

窝儿七 HPLC 指纹图谱建立及 12 种成分含量测定

崔誉文¹, 宋小妹², 李玉泽², 梁小飞²

1. 西安医学院药学院, 陕西 西安 710021

2. 陕西中医药大学 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 咸阳 712046

摘要: 目的 建立窝儿七 HPLC 指纹图谱, 并同时测定 19 个批次不同产地窝儿七中苦鬼白毒素葡萄糖二苷、苦鬼白毒素葡萄糖苷、4'-去甲基鬼白毒素、鬼白毒素葡萄糖苷、山柰酚葡萄糖苷、鬼白毒素、arabeline、鬼白毒酮、山荷叶素葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚和山荷叶素 12 种化学成分含量, 为窝儿七质量控制提供科学依据。方法 采用 COSMOSIL-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇 (A) -0.4% 磷酸水溶液 (B) 为流动相; 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃; 检测波长 300 nm, 进样量 10 μL; 建立窝儿七药材指纹图谱, 测定 12 个成分含量, 对结果进行聚类分析。结果 19 批窝儿七 HPLC 指纹图谱有 16 个共有峰, 各相似度均在 0.9 以上, 12 个化学成分在各自范围内线性关系良好 ($r^2 \geq 0.999 0$), 精密性、重复性 RSD < 2%, 在 24 h 内稳定性较好 (RSD < 2%), 加样回收率均在 99.27%~100.30%, RSD 均在 1.03%~1.98%。19 批样品中上述 12 个成分的含量测定结果及聚类分析结果可知不同产地窝儿七质量有所差异。结论 该方法简单、灵敏、准确, 为窝儿七的鉴别及质量评价提供了全面的参考依据。

关键词: 窝儿七; HPLC; 指纹图谱; 苦鬼白毒素葡萄糖二苷; 苦鬼白毒素葡萄糖苷; 4'-去甲基鬼白毒素; 鬼白毒素葡萄糖苷; 山柰酚葡萄糖苷; 鬼白毒素; arabeline; 鬼白毒酮; 山荷叶素葡萄糖苷; 槲皮素; 山柰酚; 山荷叶素; 聚类分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-5041-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.024

Establishment of HPLC fingerprint of *Diphylleia sinensis* and determination of 12 components

CUI Yu-wen¹, SONG Xiao-mei², LI Yu-ze², LIANG Xiao-fei²

1. Department of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

2. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and New Drug Research, Shaanxi Qinling Chinese Herbal Medicine Application Development Engineering Technology Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprints of *Diphylleia sinensis* from different habitats and determine the content of 12 chemical ingredients of picropodophyllotoxin-4-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside, picropodophyllotoxin-4-O-glucoside, 4'-demethylpodophyllotoxin, podophyllotoxin-4-O-β-D-glucoside, kaempferol-3-O-β-D-glucoside, podophyllotoxin, arabeline, podophyllotoxone, diphyllin-4-O-β-D-glucoside, quercetin, kaempferol, and diphyllin for providing a scientific basis for the quality control of *D. sinensis*. **Methods** COSMOSIL-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for gradients elution with MeOH (A) -0.4% phosphoric acid solution (B) as mobile phase. Working conditions were as follows: the column temperature was 30 ℃, the flow rate was 1 mL/min, the detection wavelength was 300 nm, and the injection volume was 10 μL. HPLC fingerprint of *D. sinensis* was established and 12 components were determined. The results were analyzed by cluster analysis. **Results** The HPLC fingerprint with 16 common peaks of *D. sinensis* was established, and the similarities of samples were over 0.9. The linear relationship of 12 components was good ($r^2 \geq 0.999 0$), RSD of precision and repeatability was less than 2%, and the stability was also good with in 24 h (RSD < 2%). The average recoveries ($n = 6$) of 12 components were between 99.27% and 100.3%, and the RSD were in the range of 1.03%—1.98%. The results of the content determination and cluster analysis of twelve components

收稿日期: 2020-03-06

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2019ZDLSF04-03-02); 陕西中医药大学学科创新团队项目 (2019-YL12)

作者简介: 崔誉文, 博士, 讲师, 从事天然药物化学成分及活性研究。Tel/Fax: (029)86177468 E-mail: 317364327@qq.com

showed that *D. sinensis* in different habitats were different from each other. **Conclusion** This method was simple, sensitive and accurate, which provided a comprehensive reference for the identification and quality evaluation of *D. sinensis*.

Key words: *Diphylleia sinensis* Li.; HPLC; fingerprints; picropodophyllotoxin-4-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside; picropodophyllotoxin-4-*O*-glucoside; 4'-demethylpodophyllotoxin; podophyllotoxin-4-*O*- β -D-glucoside; kaempferol-3-*O*- β -D-glucoside; podophyllotoxin; arabeline; podophyllotoxone; diphyllin-4-*O*- β -D-glucoside; quercetin; kaempferol and diphyllin; cluster analysis

窝儿七为小檗科鬼臼亚科山荷叶属植物中华山荷叶 *Diphylleia sinensis* Li. 的干燥根及根茎, 又名金鞭七、阿儿七、山荷叶、江边一碗水等, 在我国主要分布于陕西、甘肃、云南、湖北等地^[1]。作为陕西秦巴山区广泛使用的民间草药, 当地草医认为其根茎具有“破血生肌、解热镇痛消炎、刺激肠蠕动”等功效^[2-3]。自 20 世纪 80 年代起, 国内外学者就开始了鬼臼类植物的研究, 窝儿七作为鬼臼类植物之一, 其主要成分为木脂素类和黄酮类化合物^[4-8], 如 4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素、山荷叶素、山柰酚、槲皮素等。现代药理研究表明, 木脂素类和黄酮类成分具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抗菌消炎等药理活性^[9-10], 尤其是窝儿七中鬼臼毒素类不仅在合成抗肿瘤新药上具有很高的药用价值^[11-12], 而且在治疗尖锐湿疣、牛皮癣、扁平疣等顽固皮肤病方面具有显著效果且复发率低^[13-14], 对其进行深入研究具有重要意义。然而, 目前对窝儿七质量控制标准的研究尚不完整, 已有文献报道采用 HPLC 测定窝儿七中主要成分槲皮素、山柰酚、4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素、山荷叶素、山柰素的含量^[15-17], 但总体所测成分较少, 且未见有关窝儿七指纹图谱研究等报道。因此, 本实验在化学成分研究的基础上, 为了进一步完善窝儿七质量评价体系, 通过建立窝儿七 HPLC 指纹图谱, 测定其 12 个化学成分的含量, 以期对窝儿七的质量评价提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695/2998 分析型高效液相色谱仪 (Empower 工作站, 美国 Waters 公司); GB204 电子天平 (瑞士梅特勒托利多, 精密度 0.1 mg); KEWE 电热恒温水浴锅 (北京科伟永兴有限公司); 舒美 KQ-500DE 型超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); 101-A4 型电热鼓风干燥箱 (上海捷呈实验仪器有限公司); DYF-200A 型高速万能粉碎机 (上海比朗仪器有限公司)。

1.2 试剂

苦鬼臼毒素葡萄糖二苷、苦鬼臼毒素葡萄糖苷、4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素葡萄糖苷、山柰酚葡萄糖苷、鬼臼毒素、arabeline、鬼臼毒酮、山荷叶素葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚和山荷叶素 12 种化合物对照品均为本课题组分离精制得到, 通过波谱学的方法鉴定结构, 经高效液相色谱按面积归一化法测定质量分数均大于 98%, 符合定量要求。甲醇、乙腈为色谱纯 (天津市科密欧化学试剂有限公司); 其余所用试剂均为分析纯 (天津市天力化学有限公司); 实验水为娃哈哈纯净水; 窝儿七 19 批药材分别采自甘肃、陕西太白、陈仓、眉县、陇县、凤县、周至等地。由陕西中医药大学王继涛高级实验师鉴定为小檗科山荷叶属植物中华山荷叶 *Diphylleia sinensis* Li. 的干燥根及根茎。19 批药材样品来源见表 1。

表 1 窝儿七药材样品来源

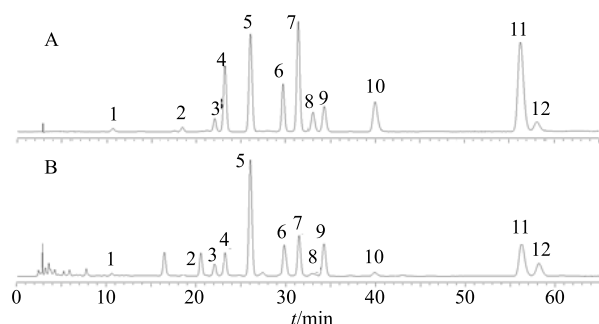
Table 1 Sources information of 19 samples

编号	采集地	采集时间
S1	太白县咀头镇唐口村王组刘秀寨阴大石上	2018-10
S2	太白县咀头镇唐口村云溪谷沟口	2018-10
S3	太白县痞子口村大沙沟	2018-10
S4	太白县咀头镇拐里四组	2018-10
S5	太白县小沟沟四方林	2018-10
S6	太白县桃川镇路平沟村老婆庵	2018-10
S7	太白县咀头镇石沟	2018-10
S8	太白县咀头镇唐口村王组刘秀寨山坡	2018-10
S9	太白县咀头镇唐口村王组龙王河山坡	2018-10
S10	太白县咀头镇马台沟	2018-10
S11	太白县桃川镇杜家庄村小沙沟石门	2018-11
S12	太白县咀头镇唐口村王组刘秀寨山坡	2018-09
S13	眉县红河谷	2018-11
S14	周至厚畛子	2018-11
S15	甘肃	2018-09
S16	陈仓大岭	2018-11
S17	凤县紫白	2018-11
S18	陇县	2018-11
S19	眉县红河谷	2018-10

2 方法与结果

2.1 色谱条件

COSMOSIL-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇 (A)-0.4%磷酸水溶液 (B); 梯度洗脱 (0~13 min, 35%~40% A; 13~20 min, 40%~45% A; 20~25 min, 45%~49% A; 25~40 min, 49% A; 40~45 min, 49%~52% A; 45~65 min, 52% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 300 nm; 进样量 10 μL。窝儿七化学对照品及供试品 HPLC 色谱图见图 1。



1-苦鬼臼毒素葡萄糖二苷 2-苦鬼臼毒素葡萄糖苷 3-4'-去甲基鬼臼毒素 4-鬼臼毒素葡萄糖苷 5-山柰酚葡萄糖苷 6-鬼臼毒素 7-arabesine 8-鬼臼毒酮 9-山荷叶素葡萄糖苷 10-槲皮素 11-山柰酚 12-山荷叶素
1-picropodophyllotoxin-4-O-β-D-glucopyranoside 2-picropodophyllotoxin 4-O-glucoside 3-4'-demethylpodophyllotoxin 4-podophyllotoxin-4-O-β-D-glucoside 5-kaempferol-3-O-β-D-glucoside 6-podophyllotoxin 7-arabesine 8-podophyllotoxone 9-diphyllin-4-O-β-D-glucoside 10-quercetin 11-kaempferol 12-diphyllin

图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 窝儿七 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of *D. sinensis* of mixed reference substances (A) and samples (B)

2.2 对照品溶液的制备

取苦鬼臼毒素葡萄糖二苷、苦鬼臼毒素葡萄糖苷、4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素葡萄糖苷、山柰酚葡萄糖苷、鬼臼毒素、arabesine、鬼臼毒酮、山荷叶素葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚、山荷叶素对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解并定容成终浓度分别为 0.20、0.50、0.50、1.80、0.67、1.70、1.40、0.40、0.90、0.50、0.90、0.07 mg/mL 的溶液, 作为混合对照品溶液, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

分别取 19 批取窝儿七药材粉末 (过 5 号筛) 约 0.50 g, 精密称定, 加入 10 mL 甲醇超声 (220 W, 40 kHz) 提取 1 次, 时间 30 min, 滤过, 用甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 作为供试品溶液, 备用。

2.4 指纹图谱建立

2.4.1 精密度试验 称取窝儿七药材粉末 (S8), 按照“2.2”项下的方法制备混合对照品溶液及在“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录各共有峰保留时间和峰面积, 并计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明测定仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取窝儿七药材粉末 (S8) 6 份, 按照“2.3”项下的方法制备供试品溶液及在“2.1”项下的色谱条件测定, 记录各共有峰保留时间和峰面积, 计算各共有峰相对保留时间和峰面积的 RSD 值, 结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明该分析方法稳定, 重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 称取窝儿七药材粉末 (S8), 按照“2.3”项下的方法制备供试品溶液及按“2.1”项下色谱条件测定, 精密吸取窝儿七供试品溶液 10 μL, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 分别记录各共有峰保留时间和峰面积, 计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值, 结果各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 值均小于 3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.4 指纹图谱建立与分析 取 19 批窝儿七不同产地的药材供试品溶液各 10 μL 进样, 记录 HPLC 色谱图, 将 19 批窝儿七样品的色谱图导入中国药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004A 版) 软件进行分析, 以 S8 指纹图谱为参照图谱, 时间窗宽度为 0.4 s, 经多点校正、自动匹配后生成 16 个共有峰的窝儿七药材指纹图谱 (图 2) 及对照指纹图谱 (图 3)。通过 HPLC 将各对照品的保留时间与各药材的指纹图谱对照, 共指认了其中的 12 个共有峰, 分别为苦鬼臼毒素葡萄糖二苷 (3 号峰)、苦鬼臼毒素葡萄糖苷 (5 号峰)、4'-去甲基鬼臼毒素 (7 号峰)、鬼臼毒素葡萄糖苷 (8 号峰)、山柰酚葡萄糖苷 (9 号峰)、鬼臼毒素 (10 号峰)、arabesine (11 号峰)、鬼臼毒酮 (12 号峰)、山荷叶素葡萄糖苷 (13 号峰)、槲皮素 (14 号峰)、山柰酚 (15 号峰) 和山荷叶素 (16 号峰)。选择出峰时间适中、峰面积较大、对称性较好的鬼臼毒素色谱峰 (10 号峰) 作为参照峰 (S), 以参照峰的保留时间和峰面积作为 1, 分别计算

其他各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。
结果见表 2、3。

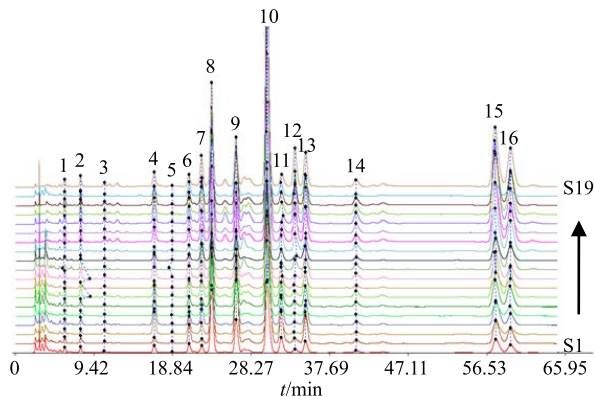
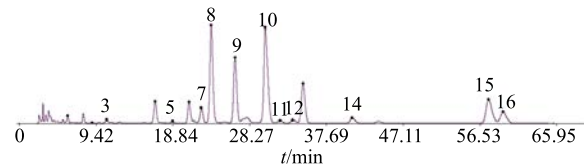


图 2 19 批次窝儿七的指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 19 batches of the root of *D. sinensis*



3-苦鬼白毒素葡萄糖二苷 5-苦鬼白毒素葡萄糖苷 7-4'-去甲基
鬼白毒素 8-鬼白毒素葡萄糖苷 9-山奈酚葡萄糖苷 10-鬼白毒
素 11-arabesine 12-鬼白毒酮 13-山萘叶素葡萄糖苷 14-槲皮
素 15-山奈酚 16-山萘叶素
3-picropodophyllotoxin-4-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyrano
side 5-picropodophyllotoxin 4-O-glucoside 7-4'-demethyl-
podophyllotoxin 8-podophyllotoxin-4-O-β-D-glucoside 9-kaempferol-
3-O-β-D-glucoside 10-podophyllotoxin 11-arabesine
12-podophyllotoxone 13-diphyllin-4-O-β-D-glucoside 14-quercetin
15-kaempferol 16-diphyllin

图 3 窝儿七 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 3 HPLC of common models fingerprint of the root of *D. sinensis*

表 2 各共有峰相对保留时间
Table 2 Relative retention time of come peak

编号	相对保留时间															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
S1	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S2	0.20	0.26	0.36	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.05	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S3	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S4	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S5	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.96
S6	0.20	0.26	0.36	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.36	1.91	1.97
S7	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S8	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S9	0.20	0.27	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.36	1.91	1.97
S10	0.20	0.26	0.36	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S11	0.19	0.26	0.35	0.55	0.61	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S12	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.12	1.15	1.36	1.91	1.97
S13	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S14	0.20	0.26	0.36	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.9	1.97
S15	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S16	0.20	0.26	0.36	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.9	1.97
S17	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.9	1.97
S18	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
S19	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.36	1.91	1.96
平均值	0.20	0.26	0.35	0.55	0.62	0.69	0.74	0.78	0.88	1.00	1.06	1.11	1.15	1.35	1.91	1.97
RSD/%	0.77	0.88	0.03	0	0.24	0	0.03	0.04	0.06	0	0.22	0.20	0.04	0.10	0.19	0.09

2.4.5 相似度评价 将各个批次的窝儿七指纹图谱分别导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)”软件, 对各批次样品的指纹图谱与对照图谱进行相似度评价。窝儿七对照图谱的相似度均在 0.9 以上, 说明不同产地的窝儿七差异较小, 药材的质量稳定。结果见表 4。

2.5 定量测定

2.5.1 线性关系考察 取“2.2”项下混合对照品溶

液, 用甲醇分别稀释 0、3、6、12、24、48 倍, 配制成系列浓度的混合对照品溶液($n=6$), 分别进样 10 μL , 按照“2.1”项下色谱条件进行测定。以进样量(X)对色谱峰面积(Y)绘制标准曲线, 进行线性回归, 得 12 种成分回归方程。结果表明, 12 种成分线性关系良好, 见表 5。

2.5.2 精密度试验 精密吸取窝儿七混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 测得峰面积, 计算 12 种

表 3 各共有峰相对保留峰面积

Table 3 Relative retention area of come peak

编号	相对峰面积															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
S1	0.02	0.02	0.08	0.02	0.20	0.04	0.05	0.92	0.27	1.00	0.04	0.27	0.5	0.01	0.07	0.02
S2	0.05	0.05	0.07	0.08	0.16	0.1	0.08	0.94	0.23	1.00	0.04	0.24	0.29	0.01	0.09	0.02
S3	0.03	0.04	0.10	0.04	0.32	0.11	0.1	1.05	0.33	1.00	0.03	0.45	0.54	0.01	0.08	0.02
S4	0.04	0.04	0.06	0.28	0.16	0.21	0.02	0.42	0.25	1.00	0.04	0.30	0.75	0.01	0.08	0.04
S5	0.06	0.08	0.16	0.49	0.19	0.18	0.12	1.40	0.52	1.00	0.04	0.50	0.59	0.01	0.09	0.02
S6	0.04	0.04	0.12	0.04	0.19	0.09	0.26	0.41	0.48	1.00	0.04	0.56	0.64	0.02	0.18	0.03
S7	0.04	0.04	0.07	0.03	0.24	0.07	0.09	1.13	0.29	1.00	0.02	0.36	0.35	0.01	0.10	0.04
S8	0.04	0.01	0.07	0.08	0.24	0.10	0.05	0.99	0.18	1.00	0.04	0.27	0.53	0.02	0.07	0.04
S9	0.04	0.04	0.10	0.07	0.07	0.09	0.12	0.59	0.23	1.00	0.04	0.30	0.77	0.02	0.08	0.04
S10	0.04	0.01	0.08	0.16	0.21	0.16	0.06	1.03	0.25	1.00	0.03	0.28	0.40	0.01	0.08	0.02
S11	0.01	0.04	0.11	0.02	0.62	0.03	0.12	1.10	0.31	1.00	0.02	0.57	0.92	0.02	0.10	0.02
S12	0.04	0.04	0.08	0.07	0.07	0.07	0.16	0.14	0.05	1.00	0.06	0.11	0.25	0.02	0.09	0.04
S13	0.02	0.02	0.11	0.14	0.22	0.02	0.21	0.43	0.18	1.00	0.08	0.39	0.43	0.02	0.16	0.04
S14	0.02	0.02	0.04	0.05	0.09	0.04	0.07	0.23	0.04	1.00	0.07	0.09	0.33	0.02	0.06	0.03
S15	0.02	0.04	0.06	0.07	0.06	0.07	0.10	0.38	0.10	1.00	0.10	0.19	0.87	0.01	0.11	0.03
S16	0.02	0.04	0.10	0.07	0.11	0.05	0.10	0.60	0.16	1.00	0.07	0.23	0.66	0.03	0.14	0.03
S17	0.02	0.03	0.08	0.05	0.12	0.05	0.14	0.40	0.13	1.00	0.1	0.19	0.91	0.02	0.15	0.02
S18	0.02	0.04	0.07	0.07	0.06	0.05	0.10	0.38	0.13	1.00	0.07	0.20	0.74	0.01	0.12	0.03
S19	0.04	0.04	0.06	0.11	0.11	0.16	0.09	0.38	0.11	1.00	0.10	0.18	0.31	0.01	0.11	0.03
平均值	0.03	0.04	0.09	0.10	0.18	0.09	0.11	0.68	0.22	1.00	0.05	0.3	0.57	0.02	0.10	0.03
RSD	40.97	43.99	31.67	109.95	71.78	60.95	52.89	53.87	57.78	0	47.10	46.94	38.78	37.75	33.18	26.70

表 4 窝儿七样品与生成的对照图谱的相似度

Table 4 Similarities of 19 batches of samples

样品	相似度	样品	相似度
S1	0.966	S11	0.923
S2	0.997	S12	0.973
S3	0.949	S13	0.922
S4	0.910	S14	0.951
S5	0.997	S15	0.919
S6	0.973	S16	0.923
S7	0.963	S17	0.929
S8	0.999	S18	0.984
S9	0.969	S19	0.966
S10	0.912		

化合物的 RSD 值分别为 1.79、1.39、1.31、0.89、0.82、1.02、1.15、1.34、0.93、1.28、1.56、1.65，表明测试仪器的精密度良好。

2.5.3 重复性试验 精密称取窝儿七药材粉末 6 份 (S8)，按照“2.3”项下的方法制备供试品溶液，“2.1”项下色谱条件测定峰面积，结果 12 种化合物质量分数的 RSD 值分别为 1.36、1.50、1.59、0.92、1.14、0.84、1.69、0.87、1.14、1.19、0.95、1.52，表明该分析方法稳定，重复性良好。

2.5.4 稳定性试验 精密吸取窝儿七供试品 (S8) 溶液 10 μL ，分别在 0、2、4、8、12、24 h 进行测

表 5 12 种成分线性关系结果

Table 5 Results of linear ranges of 12 constituents

化合物	回归方程	R	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
苦鬼白毒素葡萄糖二苷	$Y=46\ 877\ X+555.17$	0.999 7	4.0~200.0
苦鬼白毒素葡萄糖苷	$Y=23\ 344\ X+1\ 537.5$	0.999 2	10.5~500.0
4'-去甲基鬼白毒素	$Y=322\ 162.4803\ X+18\ 326$	0.999 4	10.5~500.0
鬼白毒素葡萄糖苷	$Y=225\ 855.4915\ X+61\ 879$	0.999 6	37.5~1 800.0
山柰酚葡萄糖苷	$Y=1\ 000\ 000\ X-174\ 282.060\ 4$	0.999 6	14.0~670.0
鬼白毒素	$Y=375\ 782.2244\ X+93\ 259$	0.999 7	35.0~1 700.0
arabeline	$Y=948\ 495.7834\ X+153\ 122.525$	0.999 7	29.0~1 400.0
鬼白毒酮	$Y=682\ 604.2084\ X+20\ 422$	0.999 8	8.3~400.0
山荷叶素葡萄糖苷	$Y=450\ 913.2492\ X+48\ 602$	0.999 4	19.0~900.0
槲皮素	$Y=1\ 000\ 000\ X+100\ 367.373\ 2$	0.999 0	10.5~500.0
山柰酚	$Y=2\ 000\ 000\ X+270\ 192.176\ 7$	0.999 2	19.0~900.0
山荷叶素	$Y=5\ 000\ 000\ X-9\ 745.9$	0.999 4	1.5~73.0

定,记录峰面积,结果 12 种化合物峰面积的 RSD 值分别为 1.03、1.16、1.70、0.95、0.87、1.51、1.12、0.91、1.25、0.94、0.90 和 1.15,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5.5 加样回收率试验 取已知含量的窝儿七药材粉末(S8)约 0.125 0 g,共 6 份,精密称定,分别加入等量的对照品,按照“2.3”项下的方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定峰面积,计算回收率。结果显示,12 种化合物平均回收率分别为 99.27%、99.90%、99.73%、99.75%、99.93%、99.91%、100.3%、99.61%、99.87%、99.49%、99.53%、99.62%,RSD 分别为 1.79、1.12、1.98、1.27、1.30、1.39、1.03、1.07、1.43、1.11、1.17、1.49。

2.5.6 样品含量测定 取 19 批次窝儿七药材粉末共 19 份(过 5 号筛,低温烘干至恒定质量),每份约 0.50 g,精密称定,按照“2.4”项下方法制备供

试品溶液,按“2.1”项下的色谱条件测定峰面积,计算 19 批药材中苦鬼臼毒素葡萄糖二苷、苦鬼臼毒素葡萄糖苷、4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素葡萄糖苷、山柰酚葡萄糖苷、鬼臼毒素、arabeline、鬼臼毒酮、山荷叶素葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚、山荷叶素的含量。从 19 批窝儿七样品含量测定可以看出(表 6),19 批窝儿七样品的化学成分种类差异不大,主要化学成分还是以鬼臼毒素、鬼臼毒素葡萄糖苷、山荷叶素葡萄糖苷为主,但不同批次的 12 种化学成分的含量还是有一定差异。

2.5.7 聚类分析 通过 SPSS 软件对 19 批样品中 12 个对照品含量进行聚类分析结果可知,19 批窝儿七样品主要分为 2 类,19 批窝儿七样品主要分为 2 类,S1~S14,S19 聚为一类,产地主为陕西太白县、眉县和周至;S15~S18 聚为一类,产地为陇县、甘肃、陈仓和凤县。

表 6 样品含量测定结果

Table 6 Results of the samples content determination

批次	质量分数/(mg·g ⁻¹)												
	苦鬼臼毒素葡萄糖二苷	苦鬼臼毒素葡萄糖苷	4'-去甲基鬼臼毒素	鬼臼毒素葡萄糖苷	山柰酚葡萄糖苷	鬼臼毒素	arabeline	鬼臼毒酮	山荷叶素葡萄糖苷	槲皮素	山柰酚	山荷叶素	总和
1	1.50	3.79	0.93	17.11	5.04	18.64	1.63	0.74	5.02	0.04	1.22	0.34	56.0
2	0.88	1.93	1.02	11.30	2.79	12.23	1.57	0.49	2.85	0.17	1.05	0.26	36.5
3	1.18	3.81	1.16	12.68	4.01	12.04	1.06	0.41	5.37	0.03	1.02	0.24	43.0
4	1.46	3.99	0.46	10.65	6.38	25.12	2.83	0.97	7.52	0.25	1.98	0.91	62.5
5	1.90	2.18	1.38	16.48	6.09	11.73	2.29	0.48	5.91	0.23	1.04	0.21	49.9
6	1.35	2.19	2.99	4.79	5.60	18.59	2.17	0.49	6.44	0.28	2.08	0.38	47.4
7	0.71	2.33	0.85	10.90	2.76	19.66	1.94	0.21	3.45	0.08	0.96	0.34	44.2
8	1.33	4.78	0.88	19.40	3.48	19.61	2.42	0.71	5.26	0.33	1.35	0.69	60.2
9	2.45	1.72	3.11	14.95	5.80	25.33	3.52	1.01	7.70	0.62	2.10	0.98	69.3
10	1.10	2.98	0.84	14.55	3.59	14.19	2.06	0.48	4.02	0.10	1.09	0.31	45.3
11	1.79	9.98	1.86	17.74	5.05	16.12	0.16	0.36	9.24	0.33	1.61	0.33	64.6
12	1.75	1.66	3.62	3.26	1.17	22.50	0.67	1.39	2.46	0.56	1.96	0.89	41.9
13	1.24	2.41	2.33	4.76	2.03	11.15	1.01	0.92	4.31	0.26	1.75	0.47	32.6
14	1.58	3.31	2.76	8.73	1.65	37.79	1.58	2.55	3.26	0.78	2.14	1.02	67.2
15	3.02	2.59	4.63	17.84	4.50	36.79	0.90	4.48	8.72	0.49	4.94	1.40	90.3
16	2.73	3.06	2.77	17.19	4.51	28.54	0.71	2.10	6.56	0.76	4.11	0.71	73.8
17	3.70	5.45	6.63	18.92	6.17	36.98	0.19	4.71	9.13	0.97	7.24	1.15	101.2
18	2.62	2.14	3.74	14.06	4.65	36.75	0.93	2.42	7.36	0.51	4.31	1.15	80.6
19	1.05	1.80	1.54	16.39	1.80	16.64	0.30	1.67	3.07	0.25	1.76	0.46	46.7

3 讨论

本研究对窝儿七检测的色谱条件进行了选择及优化,分别考察了甲醇-水、乙腈-水不同比例洗脱溶剂对 HPLC 色谱图的影响,结果显示甲醇-水为较优溶剂;并结合全波长扫描,结果显示“2.1”项下的色谱条件下,化合物有很好分离效果,由色谱图可知,本实验所采用的指标化合物分离度均大于 1.5,且峰

形对称,无拖尾等现象。另对提取方式(回流、超声)、提取溶剂(水、乙醇、甲醇)、提取时间(20、30、45 min)及提取次数(1、2 次)等对实验结果影响进行了考察,发现以甲醇超声(250 W, 40 kHz)提取 30 min 1 次为最优方案。该方法不仅可减少对色谱仪的损耗,同时还简洁方便,易于操作,可准确测定窝儿七药材中的 12 个指标成分。

指纹图谱中 16 个共有峰相对保留时间的 RSD 值均小于 1.0%, 表明本实验建立的指纹图谱研究方法为一种稳定的共有模式, 可以作为窝儿七药材品质评价的方法。19 批样品相对峰面积 RSD 值较大, 说明各批样品间组分含量差异较大, 提示窝儿七的品质与其产地密切相关, 需要对窝儿七中组分含量进行测定, 阐明药材品质与产地之间的关系, 为临床使用窝儿七提供依据。

从含量测定结果可知, 不同产地的窝儿七药材主要化学成分有鬼臼毒素、鬼臼毒素葡萄糖苷、山荷叶素。秦岭西侧甘肃、陈仓、凤县的窝儿七次生代谢产物含量较秦岭中部的太白、眉县、周至的含量高。同一产地不同批次个别化学成分含量差异较大, 但总体上成分含量差异较小, 说明窝儿七药材质量稳定。

从聚类分析结果可知, 19 批次窝儿七药材可分类 2 类, 产地甘肃、陈仓、陇县和凤县为一类; 产地陕西太白县、眉县和周至为一类。对照陕西省地理分布图, 发现甘肃、陈仓和凤县位于秦岭西侧, 太白县、眉县和周至位于秦岭中部, 表明窝儿七次生代谢产物的含量成呈明显的地域差异, 提示窝儿七的药材品质与其生长环境密切相关, 可能与受当地气候条件 and 环境因素影响, 值得进一步研究。

通过与文献报道比较发现^[18], HPLC 和 LC-MS/MS 2 种方法所测定的窝儿七中共有 10 个相同成分 4'-去甲基鬼臼毒素、鬼臼毒素葡萄糖苷、山柰酚葡萄糖苷、鬼臼毒素、arabelline、鬼臼毒酮、山荷叶素葡萄糖苷、槲皮素、山柰酚和山荷叶素, 其含量测定结果具有一致性, 说明本实验所建立含量测定方法的可靠性, 在窝儿七药材质量评价中可使用。此外, HPLC 法中苦鬼臼毒素葡萄糖二苷和苦鬼臼毒素葡萄糖苷两指标在 LC-MS 检测中没有发现。因此, HPLC 法可多成分、多指标更好地控制窝儿七药材质量。

鬼臼类化合物洗脱有一定规律, 在 HPLC 反相色谱柱的流出顺序为苦鬼臼类化合物先于鬼臼类化合物。推测其第 1 个原因可能是由于前者具有构型上的弹性, 在空间上比较容易重排, 可以极大限度和有机溶剂结合。第 2 个原因可能是苦鬼臼类物质在空间上比鬼臼毒素空间阻力大^[19]。

窝儿七是秦岭“太白七药”中重要的代表药物之一, 在民间药用历史悠久, 然而其质量标准尚未

完整制定。本研究建立了窝儿七指纹图谱研究, 并对窝儿七中 12 种成分进行了含量测定, 为窝儿七质量标准的制定提供一定依据。

参考文献

- [1] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志-第一卷, 第二册-种子植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1974.
- [2] 宝鸡市卫生局. 太白山本草志 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1993.
- [3] 宋小妹, 刘海静. 太白七药研究与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [4] 畅行若, 胡之璧, 曾广方. 草药窝儿七化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1980, 3: 158-162.
- [5] 马养民, 郑敬海, 刘建军, 等. 太白七药窝儿七化学成分的研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(32): 19781-19782.
- [6] 李真, 范冬冬, 张东东, 等. 窝儿七化学成分研究 [J]. 西北药学杂志, 2015, 30(6): 666-668.
- [7] 白玮, 李真, 张丽, 等. 窝儿七中 1 个新的木脂素成分 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1504-1507.
- [8] 孙琛, 史鑫波, 侯青, 等. 窝儿七木脂素类成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5193-5197.
- [9] 张丽, 王菲, 许欢, 等. 窝儿七的研究进展 [J]. 现代中医药, 2017, 37(1): 89-92.
- [10] 杨秀芳, 马养民, 郑敬海, 等. 窝儿七中化学成分活性的研究 [J]. 陕西科技大学学报: 自然科学版, 2013, 31(1): 86-89.
- [11] Hande K R. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(10): 1514-1521.
- [12] 孙彦秀, 李占林, 陈虹, 等. 鬼臼类植物化学成分和生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1626-1634.
- [13] 胡步超, 田淑惠, 傅长才. 太白山草药窝儿七活性成分修饰物 P-01 治疗尖锐湿疣、扁平疣初步研究 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2001, 10(4): 205.
- [14] 周凡. 鬼臼毒素酮与 CO₂ 激光治疗尖锐湿疣疗效比较 [J]. 皮肤病与性病, 2015, 37(5): 275-276.
- [15] 白吉庆, 王小平, 孙涛, 等. 高效液相色谱法测定窝儿七中槲皮素、鬼臼毒素、山柰素 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(1): 69-71.
- [16] 赖菁华, 宋小妹. HPLC 法测定窝儿七中 5 种成分的含量 [J]. 西北药学杂志, 2016, 31(1): 12-15.
- [17] 赖菁华, 柴江, 张亚强, 等. 高效液相色谱法测定窝儿七中鬼臼毒素和 4'-去甲基鬼臼毒素的含量 [J]. 中南药学, 2015, 13(2): 169-172.
- [18] 白玮, 孙晓, 许苗苗, 等. LC-MS/MS 同时测定窝儿七中 10 种成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 63-69.
- [19] 赵磊. HPLC-DAD、HPLC-ESI/MSⁿ 研究天然抗癌药物鬼臼类化合物立体异构体 [D]. 兰州: 兰州大学, 2009.