丝桃苷和异槲皮苷进行了定量分析。10批不同产地水冬瓜叶药材的含量测定结果显示,编号为Y1(采集于贵州沿河县)、Y4(采集于贵州福泉市)的样品中金丝桃苷、异槲皮苷的含量均较低,提示这2批样品中上述成分的含量与其他批次差异较大。分析其原因,可能与药材生长的海拔、土壤、光照、水源、温度等影响因素有关,相关研究有待进一步深入。

综上所述,本研究建立了10批不同产地水冬瓜叶的HPLC指纹图谱,共确立了11个共有峰,结合PCA和PLS-DA等化学模式识别评价方法初步筛选出了影响不同产地水冬瓜叶质量的6个差异性标志物,并对不同产地水冬瓜叶主要化学成分金丝桃苷和异槲皮苷进行了含量测定。所建立的HPLC指纹图谱和含量测定方法稳定、可靠,可用于水冬瓜叶药材的质量控制,化学模式识别法初筛的质量差异性标志物也为后期深入研究奠定了基础。

### 参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:107.  
[2] 湖北省卫生局.湖北中草药志:二[M].武汉:湖北人民出版社,1982:677.  
[3] 贵阳中医学院.中华本草:苗药卷[M].贵阳:贵州科技出版社,2005:164.

[4] 韩忠耀,宋伟,李燕,等.黔产大接骨丹药材不同用药部位中紫丁香苷和总黄酮含量的经时变化特征分析[J].中国药房,2020,31(17):2124-2128.  
[5] 张锦文,郭洁茹,唐菲,等.大接骨丹化学成分研究:Ⅲ[J].中草药,2011,42(1):15-17.  
[6] 张锦文,郭洁茹,唐菲,等.大接骨丹化学成分研究[J].中草药,2010,33(11):1725-1727.  
[7] 王燕燕,涂念,张勇慧,等.大接骨丹化学成分研究:Ⅱ[J].中草药,2009,40(10):1551-1553.  
[8] 吴少华,马云保,罗晓东,等.大接骨丹化学成分[J].云南植物研究,2000,22(2):214-218.  
[9] 韩忠耀,余跃生,袁开伦,等.基于信息熵赋权法优化苗药水冬瓜根皮药材提取工艺[J].中药材,2019,42(2):390-392.  
[10] 王晶.大接骨丹免疫活性成分研究[D].武汉:华中科技大学,2008.  
[11] 涂念.大接骨丹免疫调节活性成分研究[D].武汉:华中科技大学,2009.  
[12] 韩忠耀,陆廷祥,张秋瑾,等.苗药水冬瓜根皮药材质量标准提升研究[J].西部中医药,2019,32(3):41-44.  
[13] 韩忠耀,余跃生,董海平,等.声光可调滤光器-近红外光谱法快速测定苗药水冬瓜根皮药材中总黄酮和浸出物的含量[J].理化检验:化学分册,2019,55(6):668-671.  
[14] 陈华栋,张锦文,张勇慧.大接骨丹干燥树皮抗炎镇痛活性有效部位筛选[J].海峡药学,2012,24(2):29-30.  
[15] 韩忠耀,余跃生,魏学军,等.苗药水冬瓜根皮药材高效液相色谱指纹图谱研究[J].中国医院药学杂志,2017,37(2):126-129.  
[16] 韩忠耀,张涛,李燕,等.不同采收期大接骨丹HPLC指纹图谱建立及化学模式识别[J].中成药,2021,43(2):547-551.  
[17] 韩忠耀,曹芳,江品良,等.基于高效液相色谱指纹图谱和化学模式识别法评价不同采收期水冬瓜树皮药材质量[J].理化检验:化学分册,2021,57(3):204-209.  
[18] 索彩仙,邱韵静,吴文平,等.基于化学模式识别及多指标定量分析比较诃子和西青果的差异[J].中国药房,2020,31(20):2512-2518.  
[19] 曾鸿莲,刘振丽,宋志前,等.不同品种枳实HPLC指纹图谱及成分含量差异性研究[J].中国中药杂志,2016,41(17):3272-3278.  
[20] 沈颖昕,张荣榕,韩荣欣,等.玉红膏指纹图谱研究及质量标志物预测分析[J].中国医院药学杂志,2021,41(7):675-680.  
[21] 舒庆,郑其萍.金丝桃苷抗心/脑缺血损伤作用的药理学研究进展[J].中国药房,2016,27(10):1415-1417.  
[22] 陈燕,詹羽姣,李晨阳,等.异槲皮苷的生物活性研究进展[J].中国现代中药,2018,20(12):1579-1582、1592.

(收稿日期:2021-02-01 修回日期:2021-04-13)

(编辑:林 静)