

基于指纹图谱结合化学模式识别及多酚类成分含量测定的大盘龙七质量评价

任 慧, 胡 静, 崔小敏, 鲁文静, 李 宁, 曲 彤, 陈志永*

陕西省中医药研究院, 陕西 西安 710003

摘要:目的 建立大盘龙七 *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* 的 HPLC 指纹图谱及多酚类成分的含量测定方法, 为大盘龙七药材质量控制及临床应用提供依据。方法 采用 Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 275 nm, 柱温 25 °C; 对 10 批大盘龙七药材进行指纹图谱构建, 基于指纹图谱相似度分析结合聚类分析与主成分分析, 同时测定熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-*O*-没食子酰岩白菜素、11-*O*-没食子酰岩白菜素、儿茶素没食子酸酯的含量。结果 建立了大盘龙七药材的 HPLC 指纹图谱, 其中 S5 的相似度为 0.752, 其余批次的相似度均大于 0.92, 共标定了 14 个共有峰, 指认出 7 个色谱峰, 分别为熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-*O*-没食子酰岩白菜素、11-*O*-没食子酰岩白菜素、儿茶素没食子酸酯。聚类分析将 10 批大盘龙七药材分为 3 类; 经主成分分析, 主成分 1~4 是影响药材样品质量评价的主要因子; 采用正交偏最小二乘法判别分析标记了大盘龙七中 6 个差异性成分。含量测定结果表明 10 批大盘龙七药材中熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-*O*-没食子酰岩白菜素、11-*O*-没食子酰岩白菜素、儿茶素没食子酸酯的含量范围分别为 7.30~63.24、0.26~2.98、15.96~78.04、1.54~11.17、0.97~2.54、2.09~7.38、0.64~12.30 mg/g。结论 建立的大盘龙七药材的 HPLC 指纹图谱及多酚类成分的含量测定方法操作简便、重复性好, 可用于大盘龙七药材的定性定量分析, 为大盘龙七药材的质量评价提供参考。

关键词: 大盘龙七; 秦岭岩白菜; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析; 定量测定; 熊果苷; 没食子酸; 岩白菜素; 儿茶素; 4-*O*-没食子酰岩白菜素; 11-*O*-没食子酰岩白菜素; 儿茶素没食子酸酯

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)19-6452-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.026

Quality evaluation of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* based on fingerprints combination with chemical pattern recognition and content determination of phenolic compounds

REN Hui, HU Jing, CUI Xiao-min, LU Wen-jing, LI Ning, QU Tong, CHEN Zhi-yong

Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprints of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* and content determination of phenolic compounds, and provide reference for the quality control and clinical application of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*. **Methods** The HPLC separation was carried out by gradual elution with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution. The chromatographic conditions: Agilent 5 TC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), flowing at 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 275 nm and the column temperature was 25 °C. The fingerprints of 10 batches of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* were constructed. Based on the similarity analysis of fingerprints, cluster analysis and principal component analysis, the content of arbutin, gallic acid, bergenin, catechin, 4-*O*-galloyl bergenin, 11-*O*-galloyl bergenin and catechin gallate were determined. **Results** The HPLC fingerprints of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* were established, the similarity of S5 was 0.752, and the similarities of other batches were above 0.92. A total of 14 common peaks were demarcated and seven common peaks were identified as arbutin, gallic acid, bergenin, catechin, 4-*O*-galloyl bergenin, 11-*O*-galloyl bergenin and catechin gallate. The 10 batches of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* were divided into three categories by hierarchical cluster analysis (HCA). According to the principal component analysis (PCA), the principal components 1—4 were the main factors affecting the quality evaluation of the samples.

收稿日期: 2023-03-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973419); 陕西省重点研发计划一般项目 (2022SF-544); 陕西省中医药管理局“双链融合”中青年科研创新团队 (2022-SLRH-YQ-003); 陕西省中医药管理局科研项目 (2021-ZZ-JC033); 陕西省中医药研究院“苗圃培育计划”项目 (2021-05)

作者简介: 任 慧 (1989—), 女, 博士, 副研究员, 从事中药质量控制与活性成分研究。E-mail: renhui1.cool@163.com

*通信作者: 陈志永 (1987—), 男, 博士, 副研究员, 从事中药质量控制与活性成分研究。E-mail: chenzyong0612@sina.com

Six differential components in *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* were marked by partial least squares discrimination analysis (OPLS-DA). The contents of arbutin, gallic acid, bergenin, catechin, 4-*O*-galloyl bergenin, 11-*O*-galloyl bergenin and catechin gallate were 7.30—63.24, 0.26—2.98, 15.96—78.04, 1.54—11.17, 0.97—2.54, 2.09—7.38 and 0.64—12.30 mg/g, respectively. **Conclusion** The established HPLC fingerprints and phenolic compounds determination method are simple and reproducible, which can be used for qualitative and quantitative analysis of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* and provide reference for quality evaluation of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*.

Key words: *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*; *Bergenia scopulosa* T. P. Wang; fingerprints; hierarchical cluster analysis; principal component analysis; content determination; arbutin; gallic acid; bergenin; catechin; 4-*O*-galloyl bergenin; 11-*O*-galloyl bergenin; catechin gallate

大盘龙七 *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* 为虎耳草科岩白菜属植物秦岭岩白菜 *Bergenia scopulosa* T. P. Wang 的干燥根茎^[1], 是著名的太白“七药”之一, 主要分布于陕西秦岭和祁连山地区^[2], 临床主要用于泄泻、痢疾、崩漏、带下、脘腹胀痛、黄水疮、秃疮、疥癣等疾病的治疗^[1]。因“七药”多年来以习习相因、师传口授的方式流传导致各区域各民族所使用盘龙七的药材来源不同, 秦岭岩白菜作为盘龙七的来源之一在临床使用。陕西关中一带(包括陕西周至县、蓝田县、眉县等地)一直将秦岭岩白菜作为盘龙七使用, 并且《秦岭巴山天然药物志》^[3]、《华山药物志》^[4]、《秦岭七药》^[5]和《太白七药原色图鉴》^[6]中均收录盘龙七的来源为秦岭岩白菜的根茎,《中国植物志》中也记载秦岭岩白菜别名为盘龙七^[2]。为了与陕西商洛地区以蓼科植物大海蓼 *Polygonum milletii* (H. Lév.) H. Lév. 为来源的盘龙七相区分, 2015年版《陕西省药材标准》中将秦岭岩白菜的副名规定为大盘龙七^[1]。

目前从大盘龙七中分离鉴定的化学成分主要有异香豆素、黄酮、酚酸、蒽醌及氧苷、碳苷等^[7-10]。关于大盘龙七药材的质量标准, 目前仅有2015年版《陕西省药材标准》收录, 薄层鉴别和含量测定均是以岩白菜素为指标成分。另外, 有学者对大盘龙七药材中儿茶素或没食子酸单一成分的含量进行了测定^[11-12], 郭琳等^[13]采用薄层色谱对大盘龙七中儿茶素、岩白菜素、没食子酸进行同时鉴别, 并建立了同时测定药材中儿茶素、岩白菜素和芦丁含量的方法。笔者前期研究发现, 大盘龙七药材中富含没食子酸与儿茶素或岩白菜素的酯化产物, 如4-*O*-没食子酰岩白菜素、11-*O*-没食子酰岩白菜素、3-*O*-没食子酰儿茶素等^[10], 这些成分可水解成大盘龙七中的主要活性成分没食子酸、儿茶素、岩白菜素在体内代谢发挥作用^[14]。然而, 目前大盘龙七药材的含量测定研究并没有涉及这类成分的研究, 也没有对药

材指纹图谱的构建及成分指认。指纹图谱作为一种中药质量控制模式, 可以结合化学模式识别分析对中药成分进行有效的分析, 并且与多成分薄层鉴别和多成分含量测定相结合进一步达到中药质量评价的目的^[15-17]。因此, 本实验首次对大盘龙七药材的指纹图谱进行研究, 并首次建立了同时测定大盘龙七中熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-*O*-没食子酰岩白菜素、11-*O*-没食子酰岩白菜素、儿茶素没食子酸酯共7个成分含量的方法, 为太白“七药”大盘龙七药材的整体质量评价提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪, 配置 VWD 检测器和 Agilent Chem Station 工作站(美国安捷伦科技有限公司); KQ-400DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); SQP 型 1/10 万电子天平和 SQP 型 1/1 万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 试剂

熊果苷(批号 18061203)、岩白菜素(批号 17061307)、儿茶素(批号 18061201)对照品购自上海圻明生物有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$ 。没食子酸对照品为实验室自制, 经 HPLC 检测, 质量分数 $\geq 98\%$ 。4-*O*-没食子酰岩白菜素(批号 191025, 质量分数 97.10%)、11-*O*-没食子酰岩白菜素(批号 22021402, 质量分数 97.47%)、儿茶素没食子酸酯(批号 21110401, 质量分数 98.72%)对照品购自成都普菲德生物技术有限公司。乙腈为色谱纯(Fisher 化学试剂公司), 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

本实验所用大盘龙七药材分别收集于陕西、河北, 经陕西省中医药研究院陈志永副研究员鉴定为秦岭岩白菜 *B. scopulosa* T. P. Wang 的根茎, 大盘龙七样品来源见表 1。

表1 秦岭岩白菜药材样品信息

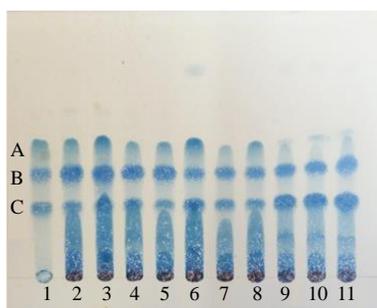
Table 1 Sources of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*

序号	药材来源	日期
S1	陕西眉县	2019-09-16
S2	河北安国	2019-11-12
S3	河北安国	2019-11-15
S4	陕西眉县	2019-12-13
S5	陕西眉县	2019-12-14
S6	陕西药王谷	2021-08-08
S7	陕西红河谷	2021-08-08
S8	陕西蓝田县	2021-10-20
S9	陕西周至县	2021-10-20
S10	陕西周至县	2021-11-08

2 方法和结果

2.1 薄层鉴别

取过60目筛的大盘龙七药材粉末0.2 g,加50%甲醇溶液20 mL,超声处理20 min,滤过。滤液蒸干,残渣加50%甲醇1.5 mL溶解,作为供试品溶液。另取儿茶素、岩白菜素、熊果苷对照品制成质量浓度分别为0.3 mg/mL的混合对照品溶液,作为对照品溶液。吸取对照品溶液5 μ L,供试品溶液各2 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(4:4:1.5)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以2%三氯化铁溶液-1%铁氰化钾溶液(1:1)的混合溶液。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,见图1。



1-混合对照品溶液 2~11-10批大盘龙七药材样品溶液 A-儿茶素 B-岩白菜素 C-熊果苷

1-mixed reference substances solution 2-11-sample solutions of 10 batches of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* A-catechin B-bergenin C-arbutin

图1 10批大盘龙七药材及对照品的薄层色谱图

Fig. 1 Thin-layer chromatogram for 10 batches of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* and reference substances

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~12 min, 2% A; 12~14 min, 2%~11% A; 14~40 min, 11%~12% A; 40~85 min, 12%~24% A; 85~90 min, 24% A),体积流量为1.0 mL/min,检测波长为275 nm;柱温为25 $^{\circ}$ C;进样量10 μ L。

2.2.2 供试品溶液的制备 取大盘龙七药材样品粉末(过60目筛)约0.1 g,精密称定,置于100 mL具塞锥形瓶中,精密加入60%甲醇30 mL,称定质量,超声处理30 min,放冷,用60%甲醇补足减失质量,用0.45 μ m微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 混合对照品溶液的制备 取熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-O-没食子酰岩白菜素、11-O-没食子酰岩白菜素和儿茶素没食子酸酯对照品适量,精密称定,用60%甲醇水溶液溶解,配制质量浓度分别为265、75、260、150、48、55、51.5 μ g/mL的混合对照品溶液。

2.2.4 精密度试验 取“2.2.2”项下同一份(S1)供试品溶液,依据“2.2.1”项下色谱条件测定,连续进样测定6次,因岩白菜素峰分离度以及对称性良好,色谱响应值高,故以岩白菜素峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,14个共有峰相对保留时间的RSD值为0.15%~4.75%,相对峰面积的RSD值为0.20%~3.83%,表明本方法精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 取“2.2.2”项下同一份(S1)供试品溶液,分别在第0、4、8、12、24、48小时按照“2.2.1”项下色谱条件测定,以岩白菜素峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,14个共有峰相对保留时间的RSD值为0.31%~4.88%,相对峰面积的RSD值为0.23%~3.69%。

2.2.6 重复性试验 取同一批药材样品(S1),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,平行制备6份,按“2.2.1”项下色谱条件测定,以岩白菜素峰的保留时间和峰面积为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,14个共有峰相对保留时间的RSD为0.18%~1.41%,相对峰面积的RSD值为1.11%~4.21%,表明本方法重复性良好。

2.2.7 HPLC 指纹图谱的建立 取10批次大盘龙七药材样品,分别按照“2.2.2”项下方法制备供试品

溶液，再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱数据，并将其导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）进行数据分析处理。选取S1样品的色谱图为参照图谱，采用多点校正方式，用中位数法生成10批次大盘龙七药材样品的HPLC指纹图谱（图2）和对照指纹图谱（图3）。通过对10批次样品指纹图谱分析，发现图中有14个峰为所有样品色谱图中的共有色谱峰，因此，确定此14个色谱峰为大盘龙七药材的共有峰。

2.2.8 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10批大盘龙七药材样品进行相似度分析，见表2。结果，S1~S4、S6~S10的相似度均大于0.920，表明这9个批次药材的质量相对稳定，但各成分含量存在较大差异；而S5样品的相似度为0.752，表明S5与其他批次药材差异较大，推测可能与产地、生长年限、采收时间、加工方法等因素有关。

2.2.9 共有峰指认归属 通过共有峰与混合对照品

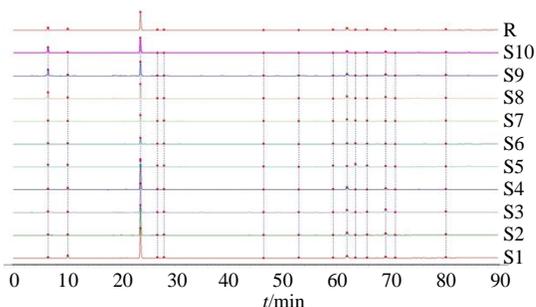


图2 10批大盘龙七药材的指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 10 batches of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*

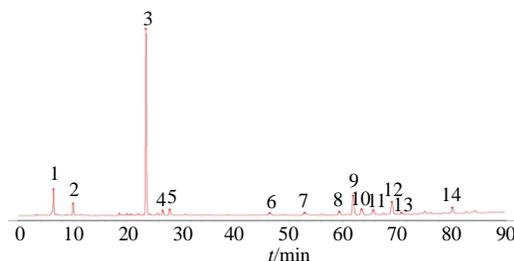


图3 大盘龙七药材的对照指纹图谱

Fig. 3 HPLC control fingerprint of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*

溶液（图4）的保留时间进行对比，指认了其中7个共有峰，分别为1号峰（熊果苷）、2号峰（没食子酸）、3号峰（岩白菜素）、5号峰（儿茶素）、7号峰（4-O-没食子酰岩白菜素）、9号峰（11-O-没食子酰岩白菜素）和12号峰（儿茶素没食子酸酯），其中3号峰（岩白菜素）分离度以及对称性良好，色谱响应值高，且廉价易得，故选择3号峰（岩白菜素）作为参照峰（S），计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

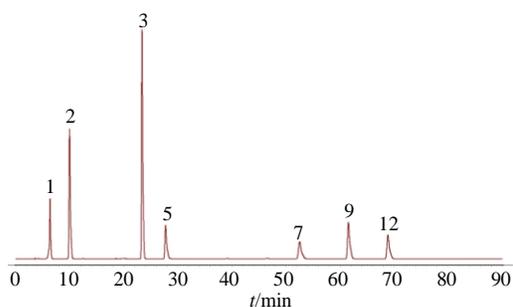
2.3 化学模式识别分析

2.3.1 聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 运用SPSS 19统计分析软件对10批大盘龙七药材样品指纹图谱中14个共有峰的峰面积为变量进行HCA，以组间联接法聚类，欧氏距离为指标进行HCA，结果见图5。结果显示，当欧氏距离为15时，10批大盘龙七药材样品聚为2类：S1~S4聚为一类，S5~S10聚为另一类。当欧氏距离为5时，10批大盘龙七药材样品聚为3类：S1~S4聚为一类，S5~S7聚为一类，S8和S10聚为一类。

表2 相似度评价结果

Table 2 Results of similarity evaluation

编号	相似度										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.996	0.991	1.000	0.695	0.957	0.886	0.915	0.911	0.935	0.988
S2	0.996	1.000	0.997	0.997	0.700	0.961	0.903	0.922	0.919	0.941	0.992
S3	0.991	0.997	1.000	0.992	0.687	0.949	0.891	0.924	0.922	0.944	0.989
S4	1.000	0.997	0.992	1.000	0.695	0.960	0.895	0.918	0.913	0.936	0.989
S5	0.695	0.700	0.687	0.695	1.000	0.844	0.830	0.716	0.714	0.728	0.752
S6	0.957	0.961	0.949	0.960	0.844	1.000	0.968	0.928	0.920	0.937	0.978
S7	0.886	0.903	0.891	0.895	0.830	0.968	1.000	0.890	0.877	0.892	0.925
S8	0.915	0.922	0.924	0.918	0.716	0.928	0.890	1.000	0.999	0.997	0.959
S9	0.911	0.919	0.922	0.913	0.714	0.920	0.877	0.999	1.000	0.998	0.956
S10	0.935	0.941	0.944	0.936	0.728	0.937	0.892	0.997	0.998	1.000	0.973
R	0.988	0.992	0.989	0.989	0.752	0.978	0.925	0.959	0.956	0.973	1.000



1-熊果苷 2-没食子酸 3-岩白菜素 5-儿茶素 7-4-O-没食子酰岩白菜素 9-11-O-没食子酰岩白菜素 12-儿茶素没食子酸酯
1-arbutin 2-gallic acid 3-bergenin 5-catechin 7-4-O-galloyl bergenin 9-11-O-galloyl bergenin 12-catechin gallate

图 4 7 种成分的混合对照品的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC chromatogram of mixed reference substances of seven components

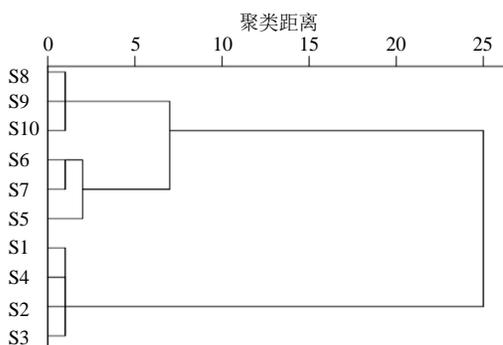


图 5 10 批大盘龙七药材的聚类分析树状图

Fig. 5 Dendrogram of hierarchical cluster analysis for 10 batches of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*

2.3.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 采用 MarkerLynx^{xs} 以 10 批大盘龙七药材样品指纹图谱中 14 个共有峰的峰面积为变量进行 PCA, 计算特征值及方差贡献率。以特征值 > 1 为标准, 得到 4 个主成分, 其累积方差贡献率达到 96.445%, 表明前 4 个主成分可代表大盘龙七药材样品的基本特征和大部分信息。结果见表 3、4。峰 4~6、8、10、11、13 在主成分 1 上具有较高的正载荷, 峰 3、7、9、12、14 在主成分 2 上具有较高的正载荷, 峰 2 在主成分 3 上具有较高的正载荷, 峰 1 在主成分 4 上具有较高的正载荷。采用 MarkerLynx^{xs} 绘制 PCA 得分图, 其结果与 HCA 结果基本一致, 见图 6。

2.3.3 正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 将 10 批大盘龙七药材样品指纹图谱中 14 个共有峰

表 3 特征值和累积方差贡献率

Table 3 Eigen value and cumulative variance contribution rate

主成分因子	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	7.538	53.840	53.840
2	3.403	24.310	78.150
3	1.561	11.147	89.296
4	1.001	7.149	96.445

表 4 主成分因子载荷矩阵

Table 4 Load matrix of principal component factors

共有峰号	载荷			
	1	2	3	4
1	-0.407	-0.505	0.310	0.658
2	0.369	0.307	0.860	-0.124
3	-0.496	0.799	0.187	-0.263
4	0.931	0.129	0.318	-0.023
5	0.801	0.582	-0.013	-0.034
6	0.888	-0.028	-0.422	-0.100
7	0.176	0.951	-0.052	0.114
8	0.919	0.193	0.309	0.135
9	-0.731	0.531	-0.166	-0.033
10	0.943	0.063	0.007	0.273
11	0.909	0.105	-0.150	0.356
12	-0.613	0.675	0.019	0.339
13	0.817	0.259	-0.481	0.037
14	-0.723	0.546	-0.177	0.348

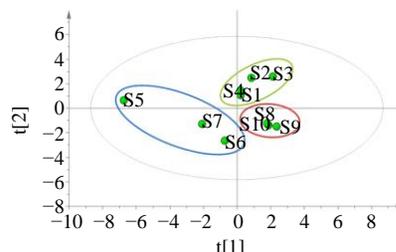


图 6 10 批大盘龙七药材的 PCA 得分图

Fig. 6 PCA score plot for 10 batches of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*

的峰面积导入 MarkerLynx^{xs} 进行 OPLS-DA, 在该模型下 R^2_X 为 0.772, R^2_Y 为 0.819, Q^2 为 0.668, 均大于 0.5, 表明该模型具有较好的预测能力。10 批大盘龙七药材样品的 OPLS-DA 模型得分图见图 7, 结果显示与 HCA 和 PCA 分类结果一致。然后, 通过提取 OPLS-DA 模型中 14 个变量的重要值 (variable importance in projection, VIP), 以 VIP > 1 为标准, 筛选出 1 号峰 (熊果苷)、3 号峰 (岩白菜素)、7 号峰 (4-O-没食子酰岩白菜素)、5 号峰 (儿茶素)、9 号峰 (11-O-没食子酰岩白菜素) 和 6 号峰 (图 8) 可能是导致这 10 批大盘龙七药材之间产生差异的主要特征成分, 对分类结果具有显著影响。

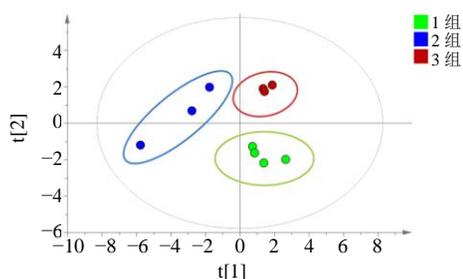


图7 10批大盘龙七药材的 OPLS-DA 得分图

Fig. 7 OPLS-DA score plot for 10 batches of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*

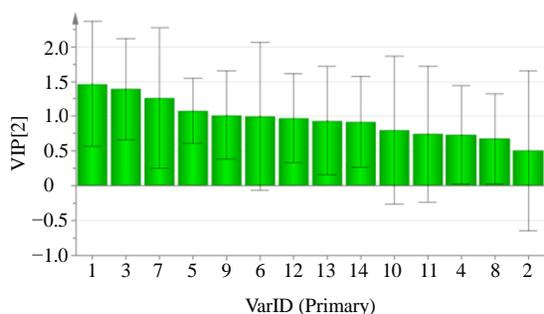


图8 10批大盘龙七药材的 OPLS-DA 的 VIP 值

Fig. 8 VIP value of OPLS-DA for 10 batches of *Bergeniae Scopulosae Rhizoma*

2.4 多成分含量测定

2.4.1 色谱条件 Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈 (A)-0.1%磷酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~12 min, 2% A; 12~14 min, 2%~11% A; 14~40 min, 11%~12% A; 40~85 min, 12%~24% A; 85~90 min, 24% A); 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 275 nm; 柱温为 25 °C; 进样量 10 μL。

2.4.2 供试品溶液的制备 取大盘龙七药材样品粉末 (过 60 目筛) 约 0.1 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 60% 甲醇 30 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 用 60% 甲醇补足减失质量, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4.3 混合对照品溶液的制备 取熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-O-没食子酰岩白菜素、11-O-没食子酰岩白菜素、儿茶素没食子酸酯对照品适量, 精密称定, 加 60% 甲醇水溶液配制成质量浓度分别为 530、150、520、300、96、110、103 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.4.4 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mL 置 10 mL 量瓶中,

加 60% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按照“2.4.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 测定峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 得线性回归方程, 见表 5。

表 5 7 个成分的线性关系

Table 5 Linear relationship of 7 components

化合物	线性范围/(μg mL ⁻¹)	线性方程	r
熊果苷	5.30~530.00	Y=3.502 5 X-1.546 6	0.999 9
没食子酸	1.50~150.00	Y=28.838 0 X-102.790 0	0.999 5
岩白菜素	5.20~520.00	Y=13.368 0 X-151.130 0	0.999 5
儿茶素	3.00~300.00	Y=5.219 9 X-34.445 0	0.999 5
4-O-没食子酰岩白菜素	0.96~96.00	Y=14.123 0 X-1.705 2	0.999 9
11-O-没食子酰岩白菜素	1.10~110.00	Y=20.531 0 X-3.326 9	0.999 9
儿茶素没食子酸酯	1.03~103.00	Y=16.180 0 X-7.616 6	0.999 7

2.4.5 精密度试验 精密吸取“2.4.4”项下同一份混合对照品溶液, 依据“2.4.1”项下色谱条件测定, 连续进样 6 次, 记录峰面积。计算得熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-O-没食子酰岩白菜素、11-O-没食子酰岩白菜素和儿茶素没食子酸酯峰面积的 RSD 值分别为 0.31%、0.08%、0.38%、0.50%、0.16%、0.13% 和 0.18%, 表明本方法精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 取同一供试品 (S1) 溶液分别在第 0、4、8、12、24、48 h 进样测定, 计算熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-O-没食子酰岩白菜素、11-O-没食子酰岩白菜素和儿茶素没食子酸酯峰面积的 RSD 值分别为 1.18%、3.00%、0.25%、2.08%、3.68%、0.47% 和 3.17%, 表明本方法所制供试品在 48 h 内稳定。

2.4.7 重复性试验 取同一批次药材 (S1), 按“2.4.2”项下方法制备供试品溶液, 平行制备 6 份, 按“2.4.1”项下色谱条件测定, 测定含量, 计算熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-O-没食子酰岩白菜素、11-O-没食子酰岩白菜素和儿茶素没食子酸酯的 RSD 值分别为 2.85%、1.43%、0.59%、1.93%、1.55%、1.56% 和 2.54%, 结果表明该方法重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 取同一批大盘龙七药材样品粉末 (S1), 精密称定 6 份, 每份 0.05 g, 分别加入约与样品中熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-O-没食子酰岩白菜素、11-O-没食子酰岩白菜素和儿茶素没食子酸酯含量相同的对照品, 按“2.4.2”项方

法制备供试品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算平均加样回收率。结果,熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-*O*-没食子酰岩白菜素、11-*O*-没食子酰岩白菜素和儿茶素没食子酸酯的平均加样回收率分别为 99.09%、98.88%、99.10%、100.93%、102.05%、98.39%和 100.34%,RSD 值分别为 2.40%、2.83%、1.36%、2.75%、1.46%、1.79%

和 2.72%,表明实验方法良好。

2.4.9 样品含量测定 精密称取大盘龙七药材样品各 0.1 g,按“2.4.2”项下方法制备样品溶液,依“2.4.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,采用外标法计算熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-*O*-没食子酰岩白菜素、11-*O*-没食子酰岩白菜素和儿茶素没食子酸酯的含量,结果见表 6。

表 6 大盘龙七药材中 7 个成分的含量测定结果 ($n = 3$)

Table 6 Results of determination of seven components in *Bergeniae Scopulosae Rhizoma* ($n = 3$)

编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)						
	熊果苷	没食子酸	岩白菜素	儿茶素	4- <i>O</i> -没食子酰岩白菜素	11- <i>O</i> -没食子酰岩白菜素	儿茶素没食子酸酯
S1	7.30	2.98	77.42	5.93	1.69	5.61	4.97
S2	9.01	0.87	78.04	7.40	2.15	7.38	7.98
S3	9.81	0.91	75.08	4.75	2.54	7.01	12.30
S4	7.35	2.62	77.65	6.43	1.81	6.85	5.05
S5	18.42	2.86	15.96	11.17	2.00	2.09	2.24
S6	8.02	0.90	17.19	2.95	0.97	2.78	0.64
S7	7.98	0.26	16.42	6.24	1.21	5.22	0.92
S8	62.96	1.29	37.39	1.88	1.17	6.29	4.93
S9	63.24	1.36	36.69	1.54	1.08	5.59	6.00
S10	56.73	1.47	40.01	2.25	1.08	5.44	6.35

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

本实验薄层鉴别中考察了通用显色剂碘和酚类显色剂 2%三氯化铁溶液-1%铁氰化钾溶液 (1:1) 的混合溶液,结果用碘熏斑点不清晰,2%三氯化铁溶液-1%铁氰化钾溶液 (1:1) 的混合溶液为显色剂,斑点清晰,拖尾、颜色等效果一目了然。本实验考察了提取溶剂 (50%、60%、70%、80%、100% 甲醇)、溶剂量 (20、30、40、50 mL) 以及超声提取时间 (15、30、45、60 min) 对待测成分提取效率的影响,综合考虑主要色谱峰的峰面积和分离度,最终确定以 60% 甲醇为溶剂,溶剂量为 30 mL,超声 30 min 进行提取。通过二极管阵列检测器进行全波长扫描 (190~400 nm),发现大盘龙七中化学成分的色谱峰紫外图谱较相似,最大吸收峰约在 275 nm 处,因此本研究选择 275 nm 作为大盘龙七药材含量测定的检测波长。流动相分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 磷酸水,结果以乙腈-0.1% 磷酸水梯度洗脱可使大盘龙七药材样品得到较好的分离;分别对

Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Thermo Scientific Synchronis aQ C₁₈ 色谱柱 (250×4.6 mm, 5 μm) 进行考察,最终选择 Agilent 5 TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱大盘龙七样品中各色谱峰的分离效果较好;并对不同柱温 (25、30 °C) 进行考察,结果大盘龙七样品在 25 °C 时分离效果较好。

3.2 指纹图谱及模式识别分析

本实验构建了 10 批次大盘龙七药材指纹图谱,发现有 14 个共有峰,并指认了其中 7 个共有峰,分别为 1 号峰 (熊果苷)、2 号峰 (没食子酸)、3 号峰 (岩白菜素)、5 号峰 (儿茶素)、7 号峰 (4-*O*-没食子酰岩白菜素)、9 号峰 (11-*O*-没食子酰岩白菜素) 和 12 号峰 (儿茶素没食子酸酯)。对于多批次大盘龙七药材指纹图谱的评价除了相似度评价,还采用了 HCA、PCA 和 OPLS-DA,从而更加全面客观地对不同批次大盘龙七药材的质量进行了评价。在对 10 批大盘龙七药材样品的相似度分析中,S1~S4、S6~S10 的相似度均大于 0.920,表明这 9 个批次药材质量相对稳定,但各成分含量存在较大差异;而

S5样品的相似度为0.752,表明S5与其他批次药材差异较大,推测可能与产地、生长年限、采收时间、加工方法等因素有关。HCA表明,当欧氏距离为15时,10批大盘龙七药材样品聚为2类:S1~S4聚为一类,S5~S10聚为另一类;当欧氏距离为5时,S5~S10聚为2类,S5~S7聚为一类,S8和S10聚为一类,这说明同一产地大盘龙七药材质量存在一定的差异性,并且不同产地药材质量也具有一定的相似性。PCA得到4个主成分,其累计方差贡献率达到96.445%,表明前4个主成分可代表大盘龙七药材样品的基本特征和大部分信息。通过OPLS-DA筛选出1号峰(熊果苷)、3号峰(岩白菜素)、7号峰(4-O-没食子酰岩白菜素)、5号峰(儿茶素)、9号峰(11-O-没食子酰岩白菜素)和6号峰可能是导致这10批大盘龙七药材之间产生差异的主要特征成分,对分类结果具有显著影响。

3.3 指标性成分的选择

通过OPLS-DA筛选出1号峰(熊果苷)、3号峰(岩白菜素)、7号峰(4-O-没食子酰岩白菜素)、5号峰(儿茶素)、9号峰(11-O-没食子酰岩白菜素)和6号峰可能是导致这10批大盘龙七药材之间产生差异的主要特征成分,在对共有峰指认中还发现2号峰(没食子酸)和12号峰(儿茶素没食子酸酯)在各批次大盘龙七药材样品中的色谱峰均比较明显。文献报道熊果苷具有抗炎、保肝、抗微生物、抗溃疡、利尿、抗糖尿病等作用^[18],没食子酸具有抗微生物、抗炎、抗氧化、抗肥胖等作用^[19],岩白菜素具有抗菌、抗疟原虫、抗癌、促进伤口愈合、抗糖尿病及胃保护等作用^[20],儿茶素能够抑制脂多糖诱导的BV-2细胞的炎症反应^[21],4-O-没食子酰岩白菜素具有较强的清除DPPH自由基的能力^[22]、11-O-没食子酰岩白菜素具有镇痛、抗炎、抗疟原虫、抗氧化等作用^[23-24]、儿茶素没食子酸酯具有明显的调血脂作用^[25]。因此,本研究最终确定了以儿茶素、岩白菜素和熊果苷作为大盘龙七药材的薄层鉴别的指标性成分,以熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-O-没食子酰岩白菜素、11-O-没食子酰岩白菜素和儿茶素没食子酸酯作为大盘龙七药材的含量测定指标性成分。

综上所述,本实验首次构建了10批大盘龙七药材的指纹图谱,发现有14个共有峰;首次建立了大盘龙七中熊果苷、没食子酸、岩白菜素、儿茶素、4-O-没食子酰岩白菜素、11-O-没食子酰岩白菜素和

儿茶素没食子酸酯7个成分的含量测定方法,并测定了10批大盘龙七药材中这7种成分的含量,为陕产特色药材大盘龙七的质量控制提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陕西省食品药品监督管理局. 陕西省药材标准(2015年版)[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2016: 109-110.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第八卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 23.
- [3] 李世全. 秦岭巴山天然药物志[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987: 262-263.
- [4] 《华山药志》编辑委员会. 华山药志[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1985: 458-459.
- [5] 毛水龙. 秦岭七药[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 2011: 75-77.
- [6] 宋小妹, 王薇. 太白七药原色图鉴[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 208-209.
- [7] 崔莹. 盘龙七化学成分的研究(I)[J]. 中成药, 2011, 33(9): 1546-1549.
- [8] 崔莹. 盘龙七化学成分研究(II)[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1704-1707.
- [9] 毛少利, 李倩, 李阳, 等. 珍稀濒危植物秦岭岩白菜的研究进展[J]. 广西林业科学, 2017, 46(4): 396-399.
- [10] 任慧, 崔小敏, 胡静, 等. 秦岭岩白菜根茎化学成分的UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 118-128.
- [11] 冯永辉, 李鹏, 汪兴军, 等. 盘龙七中儿茶素的含量测定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(28): 17235-17236.
- [12] 王星, 张娜, 马英丽, 等. HPLC测定不同产地盘龙七中没食子酸的含量[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(32): 11276-11278.
- [13] 郭琳, 徐悦, 李玉泽, 等. 盘龙七药材的质量评价[J]. 陕西中医药大学学报, 2021, 44(6): 61-66.
- [14] 任慧, 鲁文静, 崔小敏, 等. 秦岭岩白菜入血成分及其代谢产物的UHPLC-Q Exactive Focus MS/MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(1): 113-122.
- [15] 李晶峰, 杨海南, 郅慧, 等. 不同产地槐角HPLC指纹图谱建立及化学模式识别研究[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6677-6682.
- [16] 李妍, 何文媛, 王康宇, 等. 基于HPLC多指标成分测定及指纹图谱多模式识别方法的北细辛质量分析[J]. 中草药, 2022, 53(1): 238-243.
- [17] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究[J]. 中草药, 2022, 53(1): 231-237.
- [18] Saeedi M, Khezri K, Seyed Z A, et al. A comprehensive

- review of the therapeutic potential of α -arbutin [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(8): 4136-4154.
- [19] Choińska R, Dąbrowska K, Świsłocka R, *et al.* Antimicrobial properties of mandelic acid, gallic acid and their derivatives [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2021, 21(17): 2544-2550.
- [20] Bajracharya G B. Diversity, pharmacology and synthesis of bergenin and its derivatives: Potential materials for therapeutic usages [J]. *Fitoterapia*, 2015, 101: 133-152.
- [21] 王青, 贾哲琳, 宋丽娟, 等. 儿茶素对脂多糖诱导的 BV-2 细胞炎症反应的作用 [J]. *药学学报*, 2018, 53(2): 244-248.
- [22] Mu L H, Feng J Q, Liu P. A new bergenin derivative from the rhizome of *Ardisia gigantifolia* [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(14): 1242-1245.
- [23] Arfan M, Amin H, Khan N, *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of 11-*O*-galloylbergenin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(2): 502-504.
- [24] Khan H, Amin H, Ullah A, *et al.* Antioxidant and antiplasmodial activities of bergenin and 11-*O*-galloyl bergenin isolated from *Mallotus philippensis* [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1051925.
- [25] Hui K C, Majid N I, Yusof H M, *et al.* Catechin profile and hypolipidemic activity of *Morinda citrifolia* leaf water extract [J]. *Heliyon*, 2020, 6(6): e04337.

[责任编辑 时圣明]