

基于 UPLC 指纹图谱和多指标成分定量的不同产地白茅根标准汤剂质量评价研究

李振雨^{1,2*}, 周湘媛^{1,2}, 马懿飞^{1,2}, 何民友^{1,2},
刘晓霞^{1,2}, 陈向东^{1,2}, 孙冬梅^{1,2,3,4}, 罗文汇^{1,2,3,4}

¹广东一方制药有限公司; ²广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244;
³江西一方天江药业有限公司, 南昌 330000; ⁴湖南一方天江药业有限公司, 常德 415000

摘要:本研究通过超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱结合多成分定量对不同产地的白茅根标准汤剂的质量进行评价。采用相似度计算、聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)对指纹图谱数据进行分析。结果显示,18批白茅根标准汤剂指纹图谱共标识出9个共有指纹峰,指纹图谱相似度在0.920~0.997;HCA将18批样品分为3类,河北产区的样品自成一类,江苏与安徽、河南的样品在分类上存在交叉;PCA结果显示,除江苏外,同一产区白茅根标准汤剂指纹图谱共有峰的差异较小;OPLS-DA筛选出3个差异标志性色谱峰,分别为峰9(对羟基肉桂酸)、峰6和峰5(绿原酸)。对白茅根标准汤剂中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和对羟基肉桂酸的含量进行测定,结果显示,4种酚酸的总含量:河北>安徽>江苏>河南,不同产区的样品4种酚酸的总含量差异明显;其中河南产区的样品绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的含量明显低于其他产区,安徽产区的样品对羟基肉桂酸的平均含量最高且比较稳定,江苏产区的样品对羟基肉桂酸和4种酚酸的总含量波动较大。所建立的分析方法稳定可靠,重复性好,为白茅根标准汤剂及其相关制剂的质量评价提供参考。

关键词:白茅根标准汤剂;UPLC指纹图谱;多指标成分;定量分析

中图分类号:R282.4

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)11-1900-11

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.11.011

Study on quality evaluation of Imperatae Rhizoma standard decoction based on UPLC fingerprint and multi-components content determination

LI Zhen-yu^{1,2*}, ZHOU Xiang-yuan^{1,2}, MA Yi-fei^{1,2}, HE Min-you^{1,2},
LIU Xiao-xia^{1,2}, CHEN Xiang-dong^{1,2}, SUN Dong-mei^{1,2,3,4}, LUO Wen-hui^{1,2,3,4}

¹Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd.; ²Guangdong Provincial Key Laboratory
of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China;

³Jiangxi Yifang Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330000, China;

⁴Hunan Yifang Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Changde 415000, China

Abstract: In this study, the quality of Imperatae Rhizoma standard decoction from different habitats was evaluated by UPLC fingerprint and quantitative analysis of multiple components. Similarity calculation, cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze the fingerprint data. The results showed that there were 9 common fingerprint peaks in the fingerprints of 18 batches of Imperatae Rhizoma standard decoction. The similarity of fingerprints ranged from 0.920 to 0.997. HCA divided 18 batches of samples into three categories. The samples from Hebei Province were of their own kind. The samples from Jiangsu Province were crossed with those from Anhui and Henan provinces respectively. PCA showed that, except Jiangsu Province, the differences of common peaks in the fingerprints of Imperatae Rhizoma standard decoction in the same production area were small. OPLS-DA

收稿日期:2022-07-06 接受日期:2022-10-10

基金项目:国家工业和信息化部2019年产业技术基础公共服务平台项目(2019-00902-1-2);湖南省自然科学基金-科药联合基金(2021JJ80057);江西省中医药标准化项目(2020A10)

*通信作者 Tel:86-757-85128602; E-mail:lzy1083656123@126.com

screened three differential marker chromatographic peaks, which were peak 9 (*p*-hydroxycinnamic acid), peak 6 and peak 5 (chlorogenic acid) respectively. The contents of chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and *p*-hydroxycinnamic acid in Imperatae Rhizoma standard decoction were determined. The results showed that the total content of four phenolic acids in Imperatae Rhizoma standard decoction were: Hebei > Anhui > Jiangsu > Henan. The contents of four phenolic acids in samples from different production areas were significantly different. The contents of chlorogenic acid, neochlorogenic acid and cryptochlorogenic acid in the samples from Henan production area were significantly lower than that from other production areas. The average content of *p*-hydroxycinnamic acid in the samples from Anhui production area was the highest and relatively stable. The total amount of *p*-hydroxycinnamic acid and four phenolic acids in the samples of Jiangsu production area fluctuated greatly. The established analytical method is stable, reliable and reproducible, which can provide reference for the quality evaluation of Imperatae Rhizoma standard decoction and its related preparations.

Key words: Imperatae Rhizoma standard decoction; UPLC fingerprint; multiple components; quantitative analysis

中药标准汤剂是以中药饮片为原料,参考传统中药汤剂煎煮习惯,以水为溶剂,采用标准化的煎药模式制备得到的单味中药饮片水煎液。中药标准汤剂作为一种标准物质或标准体系,常用于标化中药临床用药,规范中药配方颗粒等新型中药饮片在临床上的使用,从而保障中药临床用药的准确性^[1]。因此,通过建立中药标准汤剂的质量标准,能够为相应的中药配方颗粒及经典名方等现代中药制剂质量标准的建立提供重要参考。

白茅根为禾本科植物白茅 *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb. 的干燥根茎,具有凉血止血,清热利尿的作用^[2]。现代研究表明,白茅根含有三萜、黄酮、有机酸、苯丙素、内酯、甾醇等多种化学成分^[3],具有止血、利尿、镇痛、抑菌、抗炎、抗氧化、降血压、保肝、调节机体免疫等多种药理活性^[4,5]。2020年版《中国药典》白茅根药材项下质量标准缺乏含量指标,现行的质量标准难以较全面反映白茅根的内在质量。已有的研究报道,多采用指纹/特征图谱结合绿原酸含量测定对白茅根进行质量控制^[6-8],尚未见到指纹图谱结合多指标成分的定量研究。研究表明,中药中的酚酸类成分具有抗炎、抑菌、抗氧化、抗肿瘤等作用,是极具研究价值和应用潜力的天然活性产物^[9]。白茅根中含有较多的酚酸类成分^[10],其抗炎、抑菌、抗氧化等药理活性与白茅根功能主治密切相关^[11],因此,本次研究通过建立白茅根标准汤剂 UPLC 指纹图谱并首次实现对标准汤剂中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和对羟基肉桂酸含量的同时测定,结合化学计量学分析方法,为不同产区的白茅根标准汤剂质量评价提供依据。

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪 (H-Class, 沃特世公

司); Waters CORTECS T3 C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.6 μm) 色谱柱; 百分之一电子分析天平 (JJ600, 常熟市双杰测试仪器厂); 万分之一电子分析天平 (ME204E, 梅特勒-托利多公司); 百万分之一电子分析天平 (XP26, 梅特勒-托利多公司); 数控超声波清洗器 (KQ500DE, 昆山市超声仪器有限公司); 超纯水系统 (Milli-Q Direct 默克股份有限公司)。

1.2 试剂与试药

试剂:乙醇(广东光华科技股份有限公司,分析纯);甲醇(广东光华科技股份有限公司,分析纯);磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱纯);甲醇(默克股份有限公司,色谱纯);水为超纯水。

试药:绿原酸(中国食品药品检定研究院,批号:110753-201716,含量:99.3%);新绿原酸(四川省维克奇生物科技有限公司,批号:wkq21083002,含量:96.7%);隐绿原酸(成都乐天美医药科技有限公司,批号:DST210427-035,含量:99.1%);对羟基肉桂酸(成都普菲德生物技术有限公司,批号:21001401,含量:99.8%)。

1.3 样品

实验所用 18 批白茅根药材由广东一方制药有限公司采购管理部于产地购买和收集,产地信息见表 1 所示,经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定为禾本科植物白茅 *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb. 的干燥根茎,并经广东一方制药有限公司质量中心检定合格,均符合 2020 年版《中国药典》(一部)白茅根药材项下的各项规定,并按照 2020 年版《中国药典》(一部)白茅根饮片项下炮制规定制成白茅根饮片,具体炮制方法为:取白茅根药材,挑去非药用部位、杂质,洗净,稍润,切 10~15 mm 的段,干燥,筛去碎屑。

表 1 白茅根产地信息表

Table 1 Origin information table of Imperatae Rhizoma

编号 No.	产地 Origin
S1	河北省邢台市隆尧县
S2	河北省邢台市隆尧县
S3	河北省邢台市隆尧县
S4	河北省邢台市内丘县
S5	河北省邢台市内丘县
S6	河北省邢台市内丘县
S7	安徽省亳州市谯城区
S8	安徽省亳州市谯城区
S9	安徽省亳州市谯城区
S10	安徽省亳州市谯城区
S11	江苏省宿迁市泗阳县
S12	江苏省宿迁市泗阳县
S13	江苏省宿迁市宿城区
S14	江苏省宿迁市宿城区
S15	江苏省宿迁市宿城区
S16	河南省南阳市桐柏县
S17	河南省南阳市桐柏县
S18	河南省南阳市桐柏县

2 方法与结果

2.1 白茅根标准汤剂的制备

根据《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》和《医疗机构中药煎药室管理规范》，确定白茅根标准汤剂的制备工艺为：取白茅根饮片 100 g，加水煎煮两次，第一次加 9 倍量水，浸泡 30 min，煎煮 30 min，趁热过滤，滤液迅速冷却；第二次加 7 倍量水，煎煮 25 min，趁热过滤，滤液迅速冷却，合并两次滤液，减压浓缩至 100 mL 的浓缩液，冷冻干燥，得白茅根标准汤剂冻干粉。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件

选择 Waters CORTECS T3 C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.6 μm) 色谱柱；以甲醇为流动相 A，以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B；梯度洗脱 (0 ~ 4 min, 4% A；4 ~ 12 min, 4% → 7% A；12 ~ 15 min, 7% → 13% A；15 ~ 25 min, 13% → 16% A；25 ~ 27 min, 16% → 20% A；27 ~ 35 min, 20% A)；流速为 0.30 mL/min；柱温为 40 °C；检测波长为 325 nm；进样量为 2 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备

取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和对羟基肉桂酸对照品适量，精密称定，加 50% 甲醇制成每 1 mL 含绿原酸 9.27 μg、新绿原酸 4.06 μg、隐绿原酸 4.12 μg、对羟基肉桂酸 5.10 μg 的混合溶液，即得。

2.2.3 供试品溶液的制备

取白茅根标准汤剂冻干粉适量，研细，取约 0.1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 15 mL，称定重量，超声处理 (功率 300 W，频率 40 kHz) 30 min，放冷，再称定重量，用 50% 甲醇补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2.4 方法学验证

2.2.4.1 精密度考察

取白茅根标准汤剂冻干粉 (编号: S1) 适量，研细，取约 0.1 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，精密吸取上述供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次，以绿原酸色谱峰为参照峰 S，计算各共有指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.05% ~ 0.13% 范围内，相对峰面积 RSD 值在 0.32% ~ 2.61% 范围内，均小于 3.0%，表明仪器精密度良好。

2.2.4.2 重复性考察

取同一批白茅根标准汤剂冻干粉 (编号: S1) 适量，研细，取约 0.1 g，精密称定，平行 6 份，按“2.2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，以绿原酸色谱峰为参照峰 S，计算各共有指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.03% ~ 0.17% 范围内，相对峰面积 RSD 值在 0.36% ~ 2.76% 范围内，均小于 3.0%，说明该方法重复性良好。

2.2.4.3 稳定性考察

取白茅根标准汤剂冻干粉 (编号: S1) 适量，研细，取约 0.1 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件，分别在 0、3、6、9、12、18、24 h 进样分析，以绿原酸色谱峰为参照峰 S，计算各共有指纹峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值在 0.03% ~ 0.21% 范围内，相对峰面积 RSD 值在 0.37% ~ 2.34% 范围内，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 指纹图谱的建立及共有峰的标定

分别取 18 批白茅根标准汤剂冻干粉适量，研细，取约 0.1 g，精密称定，按“2.2.3”项下方法制备 18 份供试品溶液，分别按“2.2.1”项下色谱条件进样

测定,记录各批次白茅根标准汤剂样品指纹图谱,并导出指纹图谱 CDF 格式,将 18 批白茅根标准汤剂样品指纹图谱 CDF 格式导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》软件中,以编号为 S1 的样

品指纹图谱为参照图谱,进行保留时间校正和全峰匹配,18 批白茅根标准汤剂指纹图谱共标识出 9 个共有指纹峰(见图 1),以中位数法生成白茅根标准汤剂对照指纹图谱(见图 2)。

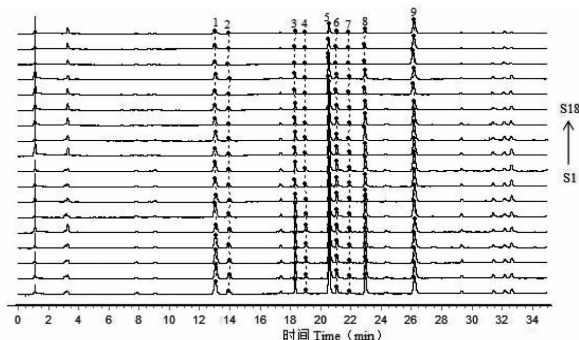


图 1 18 批白茅根标准汤剂指纹图谱叠加图

Fig. 1 Superimposed fingerprints of 18 batches of Imperatae Rhizoma standard decoction

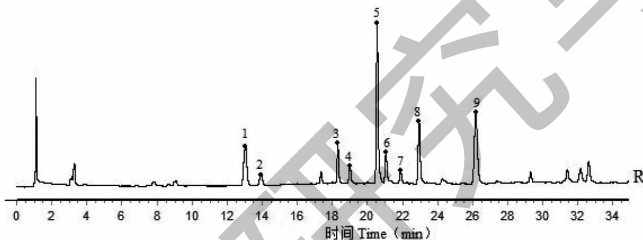


图 2 白茅根标准汤剂指纹图谱共有模式

Fig. 2 Common pattern of the fingerprint of Imperatae Rhizoma standard decoction

2.2.6 相似度计算

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723 版本)》软件计算 18 批白茅根标准汤剂样品指纹图谱与白茅根标准汤剂对照指纹图谱的相似度值,结果见表 2 所示。结果显示,18 批白茅根标准汤剂指纹图谱与对照指纹图谱的相似度在 0.920 ~ 0.997,其中河北产区的 6 批相似度值在 0.972 ~ 0.986,安徽产区的 4 批相似度值在 0.991 ~ 0.997,江苏产区的 5 批相似度值在 0.954 ~ 0.992,河南 3 批相似度值在 0.920 ~ 0.945。从相似度计算结果可知,河北、安徽和河南的样品存在一定的差异,而江苏产区的样品不同批次间指纹峰的峰面积比例波动较大,与河北和安徽的样品并不能明显地区分和鉴别。这种差异可能与不同产地的白茅根药材的生长环境、产地加工和采收时间的不同有关,此外,白茅根中含量较高的酚酸类成分,遇热不稳定,药材的储藏方式、放置时间均可能对药材的质量造成一定的影响。

表 2 相似度评价结果

Table 2 Evaluation results of the similarity

编号 No.	相似度 Similarity
S1	0.981
S2	0.984
S3	0.982
S4	0.986
S5	0.985
S6	0.972
S7	0.991
S8	0.993
S9	0.996
S10	0.997
S11	0.992
S12	0.987
S13	0.972
S14	0.954
S15	0.962
S16	0.920
S17	0.932
S18	0.945

2.2.7 共有峰的指认

取白茅根标准汤剂冻干粉(编号:S1)适量,研细,取约0.1 g,精密称定,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,取“2.2.2”项下混合对照品溶液和白茅根标准汤剂供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条

件进样分析,结果如图3所示。经与对照品保留时间和紫外-可见光3D光谱比对分析,确定峰1为新绿原酸,峰5为绿原酸,峰8为隐绿原酸,峰9为对羟基肉桂酸。

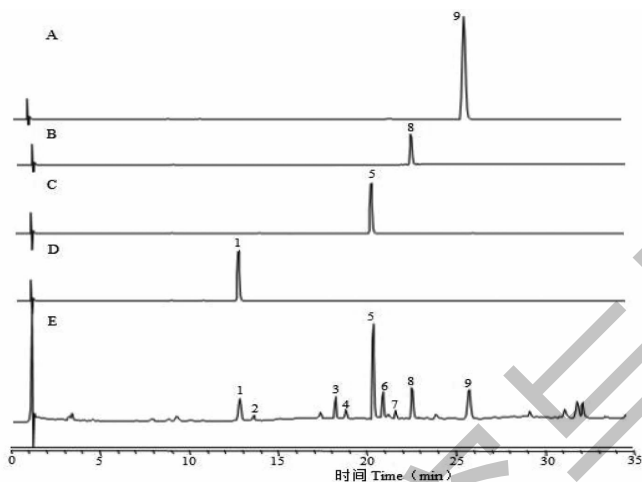


图3 共有指纹峰的指认

Fig. 3 Identification of common peaks

注:A:对羟基肉桂酸对照品;B:隐绿原酸对照品;C:绿原酸对照品;D:新绿原酸对照品;E:供试品。1:新绿原酸;5:绿原酸;8:隐绿原酸;9:对羟基肉桂酸。Note:A:P-hydroxycinnamic acid reference; B:Cryptochlorogenic acid reference; C:Chlorogenic acid reference; D:Neochlorogenic acid reference; E:Sample. 1:Neochlorogenic acid; 5:Chlorogenic acid; 8:Cryptochlorogenic acid; 9:p-Hydroxycinnamic acid.

2.3 化学计量学分析

化学计量学中的模式识别技术,分为有监督和无监督两种方式,无监督模式识别技术用于中药研究领域,用的最多诸如聚类分析(HCA)和主成分分析(PCA),常用于观察样本之间的分类趋势;而有监督模式识别技术常用的方法为偏最小二乘法-判别式分析以及正交偏最小二乘法-判别式分析,用于显示样品间的差异主要由哪些变量引起,化学计量学分析方法已广泛用于中药的真伪鉴别、基原研究、炮制工艺研究及质量分析^[12,13]。

2.3.1 聚类分析(HCA)

采用IBM SPSS Statistics 20.0软件,以18批白茅根标准汤剂指纹图谱的9个共有指纹峰的峰面积积分值为变量,并采用Z得分法对峰面积积分值进行标准化处理,样本间距以平方Euclidean距离表征,采用组间联接法对18批白茅根标准汤剂指纹图谱进行系统聚类分析,结果见图4所示。结果显示,当组间距离为10时,18批白茅根标准汤剂样品被分为三类,其中编号S7~S12的样品归为一类,编号S1~S6的样品归为第二类,编号S13~S18的样品

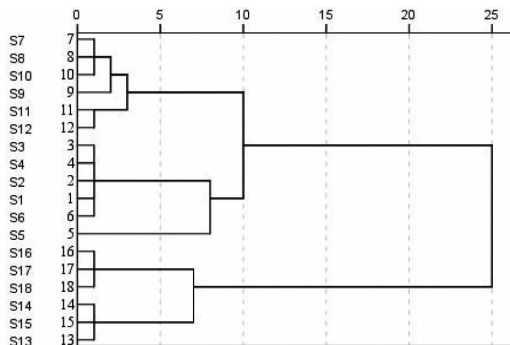


图4 聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis diagram

归为第三类。通过产地分析可知,河北产区的白茅根标准汤剂自成一类,而江苏产区的白茅根标准汤剂部分批次分别与安徽和河南产区的样品聚为一类,聚类分析结果基本与相似度评价结果相类似。

2.3.2 主成分分析(PCA)

以白茅根标准汤剂指纹图谱 9 个共有峰的峰面积积分为变量,导入 SIMCA14.1 软件,进行 PCA 分析,共生成 3 个主成分, R^2X 为 0.963, Q^2 为 0.741,均大于 0.5,证明模型有效。其中主成分 1 累积贡献率为 77.3%,主成分 2 累积贡献率为 13.2%,前两个主成分累积贡献率在 90% 以上,以前两个主成分的得分值为 X、Y 轴,自动生成 18 批白茅根标准汤剂指纹图谱 PCA 得分图,结果见图 5

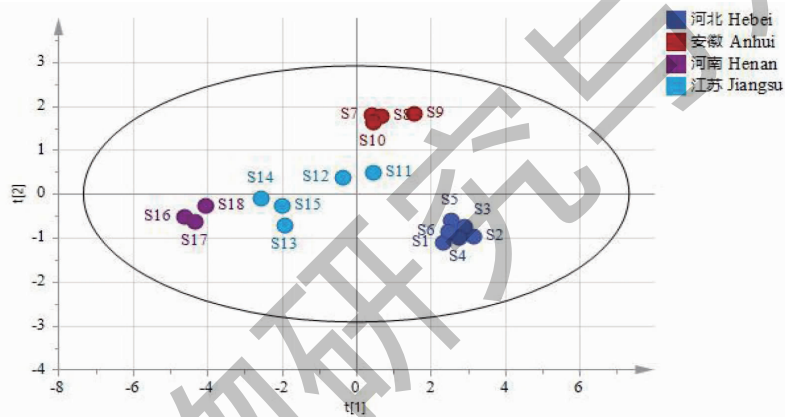


图 5 PCA 得分图

Fig. 5 PCA scores plot

2.3.3 正交偏最小二乘法-判别式分析(OPLS-DA)

以 9 个共有指纹峰的峰面积积分为变量导入 SIMCA14.1 软件,进行 OPLS-DA 分析,运用统计推断方法分析该模型,将模型随机排列 200 次做置换检验,结果见图 6。由图 6 可知, R^2 和 Q^2 截距值分别为 0.083 和 -0.449,置换检验图左边的 R^2 和 Q^2 值均小于最右边的值,说明建立的 OPLS-DA 模型没有出现拟合现象。通过 SIMCA14.1 软件,建立 4 个产区白茅根标准汤剂样品的 OPLS-DA 模型,生成 OPLS-DA 得分图,见图 7 所示,OPLS-DA 模型中累积解释能力参数 R^2X (cum) 为 0.954,累积解释能力参数 R^2Y 为 0.716,预测能力参数 Q^2 为 0.608,均大于 0.5,表明模型的拟合准确性好,具有较强的解释和预测能力,利用 SIMCA14.1 软件生成变量 VIP 图,对变量的显著性进行预测,结果见图 8 所示。结果显示,4 个产区白茅根标准汤剂样品 OPLS-DA 得分图与 PCA 得分图类似,表明以 9 个共有指纹峰的

所示。结果显示,除江苏外,其余 3 个产区的样品相互比较,同一产区样品在 PCA 得分图上分布较集中,说明其指纹图谱共有峰的差异性较小,不同产区样品在 PCA 得分图上的位置相距较远,说明其共有峰的差异较大。与河北、安徽、河南 3 个产区相比,江苏产区的 5 批白茅根标准汤剂在 PCA 得分图上分布较为分散,其中编号为 S11 和 S12 的样品在 PCA 得分图上与安徽产区的样品距离接近,编号为 S13 ~ S15 的样品在 PCA 得分图上与河南产区的样品距离接近,说明江苏产区不同批次的白茅根标准汤剂化学成分也存在较大差异,PCA 分析结果基本与 HCA 结果基本一致。

峰面积为变量,不同产区的标准汤剂样品存在明显差异,而同一产区,除江苏外,共有峰的差异较小。以 $VIP > 1.0$ 筛选具有显著差异的色谱峰,并以 VIP 值进行排序,结果显示,峰 9 (对羟基肉桂酸) $>$ 峰 6 $>$ 峰 5 (绿原酸) $>$ 峰 2 $>$ 峰 8 (隐绿原酸) $>$ 峰 1 (新绿原酸) $>$ 峰 3 $>$ 峰 7 $>$ 峰 4,其中 VIP 值大于 1.0 的色谱峰分别为峰 9 (对羟基肉桂酸)、峰 6 和峰 5 (绿原酸),说明不同产区白茅根标准汤剂羟基肉桂酸和绿原酸的含量有着较明显的差异,可能与药材的采收时间和产区加工方式的不同有关。

2.4 含量测定

2.4.1 精密度考察

精密吸取白茅根标准汤剂(编号:S1)供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次,记录绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和对羟基肉桂酸色谱峰面积,并计算峰面积 RSD 值分别为 0.25%、0.12%、0.20% 及 0.51%,表明该方法精密度良好。

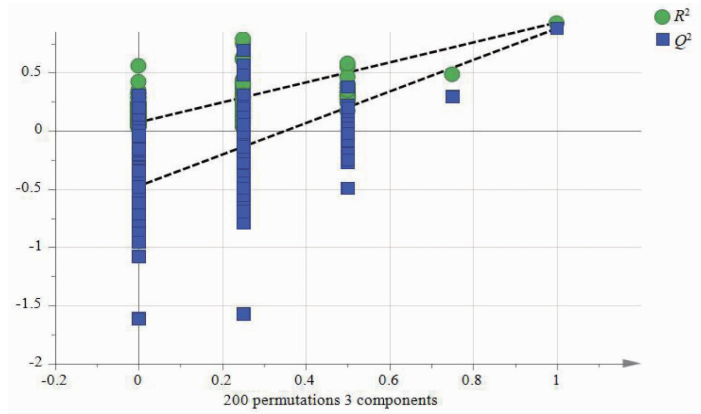


图6 OPLS-DA 模型置换检验图

Fig. 6 OPLS-DA model permutation test diagram

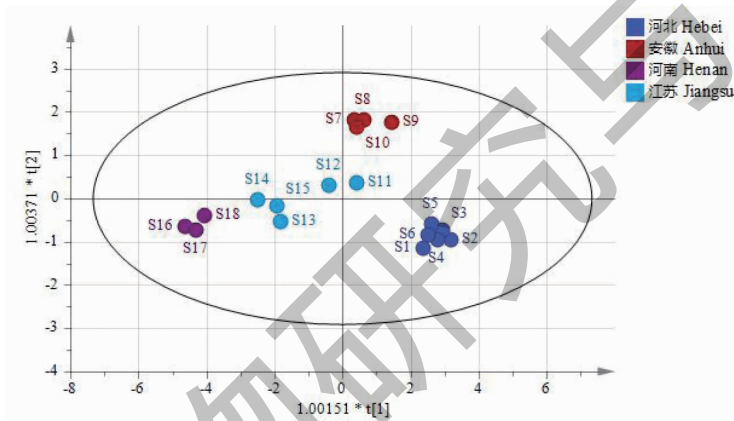


图7 OPLS-DA 得分图

Fig. 7 OPLS-DA scores diagram

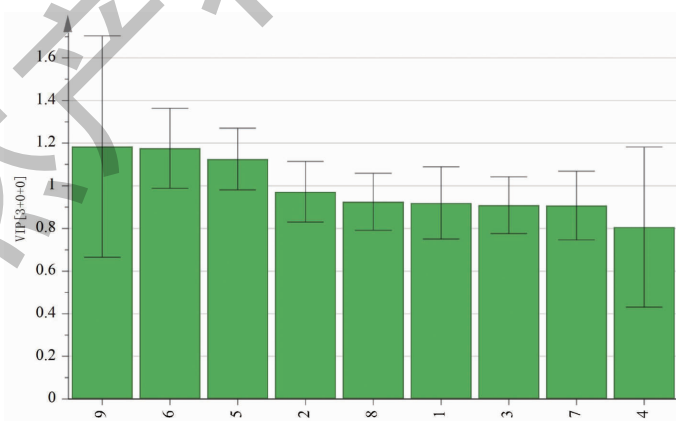


图8 OPLS-DA 模型 VIP 图

Fig. 8 VIP diagram of OPLS-DA

2.4.2 线性关系考察

精密称定绿原酸对照品 3.734 mg、新绿原酸对照品 1.679 mg、隐绿原酸对照品 1.663 mg、对羟基肉桂酸对照品 2.036 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加 50%

甲醇溶解, 并稀释至刻度, 即得绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和对羟基肉桂酸混合对照品储备液。精密量取上述混合对照品储备液 0.2、0.4、1、2、4 mL, 分别置 20 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释, 并定容至刻度,

摇匀,制成每 1 mL 含绿原酸 1.86、3.71、9.27、18.54、37.08 μg , 含新绿原酸 0.81、1.62、4.06、8.12、16.24 μg , 含隐绿原酸 0.82、1.65、4.12、8.24、16.48 μg , 含对羟基肉桂酸 1.02、2.03、5.08、10.16、20.32 μg 的混合对照品应用液,分别精密吸取上述对照品储备液和应用液,按“2.2.1”项下色谱条件依次进样 2 μL ,记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),对照品浓度为横坐标(X)绘制标准曲线,结果显示,绿原酸的线性回归方程为: $Y = 24\ 218.07X + 21\ 285.41$,相关系数 $r = 0.999\ 9$,表明在浓度 1.86 $\mu\text{g}/\text{mL} \sim 185.39\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内绿原酸浓度与峰面积线性关系良好,新绿原酸的线性回归方程为: $Y = 25\ 449.74X - 893.08$,相关系数 $r = 1.000\ 0$,表明在浓度为 0.81 $\mu\text{g}/\text{mL} \sim 81.20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内新原酸浓度与峰面积线性关系良好,隐绿原酸的线性回归方程为: $Y = 27\ 804.92X - 6\ 109.84$,相关系数 $r = 0.999\ 8$,表明在浓度为 0.82 $\mu\text{g}/\text{mL} \sim 82.40\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内隐绿原酸浓度与峰面积线性关系良好,对羟基肉桂酸的线性回归方程为: $Y = 26\ 415.77X - 7\ 481.78$,相关系数 $r = 0.999\ 9$,表明在浓度为 1.02 $\mu\text{g}/\text{mL} \sim 102.00\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内对羟基肉桂酸浓度与峰面积线性关系良好。

2.4.3 重复性考察

取同一批白茅根标准汤剂冻干粉(编号:S1),平行称定 6 份,按“2.2.3”项下确定的供试品溶液

制备方法,制备供试品溶液 6 份。按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,分别计算绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和对羟基肉桂酸的含量和 RSD 值,结果显示,绿原酸的平均含量为 1.91 mg/g ,RSD 值为 0.91%,新绿原酸的平均含量为 0.84 mg/g ,RSD 值为 1.02%,隐绿原酸的平均含量为 0.85 mg/g ,RSD 值为 1.27%,对羟基肉桂酸的平均含量为 1.06 mg/g ,RSD 值为 1.56%,表明该方法重复性良好。

2.4.4 加样回收率考察

取已知含量的白茅根标准汤剂冻干粉(编号:S1)适量,研细,取约 0.05g,精密称定,平行 6 份,按样品与对照品含量比为 1:1 的比例加入绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和对羟基肉桂酸对照品,按“2.2.3”项下方法制备 6 份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表 3。结果显示,绿原酸的加样回收率均值为 99.93%,回收率范围为 99.02% ~ 100.78%,RSD 值为 0.71%,新绿原酸的加样回收率均值为 101.78%,回收率范围为 100.47% ~ 102.61%,RSD 值为 0.83%;隐绿原酸的加样回收率均值为 99.59%,回收率范围为 98.27% ~ 102.51%,RSD 值为 1.72%,对羟基肉桂酸的加样回收率均值为 98.79%,回收率范围为 97.15% ~ 101.22%,RSD 值为 1.85%,均符合 2020 年版《中国药典》通则 9101 的规定,表明该方法的准确度良好。

表 3 加样回收率测定结果

Table 3 Results of the sample recovery rate

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample weight (g)	测得量 Measured quantity (mg)	加入量 Added amount (mg)	已知量 Known quantity (mg)	回收率 Recovery rate (%)	均值 Average (%)	RSD(%)
绿原酸 Chlorogenic acid	1	0.053 1	0.203 2	0.101 4	0.101 5	100.30	99.93	0.71
	2	0.054 1	0.204 3	0.101 4	0.103 4	99.54		
	3	0.053 2	0.202 4	0.101 4	0.101 6	99.38		
	4	0.056 1	0.207 6	0.101 4	0.107 2	99.02		
	5	0.051 2	0.199 8	0.101 4	0.097 8	100.54		
	6	0.052 3	0.202 1	0.101 4	0.099 9	100.78		
新绿原酸 Neochlorogenic acid	1	0.053 1	0.087 5	0.042 2	0.044 6	101.66	101.78	0.83
	2	0.054 1	0.088 7	0.042 2	0.045 4	102.61		
	3	0.053 2	0.087 1	0.042 2	0.044 7	100.47		
	4	0.056 1	0.089 8	0.042 2	0.047 1	101.18		
	5	0.051 2	0.086 1	0.042 2	0.043 0	102.13		
	6	0.052 3	0.087 2	0.042 2	0.043 9	102.61		

续表 3 (Continued Tab. 3)

指标成分 Index component	序号 No.	称样量 Sample Weight (g)	测得量 Measured quantity (mg)	加入量 Added amount (mg)	已知量 Known quantity (mg)	回收率 Recovery rate (%)	均值 Average (%)	RSD (%)
隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid	1	0.053 1	0.092 1	0.045 6	0.045 4	102.51	99.59	1.72
	2	0.054 1	0.091 0	0.045 6	0.046 2	98.27		
	3	0.053 2	0.091 4	0.045 6	0.045 4	100.85		
	4	0.056 1	0.092 8	0.045 6	0.047 9	98.47		
	5	0.051 2	0.088 7	0.045 6	0.043 7	98.63		
	6	0.052 3	0.089 7	0.045 6	0.044 6	98.80		
对羟基肉桂酸 p-Hydroxycinnamic acid	1	0.053 1	0.112 3	0.055 4	0.056 2	101.22	98.79	1.85
	2	0.054 1	0.113 2	0.055 4	0.057 3	100.97		
	3	0.053 2	0.110 4	0.055 4	0.056 3	97.66		
	4	0.056 1	0.113 2	0.055 4	0.059 4	97.15		
	5	0.051 2	0.108 2	0.055 4	0.054 2	97.47		
	6	0.052 3	0.109 8	0.055 4	0.055 3	98.29		

2.4.5 稳定性考察

精密吸取白茅根标准汤剂(编号:S1)供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件,分别在0、3、6、8、12、18、24 h进样分析,计算峰面积RSD值,结果显示,绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和对羟基肉桂酸的峰面积RSD值分别为0.19%、0.56%、0.96%和1.02%,均小于3.0%,说明供试品溶液在24h内稳定性良好。

2.4.6 样品测定

取18批白茅根标准汤剂冻干粉,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,分别记录供试品溶液中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和对羟基肉桂酸的色谱峰面积,并采用外标法计算含量,结果如表4所示。结果显示,白茅根标准汤剂4种酚酸的总含量:河北>安徽>江苏

>河南,不同产区的样品4种酚酸类成分的含量差异较大,主要由白茅根药材的含量差异所致,根据对药材的测定结果来看,河北产区的白茅根药材4种酚酸的总含量最高,河南产区的3批样品含量较低,这种差异可能与不同产区的白茅根药材的生长环境、产地加工和采收时间的不同有关。此外,河南产区白茅根标准汤剂绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的含量均低于其他产区,安徽产区的白茅根标准汤剂对羟基肉桂酸的平均含量最高且比较稳定,但绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的含量并不高;江苏产区不同批次白茅根标准汤剂对羟基肉桂酸和4种酚酸的总含量波动比较大,绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的含量也不高。根据上述研究结果,企业将白茅根药材的固定产地规定为河北省邢台市具有一定的现实意义。

表4 18批白茅根标准汤剂含量测定结果

Table 4 Content determination of 18 batches of Imperatae Rhizoma standard decoction

编号 No.	新绿原酸 Neochlorogenic acid (mg/g)	绿原酸 Chlorogenic acid (mg/g)	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid (mg/g)	对羟基肉桂酸 P-hydroxycinnamic acid (mg/g)	总含量 Total content (mg/g)
S1	0.84	1.91	0.85	1.06	4.66
S2	0.81	1.81	0.73	1.03	4.38
S3	0.81	1.72	0.69	1.01	4.23
S4	0.73	1.74	0.74	0.98	4.19
S5	0.52	1.83	0.75	0.88	3.98
S6	0.93	1.72	0.78	1.02	4.45

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 No.	新绿原酸 Neochlorogenic acid(mg/g)	绿原酸 Chlorogenic acid(mg/g)	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid(mg/g)	对羟基肉桂酸 P-hydroxycinnamic acid(mg/g)	总含量 Total content (mg/g)
S7	0.45	1.09	0.67	1.45	3.66
S8	0.50	1.23	0.62	1.31	3.66
S9	0.56	1.27	0.58	1.46	3.87
S10	0.40	1.12	0.44	1.39	3.35
S11	0.52	1.17	0.55	1.05	3.29
S12	0.47	1.27	0.49	1.07	3.30
S13	0.40	1.02	0.47	0.89	2.78
S14	0.34	1.07	0.57	0.88	2.86
S15	0.36	1.11	0.51	0.79	2.77
S16	0.34	0.87	0.43	0.58	2.22
S17	0.38	0.86	0.48	0.67	2.39
S18	0.36	0.95	0.46	0.60	2.37

3 讨论与结论

3.1 含量指标的选择

目前对白茅根含量测定指标的研究较少,多集中在对酚酸和糖类的测定上^[14,15],也有报道测定白茅根中白茅素、芦竹素的含量,但白茅素和芦竹素在药材中的含量很低^[16],白茅根标准汤剂以水为溶剂,有效成分以水溶性成分为主,白茅素、芦竹素不仅含量低,且为脂溶性成分,因此,不适宜作为指标成分,糖类成分专属性差,也不宜作为指标性成分。从指纹图谱的研究中也发现,白茅根虽然化学成分多,但有效成分含量均较低。从指纹图谱中指出 4 个峰型较高的色谱峰,均为酚酸类成分,且均与白茅根标准汤剂的药理活性密切相关,因此,在含量指标的选择上,首选酚酸类成分的测定。研究表明,绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸在酸性 pH 条件下较为稳定,而在中性和碱性条件下不稳定,相互之间存在一定的转化^[17,18]。我们在对白茅根药材和标准汤剂指纹图谱研究过程中发现,相对于白茅根药材,白茅根标准汤剂指纹图谱,峰 1(新绿原酸)、峰 8(隐绿原酸)与峰 5 的峰面积比例明显增加,由此推测,白茅根在煎煮过程中,绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸存在较大的转化几率。绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸结构类似,具有相同或相近的药理活性^[9],因此,我们认为,白茅根标准汤剂在选择含量指标时,应以测定绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的总量为佳,而不仅仅是测定单一的绿原酸类成分。研究结果显示,不同产区的白茅根标准汤剂 4 种酚酸类成分的总量存在明显差异,反映了不同产区白茅根药材质量的优劣,可能与不同产区药材的采收时间和产地加工

方式的不同有关。

3.2 分析方法的建立

目前采用指纹图谱结合多成分定量对白茅根进行质量控制的研究尚未见到,白茅根标准汤剂冻干粉含有较多的糖类,且酚酸类成分结构相似,对色谱分离要求较高。因此,在方法的建立中,充分考察不同的流动相比例、不同的色谱柱、柱温、流速对各指纹峰,尤其是含量测定色谱峰的分离效果,优选最佳的色谱条件和色谱柱;选择 280、300、325、350 nm 作为检测波长,并进行全波扫描,记录样品在 200 ~ 400 nm 范围内的吸收光谱,结果显示,不同波长下,各色谱图色谱峰数目和峰型无明显区别,采用 325 nm 为检测波长,色谱峰的吸收值最大,因此,选择 325 nm 作为该特征图谱的检测波长。采用单因素分析方法,对提取溶剂(甲醇、10% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、70% 乙醇、50% 乙醇、10% 乙醇)、提取方式(超声和加热回流)、溶剂用量(15、25、50 mL)和提取时间(15、30、45 min)进行考察,最终确定合理的供试品溶液的制备方法。

3.3 相似度评价和化学计量学分析

指纹图谱相似度计算结果显示,河南产区 3 批白茅根标准汤剂的相似度值明显低于其他产区,说明河南的白茅根在化学成分的组成比例上与其他产地存在明显差异。HCA 和 PCA 结果均能很好区分河北、安徽、河南产区的样品,但对江苏产区的样品区分不明显。绿原酸等酚酸类成分易溶于水,遇热不稳定,因此,产地加工、储藏、运输等均会影响药材的质量,从而导致不同产区白茅根标准汤剂质量的差异。采用 OPLS-DA 寻找到 3 个差异性标志物,根

据VIP值排序,分别为峰9 > 峰6 > 峰5,说明不同产区的白茅根标准汤剂峰9、峰6和峰5的差异具有显著性,已经证实峰9为对羟基肉桂酸,峰5为绿原酸、峰6有待进一步研究。目前多省出台地方政策,鼓励药材产地鲜切,减少有效成分的损失^[19],有报道研究显示,草珊瑚药材趁鲜清洗、切段制成的饮片中绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸等成分的含量明显高于传统加工方式制成的饮片,趁鲜加工的草珊瑚饮片抗炎、镇痛的效果明显优于传统饮片,表明草珊瑚炮制与产地加工一体化的可行性^[20]。白茅根富含酚酸类成分,尤其适用于产地鲜加工,从而提高药材的含量。

本研究建立了白茅根标准汤剂UPLC指纹图谱方法并同时测定4种酚酸类成分,该方法操作简便,稳定可靠,重复性好,为白茅根标准汤剂、药材、饮片及其相关制剂的质量评价提供重要参考。

参考文献

- 1 Yang LW, Wang HN, Geng L, et al. Discussion on whole quality control mode of traditional Chinese medicine based on standard decoction[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2018,24:1-6.
- 2 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2020:111.
- 3 Jiang HY. Study on the chemical constituents from the rhizome of *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb. and their in vitro anti-inflammatory activity[D]. Tianjing:Tianjing University of Chinese Medicine(天津中医药大学),2021.
- 4 Jiang LL, Miao MS. Cogongrass rhizome chemistry, pharmacology and clinical application[J]. Acta Chin Med(中医学报),2014,29:713-715.
- 5 Liu JR. Chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of *Imperatae Rhizoma*[J]. Shandong J Tradit Chin Med(山东中医杂志),2014,33:1021-1024.
- 6 Cai Y, Lu Y, Qiu RL, et al. Study on HPLC-DAD fingerprint of water-soluble components in *Imperatae Rhizoma*[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2015,26:1929-1931.
- 7 Zhang YT, Gao Y, Duan HQ, et al. Study on HPLC characteristic chromatogram of *Imperata cylindrica* granules[J]. China Pharm(中国药房),2015,26:813-815.
- 8 Tong PZ, Li ZY, Cao SQ, et al. Study on UPLC fingerprints of

- Imperatae Rhizoma* standard decoction[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志),2020,27:70-75.
- 9 Wang J, Ding HY. Research progress on bacteriostasis of phenolic acids[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2022,44:1906-1911.
- 10 Xiong KY, Liu RH, Chen SS, et al. Comparative analysis of total phenolic acid in the roots of *Imperata cylindrica* from different habitats[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2012,23:844-845.
- 11 Wang Y, Ju ZC, Zhang T, et al. Determination of six effective ingredients in *Imperatae Rhizoma* concentrated granules by ultra-performance liquid chromatography using two internal references[J]. Acta Pharm Sin(药学报),2022,57:467-473.
- 12 Xiong J, Li HY, Li GS, et al. Discussion on the application of chemometrics in chromatographic analysis of traditional Chinese medicine[J]. J Pharm Anal(药物分析杂志),2021,41:1681-1689.
- 13 Yin Y, Wang M, Yang ZQ, et al. Application of chemical pattern recognition in processing of Chinese materia medica[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2021,52:5369-5377.
- 14 Zhang SH, Wang JH, Guo HZ, et al. Determination of fructose, glucose and sucrose in *Imperatae Rhizoma* by HPLC-CAD[J]. J Pharm Anal(药物分析杂志),2018,38:942-947.
- 15 Study on the quality standard of *Imperatae Rhizoma* and *Polygonati Odorati Rhizoma*[D]. Beijing:Beijing University of Chinese Medicine(北京中医药大学),2018.
- 16 Lu JC, Sun QS, Wang ML, et al. Determination of rutin and citronellosin in *Imperatae Rhizoma*[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报),1996:59-60.
- 17 Trugo LC, Macrae R. Chlorogenic acid composition of instant coffees[J]. Analyst,1984,109:263-266.
- 18 Zhu P, Miao XL, Chen Y. Degradation kinetics of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, and neochlorogenic acid at neutral and alkaline pH values[J]. Acta Pharm sin(药学报),2016,51:122-126.
- 19 Hong ZH, Du WF, Li XN, et al. Feasibility and suggestion about the fresh processing on origin of traditional Chinese medicinal materials[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2021,36:80-85.
- 20 Wen R. Quality evaluation of *Sarcandra glabra* and feasibility study of fresh-processing[D]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese Medicine(江西中医药大学),2020.