

## 基于 HPLC 指纹图谱及化学计量学筛选石楠叶质量标志物及其含量测定研究

马永奔<sup>1</sup>, 田宇柔<sup>1,2,3</sup>, 田伟<sup>1,2,3</sup>, 高乐<sup>1,2,3</sup>, 展佳琪<sup>1</sup>, 冯希雅<sup>1</sup>, 吴玲芳<sup>1,2,3</sup>, 牛丽颖<sup>1,2,3</sup>

(1 河北中医学院, 石家庄 050091; 2 河北省中药配方颗粒技术创新中心, 石家庄 050091;

3 中药材品质评价与标准化河北省工程研究中心, 石家庄 050091)

**[摘要]** **目的:** 建立石楠叶药材 HPLC-PDA 指纹图谱, 结合化学计量学识别和筛选石楠叶药材的质量标志物, 为石楠叶的质量提供科学依据。 **方法:** 采用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 350 nm, 柱温 35 ℃; 建立 15 批石楠叶药材指纹图谱并进行相似度评价, 对共有峰进行化学识别模式分析区分不同产地的石楠叶药材, 筛选石楠叶的质量标志物。 **结果:** 15 批石楠叶药材的相似度均在 0.996 以上, 共标定了 10 个共有峰, 聚类分析、主成分分析和偏最小二乘分析筛选出 1 号色谱峰 (新绿原酸)、2 号色谱峰 (绿原酸)、4 号色谱峰 (芦丁)、5 号色谱峰 (金丝桃苷)、6 号色谱峰 (异槲皮苷) 为石楠叶的质量标志性成分, 其中新绿原酸、绿原酸的含量与药材的优质性呈正相关, 芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的含量可能与药材质量呈负相关, 说明这 3 种成分在药材中含量不宜太高。进一步对以上 5 个成分进行定量分析, 线性范围分别为: 0.135 3 ~ 2.706 0, 0.134 0 ~ 2.680 0, 0.008 5 ~ 0.170 5, 0.015 6 ~ 0.312 8, 0.005 9 ~ 0.118 9 μg, 各成分线性关系良好 ( $R^2 \geq 0.999 0$ ), 平均回收率在 99.30% ~ 101.90%。 **结论:** 建立的 HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法稳定、可靠, 可为石楠叶药材的质量评价提供依据。

**[关键词]** 石楠叶; 指纹图谱; 相似度评价; 聚类分析; 主成分分析; 质量标志物

**[中图分类号]** R917; R932 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)09-0961-08

## Screening and determination of quality markers of Folium Photiniae based on HPLC fingerprint and chemometrics

MA Yong-ben<sup>1</sup>, TIAN Yu-rou<sup>1,2,3</sup>, TIAN Wei<sup>1,2,3</sup>, GAO Le<sup>1,2,3</sup>, ZHAN Jia-qi<sup>1</sup>,  
FENG Xi-ya<sup>1</sup>, WU Ling-fang<sup>1,2,3</sup>, NIU Li-ying<sup>1,2,3</sup>

(1 Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China; 2 Hebei Traditional Chinese Medicine Formula Granule Engineering & Technology Innovate Center, Shijiazhuang 050091, China; 3 Quality Evaluation & Standardization Hebei Province Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the HPLC-PDA fingerprint of Folium Photiniae combined with chemometrics to identify and screen the quality markers of Folium Photiniae, in order to provide a scientific basis for the quality of Folium Photiniae. **Methods:** The fingerprint was obtained by an Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm,

**[基金项目]** 河北省中医药管理局科研计划项目 (2023114); 河北省高等学校科学技术研究资助项目 (QN2019119); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2020130); 河北中医学院博士基金资助项目 (BZS2019001)

**[作者简介]** 马永奔, 男, 硕士研究生, 主要从事中药药效物质研究。E-mail: Mayongben@hebcm.edu.cn。

**[通讯作者]** 吴玲芳, 女, 副教授, 主要从事中药药效物质研究。联系电话: (0311)89926890, E-mail: fanglingwu@126.com。牛丽颖, 女, 博士生导师, 教授, 主要从事中药分析及药效物质基础研究。联系电话: (0311)89926890, E-mail: niuliyngy@163.com。

5  $\mu\text{m}$ ) chromatographic column with a mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) in a gradient elution. The volume flow rate was set at 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ , the wavelength was 350 nm and the column temperature was 35  $^{\circ}\text{C}$ . The fingerprints of 15 batches of Folium Photiniae were established using the developed method and the similarity was evaluated. The common peaks were analyzed by chemical identification pattern to distinguish Folium Photiniae from different origins, and the quality markers of Folium Photiniae were screened.

**Results:** The similarity of the 15 batches of Folium Photiniae were all above 0.996, and a total of 10 common peaks were calibrated. Cluster analysis, principal component analysis and partial least squares analysis screened out chromatographic peak No.1 (neochlorogenic acid), No.2 (chlorogenic acid), No.4 (rutin), No.5 (hyricoside), and No.6 (isoquercitrin) as the quality markers of Folium Photiniae. The contents of neochlorogenic acid and chlorogenic acid is positively correlated with the quality of Folium Photiniae. The contents of rutin, hypericin and isoquercitrin may be negatively correlated with the quality of Folium Photiniae, indicating that the contents of these three components in Folium Photiniae should be limited at a low level. Further quantitative analysis of the above five components indicated the linear ranges of 0.135 3 ~ 2.706 0, 0.134 0 ~ 2.680 0, 0.008 5 ~ 0.170 5, 0.015 6 ~ 0.312 8, 0.005 9 ~ 0.118 9  $\mu\text{g}$ , respectively. The linear relationship of each component is good ( $R^2 \geq 0.999 0$ ), and the average recovery rate is 99.30% to 101.90%. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint and multi-component determination method are proved to be stable and reliable, which can provide a basis for the quality evaluation of Folium Photiniae.

**[Key words]** Folium Photiniae; fingerprint; similarity evaluation; cluster analysis; principal component analysis; quality markers

石楠叶为蔷薇科石楠属常绿小乔木或灌木石楠 (*Photinia serrulata* Lindl.) 的干燥叶,首载于汉末《名医别录》<sup>[1]</sup>,名为石楠草,主治脚弱。《本草纲目》中记载石楠叶为治风痹肾弱要药。《药性论》<sup>[2]</sup>中记载有令阴痿之说也。其味辛、苦、平,有小毒。归肝、肾经,有祛风、通络、益肾功效,用于风湿痹痛、腰背酸痛、足膝无力、偏头痛等症<sup>[3]</sup>,现代临床用于治疗头痛、风湿痹痛、妇科、男科相关疾病和皮肤病等<sup>[4-14]</sup>。石楠叶中含有丰富的蛋白质、微量元素和人体必需氨基酸,还含有黄酮、酚类、三萜、植物抗毒素和甾体等多种天然化合物<sup>[15]</sup>。近年来,有研究证实石楠属植物在镇痛、保肝、抗炎、降血压、抗肿瘤、杀虫等许多方面活性显著<sup>[16-18]</sup>。

在实际工作中发现有蔷薇科植物石楠叶和枇杷叶易混用的情况,两者饮片较难区别<sup>[19]</sup>。目前关于石楠叶质量控制方面的研究较少,石楠叶收载于《卫生部药品标准中药材第一册(1992年版)》,鉴别以显微鉴别和三硝基苯酚试纸变色反应为主,缺乏相关的质量控制方法,目前关于石楠叶质量控制的文献较少见,例如:罗晓清等<sup>[20]</sup>采用 RP-HPLC 法测定了石楠叶中熊果酸和齐墩果酸的含量,刘海兴等<sup>[21]</sup>毛细管电泳法测定了石楠叶中熊果酸和齐墩

果酸的含量,均只测定了2种成分的含量且均为20年前的文献,缺乏新近文献报道,指纹图谱和多成分含量测定的文献未见报道。本研究首次采用指纹图谱结合化学计量学,筛选了石楠叶的质量标志性成分,然后对质量标志性成分进行含量测定。指纹图谱信息丰富,能够对药材质量进行全面反映,被用作天然药物质量控制的有效方法,化学模式识别是确定质量标志物的重要方法<sup>[22]</sup>。使用指纹图谱结合化学识别模式寻找石楠叶的质量标志物,为其质量控制提供科学依据。因此,本实验分析了15批石楠叶指纹图谱信息,结合主成分分析(PCA)和聚类分析(HCA)确定了石楠叶的质量标志物,并建立了质量标志物的含量测定方法,以期提升石楠叶质量标准。

## 材料与方法

### 1 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);TB-215D 型电子天平、BSA224S-CW 型电子天平(赛多利斯有限公司);KQ-250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 2 试药与试剂

对照品:新绿原酸(成都普思生物科技股份有限公司)

限公司,批号:PS000974,纯度:98.0%);绿原酸(中国食品药品检定研究院,批号:110753-201817,纯度:96.8%);异槲皮苷(中国食品药品检定研究院,批号:111809-201804,纯度:97.2%);芦丁(中国食品药品检定研究院,批号:100080-201811,纯度:91.7%);金丝桃苷(中国食品药品检定研究院,批号:111521-201507,纯度:94.3%);乙腈为色谱纯(Fisher 化学试剂公司);其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

石楠叶 15 批药材均由神威药业集团有限公司提供,经楚雄彝族自治州中医医院副主任医师余惠祥老师鉴定为蔷薇科石楠的干燥叶,药材具体信息见表 1。

表 1 15 批石楠叶药材来源信息

编号	产地	药材批号
S1	云南双柏 1	2007141
S2	云南双柏 2	2007161
S3	云南双柏 3	2007031
S4	云南富民 1	2007011
S5	云南富民 2	2006261
S6	云南富民 3	2006191
S7	云南丽江玉龙县 1	2009151
S8	云南丽江玉龙县 2	2010181
S9	云南丽江玉龙县 3	2008281
S10	云南丽江鲁甸镇 1	2008051
S11	云南丽江鲁甸镇 2	2009251
S12	云南丽江鲁甸镇 3	2010171
S13	云南罗平 1	2008121
S14	云南罗平 2	2008241
S15	云南罗平 3	2009071

### 3 色谱条件

采用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 8.5 min, 5% ~ 10% A; 8.5 ~ 12.5 min, 10% ~ 14% A; 12.5 ~ 25 min, 14% ~ 18% A; 25 ~ 30.5 min, 18% ~ 23% A; 30.5 ~ 36 min, 23% ~ 29% A; 36 ~ 40.5 min, 29% ~ 40% A; 40.5 ~ 43 min, 40% ~ 90% A);流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 35 ℃;检测波长 350 nm;进样体积 10 μL。

### 4 溶液的制备

**4.1 混合对照品溶液的制备** 精密称取新绿原酸、绿原酸、异槲皮苷、芦丁和金丝桃苷对照品适量,加

甲醇溶解,制成一定质量浓度的对照品储备液;精密吸取上述各储备液适量,加甲醇稀释,即得含新绿原酸 135.30 μg·mL<sup>-1</sup>、绿原酸 134.00 μg·mL<sup>-1</sup>、芦丁 8.53 μg·mL<sup>-1</sup>、金丝桃苷 15.64 μg·mL<sup>-1</sup>、异槲皮苷 5.95 μg·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液。

**4.2 供试品溶液的制备** 取石楠叶药材粉末(过 40 目筛)约 1.0 g,精密称定。置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,称定重量,超声处理(250 W, 40 kHz)15 min,放冷,称重,用 50% 甲醇补足失重,摇匀,离心 3 000 r·min<sup>-1</sup>,取上清液 10 mL 于 25 mL 容量瓶中,用 50% 甲醇定容至刻度并摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 5 指纹图谱方法学考察

**5.1 指纹图谱精密度实验** 取混合对照品溶液,依照“4.1”项下方法制备供试品溶液,按“3”项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱图。以新绿原酸(1 号峰)为参照峰,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积,结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均 < 3%,表明仪器精密度良好。

**5.2 指纹图谱稳定性实验** 取同一批石楠叶药材粉末 1.0 g(编号 S3),依照“4.2”项下方法制备供试品溶液,按“3”项下色谱条件分别于制备后 0, 2, 9, 13, 15, 24 h 进样分析,记录色谱图。以新绿原酸(1 号峰)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均 < 3%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**5.3 指纹图谱重复性实验** 取同一批石楠叶药材粉末 1.0 g(编号 S3),依照“4.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“3”项下色谱条件测定,记录色谱图。以新绿原酸(1 号峰)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果显示各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均 < 3%,表明方法重复性良好。

### 6 指纹图谱的建立

**6.1 共有峰的标定** 取 15 批石楠叶药材,按“4.2”项方法制备供试品溶液,按“3”项下色谱条件进行测定,得 15 批石楠叶药材 HPLC 色谱图。将所得色谱图导入国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”软件,样品 S1 号色谱图作为参照图谱,以中位数法生成对照图谱 R,多点校正进行峰匹配,生成叠加图谱(见图 1),将分离度较好且为主要成分的色谱峰作为共有峰,最终标定 10 个共

有峰。通过与混合对照品溶液图谱对比,对共有峰进行指认。结果显示,15批石楠叶的色谱图中共匹配出10个共有峰。通过与混合对照品溶液图谱对比,指出其中5个共有峰,依次为绿原酸(1号

峰)、新绿原酸(2号峰)、芦丁(4号峰)、金丝桃苷(5号峰)、异槲皮苷(6号峰)。15批石楠叶的HPLC叠加指纹图谱和对照指纹图谱R见图1,混合对照品溶液的HPLC图见图2。

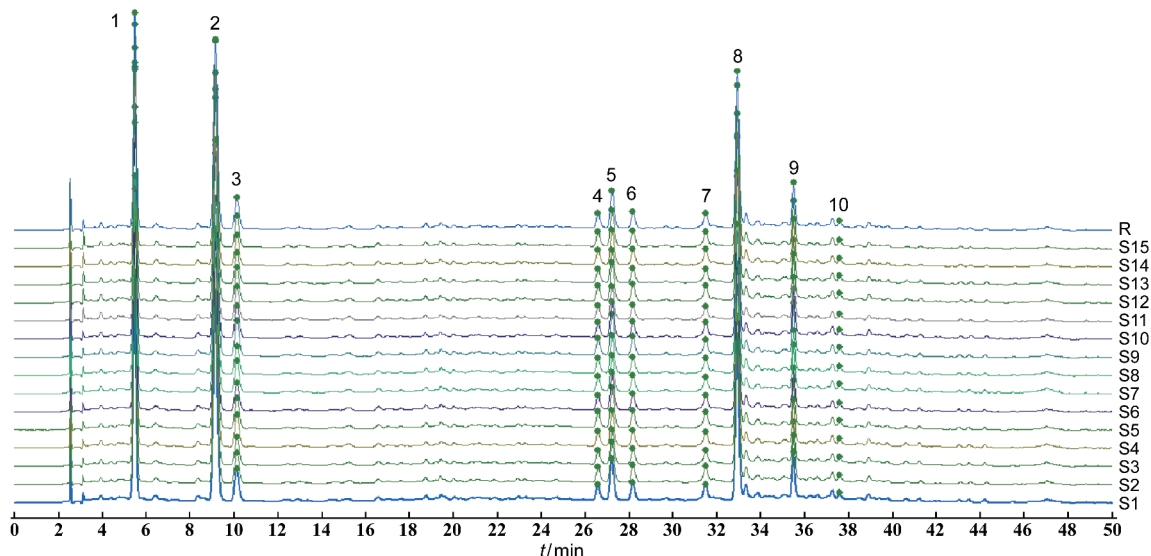
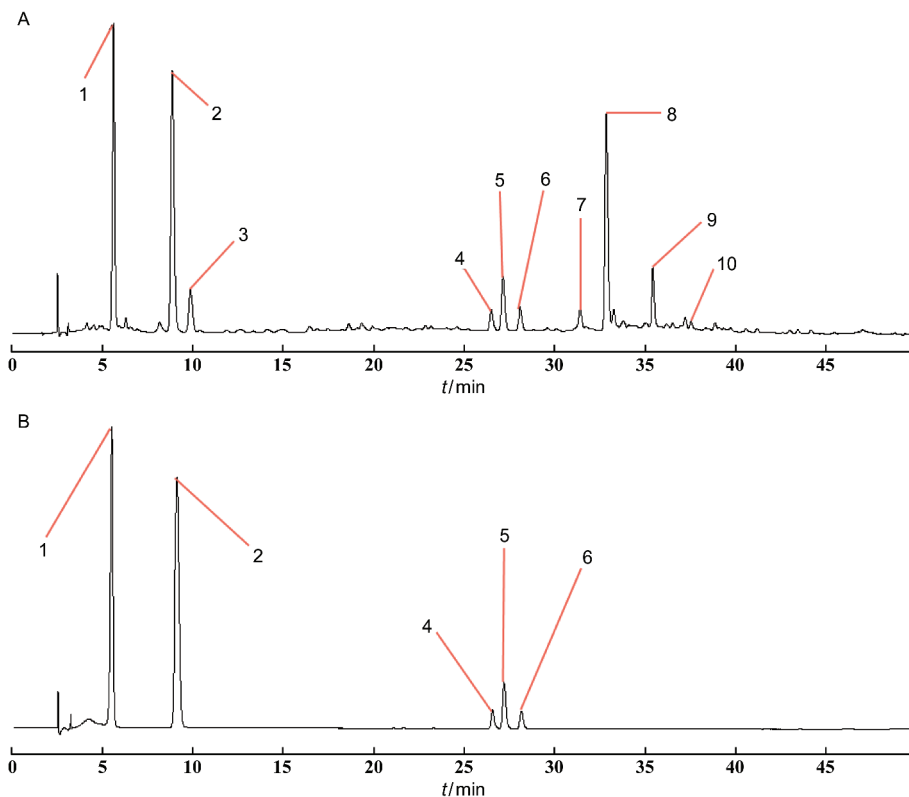


图1 15批石楠叶样品的HPLC指纹图谱(S1~S15)及对照图谱R



1:新绿原酸;2:绿原酸;4:芦丁;5:金丝桃苷;6:异槲皮苷

图2 石楠叶供试品溶液(A)与混合对照品溶液(B)的HPLC色谱图

**6.2 相似度评价** 采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)”计算相似度,15批石楠叶与对照图谱相似度分别为0.999,0.999,1.000,0.998,0.999,1.000,1.000,1.000,1.000,1.000,0.996,1.000,1.000,0.998,0.999,1,均>0.996,说明不同产地不同批次间石楠叶药材差异性较小,不同批次间化学成分组成具有良好的一致性。

**6.3 色谱峰的指认** 采用对照品对色谱峰进行指认,按“3”项下色谱条件进样测定,得到对照品HPLC色谱图。最终指认出5个共有峰,即1,2,4,

5,6号峰分别为新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷,对照品色谱图见图2。

## 7 HPLC同时测定石楠叶中5种化学成分的含量

**7.1 含量测定线性关系考察** 精密吸取“4.1”项下混合对照品溶液1,4,10,12,18,20  $\mu\text{L}$ ,按“3”项下色谱条件测定,记录色谱图。以峰面积( $Y$ )对进样量( $X$ )进行线性回归,即得回归方程及线性范围(见表2),结果表明5种化学成分在线性范围内呈良好的线性关系。

表2 线性关系考察结果

成分	回归方程	$R^2$	线性范围/ $\mu\text{g}$
新绿原酸	$Y = 842\ 612.925\ 2X + 120\ 487.771\ 5$	0.999 2	0.135 3 ~ 2.706 0
绿原酸	$Y = 1\ 027\ 645.945\ 3X + 98\ 752.302\ 7$	0.999 0	0.134 0 ~ 2.680 0
芦丁	$Y = 1\ 227\ 043.796\ 8X + 1\ 151.059\ 3$	0.999 7	0.008 5 ~ 0.170 5
金丝桃苷	$Y = 1\ 706\ 284.312\ 5X + 3\ 269.394\ 7$	0.999 1	0.015 6 ~ 0.312 8
异槲皮苷	$Y = 1\ 726\ 184.289\ 2X + 282.065\ 3$	1.000 0	0.005 9 ~ 0.118 9

**7.2 含量测定精密度实验** 精密吸取混合对照品溶液按“3”项下色谱条件连续进样6次,测定峰面积,新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的峰面积RSD分别为0.35%,1.44%,0.41%,0.37%,0.41%,表明仪器精密度良好。

**7.3 含量测定稳定性实验** 取同一批石楠叶药材粉末1.0g(编号S3),依照“4.2”项下方法制备供试品溶液,按“3”项下色谱条件分别在0,2,6,13,16,24h进样,测定峰面积,新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的峰面积RSD分别为0.30%,0.31%,0.24%,0.40%,0.29%,表明供试品溶液在24h内稳定性良好。

**7.4 含量测定重复性实验** 取同一批石楠叶药材粉末1.0g(编号S3),依照“4.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,按“3”项下色谱条件测定,测定峰面积,计算新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷的峰面积RSD分别为0.53%,2.32%,0.31%,1.64%,2.68%,表明方法重复性良好。

**7.5 含量测定加样回收率实验** 取已知含量的石楠叶样品(编号S3)粉末9份,每份约0.5g,分别加入样品含量的50%,100%,150%的对照品溶液:1.353  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的新绿原酸(1.18,2.36,3.55 mL)、1.340  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的绿原酸(1.37,2.73,4.10 mL)、0.120  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芦丁(1.00,2.00,3.00 mL)、0.150

$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的金丝桃苷(1.25,2.50,3.75 mL)和0.076 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的异槲皮苷(1.25,2.49,3.74 mL),每个比例各3份,按“4.2”项下方法制备供试品溶液,在“3”项下色谱条件测定,计算平均加样回收率及RSD,结果新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷的平均加样回收率均在95%~105%范围内,RSD均<3%,表明该方法的准确的良好。

## 结 果

### 1 化学模式识别

**1.1 PCA分析** 为进一步探究不同产地批次间石楠叶药材的质量差异性,将15批药材共有峰面积作为变量导入至SPSS 26.0软件中进行PCA分析,得到15 $\times$ 10阶数据矩阵。 $KMO = 0.732 > 0.5$ 和巴特利特检验显著性( $P = 0.00 < 0.001$ ),表明适宜做因子分析且变量高度相关。再将共有峰面积导入至SIMCA 14.1软件中进行PCA分析。采用UV进行数据归一化处理后,自动拟合PCA模型。通过PCA分析可知,从方差贡献率来看, $R^2X$ (累计解释能力参数)值为0.901 > 0.4说明该模型预测性良好。选取PC1,PC2,PC3累积贡献率达90.10%(见表3),说明3个主成分可反映石楠叶药材的整体综合质量,可作为质量标志物。以PC1,PC2和PC3建立立体坐标系进行投影,得到15批石楠叶药材的PCA

得分图,见图3。样品根据3个主成分可划分为5类:Ⅰ类S13,S14,S15和S8;Ⅱ类S2,S3,S9,S10,S11和S12;Ⅲ类S4,S5和S6;Ⅳ类S1;Ⅴ类S7。

相对较优。

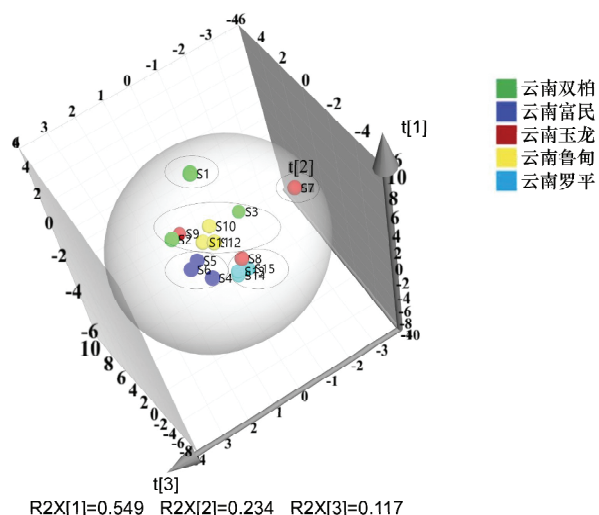


图3 15批石楠叶PCA得分图

表3 主成分特征值及方差贡献率

主成分	特征值	贡献率/%	累积贡献率/%
1	5.490 0	54.90	54.90
2	2.340 0	23.40	78.40
3	1.170 0	11.70	90.10
4	0.355 0	3.55	93.60
5	0.185 0	1.85	95.50
6	0.177 0	1.77	97.30
7	0.124 0	1.24	98.50
8	0.077 3	0.77	99.30
9	0.052 0	0.52	99.80
10	0.019 6	0.20	100.00

主成分载荷矩阵反映了各变量对主成分的贡献大小和作用方向,根据因子载荷矩阵表(见表4)可知,第1主成分与峰1~峰6和峰8~峰10成正相关,第2主成分峰4~峰6呈负相关,说明第二主成分越高则峰4~峰6含量越低。结果提示4~6号峰代表的化学成分可能与药材质量呈负相关。根据各主成分值及贡献率计算综合得分,公式为  $F = 0.549F_1 + 0.234F_2 + 0.117F_3$ ,计算结果见表5。综合得分的排名反映出不同产地批次的石楠叶药材质量,排名越高质量越好,由表可知S1和S2药材质量

表4 因子载荷矩阵表

项目	主成分		
	1	2	3
峰1	0.364 7	0.174 4	-0.032 2
峰2	0.384 2	0.161 2	0.091 8
峰3	0.405 4	0.043 5	-0.119 2
峰4	0.325 9	-0.368 5	-0.030 1
峰5	0.173 0	-0.568 7	0.119 0
峰6	0.160 4	-0.582 5	0.052 4
峰7	-0.026 7	0.020 5	0.901 4
峰8	0.412 0	0.026 9	0.078 0
峰9	0.292 2	0.342 7	0.290 4
峰10	0.370 5	0.156 8	-0.235 8

表5 主成分值及综合主成分值

编号	F1	F2	F3	F	排名
S1	5.420 7	1.715 9	-0.238 2	3.349 6	1
S2	1.364 0	0.952 0	1.259 9	1.119 0	2
S3	-1.888 3	2.028 3	-1.287 7	-0.712 7	11
S4	1.070 9	-2.187 2	0.784 2	0.167 9	8
S5	-0.063 8	-0.279 5	0.886 0	0.003 2	9
S6	0.980 5	-1.074 9	1.215 4	0.429 0	6
S7	1.634 2	-0.293 3	-2.967 2	0.481 4	5
S8	-0.587 1	-1.309 5	-0.392 5	-0.674 7	10
S9	-3.166 6	3.486 2	0.871 2	-0.820 8	12
S10	0.883 9	0.717 0	-0.016 6	0.651 1	4
S11	0.500 5	0.252 4	0.428 1	0.383 9	7
S12	1.763 8	-0.755 5	0.166 4	0.811 0	3
S13	-1.509 7	-1.462 8	-0.097 8	-1.182 6	13
S14	-3.341 0	-0.872 8	-0.109 6	-2.051 3	15
S15	-3.062 2	-0.916 3	-0.501 7	-1.954 3	14

1.2 偏最小二乘判别分析(PLS-DA) 为了进一步筛选对石楠叶质量产生影响较大的成分,在主成分分析的基础上选择偏PLS-DA分析,得到变量重要性投影值图(VIP)见图4,VIP > 1.5为标准,确定色谱峰1,2号与石楠叶药材的优质性呈正相关,可作为其质量标志性成分。

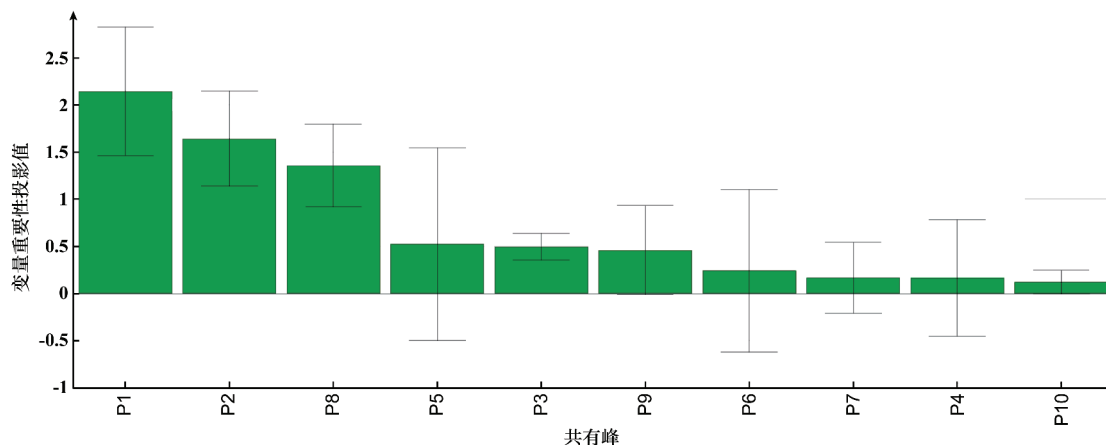


图4 15批石楠叶 PLS-DA 分析 VIP 图

**1.3 HCA 分析** 在 SPSS 26.0 软件中以 10 个共有峰面积为变量,进行系统聚类,见图 5。以平方欧式距离为区间,采用组间联接进行聚类,当类间距离为 5~10 时,15 批药材可聚为 4 大类:Ⅰ类 S13, S14, S15 和 S9;Ⅱ类 S2, S7, S10, S11 和 S12;Ⅲ类 S3, S4, S5, S6 和 S8;Ⅳ类 S1。结果表明 15 批药材虽然均产自云南省,但来自云南的 5 个县,来自同 1 个县的不同批次药材大多能聚为 1 类,但是个别产地聚不到一类,例如:S1 单独聚为一类,说明同一产地,不同批次的药材也存在一定差异,这些差异可能为采收季节、产地加工等造成的差异。

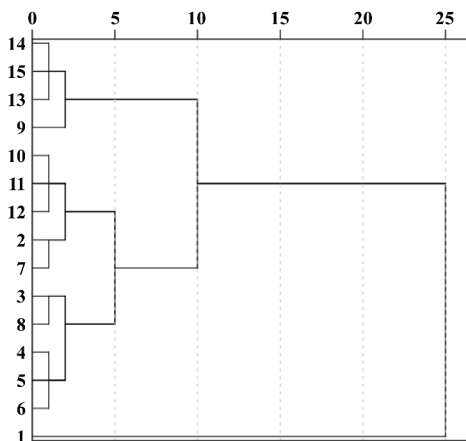


图5 15批石楠叶聚类树状图

## 2 含量测定

取 15 批石楠叶药材粉末,按“4.2”项下方法制备供试品溶液,每批平行 2 份,按“3”项下色谱条件测定,记录色谱图,计算样品中 5 种化学成分的含量,结果见表 6。

表 6 15 批石楠叶中 5 种化学成分含量测定结果  
mg·g<sup>-1</sup>

编号	含量				
	新绿原酸	绿原酸	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷
S1	9.13	8.50	0.53	0.77	0.35
S2	7.80	7.58	0.47	0.79	0.35
S3	6.74	7.12	0.42	0.71	0.33
S4	6.73	7.39	0.50	0.85	0.39
S5	6.73	7.20	0.47	0.81	0.36
S6	6.59	7.63	0.50	0.82	0.37
S7	7.40	7.29	0.49	0.80	0.36
S8	7.13	7.08	0.50	0.82	0.36
S9	6.29	6.75	0.41	0.67	0.31
S10	8.16	7.20	0.48	0.75	0.36
S11	8.02	7.09	0.47	0.79	0.35
S12	8.39	7.11	0.50	0.82	0.37
S13	6.04	6.37	0.48	0.80	0.37
S14	5.92	6.21	0.47	0.76	0.35
S15	5.80	6.35	0.46	0.79	0.35

## 讨 论

石楠的根、枝和叶均可药用,有行血止血、止痛等功效,用于黄疸、乳痈、牙痛。其叶药用价值高、研究前景广阔,但目前关于石楠叶的现代研究较为缺乏,文献报道多为临床应用方面,化学成分和药理作用研究较少。本文对 15 批石楠叶进行测定,建立了石楠叶药材的指纹图谱,标定共有峰 10 个,指纹图谱相似度评价显示 15 批次石楠叶药材具有良好的稳定性和相似性,无法对各产地的石楠叶进行评价区分<sup>[23]</sup>。所以采用 PCA 分析,显示 S1(云南双柏)

和 S2(云南双柏)的综合主成分值最高,表明此产地的石楠叶相对其他 4 个地区更为优质。

产地上的差异会对化学成分有一定影响,经 PLS-DA 分析得出 2 个质量标志物(1,2 号色谱峰)新绿原酸和绿原酸。PCA 分析发现质量标志物新绿原酸和绿原酸对药材的第一、第二主成分均为正相关,与 PLS-DA 分析的结果相一致。药材第二主成分和芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷含量呈负相关,其中对金丝桃苷和异槲皮苷的影响更为明显,说明此 3 种成分在药材中含量不宜太高,应该控制一个含量的上限,以上 5 种成分可作为石楠叶的差异性质量标志物。

综上所述,本研究共分析筛选了 5 个质量标志物:新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷和异槲皮苷,并对以上 5 种成分进行定量分析,为后期更深入研究石楠叶提供基础。其中绿原酸和新绿原酸具有多种生物活性,保护心血管及神经系统作用可能与石楠叶的祛风、通络功效有关。HPLC 指纹图谱及多成分含量测定方法稳定可靠,结合化学模式识别技术确定石楠叶的质量标志物,能系统地反映各产地石楠叶的差异性,可更加科学全面地对石楠叶药材质量进行评价。

#### [ 参 考 文 献 ]

[1] 贺献瑞,邓志厚.石楠叶、石楠藤男科妇科应用举隅[J].河北中医,2005,27(5):363-364.  
 [2] 申万祥,姚默,赵兵,等.石楠属药学研究概况[J].畜牧与饲料科学,2011,32(11):58-60.  
 [3] 安徽省药品监督管理局.安徽省中药饮片炮制规范:2019年版[M].合肥:安徽科学技术出版社,2019.

[4] 胡春平,杨伟,蔡以生.石楠叶合剂治疗血管神经性头痛 50 例[J].中医药临床杂志,2010,22(12):1051-1052.  
 [5] 王冠吉.针药并用治疗风热型荨麻疹 38 例[J].浙江中医杂志,2007,42(12):717.  
 [6] 樊士申.黄芪补肾丸治疗男性不育症 89 例[J].光明中医,2006,21(5):60-61.  
 [7] 孙惠霞.何氏坤育灵治疗不孕症 350 例[J].陕西中医,1998,19(12):531.  
 [8] 黄晖.朱南孙辨治女子不孕经验[J].中医杂志,1988,29(8):19-21.  
 [9] 尚云.朱南孙治疗不孕症的经验[J].中医杂志,1988,29(6):17-18.  
 [10] 贺献瑞,邓志厚.石楠叶、石楠藤男科妇科应用举隅[J].河北中医,2005,27(5):363-364.  
 [11] 李景天.石楠叶的应用[J].内蒙古中医药,1985(3):28.  
 [12] 袁云端.唐吉父妇科医案拾零(二)[J].上海中医药杂志,1993,27(1):17-18.  
 [13] 贺献瑞,邓志厚.石楠叶、石楠藤男科妇科应用举隅[J].河北中医,2005,27(5):363-364.  
 [14] 叶新苗.蔡鑫培副主任医师医案两则[J].浙江中医学院学报,1986,10(3):55.  
 [15] 张莹,李辛雷,李纪元,等.六种彩叶植物营养成分及有害元素含量分析[J].广西植物,2010,30(5):678-681,612.  
 [16] 杨卫明.土茯苓汤治疗血管神经性头痛 65 例[J].现代中西医结合杂志,2008,17(18):2837-2838.  
 [17] 李媛.草珊瑚、紫荆和小叶石楠的化学成分及生物活性研究[D].北京:中国协和医科大学,2006.  
 [18] 郭辉力,师光禄,王有年.8 种中药提取物对朱砂叶螨触杀活性的研究[J].北京农学院学报,2010,25(3):21-23.  
 [19] 林远灿,骆海莺.枇杷叶与混淆品石楠叶的比较鉴别[J].中药材,2013,36(8):1262-1264.  
 [20] 罗晓清,祝玮,钱苏生.RP-HPLC 法测定石楠叶中熊果酸和齐墩果酸的含量[J].现代中药研究与实践,2003,17(5):14-15.  
 [21] 刘海兴,杨更亮,王德先,等.毛细管电泳法测定石楠叶中有效成分的含量[J].中草药,2001,32(11):999.  
 [22] 漆小泉,王玉兰,陈晓亚.植物代谢组学:方法与应用[M].北京:化学工业出版社,2011:154.  
 [23] 谭国英,黄琦,沈千汇,等.草豆蔻高效液相色谱指纹图谱快速分析法研究[J].今日药学,2022,32(6):409-411,417.

编辑:毕晓帆/接受日期:2022-09-08