

不同产地石上柏指纹图谱及主要双黄酮含量测定

蒋永梅, 黎刚, 蒋奉秦, 何群, 王刚*
(遵义医学院药学院, 贵州遵义 563000)

[摘要] 目的:建立不同产地石上柏双黄酮的 HPLC 指纹图谱,并进行聚类分析和主成分分析,用于石上柏药材质量的评价。方法:采用 Dikma Diamons C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),以乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相,梯度洗脱,柱温 25 ℃,流速 0.6 mL·min⁻¹,检测波长 330 nm,进样量 10 μL。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004A 版)对 10 批样品进行共有峰确认及相似度评价。运用 SPSS 17.0 统计学软件对 HPLC 指纹图谱进行聚类分析和主成分分析。结果:方法学考察指标的 RSD 均 < 2.0%,表明在该色谱条件下,仪器精密度高,样品在 24 h 内稳定性良好,方法准确度良好;根据 10 批药材测定结果表明,各共有峰较稳定,具有指纹图谱特征性,可初步确定为石上柏双黄酮的指目标成分群。在对照指纹图谱上共标定出 9 个色谱峰作为指纹图谱共有峰,指认了其中的 3 个化学成分,分别为穗花杉双黄酮、银杏双黄酮、扁柏双黄酮。10 批样品的相似度计算结果均 > 0.850,说明各产地的药材有较好的一致性;通过聚类分析可将 10 批样品可分为 3 类,第一类是重庆和四川产地的石上柏,第二类是贵州产地的石上柏,第三类是广西产地的石上柏,并且 2 个主成分的累计方差贡献率为 98.096%。结论:该方法精密度高,重复性好,操作简便,可为石上柏药材的质量评价提供参考。

[关键词] 石上柏; 双黄酮; 高效液相色谱指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

[中图分类号] R284.1; R22; R2-03; R223 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0061-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180692

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171213.0851.018.html>

[网络出版时间] 2017-12-13 13:13

HPLC Fingerprint of *Selaginella doederleinii* from Different Origins and Content Determination of Biflavonoids

JIANG Yong-mei, LI Gang, JIANG Feng-qin, HE Qun, WANG Gang*
(School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the HPLC fingerprint of bioflavonoids in *Selaginella doederleinii* from different origins, and cluster analysis and principal component analysis are made, in order to evaluate the quality of *S. doederleinii*. **Method:** Dikma Diamons C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was adopted and eluted in a gradient mode, with acetonitrile-0.1% formic acid solution as the mobile phase. The column temperature was 25 ℃; the flow rate of the mobile phase was 0.6 mL·min⁻¹; the detection wavelength was 330 nm, and the injection volume was 10 μL. The fingerprints of 10 batches of *S. doederleinii* were further evaluated by chemometric methods. The similarity was analyzed with 'Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Chinese medicine' (2004A), and the hierarchical clustering analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were performed by SPSS 17.0. **Result:** The relative standard deviations of the methodology were < 2.0%, indicating a good precision of the instruments, a high sample stability within 24 hours and a high accuracy of the method. There were 9 common peaks; and three chemical components were identified as amentoflavone, ginkgetin and hinokiflavone by comparing with control products. The similarity degrees of the 10 batches of samples were

[收稿日期] 20170807(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560569);贵州省中医药管理局级项目(D-449);遵义医学院博士启动基金项目(F-742)

[第一作者] 蒋永梅,在读硕士,从事中药质量评价工作, Tel:0851-28609461, E-mail: 1023731996@qq.com

[通信作者] *王刚,博士,教授,从事天然产物研究, Tel:0851-28609461, E-mail: wg8855350@163.com

more than 0.850, indicating a good consistency for all of the samples from different origins. The samples were divided into three categories by HCA. The first category is those from Chongqing and Sichuan, the second category is from Guizhou, and the third category is from Guangxi. The accumulative variance contribution was 98.096% for two principal components. **Conclusion:** The method features a high precision, good repeatability and easy operation, and can provide reference for the quality evaluation of *S. doederleinii*.

[**Key words**] *Selaginella doederleinii*; bioflavonoids; HPLC fingerprint; cluster analysis; principal component analysis

石上柏属于蕨类植物门卷柏科卷柏属植物深绿卷柏的全草,为多年生草植物,又名大叶菜、地侧柏等,多生于林下、山谷、路边、沟中等阴处石上,在我国贵州、四川、广东、广西等地分布较多^[1]。该药味甘、带涩,性温平,具有清热解毒、祛风除湿、抗癌止血等功效^[2-3],临床上主要用于治疗咽喉肿痛、风湿痹痛、鼻咽癌、绒毛膜上皮癌、肺癌、宫颈癌及外伤出血等各种疾病^[4-6],同时对多种感染性炎症,特别是对上呼吸道、急性扁桃腺炎、肺炎等效果显著^[7]。

现代化学成分研究表明,石上柏主要含双黄酮类、生物碱类、甾醇、皂苷、氨基酸等成分^[8]。主要有效成分为双黄酮类化合物,目前已有研究者从深绿卷柏中分离得到 8 种双黄酮^[9],主要包括穗花杉双黄酮、扁柏双黄酮、银杏双黄酮等。双黄酮类化合物具有多种的生物活性,包括抗肿瘤、抗免疫、抗菌和抗氧化等活性^[7]。

基于石上柏双黄酮有很好的药理活性,且目前文献中未见石上柏品质方面的评价,因此本文采集了 10 个产地的石上柏,应用 HPLC 建立了中药石上柏双黄酮指纹图谱的研究方法^[11-13],同时采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A 版)对石上柏作相似度评价,并运用 SPSS 17.0 软件对其进行聚类分析和主成分分析研究,为石上柏的质量评价提供依据。

1 材料

实验所用 10 批石上柏药材由遵义医学院生物学教研室张玉金副教授鉴定为卷柏科石上柏 *Selaginella doederleinii* 的全草,来源信息见表 1。穗花杉双黄酮(批号 160523),扁柏双黄酮(批号 160819),银杏双黄酮对照品(批号 160712)由成都瑞芬恩科技有限公司提供,纯度 >98%。所用试剂甲醇、乙腈均为色谱纯,购于德国 Merck 公司;乙酸乙酯、无水乙醇、甲酸购于成都科龙试剂公司,均为分析纯。

1100 系列高效液相色谱仪(包括 1100 二极管阵列检测器,美国安捷伦公司),Dikma Diamons C₁₈

表 1 不同产地石上柏来源信息

Table 1 *Selaginella doederleinii* habitats and resource

No.	采集地	经度(E)	纬度(N)	采集时间
S1	广西玉林	110°30′	22°48′	2016-05-26
S2	广西南宁	108°33′	22°84′	2016-05-19
S3	广西桂林	110°28′	25°29′	2016-05-23
S4	贵州遵义	106°90′	27°42′	2016-07-17
S5	贵州绥阳	107°19′	27°48′	2016-09-03
S6	贵州赤水	105°42′	28°35′	2016-10-12
S7	重庆武胜	106°28′	30°35′	2016-09-12
S8	重庆潼南	105°46′	30°22′	2016-09-15
S9	四川成都	104°06′	30°67′	2016-10-11
S10	四川遂宁	105°58′	30°52′	2016-10-13

色谱柱(美国 Waters 公司),SECURA124-1CN 型电子分析天平(德国赛多利斯公司),KQ118 型超声波清洗器(北京佳源兴业科技有限公司),旋转蒸发器(西安太康生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取穗花杉双黄酮对照品 8.5 mg,扁柏双黄酮对照品 5.6 mg,银杏双黄酮对照品 8.6 mg,加甲醇适量置同一 25 mL 量瓶中,超声溶解,室温静置,并用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成含穗花杉双黄酮 0.780 mg·L⁻¹,扁柏双黄酮 0.224 mg·L⁻¹,银杏双黄酮 0.344 mg·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 选取干燥好的石上柏全草,粉碎,精密称定约 8.0 g,加入甲醇 70 mL,超声 30 min(功率 300 W,温度 50 °C),过滤、浓缩,提取液转移到 50 mL 量瓶。再用甲醇定容至刻度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,至磨口锥形瓶中。

2.3 检测波长的选择 实验中对石上柏提取物进行紫外全波长扫描,综合最大吸收情况,试验结果提示,检测波长为 330 nm 时的色谱峰数目较多且灵敏度高,峰面积较好,所以确定 330 nm 为检测波长。

2.4 色谱条件 Dikma Diamons C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.1% 甲酸

水,梯度洗脱(0~10 min,30%乙腈;10~20 min,30%~40%乙腈;20~30 min,40%~50%乙腈;30~40 min,50%~60%乙腈;40~50 min,60%~70%乙腈;50~60 min,70%~80%乙腈;60~70 min,80%~90%乙腈;70~80 min,90%~100%乙腈),检测波长 330 nm,柱温 25 ℃,流速 0.6 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,进样前样品用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取同一批供试品溶液,按 2.4 项下色谱条件测定,连续进样 6 次,检测指纹图谱,以穗花杉双黄酮峰的保留时间和峰面积为参照,计算 HPLC 色谱图中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2.0%,结果表明该仪器的精密度良好,符合指纹图谱要求。

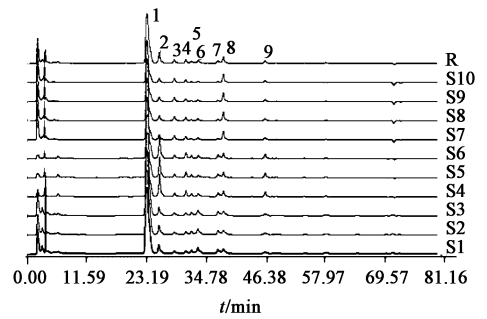
2.5.2 稳定性试验 取同一批供试品溶液,按 2.4 项下色谱条件测定,每隔 2 h 检测指纹图谱,直至 24 h,计算 HPLC 色谱图中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2.0%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好,符合指纹图谱要求。

2.5.3 重复性试验 取同一批石上柏药材 6 份,每份样品精密称定 8.0 g,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按照 2.4 项下色谱条件测定,检测指纹峰,计算 HPLC 色谱图中各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 2.0%,结果表明该方法准确度良好,符合指纹图谱要求。

2.6 指纹图谱的建立及相似度分析

2.6.1 指纹图谱的建立 分别取 10 批不同来源的石上柏药材 8.0 g,按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,按照 2.4 项下色谱条件进行测定,记录各产地色谱图。然后将色谱图数据录入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004A)分析处理,以重庆市潼南样品(S8)的指纹图谱为参照图谱,通过色谱峰多点校正的方法对 10 个产地石上柏双黄酮指纹图谱进行自动匹配生成药材的色谱指纹图谱共有模式(中位数法)^[10-11]。建立的石上柏双黄酮指纹图谱,见图 1。

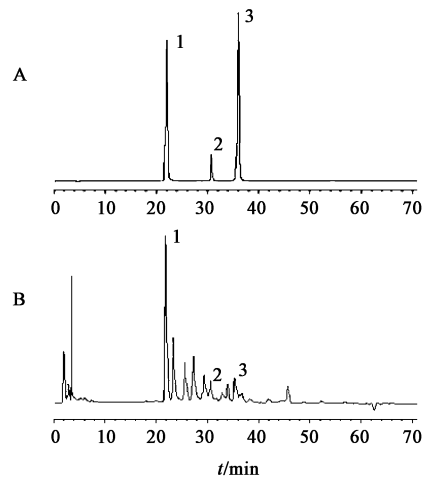
2.6.2 共有峰的标定 根据所建立石上柏双黄酮指纹图谱,在对照指纹图谱上共标定出共有色谱峰 9 个,见图 1。根据 10 批药材测定结果表明,各共有峰较稳定,具有指纹图谱特征性,可初步确定为石上柏双黄酮的目标成分群。与对照品比对指认了其中的 3 个共有峰,分别为穗花杉双黄酮、银杏双黄酮、扁柏双黄酮,见图 2。在供试品图谱中选择峰面积最大,出峰时间适中且稳定的穗花杉双黄酮色谱峰



1~9. 共有峰

图 1 10 个产地石上柏样品 HPLC 指纹谱叠加

Fig. 1 Overlay chart of HPLC fingerprint of *Selaginella doederleinii* from 10 habitats



1. 穗花杉双黄酮;2. 扁柏双黄酮;3. 银杏双黄酮;A. 对照品;B. 供试品

图 2 石上柏提取液 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC of *Selaginella doederleinii* extract spectra

作为参照峰,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。

表 2 石上柏提取液 HPLC 色谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peaks of *Selaginella doederleinii* extract

No.	2	3	4	5	6	7	8	9
S1	0.147	0.036	0.047	0.034	0.090	0.041	0.082	0.042
S2	0.142	0.033	0.045	0.032	0.086	0.038	0.076	0.039
S3	0.147	0.038	0.047	0.035	0.101	0.042	0.086	0.045
S4	0.297	0.044	0.072	0.034	0.029	0.045	0.087	0.067
S5	0.324	0.046	0.077	0.035	0.031	0.045	0.087	0.066
S6	0.349	0.052	0.088	0.041	0.037	0.045	0.085	0.064
S7	0.084	0.073	0.048	0.014	0.031	0.018	0.150	0.038
S8	0.088	0.072	0.050	0.014	0.031	0.018	0.147	0.037
S9	0.087	0.071	0.050	0.015	0.030	0.018	0.145	0.038
S10	0.079	0.074	0.046	0.015	0.030	0.018	0.153	0.039

注:1 号峰均为 1.000。

2.6.3 相似度评价 通过相似度评价软件分析,10 个产地石上柏提取物生成的共有模式与对照指纹图谱进行比较,相似度分别为 0.919,0.950,0.905,0.855,0.887,0.879,0.962,0.983,0.957,0.953。各峰的峰面积有差异,说明不同产地石上柏双黄酮成分的组成一致,但含量有差异,其原因与产地、生长年限、采收期、加工方法等因素有关,有待深入探讨。

2.7 聚类分析 将不同产地石上柏双黄酮各色谱峰面积运用 SPSS 18.0 软件进行系统聚类,采用组间平均数联结法,以欧氏距离平方法为度量标准,建立样品间特征峰相似性聚类分析,分析结果见图 3。10 批样品可分为 3 类,第一类是重庆和四川产地的石上柏,第二类是贵州产地的石上柏,第三类是广西产地的石上柏。通过各共有峰为变量计算出石上柏双黄酮指纹图谱得分图,可见 3 类样品各自分散在图中的不同区域,每类不同产地样品相应地聚集在一起,对不同产地之间的差异有了良好地区分,表明不同产地的石上柏双黄酮指纹图谱有一定的差别。

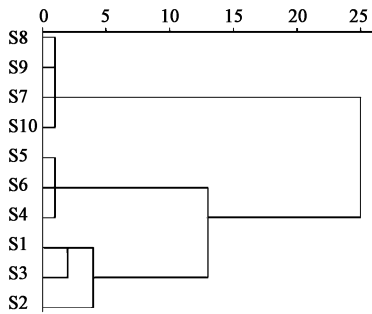


图 3 石上柏指纹谱的聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of *Selaginella doederleinii*

2.8 主成分分析 通过 SPSS 18.0 软件中的因子分析对原始数据进行标准化处理,主成分的特征根及贡献率是选择主成分的依据。经过计算,前 2 个成分 A1,A2 的特征值大于 2,即 6.640,2.189,对总方差的累积贡献率达 98.096%,故选择 A1,A2 为第一、第二主成分,结果见表 3。

旋转后的公共因子载荷矩阵见表 4,可以得出 1,2,4,5,6,7,9 号色谱峰在主成分 1 中有明显的正相负荷,表明第一主成分的信息主要来自于这 7 个峰,而其他的色谱峰对第一主成分的影响相对较小。第二主成分的信息主要来自于 2,3,4,8,9 号色谱峰,而其他的色谱峰对第二主成分的影响相对较小。

对公共因子载荷矩阵进行主成分分析,以第一、第二主成分为变量得到二维投影,见图 4。通过图 4 可看出不同产地供试品的内在相互关系可较好地表现出来,进而实现不同样品之间的分类,从图中

表 3 主成分特征值与贡献率

Table 3 Eigenvalues and contribution rates

峰号	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差 /%	累积贡献率 /%	合计	方差 /%	累积贡献率 /%
1	6.640	73.778	73.778	6.640	73.778	73.778
2	2.189	24.318	98.096	2.189	24.318	98.096
3	0.099	1.101	99.197			
4	0.068	0.760	99.957			
5	0.002	0.020	99.977			
6	0.001	0.015	99.992			
7	0.000	0.005	99.997			
8	0.000	0.002	99.999			
9	0.000	0.001	100.000			

表 4 旋转后的公共因子载荷矩阵

Table 4 Load matrices of postrotational common factors

峰号	成分 1	成分 2
1	0.966	-0.085
2	0.853	0.520
3	-0.731	0.660
4	0.769	0.627
5	0.992	-0.041
6	0.489	-0.859
7	0.998	-0.020
8	-0.946	0.319
9	0.860	0.489

可以看出 10 批不同产地的石上柏药材被分为三类,其结果与聚类分析结果一致。

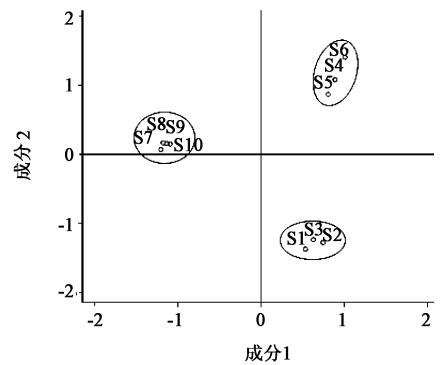


图 4 石上柏指纹图谱得分

Fig.4 Score scatter plot of *Selaginella doederleinii*

3 讨论

3.1 供试品制备方法的选择 本文采用超声提取,通过单因素试验,分别考察了不同提取溶剂(甲醇,80% 甲醇,60% 甲醇,无水乙醇,80% 乙醇,60% 乙醇),不同提取时间(10,20,30 min),提取溶剂用量(50,70,90 mL),不同温度(30,40,50 ℃)对供试品

中双黄酮的影响,结果表明石上柏药材采用甲醇超声提取 20 min,温度 50 ℃ 用量 70 mL,提取效果最佳。

3.2 色谱条件的考察 本文曾采用甲醇-0.1% 磷酸水,甲醇-0.1% 甲酸水,甲醇-0.1% 乙酸水,乙腈-0.1% 磷酸水,乙腈-0.1% 甲酸水及乙腈-0.1% 乙酸水为流动相考察对供试品中各色谱峰的影响,结果表明采用乙腈-0.1% 甲酸水作为流动相时,基线平稳,指纹信息丰富,色谱峰分离度较高且峰面积较大,有利于指纹图谱的分析,故最终选择乙腈-0.1% 甲酸水作为流动相系统。

3.3 指纹图谱相似度分析 本文建立了 10 个产地石上柏双黄酮的 HPLC-DAD 特征指纹图谱共有模式,共有峰的相对保留时间基本一致,共有峰的相对峰面积则存在着较大的差异,可能是由于不同的产地,生长时间,采收期以及生长年限等因素导致双黄酮有效成分含量差异较大,其原因有待进一步的考究。10 批样品的相似度均 >0.85,说明不同产地石上柏双黄酮的化学组成一致性较好。

3.4 聚类分析和主成分分析 聚类分析将 10 批不同产地的石上柏药材进行分类鉴定,结果分为 3 大类,如贵州省 3 个产地的石上柏药材聚在一起,说明同省几个产地石上柏的品种、生长环境相近。而且,其与相似度分析结果较为一致,得到了相互验证。利用主成分分析,得到了 2 个主成分,累计方差贡献率为 98.096%,说明这 2 个主成分可表达全部石上柏双黄酮成分的 98.096%,只有 1.904% 的信息丢失。其中,第 1 主成分方差贡献率最大,为 73.778%,是石上柏药材最重要的成分群,它所包含的化学成分基本反映出各产地石上柏双黄酮成分之间的相似性。

3.5 结论 本实验建立了不同产地石上柏药材的 HPLC 指纹图谱,通过相似度计算、聚类分析和主成分分析,对药材进行综合评价,得到较理想的结果。同时,进行了 HPLC 方法学考察,发现精密度、稳定性、重复性都符合指纹图谱的要求,由于标准物质的局限使得单一的相似度评价在筛选药材品质时,存在有一定的困难。结合聚类分析和主成分分析可从多角度综合判断石上柏双黄酮的质量。因此,多种模式相互验证,相互补充,可以为石上柏物质基础研究提供一定参考。

using fourier transform infrared spectroscopy for several herbs of the genus *Selaginella* [J]. WIT Tran Biomed Heal, 2014, 18: 511-518.

- [2] WANG G, SONG H, YAO S, et al. Analysis of volatile oil in *Selaginella doederleinii* Hieron from various habitats by GC-MS [J]. Adv Mater Res, 2013, 641-642 (1): 862-866.
- [3] WANG G, SONG H, YAO S, et al. Infrared spectroscopic analysis of different extracts from *Selaginellae doederleinii* [J]. WIT Tran Biomed Heal, 2014, 18: 503-510.
- [4] WANG G, LI S H, ZHOU H L. Comparison of antioxidant and anticancer of the extracts from various habitats of *Selaginella doederleinii* [J]. Adv Eng Res, 2016, 84: 785-790.
- [5] 黎丹,李三华,杨龙江,等. 基于组效关系的石上柏挥发油抗肿瘤有效成分的辨识[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 44-50.
- [6] 李三华,黎丹,蒋永梅,等. 不同产地石上柏抗氧化和抗肿瘤活性比较[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(22): 11-14.
- [7] WANG G, YAO S, CHENG L, et al. Antioxidant and anticancer effect of the volatile oil from various habitats of *Selaginella doederleinii* Hieron [J]. Technol Health Care, 2015, 2015: 29-36.
- [8] 戴卫波,梅全喜,曾聪彦. 石上柏化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2011, 20(2): 15-16.
- [9] LI D, QIAN Y, TIAN Y J, et al. Optimization of ionic liquid-assisted extraction of biflavonoids from *Selaginella doederleinii* and evaluation of its antioxidant and antitumor activity [J]. Molecules, 2017, 22(4): 586-602.
- [10] WANG G, YAO S, ZHANG X X, et al. Rapid screening and structural characterization of antioxidants from the extract of *Selaginella doederleinii* Hieron with DPPH-UPLC-Q-TOF/MS Method [J]. Int J Anal Chem, 2015, 2015(2): 1-9.
- [11] 张煜炯,彭昕,吉庆勇,等. 聚类分析和主成分分析法研究三叶青氯仿部位 HPLC 指纹图谱[J]. 中成药, 2016, 38(3): 607-612.
- [12] 杨光明,陈晓红,刘路,等. 女贞子生品及炮制品的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药, 2016, 47(5): 760-766.
- [13] 冯阳,陈玉梅,辛华. 广西金樱子 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 79-83.

[参考文献]

[责任编辑 顾雪竹]

- [1] WANG G, SONG H, YAO S, et al. Identification study