

狗脊药材的化学成分表征及原儿茶酸含量测定

陈艳熙¹, 于 猛², 戴晓月², 贾红梅², 张宏武², 马 卓^{1*}, 邹忠梅^{2*}

1. 湖北工业大学, 湖北 武汉 430068

2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

摘 要: **目的** 鉴定狗脊中的化学成分并建立原儿茶酸的 UPLC 含量测定方法, 比较狗脊药材与饮片中原儿茶酸的含量差异。**方法** 采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 法, ESI 电离源, 负离子扫描模式采集狗脊药材质谱数据, 根据质谱精确相对分子质量、二级碎片离子、紫外特征吸收光谱, 并与文献数据或标准品比对鉴定狗脊药材中的主要化学成分; UPLC 色谱条件为采用 ACQUITY UPLC CORTECS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈-甲醇 (70:30, B) 为流动相进行梯度洗脱, 柱温 40 °C, 体积流量 0.4 mL/min, 进样量 4 μL。**结果** 从狗脊药材中共鉴定出 26 个化学成分, 主要包括糖苷类成分 16 个、酚酸类成分 2 个、皂苷类成分 1 个、苯丙素类成分 1 个、脂类成分 1 个、其他类成分 5 个; 原儿茶酸在 0.94~202.00 μg/mL ($R^2=0.999\ 9$) 线性关系良好, 平均回收率为 101.90%, 检测限为 0.20 μg/mL, 定量限为 0.79 μg/mL。狗脊饮片中原儿茶酸的含量均符合药典规定标准 (大于 0.020%); 狗脊药材中原儿茶酸的含量 (质量分数为 0.003 8%~0.005 3%) 显著低于饮片 (0.556 0%~0.850 9%), 虽然经酸水解处理后, 原儿茶酸的含量显著升高 (0.205 2%~0.450 1%), 但仍低于饮片含量。**结论** 建立的 UPLC-Q-TOF/MS 方法可快速识别狗脊药材中的主要化学成分, 可为狗脊药材的质量控制和药效物质基础研究奠定基础; 建立的原儿茶酸 UPLC 含量测定方法灵敏度高, 准确度好, 具有可行性, 可用于狗脊药材的质量控制。

关键词: 狗脊; 糖苷; 酚酸; 皂苷; 苯丙素; UPLC-Q-TOF/MS; 原儿茶酸

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)08-2254-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.026

Characterization of major constituents and determination of protocatechuic acid in Chinese herbal medicine *Cibotii Rhizoma*

CHEN Yan-xi¹, YU Meng², DAI Xiao-yue², JIA Hong-mei², ZHANG Hong-wu², MA Zhuo¹, ZOU Zhong-mei²

1. Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China

2. The Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To identify the chemical constituents of *Cibotium barometz* and establish a UPLC method for the determination of protocatechuic acid, and to compare the content differences of protocatechuic acid between crude drug and decoction pieces. **Methods** Ultra-performance liquid chromatography-tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) combined ESI ionization source, and negative ion scanning mode were used to collect the mass spectrometry data of *C. barometz* extract. According to the precise molecular mass, secondary fragment ions and comparison with literature data or standards, the major constituents of *C. barometz* were identified. The UPLC method was performed on a ACQUITY UPLC CORTECS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm) column with 40 °C, and gradient elution with 0.1% formic acid in water (A)-acetonitrile-methanol (70:30) (B) was used at the flow rate of 0.4 μg/mL, and the injection volume was 4 μL. **Results** A total of 26 constituents were identified from *C. barometz*, including 16 glycosides, 2 phenolic acids, 1 saponin, 1 phenylpropanoid, 1 lipid and 5 other constituents. The linearity of protocatechuic acid was good in the range of 0.94–202.00 μg/mL, ($R^2=0.999\ 9$). The average recovery was 101.90%, the limit of detection was 0.20 μg/mL, and the limit of quantification was 0.79 μg/mL. The content of protocatechuic acid in the decoction pieces of

收稿日期: 2022-08-08

基金项目: 2021 年度国家药品标准修订研究课题 (2021Z004)

作者简介: 陈艳熙 (1996—), 硕士研究生, 研究方向为中药制剂及质量控制。E-mail: 1603419498@qq.com

*通信作者: 邹忠梅, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: zmzou@implad.ac.cn

马 卓, 硕士生导师, 教授, 研究方向为药物制剂与中药药理学。E-mail: 1280887725@qq.com

Cibotium barometz achieved the standard of pharmacopoeia ($>0.020\%$, $n=6$). The content of protocatechuic acid in crude drug was lower the standard of pharmacopoeia (content was $0.003\% - 0.005\%$, $n=4$); But after acid hydrolysis, the content of protocatechuic acid significantly increased ($0.205\% - 0.450\%$), while also less than in the decoction pieces of *C. barometz*. **Conclusion** The established UPLC-Q-TOF/MS method in this study can quickly identify the major constituents of *C. barometz*, which can lay a foundation for the quality control and the pharmacodynamic material basis of *C. barometz*. The established UPLC method for the determination of protocatechuic acid has high sensitivity, good accuracy, and feasibility, and can be used for the quality control of *Cibotium barometz*.

Key words: *Cibotium barometz* (L.) J. Sm.; glycosides; phenolic acids; saponin; phenylpropanoid; UPLC-Q-TOF/MS; protocatechuic acid; content determination

狗脊为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. 的干燥根茎^[1], 主要分布于中国福建、四川、云南、贵州、广东、广西、海南、浙江、江西、湖南等地^[2], 具有祛风湿、补肝肾、强腰膝等功效, 临床主用于治疗腰膝酸痛、风寒湿痹、手足麻木、半身不遂等病症。现代药理研究表明, 狗脊具有抗骨质疏松、抗炎、抑菌、止血与镇痛、抗氧化、抗风湿、保肝等多种药理作用^[2-5]。狗脊主要含有原儿茶酸、咖啡酸、阿魏酸等酚酸类成分, 异组织蕨素 A、金粉蕨素等蕨素类成分, 山柰酚、芒柄花黄素等黄酮类成分, 黄芪苷 IV、异羟基洋地黄毒苷元、樱草苷等皂苷类成分, 以及挥发油、氨基酸等成分^[2-5]。其中, 以原儿茶酸为代表的酚酸类成分^[6-8]可能是狗脊发挥抗骨质疏松^[9-10]、抗炎^[11]、调血脂^[12]等药效的主要活性物质, 因此《中国药典》2020 年版选择其作为中药狗脊饮片的质量控制指标, 且规定狗脊饮片中原儿茶酸的含量不得少于 0.020% , 但狗脊药材至今尚未建立含量测定指标, 药材与饮片中原儿茶酸的含量差异至今尚不明确。

因此, 本研究首先采用超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 技术对狗脊药材中的主要化学成分进行表征, 在明确化学成分的基础上, 建立药材中原儿茶酸的含量测定方法, 并比较不同产地狗脊药材及饮片中原儿茶酸的含量差异, 为筛选狗脊药材指标性成分提供参考, 也为狗脊的药效物质基础研究奠定基础。

1 仪器与材料

SYNAPT G2 HDMS 型超高效液相飞行时间高分辨质谱联用系统 (美国 Waters 公司); 数据处理软件为 MassLynx 4.1 工作站 (美国 Waters 公司); BT-125 D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); Acquity 型超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); 数据处理系统为 EmpowerTM 3 工作站 (美国 Waters 公司); Legend Micro 17R 型高速低温离心机 (美

国 Thermo Fisher 公司); EYELA N-1100 型旋转蒸发仪 (日本 Tokyo Rikakai 公司); KQ-500E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); YF-111B 型高速中药粉碎机 (浙江瑞安市永历制药机械有限公司); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司); 微孔滤膜 (美国 Waters 公司)。

色谱级乙腈和甲醇购自美国 Thermo Fisher 公司, HPLC 级甲酸购自上海安谱实验科技股份有限公司, 原儿茶酸对照品由国家中药化合物库提供 (UPLC-PDA 检测质量分数大于 98%), 亮氨酸-脑啡肽购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 水为去离子水, 盐酸、氢氧化钠等分析试剂均购自北京化工厂。

狗脊药材 (4 批) 产地采自贵州和广东, 经中国医学科学院药用植物研究所张本刚研究员鉴定为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *C. barometz* (L.) J. Sm. 的干燥根茎。上述狗脊药材对应的饮片 (饮片 1~4) 是参照《中国药典》2020 年版方法炮制获得; 市售狗脊饮片 (饮片 5~10) 购自北京同仁堂制药有限公司, 所有样品均留存于国家中药化合物库; 狗脊药材及饮片样品详细信息如表 1 所示。

表 1 狗脊药材及狗脊饮片信息

Table 1 Information of crude drug and commercially available decoction pieces of *C. barometz*

编号	批号	样品来源
药材 1	20200104-1	贵州省黔东南州从江县贯洞镇八洛村
药材 2	20200104-2	贵州省三都县三合镇拉揽林场
药材 3	20200104-3	贵州省罗甸县城关镇布法村
药材 4	20191125-4	广东省云浮市前锋镇崖楼村崖楼山
饮片 1	20200104-1	药材 1 炮制
饮片 2	20200104-2	药材 2 炮制
饮片 3	20200104-3	药材 3 炮制
饮片 4	20191125-4	药材 4 炮制
饮片 5	20190925	北京同仁堂制药有限公司
饮片 6	20191201	北京同仁堂制药有限公司
饮片 7	20190514	北京同仁堂制药有限公司
饮片 8	20200409	北京同仁堂制药有限公司
饮片 9	20200622	北京同仁堂制药有限公司
饮片 10	20201002	北京同仁堂制药有限公司

2 方法

2.1 狗脊药材及饮片供试品溶液的制备

取狗脊药材或饮片粉末(过 3 号筛)各 2.0 g, 精密称定, 分别置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇-1%冰醋酸水溶液(70:30), 超声处理 30 min, 放冷, 再称量, 用甲醇-1%冰醋酸水溶液(70:30)补足减失的量, 摇匀, 过 0.22 μm 滤膜, 取续滤液, 即得狗脊药材和饮片供试品溶液。

2.2 狗脊药材经酸水解处理供试品溶液的制备

取狗脊药材粉末(过 3 号筛)2.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 甲醇-1%冰醋酸水溶液(70:30), 超声处理 30 min, 挥干溶剂, 然后加入 15 mL 2 mol/L 的盐酸溶液, 置于 85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中水解 1 h, 冷却后加入 2%氢氧化钠溶液调至 pH 7, 滤过、挥干溶剂, 再用甲醇-1%冰醋酸水溶液(70:30)复溶, 过 0.22 μm 滤膜, 即得狗脊药材酸水解处理供试品溶液。

2.3 对照品储备液的制备

精密称取原儿茶酸对照品 2.0 mg, 置 2 mL 量瓶中, 用甲醇-1%冰醋酸水溶液(70:30)溶解, 并定容至刻度, 得质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品储备液, 备用。

2.4 色谱及质谱条件

2.4.1 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC CORTECS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.6 μm) 色谱柱, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 恒定体积流量 0.4 mL/min, 进样量 4 μL , 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈-甲醇(70:30)(B)。定性分析梯度程序: 0~10 min, 99%~

95% A; 10~14 min, 95% A; 14~19 min, 95%~93% A; 19~26 min, 93%~89% A; 26~28 min, 89%~1% A。定量分析梯度程序: 0~10 min, 100%~98% A。

2.4.2 质谱条件 质谱采用 Waters SYNAPT G2 HDMS 系统, ESI 离子源, 负离子模式; 毛细管电压 2.3 kV; 锥孔电压 40 V; 离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$; 质荷比采集范围 m/z 50~1200; 采用亮氨酸-脑啡肽为质量校正溶液。

3 结果与分析

3.1 狗脊药材中主要化学成分的表征

将狗脊药材样品按照“2.4”项下色谱-质谱条件进样分析, 得到负离子模式下质谱基峰图, 结果见图 1。根据特征紫外吸收波长、高分辨质谱提供的精确分子质量、特征碎片离子等信息, 并通过查阅相关文献或使用标准品比对, 共鉴定出 26 个成分, 包括糖苷类成分 17 个、酚酸类成分 2 个、黄酮类成分 1 个、其他类成分 6 个, 鉴定结果见表 2。

3.2 狗脊药材主要化学成分的鉴定

3.2.1 原儿茶酸的鉴定 负离子模式下, 化合物 5 的保留时间为 3.25 min, 准分子离子峰为 m/z 153.019 3 [$\text{M}-\text{H}$] $^{-}$ ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$), 特征碎片离子峰有 m/z 109.028 9, 是由准分子离子峰失去 1 分子 CO_2 产生的。紫外光谱中, 该成分在 219、259、294 nm 处有特征吸收, 通过与文献^[7]和使用标准品比对, 确定该化合物为原儿茶酸, 可能的裂解规律如图 2 所示。

3.2.2 香草酸-4-O- β -D-葡萄糖苷的鉴定 负离子模式下, 化合物 10 的保留时间为 5.45 min, 准分子

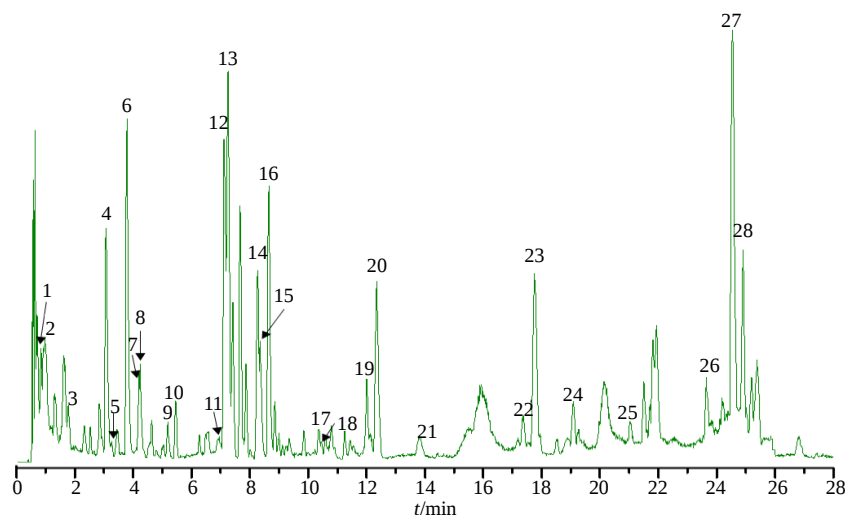


图 1 狗脊药材提取物的质谱基峰图 (负离子)

Fig. 1 Base peak intensity chromatograms of UPLC-MS of *C. barometz* extract (negative ion)

表 2 狗脊药材中化学成分的鉴定结果

Table 2 Identification results of the chemical constituents in crude drug of *C. barometz*

编号	tr/min	化合物名称	分子式	加合离子	理论值	实测值	误差($\times 10^{-6}$)	MSE	离子
1	0.84	3-羟基- γ -吡喃酮	C ₅ H ₄ O ₃	[M-H] ⁻	111.008 2	111.007 7	-4.5	111	
2	0.98	3-羟基- γ -吡喃酮 (同分异构体)	C ₅ H ₄ O ₃	[M-H] ⁻	111.008 2	111.007 6	-5.4	111	
3	1.78	3-(乙酰氧基)-2-羟丙基- β -D-吡喃葡萄糖苷	C ₁₁ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	295.102 9	295.103 2	1.0	295、101	
4	3.07	6-O-原儿茶酰基-D-葡萄糖	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	[M-H] ⁻	315.071 6	315.071 5	-0.3	315、153、109	
5	3.25	原儿茶酸*	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.018 8	153.019 3	3.3	153、109	
6	3.80	cyathenosin A	C ₁₃ H ₁₄ O ₉	[M-H] ⁻	313.056 0	313.055 6	-1.3	313、153、109	
7	4.20	6-O-原儿茶酰基-D-葡萄糖 (同分异构体)	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	[M-H] ⁻	315.071 6	315.071 5	-0.3	315、153、109	
8	4.24	6-O-原儿茶酰基-D-葡萄糖 (同分异构体)	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	[M-H] ⁻	315.071 6	315.071 5	-0.3	315、153、109	
9	5.19	原儿茶醛*	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.023 9	137.023 8	-0.7	137	
10	5.45	香草酸-4-O- β -D-葡萄糖苷	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	329.087 3	329.087 3	0.0	329、167、152	
11	6.96	cibotiumbaroside A	C ₁₈ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	411.092 7	411.091 9	-1.9	411	
12	7.12	1-O-咖啡酰- β -D-葡萄糖*	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	341.087 3	341.088 1	2.3	341、179、135	
13	7.25	3-O-咖啡酰- β -D-葡萄糖	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	341.087 3	341.088 1	2.3	341、179、135	
14	8.26	4-O-咖啡酰- β -D-葡萄糖	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	341.087 3	341.088 1	2.3	341、179、135	
15	8.35	4-O-香豆酰- β -D-阿洛糖	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	[M-H] ⁻	325.092 3	325.092 7	1.2	651、325	
16	8.66	6-O-咖啡酰- β -D-葡萄糖	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	341.087 3	341.088 3	2.9	341、179、135	
17	10.35	樱草苷	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	475.145 2	475.142 0	-6.7	475、312、281	
18	10.44	1-O-咖啡酰- β -D-葡萄糖 (同分异构体)	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	341.087 3	341.086 2	-3.2	341、179、135	
19	12.01	3,7,3',4'-四羟基黄酮	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	287.055 6	287.055 5	-0.3	287、137	
20	12.35	阿魏酸 4-O- β -D-葡萄糖苷	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	[M-H] ⁻	355.102 9	355.104 1	3.4	711、355	
21	13.80	新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 3	353.086	-3.7	353	
22	17.36	原花青素 B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	[M-H] ⁻	577.134 6	577.134 8	0.3	577	
23	17.75	cibotiumbaroside G	C ₁₈ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	411.092 7	411.092 8	0.2	411、315、153	
24	19.08	corchoionoside C*	C ₁₉ H ₃₀ O ₈	[M-H] ⁻	385.186 2	385.185 5	-1.8	431、385、223、153	
25	21.03	cibotiumbaroside E	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	439.124 0	439.122 2	-4.1	439、341、179	
26	23.65	cibotiumbaroside I	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	399.129 1	399.129 6	1.3	799、399、179	
27	24.54	未鉴定	C ₄₅ H ₃₆ O ₁₈	[M-H] ⁻	863.182 3	863.182 4	0.1	863、455、187	
28	24.90	未鉴定	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	439.124 1	439.124 0	-0.2	439、323、113	

“*” 为与对照品比对

“**” comparison with the reference substance

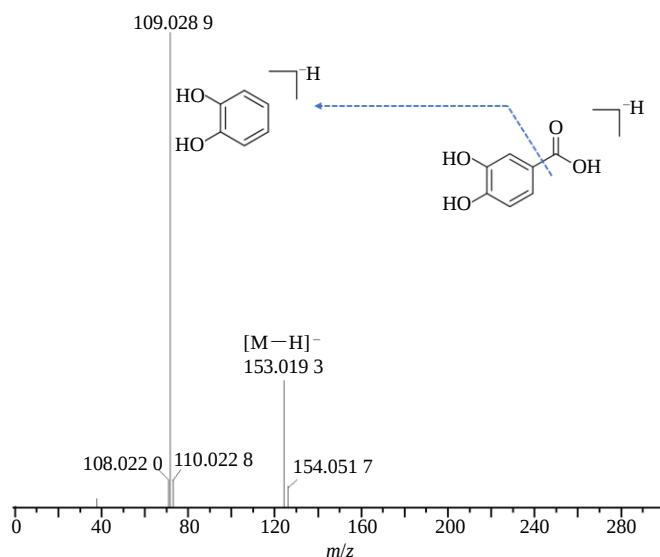


图 2 原儿茶酸的 ESI-MS 图 (负离子) 及裂解途径

Fig. 2 ESI-MS and proposed fragmentation pathway of protocatechuic acid in negative ion mode

离子峰为 m/z 329.087 3 [M-H]⁻ (C₁₄H₁₇O₉), 特征碎片离子峰有 m/z 167.034 2、152.011 5, 其中 m/z 167.034 2 是由准分子离子峰失去 1 分子 C₆H₁₀O₅ 所产生的碎片离子, 该碎片继续脱去 1 分子 CH₃, 产

生碎片离子 m/z 152.011 5。通过与文献^[13]比对, 推断该化合物为香草酸-4-O- β -D-葡萄糖苷 (vanillic acid-4-O- β -D-glucopyranoside), 可能的裂解规律如图 3 所示。

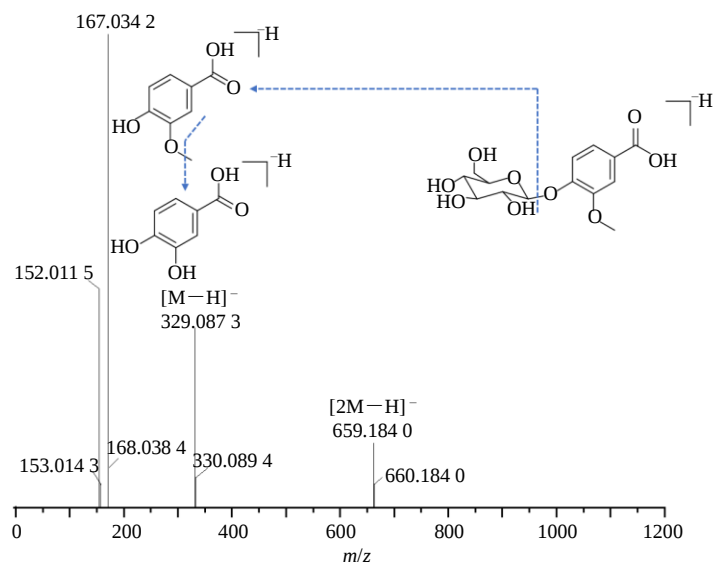


图 3 香草酸-4-O-β-D-葡萄糖苷的 ESI-MS 图 (负离子) 及裂解途径

Fig. 3 ESI-MS and proposed fragmentation pathway of vanillic acid-4-O-β-D-glucopyranoside in negative ion mode

3.2.3 樱草苷的鉴定 负离子模式下, 化合物 **17** 的保留时间为 10.35 min, 准分子离子峰为 m/z 475.142 0 $[M-H]^-$ ($C_{20}H_{27}O_{13}$), 特征碎片离子峰有 m/z 312.107 8、281.063 9, 其中 m/z 312.107 8 是由准分子离子峰失去

1 分子 $C_5H_8O_5$ 和 1 分子 CH_3 所产生的碎片离子, 该碎片继续脱去 1 分子 CH_3O , 产生碎片离子 m/z 281.063 9。通过与文献^[14]比对, 推断该化合物为樱草苷, 可能的裂解规律如图 4 所示。

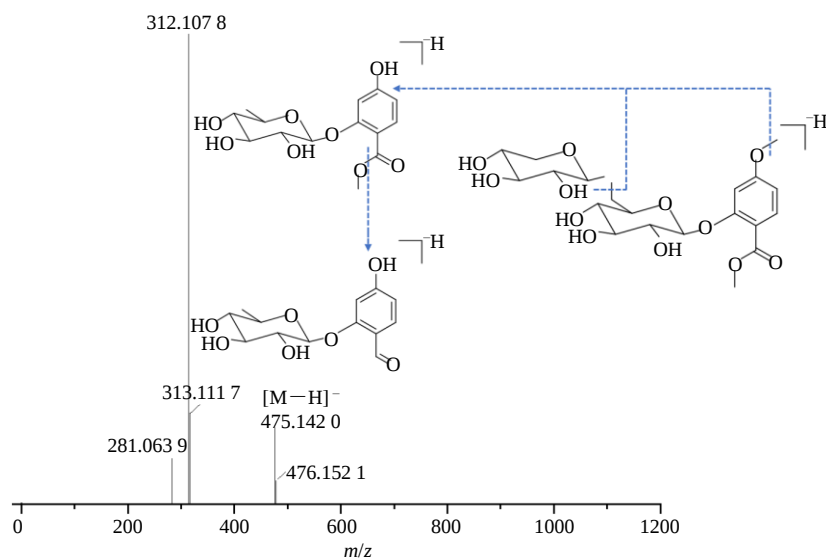


图 4 樱草苷的 ESI-MS 图 (负离子) 及裂解途径

Fig. 4 ESI-MS and proposed fragmentation pathway of primeverin in negative ion mode

3.2.4 corchoionoside C 的鉴定 负离子模式下, 化合物 **24** 的保留时间为 19.08 min, 准分子离子峰为 m/z 385.185 5 $[M-H]^-$ ($C_{19}H_{29}O_8$), 特征碎片离子峰有 m/z 431.190 6、 m/z 223.133 3、 m/z 153.091 3, 其中 m/z 431.190 6 是由准分子离子峰得到 1 分子甲酸所产生的碎片离子, 准分子

离子峰脱去 1 分子 $C_6H_{10}O_5$ 产生碎片离子 m/z 223.133 3, 继续脱去 1 分子 C_4H_6O 得到碎片离子 m/z 153.091 3。紫外光谱中, 该成分最大吸收波长 242 nm, 通过与文献^[15]和使用标准品比对, 推断该化合物为 corchoionoside C, 可能的裂解规律如图 5 所示。

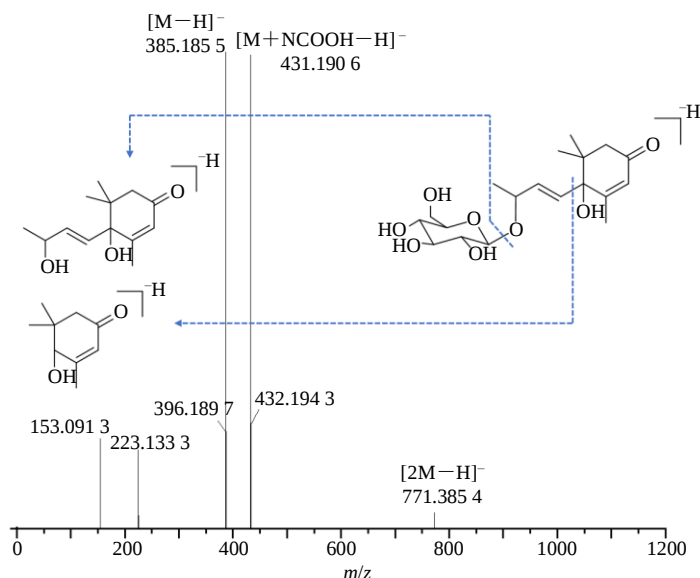


图 5 Corchoionoside C 的 ESI-MS 图 (负离子) 及裂解途径

Fig. 5 ESI-MS and proposed fragmentation pathway of corchoionoside C in negative ion mode

3.3 狗脊药材及饮片中原儿茶酸的含量测定

3.3.1 系统适用性试验 按“2.4”项下的色谱条件进行检测,以原儿茶酸计算理论塔板数大于 6000,分离度大于 1.5,对照品、狗脊药材、饮片及狗脊药材酸水解样品的色谱图见图 6 所示,该色谱条件下,原儿茶酸能够达到基线分离,可进行后续检测分析。

3.3.2 线性关系考察 精密吸取原儿茶酸对照品储备溶液,依次稀释至不同质量浓度分别为 202.00、101.00、33.67、16.83、5.61、2.81、0.94 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。按照“2.4”项下色谱条件测定,以对照品质量浓度为横坐标 (X),以色谱峰面积积分值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线,得到回归方程 $Y=$

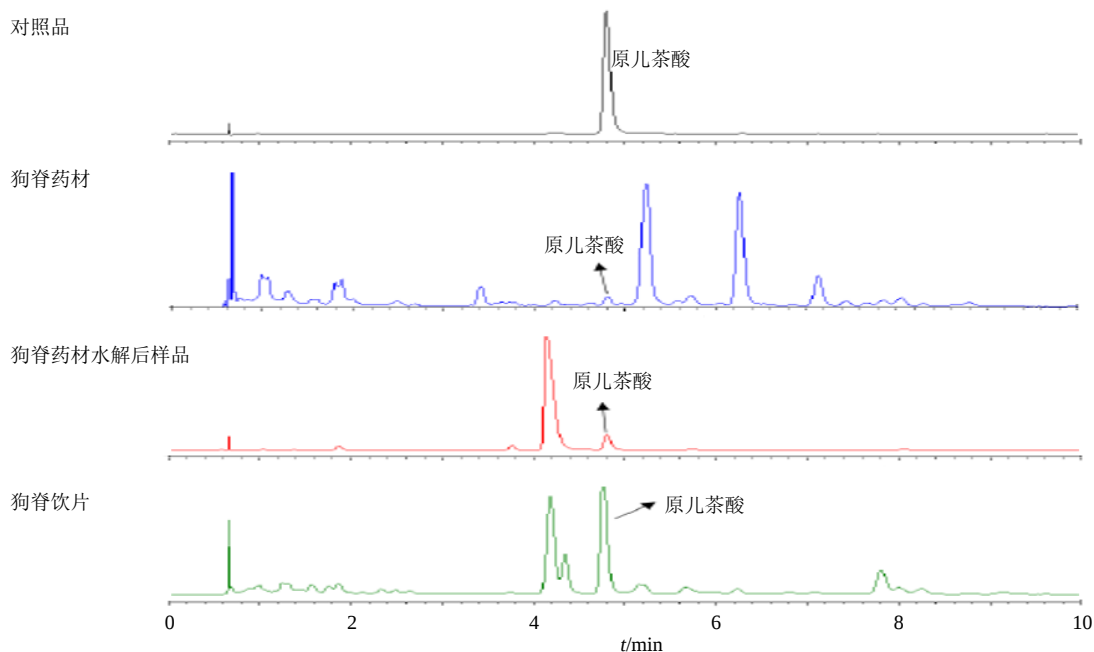


图 6 原儿茶酸及狗脊样品的 UPLC 图 (254 nm)

Fig. 6 UPLC of protocatechuic acid and *C. barometz* samples (254 nm)

6 970.5 X + 509.67 ($R^2=0.999\ 9$), 结果表明质量浓度和峰面积线性关系良好。

3.3.3 检测限与定量限测定 取原儿茶酸对照品储备溶液用甲醇-1%冰醋酸水溶液 (70:30) 逐级稀释后, 测得原儿茶酸的检测限 ($S/N=3$) 为 0.20 $\mu\text{g/mL}$, 定量限 ($S/N=10$) 为 0.79 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3.4 精密度试验 精密吸取 101.00 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液, 按“2.4”项下色谱条件连续重复进样 6 次, 记录峰面积, 计算 RSD 值。结果显示原儿茶酸平均峰面积为 702 603.8, RSD 为 0.10%, 表明仪器精密度良好。

3.3.5 重复性试验 取狗脊药材样品粉末 12 份, 分别制备酸水解前后供试品溶液, 按“2.4”项下色谱条件进样, 记录峰面积, 计算原儿茶酸峰面积的 RSD 值。结果显示酸水解前原儿茶酸峰面积的 RSD 值为 1.97%, 酸水解后原儿茶酸峰面积的 RSD 为 2.86%, 表明该方法重复性良好。

3.3.6 稳定性试验 分别取狗脊酸水解前后供试品溶液, 按“2.4”项下方法于 0、2、4、8、12、24、48 h 进样测定, 记录峰面积, 计算原儿茶酸峰面积的 RSD 值。结果显示, 酸水解前原儿茶酸峰面积的 RSD 为 1.65%, 酸水解后原儿茶酸峰面积的 RSD 为 1.20%, 该结果表明狗脊药材酸水解前后供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

3.3.7 加样回收率试验 分别称取已知测定的狗脊药材 (批号 20191125-4) 1.0 g 共 12 份, 分别精密加入原儿茶酸对照品, 按供试品制备方法制备酸水解前后供试品溶液, 并按照“2.4”项下色谱条件测定, 计算回收率。加样回收试验结果表明, 狗脊酸水解前原儿茶酸的平均加样回收率为 101.90%, RSD 为 1.75%, 狗脊酸水解后原儿茶酸的平均加样回收率为 99.11%, RSD 为 1.31%, 表明检测系统对该试验方法测定的结果影响较小。

3.3.8 狗脊药材酸水解前后及饮片中原儿茶酸的含量 按照供试品制备方法, 对 4 批狗脊药材进行前处理制备供试品溶液, 并按“2.4”项下色谱条件进样测定, 利用外标法计算原儿茶酸的质量分数, 结果见表 3。10 批狗脊饮片中的原儿茶酸的质量分数均大于 0.020%, 符合《中国药典》2020 年版规定标准。狗脊药材中原儿茶酸的质量分数在 0.003 8%~0.005 3%, 远小于《中国药典》标准, 但狗脊药材经酸水解处理后, 原儿茶酸的质量分数显著升高, 达到 0.205 2%~0.450 1%。

表 3 酸水解前后狗脊药材及饮片中原儿茶酸的含量

Table 3 Content of protocatechuic acid in crude drug and decoction pieces of *C. barometz* before and after acid hydrolysis

编号	批号	原儿茶酸/%	
		水解前	水解后
药材 1	20200104-1	0.005 1	0.215 0
药材 2	20200104-2	0.003 8	0.245 5
药材 3	20200104-3	0.005 3	0.205 2
药材 4	20191125-4	0.005 0	0.450 1
饮片 1	20200104-1	0.586 5	—
饮片 2	20200104-2	0.648 8	—
饮片 3	20200104-3	0.661 9	—
饮片 4	20191125-4	0.556 0	—
饮片 5	20190925	0.665 2	—
饮片 6	20191201	0.835 7	—
饮片 7	20190514	0.817 7	—
饮片 8	20200409	0.597 1	—
饮片 9	20200622	0.617 1	—
饮片 10	20201002	0.850 9	—

4 讨论

本实验针对狗脊药材的 UPLC-Q-TOF/MS 方法分别考察了不同的色谱柱, 包括 Waters BEH C₁₈、Waters HSS T3、Agilent SB C₈、Waters CORTECS T3、Waters BEH HILIC、Waters BEH Amide、HALO RP-Amide 等, 发现狗脊提取物中的主要成分在 Waters CORTECS T3 色谱柱中具有较好的保留和分离度; 同时考察了不同的洗脱溶剂, 有机相筛选了甲醇、乙腈以及不同比例的甲醇与乙腈混合体系, 水相筛选了不同浓度的有机酸, 最终确定有机相为乙腈-甲醇 (70:30)、水相为 0.1% 甲酸, 此时洗脱出的色谱峰较多, 分离度较好。此外, 也针对质谱参数进行了考察, 特别是离子源的温度、毛细管电压、去溶剂气温度等, 最终确定了本实验的质谱条件。

本实验基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术从狗脊药材中共鉴定出 26 个化合物, 其中原儿茶酸、原儿茶醛、1-O-咖啡酰- β -D-葡萄糖、corchoionoside C 与对照品比对, 但质谱峰中仍存在部分未知或未鉴定的成分, 将来有必要采用制备纯化分离的方法对狗脊中未鉴定的成分进行分离鉴定, 以期对狗脊指标性成分的筛选和药效物质基础研究提供科学依据。

此外, 本实验建立了同时测定狗脊饮片和药材中原儿茶酸的 UPLC 含量测定方法, 并比较了狗脊饮片与狗脊药材中原儿茶酸含量的差异, 结果发现狗脊药材中原儿茶酸的含量远低于狗脊饮片中的含量, 说明饮片加工过程药材中部分成分分解产生了较多的原儿茶酸。因此, 本实验尝试采用酸水解的方法对狗脊药材进行前处理, 结果发现, 狗脊药材中原儿茶酸的含量平均增加约 58 倍, 远超过《中国药典》狗脊饮片的限量标准, 但仍低于饮片中的含量。显然, 采用原儿茶酸单一成分作为狗脊药材的质控指标并不合适, 有必要挖掘药材中其他指标性成分对狗脊药材进行全面质量控制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 235.
- [2] 徐家星, 王业玲, 王建军, 等. 濒危植物金毛狗的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(S1): 134-140.
- [3] 时圣明, 袁永兵, 兰新新, 等. 狗脊的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 489-492.
- [4] 徐 钢, 单国顺, 鞠成国, 等. 狗脊升华与挥发性成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析 [J]. 中草药, 2013, 44(16): 2308-2312.
- [5] 胡彦武, 于俊林. 中药狗脊的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 275-276.
- [6] 鞠成国, 徐刚, 宋勇军, 等. 不同产地生制狗脊中总酚酸含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 24-26.
- [7] 许树, 步显坤, 周翎, 等. 烫狗脊中的酚性化合物研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 71-73.
- [8] 谢美萍, 李兰, 鲁安琪, 等. 狗脊中的酚酸及其苷类成分 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 194-199.
- [9] Rivera-Piza A, An Y J, Kim D K, et al. Protocatechuic acid enhances osteogenesis, but inhibits adipogenesis in C3H10T1/2 and 3T3-L1 cells [J]. *J Med Food*, 2017, 20(3): 309-319.
- [10] Jang S A, Song H S, Kwon J E, et al. Protocatechuic acid attenuates trabecular bone loss in ovariectomized mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7280342.
- [11] Min S W, Ryu S N, Kim D H. Anti-inflammatory effects of black rice, cyanidin-3-O-beta-D-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(8): 959-966.
- [12] Borate A R, Suralkar A A, Birje S S, et al. Antihyperlipidemic effect of protocatechuic acid in fructose induced hyperlipidemia in rats [J]. *Internat J Pharma Bio Sci*, 2011, 2(4): 456-460.
- [13] Chemam Y, Benayache S, Marchioni E, et al. On-line screening, isolation and identification of antioxidant compounds of *Helianthemum ruficomum* [J]. *Molecules*, 2017, 22(2): 239.
- [14] 徐钢, 孙娜, 赵敏杰, 等. 狗脊毛甲醇提取物 UPLC/Q-TOF-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 46-50.
- [15] Nguyen X C, Chau V M, Phan V K, et al. Inhibitors of osteoclast formation from rhizomes of *Cibotium barometz* [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(9): 1673-1677.

[责任编辑 时圣明]